



NATANA GONTIJO RABELO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR
Aspergillus caespitosus CCDCA 11593

LAVRAS – MG
2021

NATANA GONTIJO RABELO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR *Aspergillus caespitosus*

CCDCA 11593

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

Prof.^a Dr.^a Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo
Dr.^a Maysa Lima Parente Fernandes
Dr.^a Angélica Cristina Souza
Coorientadoras

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rabelo, Natana Gontijo.

Produção e Purificação de L-asparaginase por *Aspergillus
caespitosus* CCDCA 11593 / Natana Gontijo Rabelo. - 2020.
77 p. : il.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Coorientador(a): Lizzy Ayra Alcantara Verissimo, Maysa Lima
Parente Fernandes, Angélica Cristina de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Produção de L-asparaginase. 2. Fermentação sólida e
submersa. 3. Purificação. I. Dias, Disney Ribeiro. II. Alcantara
Verissimo, Lizzy Ayra. III. Parente Fernandes, Maysa Lima. IV. de
Souza, Angélica Cristina. V. Título.

NATANA GONTIJO RABELO

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR *Aspergillus caespitosus*
CCDCA 11593**

**PRODUCTION AND PURIFICATION OF L-ASPARAGINASE BY *Aspergillus*
caespitosus CCDCA 11593**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de dezembro de 2020.
Dr^a. Sabrina Carvalho Bastos UFLA.
Dr^a. Cintia Lacerda Ramos UFVJM.
Dr^a. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo UFLA.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo aos meus pais e ao meu irmão que lutaram comigo e me apoiaram para a realização deste sonho.

Ao meu companheiro da vida que fez o possível para estar presente sempre, sendo um exemplo de pessoa, e me amando nos momentos divertidos e nos momentos não tão fáceis. Amo você e obrigada por tudo.

Aos amigos, pelo apoio, compreensão e carinho nestes dois anos.

Ao meu orientador, professor Disney Ribeiro Dias, que me aceitou como sua orientanda, também pela sua ajuda neste trabalho, além de tornar possível a realização deste sonho. Aos professores, Rosane, Eustáquio, Cristina, Carla que foram cruciais para o meu amadurecimento como profissional e pelos ensinamentos.

Às co-orientadoras Angélica, Lizzy e Maysa, que me ajudaram muito na execução e na escrita deste trabalho, obrigada pelos conselhos e conversas, e também todo conhecimento compartilhado. Sou muito grata a vocês.

Aos técnicos Cidinha, Ivani, Paulinho e Dirceu, pela ajuda, dedicação e disponibilidade.

Agradeço à Ana por toda ajuda na escrita e na parte da execução da purificação da enzima e pelas boas conversas, me você me ajudou muito, sou muito grata a você.

Aos meus colegas de trabalho, por toda descontração.

Aos Departamentos de Ciência dos Alimentos, por me permitir executar parte do meu trabalho que me receberam muito bem.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, em especial à secretária, Rose, por fazer tudo com tanto carinho e cuidado.

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

O presente trabalho também foi realizado em apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Muito Obrigada!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a produção e purificação da enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1) produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus caespitosus*, através dos processos de fermentações sólida e submersa, utilizando substratos alternativos como fibra de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) e soro de leite em pó, respectivamente. Um delineamento de face centrada foi aplicado com a finalidade de otimizar a produção da enzima. Por meio da fermentação sólida (FES) foi avaliado a influência dos parâmetros: tempo de fermentação (h), concentração de inóculo (esporos/ml), concentração de asparagina (% m/v), temperatura (°C) e concentração de substrato (fibra de ora-pro-nobis) sobre a atividade volumétrica de L-asparaginase (U/ml). O processo de fermentação submersa (FSbm) avaliou os parâmetros: concentração de asparagina, concentração de inóculo, temperatura, tempo de fermentação, pH e concentração de substrato (soro de leite em pó) sobre a atividade enzimática da L-asparaginase. Os resultados das análises estatísticas indicaram que a melhor condição para a produção da enzima por fermentação sólida foi obtida ao se utilizar uma concentração de inóculo de 105 esporos/ml, temperatura de 25 °C, tempo de fermentação 120 h, 14% de substrato e 1% de asparagina, obtendo 2,7498 U/mL de atividade volumétrica. Já a fermentação submersa apresentou o melhor resultado nas condições de produção com 10% de asparagina, 6% de substrato, concentração de esporos 107 esporos/mL, temperatura de 25 °C, pH 7 e 120 horas de fermentação, com uma atividade de 1,49265 U/mL. Os gráficos de contorno foram escolhidos para melhor demonstrar as interações entre os parâmetros que foram significativos em ambos os processos fermentativos. As interações entre temperatura e tempo de fermentação influenciaram negativamente a produção da L-asparaginase a partir da FES. Enquanto na fermentação submersa as interações entre a concentração de asparagina e concentração de inóculo, temperatura e concentração de inóculo, concentração de soro de leite e temperatura e pH e temperatura afetaram negativamente a produção da enzima. Na FSbm, as interações entre os parâmetros, concentração de inóculo e pH, concentração de inóculo e concentração de substrato, concentração de asparagina e tempo de fermentação, concentração de inóculo e concentração de asparagina, concentração de inóculo e temperatura, temperatura e concentração de substrato, temperatura e pH, afetaram positivamente a atividade volumétrica de L-asparaginase. Em seguida, foram realizados ensaios de adsorção em batelada para encontrar a melhor condição para a purificação da selecionada-asparaginase obtida a partir da otimização da fermentação submersa. Os ensaios de adsorção da enzima foram realizados com a utilização de uma coluna de criogel de troca iônica funcionalizado com ácido 2-aminoetanossulfônico, utilizando um tampão de equilíbrio de fosfato de sódio (0,05 mol/L) em pH 3. A enzima purificada apresentou uma atividade de 4,400 U/mg, já o extrato bruto apresentou 2,779 U/mg. Estes resultados mostraram ser promissor a produção de L-asparaginase partir da espécie *Aspergillus caespitosus* por processos de fermentação sólida e submersa utilizando substratos alternativos como fibra das folhas do ora-pro-nobis e soro de leite.

Palavras chave: Fermentação sólida. Fermentação submersa. L-asparaginase. *Aspergillus caespitosus*. Ora-pro-nobis. Soro de leite em pó. Purificação por troca iônica.

ABSTRACT

This work aimed to study the production and purification of the enzyme L-asparaginase (EC 3.5.1.1) produced by the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus*, through solid and submerged fermentation processes, using alternative substrates such as ora-pro-nobis fiber (*Pereskia aculeata* Miller) and whey powder, respectively. A centered face design was applied in order to optimize the enzyme production. Through the solid fermentation (FES) the influence of the parameters was evaluated: fermentation time (h), inoculum concentration (spores/ml), asparagine concentration (% m/v), temperature (° C) and substrate concentration (ora-pro-nobis fiber) on the volumetric activity of L-asparaginase (U/ml). The submerged fermentation process (FSbm) evaluated the parameters: concentration of asparagine, concentration of inoculum, temperature, fermentation time, pH and concentration of substrate (whey powder) on the enzymatic activity of L-asparaginase. The results of the statistical analyzes indicated that the best condition for the production of the enzyme by solid fermentation was obtained by using an inoculum concentration of 10^5 spores/ml, temperature of 25 °C, fermentation time 120 h, 14% substrate and 1% of asparagine, obtaining 2.7498 U/mL of volumetric activity. Submerged fermentation, on the other hand, presented the best result in production conditions with 10% asparagine, 6% substrate, spore concentration 10^7 spores/mL, temperature of 25 °C, pH 7 and 120 hours of fermentation, with an activity of 1, 49265 U/ml. The contour graphics were chosen to better demonstrate the interactions between the parameters that were significant in both fermentation processes. The interactions between temperature and fermentation time negatively influenced the production of L-asparaginase from FES. While in the submerged fermentation the interactions between asparagine concentration and inoculum concentration, temperature and inoculum concentration, whey concentration and temperature and pH and temperature negatively affected the enzyme production. In FSbm, the interactions between the parameters inoculum concentration and pH, inoculum concentration and substrate concentration, asparagine concentration and fermentation time, inoculum concentration and asparagine concentration, inoculum concentration and temperature, temperature and substrate concentration, temperature and pH, positively affected the volumetric activity of L-asparaginase. Then, batch adsorption tests were performed to find the best condition for the purification of the selected asparaginase obtained from the optimization of the submerged fermentation. The enzyme adsorption tests were performed using an ion exchange cryogel column functionalized with 2-aminoethanesulfonic acid, using a sodium phosphate balance buffer (0.05 mol/L) at pH 3. The purified enzyme presented an activity of 4,400 U/mg, whereas the crude extract presented 2,779 U/mg. These results showed that the production of L-asparaginase from the *Aspergillus caespitosus* species is promising by solid and submerged fermentation processes using alternative substrates such as ora-pro-nobis leaf fiber and whey.

Keywords: Solid fermentation. Submerged fermentation. L-asparaginase. *Aspergillus caespitosus*. Ora-pro-nobis. Whey powder. Ion exchange purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia catalisada pela L-asparaginase	14
Figura 2. Reação geral da L-asparaginase catalisada	14
Figura 3. Formação dos aminoácidos derivados de aspartato	15
Figura 4. Estrutura química da acrilamida	16
Figura 5. Reação de Maillard: formação de acrilamida	17
Figura 6. Formação da acrilamida a partir de lipídeos	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de amilase, glicose oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fitase por <i>A. caespitosus</i>	22
Tabela 2. Condições de fermentação e microrganismos para a produção de L-asparaginase através de fermentação sólida	24
Tabela 3. Condições de fermentação e microrganismos para a produção de L-asparaginase através de fermentação submersa	26
Tabela 4. Purificação e propriedades de L-asparaginase microbianas	30

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Enzimas: Considerações Gerais	12
2.2	Enzima L-asparaginase: aspectos gerais	13
2.2.1	Aplicações da L-asparaginase na Indústria Alimentícia	15
2.2.1.1	Formação de acrilamida em alimentos	16
2.2.2	Indústria Farmacêutica: ação antineoplásica	19
2.3	Produção de Enzimas pelo Fungo Filamentoso <i>Aspergillus caespitosus</i>	21
2.4	Processos Fermentativos para a Produção de L-asparaginase	23
2.4.1	Fermentação em Estado Sólido	23
2.4.2	Fermentação Submersa	25
2.5	Utilização de substratos alternativos para a produção de L-asparaginase	27
2.5.1	Soro de leite em pó	28
2.5.2	Ora-pro-nóbis	28
2.6	Purificação de L-Asparaginase	29
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	31
	REFERÊNCIAS	33
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	44
	Otimização da fermentação sólida e submersa e purificação da enzima extracelular de L-asparaginase a partir de <i>Aspergillus caespitosus</i>	44

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores naturais, comumente utilizadas nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Isso se dá devido ao fato de possuírem eficiência catalítica nos processos de biotransformação, e por apresentarem uma elevada conversão de substrato em produto (ALI et al., 2017; ULU et al., 2019; ZHOU; HARTMANN, 2013). Sendo assim, os fungos filamentosos são considerados fonte ideal de produção de enzima, pois podem ser facilmente extraídos de processos de fermentação, e podem ser manuseados com facilidade (SWAPNIL; ARPANA, 2019).

A L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, E.C. 3.5.1.1) é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise da amina do aminoácido L-asparagina, em ácido L-aspártico e amônia. Em consequência disso, esta enzima se tornou importante para a área da biotecnologia por ser um potencial agente quimioterápico, principalmente para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda, e na indústria de alimentos, por reduzir a acrilamida em alimentos que apresentem açúcar redutor e asparagina em sua composição (YIM; KIM, 2019; BASKAR; SREE, 2020; LABROU; MUHARRAM, 2016; VERMA et al., 2009).

Esta enzima pode ser produzida por microrganismos nos quais podem ser obtidas por diferentes processos fermentativos. As fermentações em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSbm) são opções oportunas para se utilizar estes substratos alternativos. O soro de leite em pó e a fibra das folhas de ora-pro-nobis (FOPN) são exemplos de substratos alternativos com potencial para produção de enzimas. Ambos são ricos em minerais, proteínas, e aminoácidos, que são importantes para o desenvolvimento dos microrganismos e a síntese de enzimas, tornando-os assim, boas escolhas. A preferência por fontes microbianas para a produção da enzima L-asparaginase se justifica pela produção mais econômica, pela facilidade de otimização dos processos, além da opção de utilização de substratos alternativos que podem diminuir os custos do processo e aumentar a produção.

O fungo filamentoso *Aspergillus caespitosus*, apesar de pouco citado na literatura, apresentaram resultados relevantes relacionados a produção de enzimas como as fosfatase alcalina, xilanases, glicose-oxidase, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase (ALEGRE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2003a; GUIMARÃES et al., 2005). O processo de produção otimizada da L-asparaginase por FSbm e FES utilizando soro de leite em pó e fibra de ora-pro-

nobis, a partir do fungo *Aspergillus caespitosus* está sendo apresentado pela primeira vez neste trabalho.

Os trabalhos realizados com fungos para a produção de L-asparaginase abordaram uma melhor aplicação desta nas áreas farmacêutica e alimentícia, por proporcionarem menos efeitos colaterais em comparação com as enzimas sintéticas e também produzidas por bactérias. Ainda há a uma necessidade de novos estudos para a produção de L-asparaginase com elevado rendimento de produção e grau de pureza e que, ao mesmo tempo seja um processo menos dispendioso (ZUO et al., 2015). Diante disso, justifica-se a proposta para a execução deste trabalho, que objetivou otimizar a produção da L-asparaginase pelos processos de fermentação sólida e submersa utilizando substratos alternativos a partir do fungo filamentosos *Aspergillus caespitosus*, além de purificar a enzima obtida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enzimas: Considerações Gerais

As enzimas são biocatalizadores naturais e possuem amplas aplicações nas indústrias farmacêutica, de alimentos, e também no ramo na biotecnologia, entre outros, por apresentarem alta especificidade ao substrato, alta eficiência e excelente seletividade catalítica em comparação com os catalisadores químicos (ALI et al., 2017; ULU et al., 2019; ZHOU; HARTMANN, 2013).

A avaliação da atividade de uma enzima se dá através da sua velocidade de reação, a qual é determinada em condições experimentalmente estabelecidas. O substrato pode ser definido como a molécula que se liga ao sítio ativo da enzima, o qual é convertido em produto ao final da reação enzimática. Ao fim deste processo, a enzima continua íntegra e está apta a catalisar outra reação. A ação catalítica das enzimas se efetiva através da redução da energia de ativação da reação, sem alteração do seu equilíbrio termodinâmico. Devido à possibilidade de saturação da enzima com o substrato, essas apresentam velocidades máximas de atividade quando todos os seus sítios ativos estiverem preenchidos com o mesmo. Portanto, a velocidade de catálise enzimática é proporcional à concentração de substrato, até que a cinética de saturação enzimática seja alcançada, onde se obtém a velocidade máxima da reação (CHAMPE, 2006; GURUNG et al., 2013).

A descoberta da atividade enzimática se deu no final dos anos 1700, em um estudo no qual estudavam a digestão de carne por secreções no estômago. Louis Pasteur, por volta de 1850, chegou à conclusão que as fermentações realizadas pelas leveduras que convertiam açúcar em álcool, era catalisada por ‘fermentos’. Em 1897, Eduard Buchner confirmou a afirmativa anterior, e provou também que a fermentação era realizada por moléculas que continuavam ativas mesmo depois de removidas das células (NELSON; COX, 2016).

Consequentemente a estes fatos, Frederick W. Kühne nomeou as moléculas de Buchner de enzimas. Haldane, anos mais tarde, descobriu que mesmo as moléculas de enzimas não estivessem totalmente reconhecidas, ele sugeriu que as ligações fracas que compõem algumas enzimas e seu substrato poderia ser utilizada para catalisar reações. Somente no século XX as elucidações das estruturas das enzimas e seus mecanismos foram conhecidos e, posteriormente, propostas técnicas de purificação das mesmas (NELSON; COX, 2016).

Em 1956, a União Internacional de Bioquímica (IUB), através de uma comissão especialista *Enzyme Commission* (EC), classificou as enzimas em relação ao nome sistemático, que se refere ao sufixo “ase” à palavra que descreve seu substrato ou ação, em quatro

algarismos, sendo o primeiro relacionado à classe da enzima (1 a 6), o segundo à subclasse (categoria de ação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro à subclasse e o quarto refere-se ao número de ordem da enzima na subclasse. (GURUNG et al., 2013; NELSON; COX, 2016).

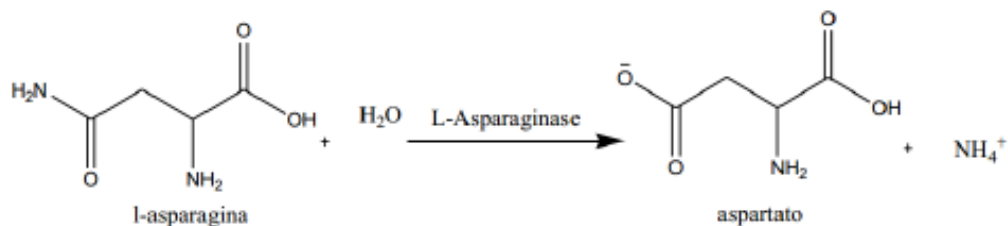
Mais de 2000 enzimas são conhecidas, sendo estas em sua grande maioria extracelulares e de origem microbiana. As enzimas podem ser produzidas por leveduras, fungos, bactérias e animais. Porém, as produzidas por fungos e bactérias possuem maiores interesses comerciais, devido à facilidade de produção, recuperação e custos de produção mais baratos em comparação com outras fontes. Os fungos filamentosos são considerados fonte ideal de produção de enzimas, pois podem ser facilmente extraídos de processos de fermentação, manuseados com facilidade e podem ser potencialmente utilizados como células inteiras (SWAPNIL; ARPANA, 2019).

As enzimas são excelentes catalisadoras, pois apresentam eficiência catalítica nos processos de biotransformação, com uma elevada conversão de substrato em produto em um curto espaço de tempo (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Além disso, atuam sob condições específicas de pressão, pH e temperatura durante a reação. No entanto, muitas destas enzimas, ainda não conseguem atender as necessidades das indústrias, pois não apresentam estabilidade mecânica, térmica e química, além das necessidades de cofatores e inibição por elevadas concentrações de substratos e produtos (WOHLGEMUTH, 2010). Com isso, surge a tecnologia enzimática que propõe a superação desses problemas, permitindo a aplicação das enzimas em processos industriais.

2.2 Enzima L-Asparaginase: aspectos gerais

A L-asparaginase, conhecida também como L-asparagina amino-hidrolase (EC 3.5.1.1) é uma amida hidrolase que catalisa a hidrólise do grupo amina da cadeia lateral do aminoácido L-asparagina, em ácido L-aspártico e amônia (Figura 1) (CAPUANO et al., 2008; FENG et al., 2019; MOHAMMADI et al., 2020; NADEEM; AL-GHAMDI; KHAN, 2019; PAUL; MONDAL; BANDYOPADHYAY, 2019). É uma enzima presente em certas plantas, animais, soro de roedores e microrganismos (bactéria, fungo, leveduras, algas e actinobactérias), mas não em humanos (CHAND et al., 2020; KANTE et al., 2018). A L-asparagina é um aminoácido proveniente da dieta humana, sendo sintetizada pela enzima L-asparagina sintetase a partir de ácido L-aspártico, L-glutamina e ATP (VAN DEN BERG, 2011).

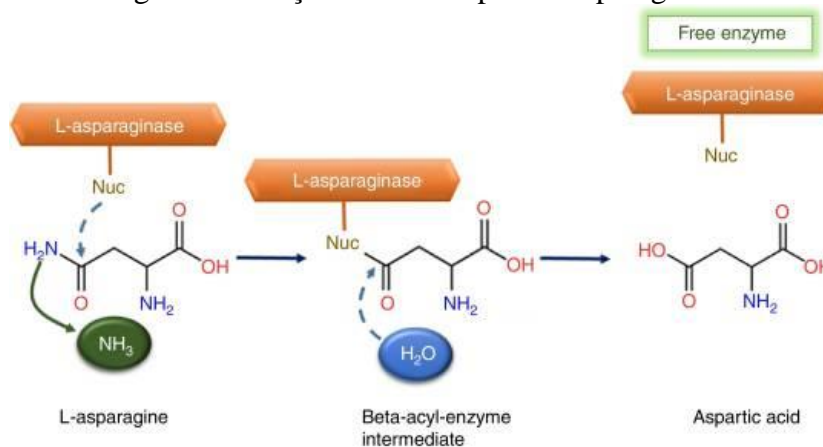
Figura 1 - Reação de hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia catalisada pela L-asparaginase.



Fonte: NARTA et al. (2007) modificado.

O processo de hidrólise da reação acima ocorre através de duas fases e através de um intermediário, o beta-acil-enzima. Na primeira etapa da reação, o aminoácido nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte que ataca o átomo de carbono da molécula de amida da L-asparagina, resultando em um produto intermediário beta-acil-enzima. Já a segunda etapa é um ataque à molécula de carbono do éster, realizado por um nucleófilo ativado pela molécula de água (Figura 2) (CACHUMBA et al., 2016).

Figura 2 - Reação catalisada pela L-asparaginase.



Fonte: CACHUMBA et al., (2016)

A L-asparaginase também está presente numa reação crucial, na biossíntese de aminoácidos derivados de aspartato, sendo eles: lisina, treonina, metionina e isoleucina (Figura 3). Dessa forma, o ácido aspártico, precursor destes aminoácidos, pode ser transformado em oxaloacetato para ser metabolizado no ciclo de Krebs. Além disso, ele também pode ser formado a partir do excesso de L-asparagina através da hidrólise catalisada por L-asparaginase (BATOOL et al., 2016; SAVITRI; AZMI, 2003).

Figura 3 - Formação dos aminoácidos derivados de aspartato.



Fonte: NELSON; COX, (2016).

2.2.1 Aplicações da L-asparaginase na Indústria Alimentícia

A L-asparaginase é utilizada na indústria alimentícia por ser uma das formas mais eficientes para a redução de acrilamida nos alimentos. Sua capacidade de hidrolisar o aminoácido asparagina em amônia e aspartato reduz a formação da acrilamida. Assim sendo, estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar novas fontes cada vez mais eficazes para a produção de L-asparaginase, para com isso, conseguir amenizar os efeitos causados pela ingestão da acrilamida (CACHUMBA et al.; 2016).

Hendriksen e seus colaboradores (2009) testaram a produção de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* com aplicação em uma variedade de produtos alimentícios, como produtos à base de massas (biscoitos semidoces, biscoitos de gengibre, pão crocante), batatas fritas e batatas fritas fatiadas. Em seu estudo, foi observada uma redução de acrilamida de 34 a 92%; 60 a 85% e; 60%, respectivamente (HENDRIKSEN et al.; 2009).

Mahajan et al. (2012) demonstraram em seu trabalho a degradação da acrilamida pela L-asparaginase de *Bacillus licheniformis* que inibiu a formação de poliacrilamida em solução de acrilamida a 10% e reduziu a formação de acrilamida em batatas fritas em 80%. Além disso, a L-asparaginase termofílica recombinante do *Thermococcus kodakarensis* KOD1 mostrou redução no conteúdo de acrilamida na massa cozida que foi reduzida para 70% após o tratamento com TkAsn recombinante em comparação com o controle não tratado (HONG et al., 2014).

O trabalho realizado por Shi et al. (2017), avaliou um novo gene da L-asparaginase (PbAsnase) de *Paenibaeillus barengoltzii* CAU 904 que foi clonado e expresso em *Escherichia*

coli. Em sequência, foi avaliado o potencial da aplicação desta enzima recombinante em batatas fritas e bolos de lua. O pré-tratamento com a enzima diminuiu significativamente o conteúdo de acrilamida em batatas fritas e bolos da lua em 86% e 52%, respectivamente.

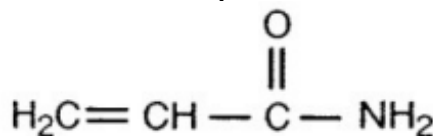
Feng et al. (2018) estudaram a expressão da L-asparaginase de *Bacillus cereus* BDRD-ST26 em *Bacillus subtilis* WB600, para a aplicação na redução de acrilamida em tiras de batatas que, quando tratadas com a enzima, resultou em uma diminuição de 72% de teor de acrilamida em comparação com as batatas não tratadas com a enzima. Já Sun e seus colaboradores (2016) avaliaram a capacidade de redução de acrilamida de uma L-asparaginase proveniente da clonagem de um gene de *Aquabacterium* sp. (*asnB*) que foi expresso em *Escherichia coli*. Quando esta enzima foi aplicada em batatas fritas, houve uma diminuição de até 82,2% de teor de acrilamida.

O estudo realizado por Dias et al. (2017), avaliou a eficácia da produção de L-asparaginase a partir do *Aspergillus oryzae* CCT 3940 em comparação com a da enzima comercial. A enzima a partir do microrganismo e a comercial foram aplicadas em batatas fritas, e conseqüentemente apresentaram uma diminuição de 72% e 92%, respectivamente.

2.2.1.1 Formação de acrilamida em alimentos

A acrilamida (C₃H₅NO) (Figura 4) também conhecida como 2-propenamida, amida acrílica, carboxamida etileno, propenamida ou ácido de amida propanóico é um composto sólido cristalino branco e inodoro em condições laboratoriais. Possui comportamento anfipático, podendo ser dissolvida em solventes polares (água) e apolares (acetona), sua temperatura de fusão é de 84,5°C, possui massa molar 71,08 g/mol e é produzida por síntese orgânica a partir da hidratação da acrilonitrila. A acrilamida é utilizada na síntese de polímeros de poliácridamida empregados nas indústrias de papel e têxtil, e atuam como flocculantes no tratamento de efluentes (CACHUMBA et al., 2016; TAREKE et al., 2002; FRIEDMAN, 2003).

Figura 4 - Estrutura química da acrilamida.

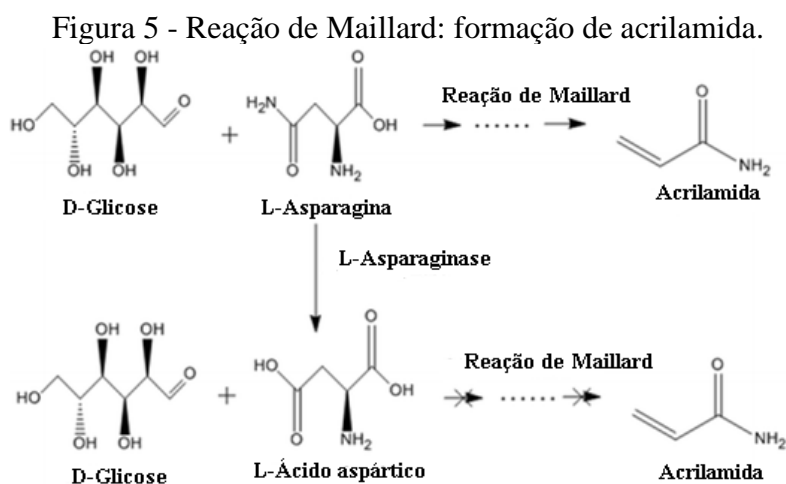


Fonte: IARC, (1994).

A acrilamida nos alimentos é formada pela reação de Maillard (Figura 5), na qual uma série de reações acontece envolvendo o açúcar redutor com uma molécula contendo o

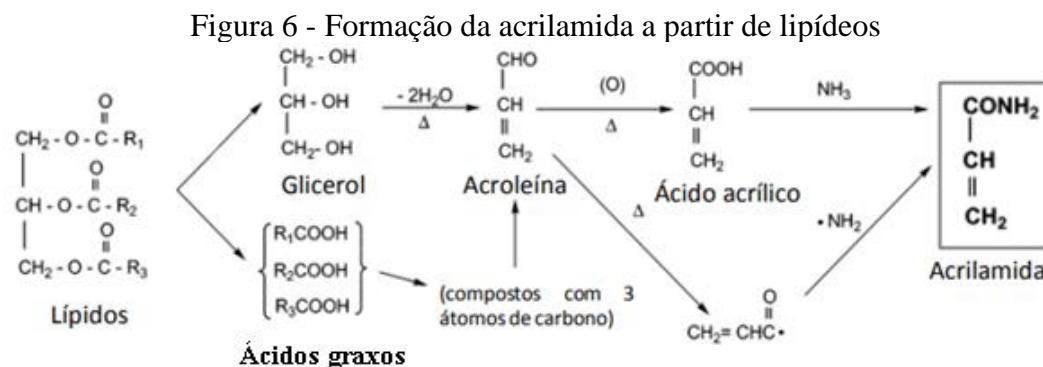
grupamento amina (normalmente o aminoácido asparagina). Isso acontece em condições de temperaturas acima de 120°C, em alimentos fritos e/ou assados que são ricos em carboidratos e asparagina (CHOHAN et al., 2019; FENG et al., 2019; LI et al., 2018; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2018; STADLER et al., 2002; ZHANG et al., 2015; WAGDY; DINC; MIZAIKOFF, 2019; YIM; KIM, 2019).

Segundo Kumar et al. 2014, a reação de Maillard é responsável pelo desenvolvimento do aroma, cor e sabor dos alimentos. Inicialmente, a reação envolve a condensação de um composto com grupo amínico com um açúcar redutor, dando origem a uma glicosilamina. Esta substância forma um número restrito de derivados (bases de Schiff, aldossilaminas e compostos de Amadori) que no seu conjunto são normalmente designados por pré-melanoidinas (MOTTRAM et al., 2002). A base de Schiff intermediária também pode hidrolisar e formar 3-aminopropionamida, um precursor de acrilamida, ou sofrer um processo de eliminação para formar diretamente à acrilamida (GRANVOGL et al., 2004). As etapas seguintes, se traduzem pela degradação dos compostos de Amadori e conduzem à formação de compostos variados, muitos dos quais correspondem a moléculas insaturadas que podem polimerizar-se (ZUO et al., 2015).



Fonte: HEDEGAARD et al., (2008); ZUO et al., (2015).

E existe uma rota secundária na qual a formação da acrilamida em alimentos ocorre em consequência da oxidação de lipídeos (Figura 6). Neste caso, o glicerol é formado a partir da hidrólise dos triacilgliceróis, que pode ser termodegradado à acroleína, sendo um importante precursor na síntese da acrilamida. Esta rota acontece exclusivamente em alimentos gordurosos e/ou fritos (ARRIBAS-LORENZO; FOGLIANO; MORALES, 2009; KERAMAT et al., 2010).



Fonte: YASUHARA et al., (2013).

Desde 1964 tem-se conhecimento do potencial tóxico da acrilamida, por conta da apresentação por modelos de animais, de irritações na pele e nos olhos quando expostos a este composto, além de efeitos neurotóxicos quando a exposição é prolongada (MCCOLLISTER; OYEN; ROWE, 1964). Durante este tempo, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994), classificou a acrilamida como um provável carcinógeno humano. Além disso, a acrilamida e as substâncias amínicas heterocíclicas aromáticas estão associadas ao desenvolvimento de osteoporose, doenças renais e diabetes (ARISSETO; TOLEDO, 2006; SUN et al., 2016).

A preocupação das consequências da presença de acrilamida nos alimentos surgiu em 2002, quando pesquisadores suecos descobriram que alimentos como batatas fritas de *fast food*, batatas industrializadas (*chips*), cereais matinais industrializados, biscoitos e torradas apresentavam tal composto (BON et al., 2008; MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002; TAREKE et al., 2002; SHI et al., 2017).

Diante disso, algumas soluções foram tomadas para tentar amenizar o efeito causado pela presença do composto de acrilamida em alimentos. Em batatas de *fast food*, por exemplo, obtiveram sucesso ao adicionar ácido cítrico, ácido acético e L-asparaginase. Portanto, o composto que obteve maior destaque no controle da acrilamida foi a L-asparaginase. Além de ter a vantagem de atenuar os níveis de acrilamida sem alterar a experiência sensorial final típica do produto, dentre os compostos testados, este também não produziu o hidroximetilfurfural, que é uma substância tóxica (DIAS et al., 2017).

Estudos realizados em alimentos como batatas fritas, batata *chips* e cereais, que possuem valor acima do aceitável pela *International Agency for Research on cancer* (IARC), relataram que quando estes foram pré-tratados com a enzima L-asparaginase, os resultados alcançados apresentaram uma redução final do conteúdo de acrilamida de 30 a 97%. Isso se deu devido ao aminoácido asparagina ser hidrolisado, liberando L-aspartico e amônia, e reduzindo a formação

da acrilamida. Assim, a L-asparaginase pode ser utilizada para minimizar a exposição dietética à acrilamida (AGRAWAL et al., 2018; HENDRIKSEN et al., 2009; KUMAR et al., 2014; KUMAR; KISHORE; MANONMANI, 2014; LI; LUO; LIN, 2019; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008; PEDRESCHI et al., 2011; ZUO et al., 2015).

2.2.2 Indústria Farmacêutica: ação antineoplásica

O desenvolvimento da L-asparaginase com propósito medicinal se iniciou em 1953, quando Kidd observou que a injeção intraperitoneal do soro de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) em camundongos portadores de linfomas subcutâneas era capaz de causar regressão no crescimento desses tumores (CACHUMBA et al., 2016). A L-asparaginase começou a despertar interesse biotecnológico quando Broome (1965) mostrou que, quando realizava o transplante de linfossarcoma em ratos tratados com soro de cobaia, havia uma melhora no tumor devido à presença de anti-linfoma no soro de cobaia. Com isso, postulou-se que a atividade antitumoral da L-asparaginase advém da sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina, reduzindo a concentração plasmática desse aminoácido que é essencial para o crescimento de certas células tumorais. Esse conhecimento deu início à produção em larga escala da enzima (CACHUMBA et al., 2016).

Em 1967, Oettgen e colaboradores conseguiram comprovar a eficiência terapêutica da L-asparaginase em seres humanos com leucemia. Todos esses estudos culminaram na aprovação, em 1978, do uso da L-asparaginase de *E. coli* para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e linfossarcomas pelo órgão de vigilância sanitária norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) (NAGARETHINAM et al., 2012). A L-asparaginase obtida a partir do cultivo de *Erwinia chrysanthemi* também foi extensivamente estudada desde a década de 1960 (WADE; CAMMACK, 1969; SALZER et al.; 2012).

A enzima L-asparaginase é um importante agente quimioterápico utilizado para tratar uma variedade de doenças do sistema linfático e linfomas, sendo utilizado principalmente para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (AGRAWAL; KANGO, 2019; BATOOL et al., 2016; CACHUMBA et al., 2019; EL-NAGGAR et al., 2016; JAYACHANDRAN et al., 2019; LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015; PATRO et al., 2013; ROCHA et al., 2019; SILVA et al., 2018; VIMAL; KUMAR, 2017a). Também pode ser aplicada no tratamento de doenças como: doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfoblástica crônica, linfossarcoma, reticulosarcoma e melanossarcoma (DIAS et al., 2016).

A síntese do aminoácido L-asparagina em uma célula animal saudável se dá mediante a ação da enzima asparagina sintetase. Portanto, as células cancerosas, principalmente as células linfáticas, são incapazes de induzir a síntese da asparagina sintetase. Com isso, a proveniência da L-asparagina extracelular se dá através da ingestão na dieta ou da síntese de alguns aminoácidos produzidos pelo organismo. (CACHUMBA et al., 2016; EL-NAGGAR et al., 2019)).

A L-asparaginase hidrolisa a asparagina em ácido aspártico e amônia a partir do soro sanguíneo, conduzindo as células tumorais à morte por falta de um fator essencial, a enzima asparagina sintetase, para as sínteses proteicas. Por outro lado, as células saudáveis possuem a enzima L-asparagina sintetase que converte novamente, o ácido L-aspártico em L-asparagina, sendo pouco afetadas pelo tratamento com a L-asparaginase (ABDELRAZEK et al., 2019; CACHUMBA et al., 2016; DORIYA; KUMAR, 2016; VIMAL; KUMAR, 2017b).

Quando se obteve o conhecimento sobre a eficácia do cultivo de microrganismos em larga escala, foi possível produzir a enzima L-asparaginase para aplicação no tratamento de câncer. A L-asparaginase está acessível em três preparações: duas obtidas de forma nativa, ambas de origem bacteriana e uma preparação obtida a partir da enzima de *E. coli* conjugada com m-PEG. As duas primeiras apresentam os mesmos mecanismos de ação e toxicidade, diferindo nas características farmacocinéticas. A enzima conjugada identificada como PEG-L-asparaginase é empregada na quimioterapia de pacientes adultos ou que demonstrem hipersensibilidade às formas nativas da enzima (DORIYA et al., 2016; NARTA et al., 2007).

Os quimioterápicos disponíveis no mercado hoje são originados de bactérias como *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (WLODARCZYK et al., 2019), e apesar da L-asparaginase ser importante para o tratamento de câncer, a produção desta enzima a partir de bactérias pode apresentar efeitos colaterais como: anafilaxia, anormalidades da coagulação, trombose, disfunção hepática, pancreatite, hiperglicemia, disfunção cerebral, hipersensibilidade, inativação imune, dentre outras. A produção de anticorpos anti-asparaginase ou a presença de L-glutaminase e a atividade da urease causam resposta imunogênica no paciente (COSTA-SILVA et al., 2018; DORIYA; KUMAR, 2016; VIMAL; KUMAR, 2017a). A utilização de fungos para a produção de L-asparaginase está sendo cada vez mais estudada para tentar amenizar alguns destes problemas (VIEIRA et al., 2019). As enzimas geneticamente modificadas, obtidas a partir de fungos para a produção da L-asparaginase apresentam menos efeitos colaterais quando aplicadas como agentes quimioterápicos, por apresentarem uma similaridade e compatibilidade maior por serem organismos eucarióticos.

Diante destes fatos, pesquisas com novas fontes microbianas potencialmente produtoras de L-asparaginase e técnicas avançadas para a purificação da enzima devem ser impulsionadas, a fim de se obter medicamentos mais eficazes (COSTA-SILVA et al., 2018; DORIYA; KUMAR, 2016; VIMAL; KUMAR, 2017b).

Em 2018, Qeshmi e seus colaboradores relataram que a L-asparaginase produzida por fontes bacterianas marinhas são candidatas promissoras para aplicações nas áreas clínicas e alimentares, devido às suas massas moleculares menores e com elevada especificidade ao substrato (QESHMI et al., 2018).

Aishwarya e seus colaboradores (2019), realizaram pesquisas a partir de microrganismos probióticos que possuem atividade anticancerígena e probiótica, que podem ser uma alternativa para superar os efeitos colaterais negativos do uso da L-asparaginase. Os resultados sobre a produção da enzima L-asparaginase II a partir do *Lactobacillus casei* subsp. *Casei*, clonagem e purificação da enzima que foi concentrada com Amicon® Pro Affinity Concentrator, resultou em uma atividade enzimática específica de 0,419 U/ mg, fator de purificação de 9,78 e massa molecular de aproximadamente 35 kDa. Estes resultados são similares aos obtidos para a L-asparaginase comercial, sendo assim, um resultado promissor (AISHWARYA et al., 2019).

2.3 Produção de Enzimas pelo Fungo Filamentoso *Aspergillus caespitosus*

Aspergillus caespitosus pertence ao reino Fungi, sendo um ascomycota e membro do gênero *Aspergillus*. Este foi cientificamente descrito e cultivado pela primeira vez em 1944, pelos pesquisadores Raper e Thom, que o isolaram do solo (RAPER; THOM, 1944). Desde então, poucos trabalhos têm sido realizados com este fungo. Porém, as aplicações das enzimas produzidas por este fungo apresentam aplicações biotecnológicas interessantes.

Guimarães et al. (2003a), fizeram um trabalho com mais de 30 fungos isolados de solos brasileiros para analisar a produção da enzima fosfatase alcalina. O fungo *Aspergillus caespitosus* apresentou a maior produção e secretou a maior taxa desta enzima. Foi cultivado em meio de cultura suplementado com xilano. Esta enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica nas colunas DEAE- celulose e A-sepharose. Esta enzima apresenta aplicações práticas, como experimentos de clonagem e sequenciamento de genes. Pode também ser usada para revelar presença de complexos enzimáticos detectores-alvo usando compostos trombogênicos ou quimioluminescentes e especificamente as fosfatases microbianas podem ter aplicações biotecnológicas como de termoestabilidade e alta atividade catalítica

(GUIMARÃES et al., 2003a).

Outro trabalho realizado por Guimarães e seus colaboradores, abordou a produção de fosfatase alcalina por *Aspergillus caespitosus*, com diversas fontes de carbono. O fungo, quando cultivado por longos períodos com xilana ou trigo cru e bagaço de cana nos meios de cultura, liberou altos níveis de fosfatases alcalinas. Em contraste, as atividades da fosfatase alcalina foram encontradas apenas intracelularmente quando o fungo foi cultivado em meio suplementado com glicose (GUIMARÃES et al., 2003b).

O fungo *Aspergillus caespitosus* também foi referenciado como produtor de duas xilanases extracelulares (xyl I e xyl II). Foi cultivado em bagaço de cana-de-açúcar e suas massas moleculares estimadas por filtração em gel e SDS-PAGE foram 26,3 e 27 kDa (xyl I) e 7,7 e 17,7 kDa (xyl II), respectivamente. Estas enzimas hidrolisaram preferencialmente xilano de madeira de bétula. A ação de ambas as xilanases, principalmente a do xyl II na polpa kraft, reduziu o número de kappa e aumentou a viscosidade da polpa, evidenciando mais uma aplicação biotecnológica de enzimas produzidas por este fungo (SANDRIM et al., 2005).

Guimarães et al., (2005), avaliaram a capacidade de alguns microrganismos produzirem xilanases, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase, pectinases e amilase. Foram 40 isolados diferentes regiões do estado de São Paulo. Entre estes, 23 apresentaram potencial enzimático, sendo que o *Aspergillus caespitosus* apresentou interessantes resultados em relação à produção de amilase e glicose oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, fitase e xilanase conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Produção de amilase, glicose oxidase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fitase por *A. caespitosus*.

Enzimas	Proteína Total (mg)	Atividade extracelular (U)	Atividade intracelular (U)
Amilase	1,3	2,2	-*
Glicose oxidase	7,1	-*	0
Fosfatase alcalina	-*	6270	470
Fosfatase ácida	-*	-*	580
Fitase	-*	-*	1612
Xilanase	3,15	490,77	39,35

-* Não realizado

Fonte: GUIMARÃES et al., (2005), adaptado.

A produção de β -glicosidase por 13 culturas de fungos termofílicos e termotolerantes isolados de solos de compostagem foi avaliada por Sonia e colaboradores (2008). O *A. caespitosus* apresentou $0,29 \pm 0,002$ U/mL desta enzima. A presença de glicose estimulou a atividade de duas isoformas, sendo umas delas, a ASC β G-II. Um aumento gradual de sua atividade foi observado na presença de 100-300 (mM) de glicose, com um máximo na concentração de 300 mM, que mostrou uma atividade 3,8 vezes maior quando comparado à atividade nas misturas de reação sem glicose. Porém, um declínio acentuado foi observado acima dessa concentração (SONIA et al., 2008).

A produção de invertases intracelulares e extracelulares pelo *Aspergillus caespitosus* sob fermentação sólida (FES) e submersa (FSbm) utilizando resíduos agroindustriais como farelo de trigo, foi estudada por Alegre e pesquisadores (2009). A atividade extracelular sob FES foi cerca de 5,5 vezes maior que a obtida em fermentação submersa. No entanto, a produção de enzima com farelo de trigo mais farinha de aveia foi 2,2 vezes maior que o farelo de trigo isolado. A produção enzimática foi afetada pela suplementação com fontes de nitrogênio e fosfato. A adição de glicose em FES e SSF promoveu a diminuição da atividade extracelular, mas a forma intracelular obtida em FSbm foi aumentada de 3 a 5 vezes. A invertase produzida em SSF exibiu temperatura ótima à 50°C, enquanto as enzimas extra e intracelulares produzidas em FSbm exibiram atividades máximas a 60°C (ALEGRE et al., 2009).

2.4 Processos Fermentativos para a Produção de L-asparaginase

2.4.1 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido é definida como um processo no qual uma cultura de microrganismos se encontra sobre ou dentro de uma matriz sólida, sendo este, substrato ou material inerte. O substrato atua como fonte de carbono e o conteúdo líquido se encontra ligado ao substrato, servindo para assegurar o crescimento e metabolismo das células microbianas (PANDEY et al., 2000).

O substrato em fermentação sólida precisa apresentar características que contribuem para um maior rendimento em relação à produção da enzima L-asparaginase, sendo também imprescindível que este substrato esteja acessível a todos os microrganismos. Por esse motivo, as características mais importantes desta fermentação são: porosidade, formato e tamanho das partículas. No entanto, é importante ressaltar que como essa fermentação é realizada na ausência de água livre, a recuperação de seus produtos, requerem a extração do sólido

fermentado. A água deionizada geralmente é utilizada como solvente extrator para este processo (PANDEY et al., 2000; SCHMIDELL et al., 2001).

A FES é relatada pelos pesquisadores como uma alternativa em relação à fermentação submersa, por apresentar maior rendimento de produto gerado, menor necessidade de energia, menor risco de contaminação por bactérias, menor geração de águas residuais e conseqüentemente, menos preocupações ambientais sobre o descarte de resíduos sólidos. Outra vantagem é a capacidade de utilizar resíduos alternativos baratos e prontamente disponíveis, como fonte de crescimento para microrganismos na produção de produtos de baixo volume e alto custo (DORIYA et al., 2016; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; WATANABE et al., 2002). Na Tabela 2 são apresentados trabalhos sobre a produção de L-asparaginase empregando resíduos agroindustriais como substratos.

Tabela 2 - Condições de fermentação e microrganismos para a produção de L-asparaginase através de fermentação sólida.

Substrato	Microrganismo	Parâmetros da fermentação	Produção de L-asparaginase	Atividade específica	Referências
1/3 farelo de trigo; 1/3 farelo de soja e 1/3 farelo de algodão	<i>Aspergillus niger</i> LBA 02	50,0% de umidade, temperatura de 30,0 °C e inóculo 10 ⁷ esporos/g	22,61 U/g	-*	(DIAS et al., 2015)
Bagaço de cana	<i>Aspergillus terreus</i> CCT7693	Temperatura de 30 °C; por 96 horas e 80% umidade relativa	-*	0,120723 U/mL	(CACHUMBA et al., 2019)
M1- farelo de trigo, soja triturada, casca de laranja, com agente umidificante Sal Czapeck Dox	<i>Aspergillus niveus</i>	Temperatura de 35 °C, pH 5,0 e por diferentes períodos de tempo 24-240 h	± 0,15 U/g	-*	(AMATTO; GUIMARÃES, 2019)
Glicina	<i>Aspergillus niger</i>	Temperatura 30 °C, pH 6,5; 70% umidade (w/v)	40,9 ± 3,35 U/g de substrato	-*	(MISHRA, 2006)

Bolo de amendoim	<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Temperatura 30 °C, pH 6,2	30,35 U/g	-*	(BASKAR e RENGANATHA N, 2009)
Bolo de óleo de coco	<i>Serratia marcescens</i>	Temperatura 35,5 °C, pH 7,4, 50% de umidade inicial	5,86 U/g de substrato	-*	(GHOSH <i>et al.</i> , 2013)
Farinha de maracujá	<i>Aspergillus niger</i> LBA 02	Temperatura 30 °C; umidade 60	-*	3746,78 U/gds	(CUNHA <i>et al.</i> , 2018)
Mistura de sementes de algodão (2/3), farelo de trigo (1/6), casca de grama vermelha (1/6)	<i>Aspergillus</i> sp.	Temperatura 35 °C, pH 8, umidade 70	-*	12,57 U / mL	(DORYA; KUMAR, 2018)

* - Não apresentados nos trabalhos

Fonte: Autor

2.4.2 Fermentação Submersa

A produção da enzima L-asparaginase é normalmente realizada pelo processo de fermentação em meio submerso. Nesta fermentação, os nutrientes são solubilizados em meio líquido, no qual ocorre o crescimento dos microrganismos. Os principais motivos para a maioria das indústrias utilizar a fermentação submersa para a produção de enzimas são a facilidade de monitoramento e no manuseio do meio. Contudo, diversos fatores devem ser considerados para se obter um processo com altos rendimentos e principalmente viabilidade econômica. As condições que são comumente estudadas neste processo são: pH, temperatura, tempo de fermentação, aeração, concentração de oxigênio, concentração de substrato, concentração de inóculo, concentração de fonte de carbono e nitrogênio, fontes de carbono e nitrogênio, velocidade de agitação dentre outras. A escolha do microrganismo também influencia bastante nos resultados obtidos (DORIYA *et al.*, 2016; KUMAR; SOBHA, 2012; HYMAVATHI *et al.*, 2009; WEI; LIU, 1998).

Esse procedimento possui algumas desvantagens em relação à fermentação em estado sólido como ser mais dispendioso, gerar um excesso de efluentes nos quais se precisa de manuseio e descarte dos grandes volumes de águas residuais e também, por ter um alto custo energético e hídrico, com altos custos de aeração e agitação (EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). No entanto, possuem

algumas vantagens como maior controle dos parâmetros fermentativos, maior excreção de metabólitos pela célula microbiana e maior eficiência de absorção de nutrientes (CHAMPE, 2006; BON et al., 2008; SINGHANIA et al., 2010). Na Tabela 3 são apresentados alguns trabalhos realizados para a produção de L-asparaginase em FSbm, utilizando diferentes substratos.

Tabela 3 - Condições de fermentação e microrganismos para a produção de L-asparaginase através de fermentação submersa.

Substrato	Microrganismo	Parâmetros da fermentação	Produção de L-asparaginase	Atividade específica	Referências
Triptona 0,05; Glicose 0,1; Levedura 0,05	<i>Erwinia aroideae</i> NRRL B-138	Temperatura 28 °C, pH 7,0	1250 U/g peso seco de células	-*	(PETERSON e CIEGLER 1969)
Meio Czapeck Dox adaptado	<i>Aspergillus oryzae</i> LBA 01	pH inicial 6,2, temperatura de 30 °C, a 150 rpm por 5 dias	± 20 U/mL	-*	(DIAS; AGUIAR; SATO, 2019)
Meio Czapeck Dox agar	<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Temperatura de 35 °C; pH inicial 6,3; agitação 140 rpm;	43,29 U/mL	-*	(GURUNATH AN; SAHADEVA N, 2012)
Meio Czapeck Dox	<i>Trichosporon asahii</i> IBBLA1	Temperatura 30 °C; pH inicial 7,0; 180 rpm	20,57 U/mL	± 38,5 U/mg	(ASHOK et al., 2019)
Meio Czapeck Dox Modificado	<i>Aspergillus terreus</i> strain S - 18	Temperatura de 30°C; com aeração, a 120rpm	108 U/mL	-*	(ROCHA et al., 2019)
Meio de caldo de sais de asparagina dextrose	<i>Streptomyces fradiae</i> NEAE-82	Temperatura de 40 °C; pH 8,5; com agitação de 150-250 rpm	±50 U/mL	30,636 U/ mg	(EL- NAGGAR, et al., 2016)

Meio Czapeck Dox modificado	<i>Aspergillus terreus</i> CCT 7693	Temperatura de 30 °C; pH de 5,5 e 120 rpm	± 6,74 U/g	13,81 U/g	(COSTA-SILVA et al., 2018)
Triptona 0,5; Extrato de levedura 0,3; NaCl 0,2; glicose 0,1; FeCl₃ 2 µM; 1 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂	<i>Thermus thermophilus</i>	Temperatura 70 °C, pH 7,0	-*	840 U/mg proteína	(PRITSA; KYRIAKIDIS, 2001)
Meio salino de asparaginase e dextrose	<i>Streptomyces griseus</i> NIOT-VKMA29	Temperatura 35 °C, pH 8,0	56,78 IU/mL	-*	(MEENA et al., 2015)
Prolina	<i>Aspergillus terreus</i>	Temperatura 30 °C, pH 6,2	58,8 U/mL	-*	(SARQUIS et al., 2004)

* - Não apresentados nos trabalhos.

Fonte: Autor

2.5 Utilização de substratos alternativos para a produção de L-asparaginase

A produção de L-asparaginase a partir de microrganismos é conduzida por processos fermentativos, nos quais podem ser utilizados substratos alternativos como fonte de carbono para a produção de enzimas. Estes substratos podem ser subprodutos agroindustriais, os quais muitas vezes necessitam de disposição final adequada por gerar impactos ambientais negativos ao meio ambiente, além da perda econômica associada ao não aproveitamento dos mesmos. Cada vez mais se tem preocupado com a prática de redução de desperdício, que busca utilizar os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e a bioconversão de resíduos para melhorar a sustentabilidade da cadeia produtiva agroindustrial (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). A utilização destes substratos para a produção de enzimas torna o processo fermentativo vantajoso por apresentar uma produção mais limpa, de baixo custo e também um aumento da produtividade em relação à utilização do meio sintético (ARUN; SIVASHANMUGAM, 2015; VALA et al., 2018).

No trabalho de Shakambari e seus colaboradores (2017), foram utilizados os resíduos de casca de cebola e alho na fermentação sólida. Utilizaram também extratos de casca para a fermentação submersa para produzirem a L-asparaginase a partir do *Pseudomonas plecoglossicida* RS1. Assim sendo, a utilização de 0,9% (v/v) de resíduos de casca de alho e

0,5% (v/v) de casca de cebola, com 0,2% (p/p) de L-asparagina, resultou em um aumento duplo na atividade enzimática em comparação com o meio mínimo não suplementado.

Hymavathi et al. (2009), estudaram a produção de L-asparaginase a partir de *Bacillus circulans* (MTCC 8574) sob fermentação em estado sólido, utilizando resíduos agrícolas como casca de capim-vermelho, casca de bengala, coco e bolo de amendoim. Dentre estes, a casca de capim-vermelho proporcionou a máxima produção desta enzima.

Elshafei e El-Ghonemy (2015) realizaram um estudo que visava a produção de L-asparaginase a partir de alguns resíduos agroindustriais, como milho, farelo de arroz, casca de arroz, farelo de trigo, germe de trigo, palha de arroz, resíduos de sementes de algodão. No entanto, concluíram que os substratos adequados junto à otimização do processo podem melhorar significativamente a produção da enzima. Devido à casca de arroz e o farelo de trigo serem abundantes em países de base agrícola e apresentarem baixo custo, torna-se muito viável a utilização dos mesmos.

2.5.1 Soro de Leite

O soro de leite em pó é um subproduto derivado da produção de queijos. Possui importante papel de agregar valor nutricional e funcional em embutidos, salsichas, bebidas, comidas de bebês e doces (YOU et al., 2017). Alguns trabalhos exploraram o valor nutricional do soro de leite como fonte de carbono nos processos fermentativos.

O trabalho realizado por You e seus colaboradores (2017) utilizaram o soro de leite em pó como substrato para a produção de β -galactosidase a partir de *Kluyveromyces lactis*, sendo alcançada uma produção de 119,30 U/mL.

Zheng et al. (2019) também utilizaram o soro de leite em pó para a produção de D-tagatose produzindo 23,5 g da enzima a partir de 100 g de lactose advinda do soro.

2.5.2 Ora-pro-nobis

A ora-pro-nobis, cujo nome científico é *Pereskia aculeata*, é uma planta arbustiva pertencente à família *Cactaceae*. Suas folhas possuem alto valor nutritivo, apresentando quantidades significativas de minerais, tais como ferro, manganês, zinco, fósforo e magnésio, alguns aminoácidos essenciais, vitaminas (A, C e ácido fólico), além de proteínas e aminoácidos essenciais, como a lisina (TAKEITI et al., 2009). Seu alto valor nutritivo permite que a ora-pro-

nobis seja utilizada como alternativa para enriquecimento e melhoramento da qualidade dos alimentos, tanto para animais como para consumo humano (SILVA et al., 2010).

Alguns trabalhos, como Valente e seus colaboradores (2007) e Agostini-Costa et al. (2012), relataram que a *Pereskia acaleata* apresenta biocompostos nas folhas, caules ou raízes, que têm sido inseridos em formulações terapêuticas por possuir ação antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante.

A mucilagem da ora-pro-nobis apresenta propriedades técnico-funcionais como espessante, gelificante, emulsificante e também pode aumentar o teor proteico dos alimentos (AMARAL et al., 2018). Além disso, o pó de suas folhas pode ser utilizado como suplemento nutracêutico para enriquecer pães, bolos, biscoitos, tortas e massas em geral (SILVA et al., 2010).

Durante o processo de extração da mucilagem das folhas da ora-pro-nobis é gerado um resíduo fibroso, o qual ser utilizado como substrato para produção de enzimas a partir de microrganismos por apresentar em sua composição nutrientes que são essenciais para o crescimento dos mesmos.

2.6 Purificação de L-asparaginase

Grande parte das L-asparaginase são de origem intracelular microbiana, o que exige um elevado grau de pureza dessas enzimas, especialmente em aplicações da indústria farmacêutica (ZUO et al., 2015). A enzima é aplicada na forma de injeção intravenosa em pacientes com tumores, e para que ocorram menos casos de hipersensibilidade e efeitos colaterais nos pacientes, estudos têm sido realizados utilizando enzimas coletadas nas diferentes etapas dos processos de recuperação e purificação para tentar amenizar estes efeitos. As técnicas incluem: lise alcalina, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e/ou solventes orgânicos, filtração ou centrifugação, diálise, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de interação hidrofóbica ou cromatografia de afinidade (DORIYA et al., 2016; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Segundo Doriya et al. (2016), a purificação realizada por precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia de troca iônica tornou a ação da enzima L-asparaginase mais eficiente. Contudo, alguns procedimentos de purificação além de serem caros, são demorados e de difícil execução em larga escala.

O principal critério para que uma técnica de purificação seja utilizada, é apresentar uma maior recuperação do produto sem perda de sua atividade, além de ser economicamente viável

(JAYACHANDRAN et al., 2019). Portanto, técnicas de purificação de L-asparaginase que apresentem baixo custo, sejam verdes, e biocompatíveis, vêm sendo desenvolvidas de modo a minimizar os efeitos colaterais causados pelas mesmas (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017). Na Tabela 4 são apresentadas algumas técnicas utilizadas na purificação da L-asparaginase obtidas de diversas espécies de microrganismos.

Tabela 4 - Purificação e propriedades de L-asparaginases microbianas

Microorganismo	Método de cultivo	Método de purificação	Propriedades de L-asparaginase	Referências
<i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC1428	Fermentação Submersa	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ ; DEAE-celulose e Sephadex G-100	Temperatura 40 °C; pH 8,0-10,0; atividade específica de 2020,91 U/mg; 36,5 kDa pela análise de SDS-PAGE; K _m 0,057 mM; V _{max} . 4,45 U/μg.	(KUMAR; DASU; PAKSHIRAJAN, 2011)
<i>Cladosporium</i> sp.	Fermentação Sólida	Cromatografia de troca iônica por precipitação com metanol, cromatografia por exclusão molecular	Temperatura 30 °C; pH 6,3; V _{máx} 4,44 μmol/mL·min; K _m 0,1M	(KUMAR; MANONMANI, 2013)
<i>Streptomyces brolllosae</i>	Fermentação Submersa	Precipitação com sulfato de amônio	Temperatura 30 °C; pH, 7,0; Atividade específica 76,671 U/mg; 67 kDa; K _m 2,139x10 ³ ; V _{máx} 152,6 U/mL·min.	(EL-NAGGAR et al., 2018)
<i>Bacillus megaterium</i> MGI	Fermentação Submersa	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Temperatura 37 °C, Atividade específica 28,71e 59,44 U/mg respectivamente; K _m 2,0x10 ⁻⁴ ; V _{máx} 1,198 mM/s.	(ROY; DAS; PATRA, 2019)
<i>Aspergillus flavus</i>	Fermentação Submersa	Precipitação com sulfato de amônio; cromatografia de	Temperatura 30 °C; pH 4,5; atividade específica 12,69 U/mg	(PATRO et al., 2012)

		troca iônica e filtração em gel		
<i>Trichoderma viride</i>	Fermentação Submersa	Precipitação por acetona; cromatografia de troca iônica	Temperatura 37 °C; pH inicial 6,5; Atividade específica 22,7 e 78,2 U/mg respectivamente	(LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015)
<i>Aspergillus oryzae</i> CCT 3940	Fermentação Submersa	Precipitação com sulfato de amônio e CM Sepharose™ Fast Flow	Temperatura de 30 °C; pH 7,0 e 150 rpm	(DIAS et al., 2016)
<i>Pseudomonas resinovorans</i> IGS-131	Fermentação submersa	Cromatografia de filtração em gel	pH 8; 62.53 mg/L de proteína purificada; classificada como dimérica com 35.6 kDa e 71,1kDa respectivamente.	(MIHOOLIYA et al., 2020)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Fermentação submersa	Precipitação de sulfato de amônio e cromatografia por filtração em gel	Temperatura 37 °C; pH 7,5; K_m 49,9mM; $V_{máx}$ 45,45 $\mu\text{mo}^{-1} \text{ml}^{-1}$ min^{-1} ; atividade específica 9,5 U e 36,1 Umg^{-1}	(ALRUMMAN et al., 2019)

Fonte: Autor

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A L-asparaginase é comumente empregada em alimentos ricos em carboidratos e asparagina visando a redução na formação de acrilamida, e em tratamentos de leucemias e linfomas, atuando como quimioterápicos. Diversos estudos confirmaram a eficácia dos fungos filamentosos na produção desta enzima. Isso se dá devido às facilidades encontradas em sua extração do meio fermentado e da otimização dos parâmetros operacionais dos processos fermentativos. Outra observação importante é que as enzimas produzidas por micro-organismos apresentam menos efeitos colaterais quando utilizadas como quimioterápicos.

Neste contexto, a utilização de substratos alternativos para a produção da L-asparaginase, bem como a otimização do processo fermentativo resultam em agregação de valor a subprodutos agroindustriais e incrementos de produtividade.

Finalmente, para se obter a L-asparaginase com alto grau de pureza e rendimento de produção, são empregadas técnicas de downstream, dentre as quais se destacam os métodos cromatográficos.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAZEK, N. A. et al. Experimental and bioinformatics study for production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. **AMB Express**, v. 9, n. 39, p. 1-16, dec. 2019.
- AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B. D. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 234-238, 2012.
- AGRAWAL, S.; KANGO, N. Development and catalytic characterization of L-asparaginase nano-bioconjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 1142-1150, aug. 2019.
- AGRAWAL, S. et al. Catalytic characteristics and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets. **International Journal of Biological**, v. 144, p. 504-511, jul. 2018.
- AISHWARYA, S. S. et al Recombinant L-Asparaginase II from *Lactobacillus casei* subs. *Casei* ATCC393 and Its Anticancer Activity. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 313-320, set. 2019.
- ALEGRE, A. C. P. et al. Production of Thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, may 2009.
- ALI, Z. et al. Synthesis of paramagnetic dendritic silica nanomaterials with fibrous pore structure ($\text{Fe}_3\text{O}_4@KCC-1$) and their application in immobilization of lipase from *Candida rugosa* with enhanced catalytic activity and stability. **New Journal Chemistry**, v. 41, n. 16, p. 8222-8231, 2017.
- ALRUMMAN, S. A. et al. Production and Anticancer Activity of an L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-14, mar. 2019.
- AMARAL, T. N. et al. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331-342, 2018.
- AMATTO, I. V. da S.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of L-asparaginase by *Aspergillus niveus* under solid-state fermentation using agroindustrial byproducts. **International Journal Of Scientific Reports**, v. 5, n. 9, p. 232-239, set. 2019.
- ARISSETO, A.; TOLEDO, M. D. F. Acrilamida em alimentos: uma revisão. **Braz. J. Food Technol**, v. 9, n. 2, p. 123-134, 2006.
- ARRIBAS-LORENZO, G.; FOGLIANO, V.; MORALES, F.J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 63-72, 2009.

ARUN, C.; SIVASHANMUGAM, P. Identification and optimization of parameters for the semi-continuous production of garbage enzyme from pre-consumer organic waste by green RP-HPLC method. **Waste Management**, v. 44, p. 28-33, oct. 2015.

ASHOK, A. et al. Microbes Producing L-Asparaginase free of Glutaminase and Urease isolated from Extreme Locations of Antarctic Soil and Moss. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1423, p. 1-10, fev. 2019.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Production of L-asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen source and L-asparagine. **Int. J. Chem. React. Eng.**, v. 7, p. 1-18, 2009.

BASKAR, G.; SREE, N. S. Synthesis, characterization and anticancer activity of β -cyclodextrin-Asparaginase nanobiocomposite on prostate and lymphoma cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 1-9, feb. 2020.

BATOOL, T. et al. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900–923, 2016.

BON, E. et al. Enzimas em biotecnologia. **Rio de Janeiro: Interciência**, 2008.

BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase *in vivo*: Clearance Rates of Enzyme Preparations from Guinea Pig Serum and Yeast in Relation to Their Effect on Tumor Growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 35, ed. 6, p. 96-974, dec. 1965.

CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, p. 77-85, dec. 2016.

CACHUMBA, J. J. M. et al. Extracellular L-asparaginase production in solid-state fermentation by using sugarcane bagasse as support material. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, fev. 2019.

CHAND, S. et al. A Comprehensive Review on Microbial L-Asparaginase: Bioprocessing, Characterization and Industrial Applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1-64, jan. 2020.

CAPUANO, E. et al. Characterization of Maillard reaction in bread crisps. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 311-319, 2008.

CHAMPE, P. C. H., HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, v. 3ª. ed, p. 58-68, 2006.

CHOHAN, S.M. et al. Pcal_0970: an extremely thermostable L-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* with no detectable glutaminase activity. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 313-320, may 2019.

COSTA-SILVA, T.A. et al. Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-11, nov. 2018.

CUNHA, M. C. et al. 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.

DIAS, F. F. G. et al. Simplex centroid mixture design to improve Lasparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 528-534, set. 2015.

DIAS, F. F. G. et al. Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 785-794, 2016.

DIAS, F. F. G. et al. Acrylamide mitigation in French fries using native l-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, n. Part B, p. 222-229, mar. 2017.

DIAS, F. F. G.; AGUIAR, J. G.dos S.; SATO, H. H. L-asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech.**, v. 9, n. 289, p. 1-10, jun. 2019.

DORIYA, K. et al. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, Chapter Six, 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. 239, ed. 6, p. 1-10, aug. 2016.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate dor Lasparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 188-196, oct. 2018.

DORYA, K.; KUMAR, D. S. Optimization of solid substrate misture 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.

EC (European Commission), 2013. **Commission Recommendation of 8 November 2013 on Investigations Into the Levels of Acrylamide in Food**. Disponível em:< <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?Furi=OJ:L:2013:301:0015:0017:EN:PDF>>. Acesso em: 27/08/2019.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 Using Solit-State Fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology.**, v. 37, n. 4, p. 387-393, aug. 2004.

EI-NAGGAR, N. El. A. et al. Purification, characterization, cytotoxicity and anticâncer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. **Scientific Reports**, v. 6, set, 2016.

EL-NAGGAR, N. et al. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces Brillosae* NEAE-115. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, ed. 51, p. 1-15, 2018.

EL-NAGGAR, N. El-A. et al. Process development for scale-up production of a therapeutic L-asparaginase by *Streptomyces brollosae* NEAE-115 from shaker flasks to bioreactor. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-18, 2019.

ELSHAFEI, A. M.; EL-GHONEMY, D. H. Screening and Media Optimization for Enhancing L-asparaginase Production, an Anticancer Agent, from Different Filamentous Fungi in Solit State Fermentation. **British Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2015.

FENG, Y. et al. Improvement of catalytic efficiency and thermal stability of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 through reducing the flexibility of the highly flexible loop at N-terminus. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 42-49, mar. 2019.

FENG, Y. et al. Gene cloning and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, p. 418-424, apr. 2018.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4504-4526, 2003.

GHOSH, S. et al. 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.

GOLDSCHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.). Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. **New York: John Wiley Interprice**, p. 241-298, 1971.

GRANVOGL, M. et al. Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes a minor but potent precursor in acrylamide formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4751-4757, 2004.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Extracellular Alkaline Phosphatase from the Filamentous Fungus *Aspergillus caespitosus*: Purification and Biochemical Characterization. **Folia Microbiol.** v. 48, n. 5, p. 627-632, may 2003a.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Effect of carbono source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 210-217, jun. 2003b.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, jul 2005.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of Culture Conditions and Bench-Scale Production of L-Asparaginase by Submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n. 7, p. 923-929, apr. 2012.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed. Research International**, v. 2013, p. 18, 2013.

HEDEGAARD, R. V.; FRANDSEN, H.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of formation of acrylamide and Schiff base intermediates from asparagine and glucose. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 917-925, 2008.

HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal Agric. Food Chem.** V. 57, p. 4168-4176, 2009.

HONG, S. J. et al. Cloning, expression, and characterization of thermophilic L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. **Journal Basic Microbiol.**, v. 54, p. 500-508, 2014.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8547) using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 159, p. 191-198, 2009.

IARC. International Agency for Research on Cancer, Acrylamide -Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994.

JAYACHANDRAN, D. et al. Cationic reverse micellar based purification of recombinant glutaminase free L-asparaginase II of *Bacillus subtilis* WB800N from fermentation media. **Protein Expression and Purification**, v. 157, p. 1-8, may 2019.

KANTE, R.K. et al. Efficient and easily scalable protein folding strong anion exchange chromatography for renaturation and simultaneous purification of recombinant human asparaginase from *E. coli*. **Biotechnology Progress**, v. 34, p. 1036-1044, jul/aug. 2018.

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 530-543- 2010.

KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2077-2082, jan. 2011.

KUMAR, N. S. M. et al. Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-asparaginase Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 741-748, mar. 2014.

KUMAR, N. S. M.; KISHORE, V.; MANONMANI, H. K. Chemical modification of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. for improved activity and thermal stability. **Prep. Biochem. Biotechnol.** V. 44, p. 433-450, 2014.

KUMAR, N. M.; MANONMANI, H. 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.

KUMAR, D. S.; SOBHA, K. L-asparaginase from microbes: A comprehensive review. **Advances in Bioresearch**, v. 3, n. 4, p. 137-157, 2012.

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

LABROU, N. E.; MUHARRAM, M. M. Biochemical characterization and immobilization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in a microplate for high-throughput biosensing of L-asparagina. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 92, p. 86-93, oct. 2016.

LAUFENBERG, G.; KUN, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, apr. 2003.

LI, X. et al. Simultaneous cell disruption and semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of thermostable L-asparaginases. **Scientific Reports**, 2018.

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, ed. 4, p. 310-136, fev. 2015.

LIU, C.; LUO, L. LIN, Q. Antitumor activity and ability to prevent acrylamide formation in fried foods of asparaginase from soybean root nodules. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. 1-9, nov. 2019.

MAHAJAN, R. V. et al. Efficient production of asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 11-16, aug. 2012.

MCCOLLISTER, D. D.; OYEN, F.; ROWE, V. K. Toxicology of acrylamide. **Toxicol. Pharmacol.**, v. 6, p. 172-181, 1964.

MEENA, B. et al. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of l-asparaginase gene. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

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

MIHOOLIYA, K. N. et al. Studies on efficient production of a novel L-asparaginase by a newly isolated *Pseudomonas resinovorans* IGS-131 and its heterologous expression in *Escherichia coli*. **3 Biotech.**, v. 10, n. 148, p. 1-11, 2020.

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

MOHAMMADI, A. et al. Transformation of the L-asparaginase II Gene to Potato Hairy Roots for Production of Recombinant Protein. **Journal Crop Science Biotech.**, v. 23, n. 1, p. 81-88, jan. 2020.

MOTTRAM, D. S. et al. Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 448-449, oct. 2002.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, n. 8, p. 931-957, 2017.

NADEEM, M. S.; AL-GHAMDI, M.; KHAN, J. A. Studies on the Recombinant Production in *E. coli* and Characterization of Pharmaceutically Important Thermostable L-asparaginase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Pakistan Journal Zool.**, v. 51, n. 4, p. 1235-1241, 2019.

NAGARETHINAM, S. et al. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**. 1(4): 159-168, 2012.

NARTA, U. K. et al. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^o ed. Porto Alegre, Artmed, 2016.

OETTGEN, H. et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**, v. 27, n. 12, p. 2619-2631, 1967.

PAUL, T.; MONDAL, A.; BANDYOPADHYAY, T. K. Isolation, Purification, Characterisation and Application of L-asparaginase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, 2019.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 6, n. 2, p. 153-162, oct. 2000.

PATRO, K. R., GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-Asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *Biology Research* 3, 30-34, 2012.

PATRO, K. R. et al. Development of new médium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, p. 295-300, jan. 2013.

PEDRESCHI, F. et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **LWT- Food Science Technol.**, v. 44, p. 1473-1476, 2011.

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

PETERSON, R.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 64-67, 1969.

PRITSA, A. A.; KYRIAKIDIS, D. A. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 93-101, 2001.

QESHMI, F. I. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, p. 99-112, mar. 2018.

RAPER, K. B.; THOM, C. **New *Aspergilli* from soil**. Mycologia Official Organ of the Mycological Society of America, v. XXXVI, nº 6, nov/dec. 1944.

ROCHA, W. R. V da. et al. Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, 2019.

ROY, M. P.; DAS, V.; PATRA, A. Isolation, purification and characterization of a extracellular L-asparaginase produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* strain MG1 from the water bodies of Moraghat forest, Jalpaiguri, India. **Journal. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 65, p. 137-144, 2019.

SALZER, W.; SEIBEL, N.; SMITH, M. *Erwinia* asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1407-1414, 2012.

SANDRIM, V. C. et al. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1823-1828, Apr. 2005.

SARQUIS, M. I. D. M. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

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

SCHMIDELL, W. et al. Biotecnologia industrial. **Biotecnologia industrial**, v. 2, 2001.

SHAKAMBARI, G. et al. Agro Waste Utilization for Cost-Effective Production of L-asparaginase by *Pseudomonas plecoglossicida* RS1 with Anticancer and Acrylamide Mitigation Potential. **ACS Omega**, v. 2, n. 11, p. 8108-8117, nov. 2017.

SILVA, A. A da. DA S. et al. Pão de ora-pro-nóbis – Pão de ora-pro-nóbis – um novo conceito um novo conceito de alimentação funcional de alimentação funcional. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 35–38, 2010.

SILVA, L.F. et al. *Penicillium* and *Talaromyces endophytes* from *Tillandsia catimbauesis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 162, ed. 34, p. 1-12, fev. 2018.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SHI, R. et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. **International Journal of Biological**, v. 96, p. 93-99, mar, 2017.

SONIA, K.G. et al. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 599-604, may 2008.

STADLER, R. H. et al. Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 449-450, 2002.

SUN, Z. et al. A novel bacterial type II L-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in French fries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 232-239, 2016.

SWAPNIL, S. J.; ARPANA, H. J. Isolation, Identification and Susceptibility Testing of Potential Lipase producing Bacterial and Fungal Strains from soil. **Research Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 8, p. 1-8, aug. 2019.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 148-160, 2009.

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

ULU, A. et al. Chloro-modified Magnetic Fe_3O_4 @MCM-41 Core-Shell Nanoparticles for L-asparaginase Immobilization with Improved Catalytic Activity, Reusability, and Storage Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 938-956, mar. 2019.

U.S. EPA. SW. 846, Test methods for evaluating solid waste, Acrylamide by gas chromatography, Method 8032A; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1996.

VALA, A. K. et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41-46, mar. 2018.

VALENTE, L. M. M. et al. Evaluation of the antitumoral and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p. 167-172, 2007.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168-178, 2011.

VERMA, N. et al. *E. coli* H-12 Asparaginase-Based Asparagine Biosensor for Leukemia. **Journal Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 35, p. 449-456, jul. 2009.

VIEIRA, W. F. et al. A novel multiple reactor system for the long-term production of L-asparaginase by *Penicillium* sp. LAMAI 505. **Process Biochemistry**, p. 1-9, nov. 2019.

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, 2017a.

VIMAL, A.; KUMAR, A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, ed. 1, p. 40-61, aug. 2017b.

WADE, H. E.; CAMMACK, K. A. Physicochemical studies of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Nature**, v. 224, p. 594-595, 1969.

WAGDY, H. A.; DINC, M.; MIZAIKOFF, B. Synthesis of surface imprinted core-shell nanospheres for the selective determination of asparaginase. **Analytical Methods**, v. 11, n. 4034 p. 1-10, may 2019.

WATANABE, I. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, n. 1, p. 90-95, 2002.

WEI, D. Z.; LIU, H. Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. **Biotechnol. Tech.**, v. 12, p. 129-131, 1998.

WLODARCZYK, S. R. et al. Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 132-131, jun. 2013.

WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 713-724, 2010.

YASUHARA, A. et al. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 51, n. 14, p. 3999-4003, 2013.

YIM, S.; KIM, M. Purification and characterization of thermostable L-asparaginase from *Bacillus amyloliquefaciens* MKSE in Korean soybean paste. **LWT**, v. 109, p. 415-421, jul. 2019.

YOU, S. et al. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1271-1276, dec. 2017.

ZHANG, S. et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Bacillus megaterium* H-1 and its application in French fries. **Food Research International**, v.77, p. 527-533, nov. 2015.

ZHENG, Z. et al. Elegant and Efficient Biotransformation for Dual Production of D-Tagatose and Bioethanol from Cheese Whey Powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 829-835, jan. 2019.

ZUO, S. et al. Recent research progress on microbial L-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069-1079, feb. 2015.

ZHOU, Z.; HARTMANN, M. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 9, p. 3894-3912, 2013.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO (referência da formatação do artigo é conforme MANUAL DE NORMALIZAÇÃO E ESTRUTURA DE TRABALHOS ACADÊMICOS: TCCS, MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES - 3ª edição revista, atualizada e ampliada, 2020, da Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Lavras).

Otimização da produção e purificação parcial de L-asparaginase extracelular a partir de *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção da L-asparaginase, a partir de *Aspergillus caespitosus* utilizando o soro de leite em pó e a fibra das folhas da ora-pro-nobis como substrato nos processos de fermentação submersa e sólida, respectivamente. Um delineamento de face centrada foi aplicado de modo a avaliar o efeito dos parâmetros: concentração de inóculo, concentração de substrato, concentração de asparagina, tempo de fermentação, temperatura e pH no processo fermentativo, visando a produção de L-asparaginase. Para a fermentação sólida (FES), a condição experimental com concentração de inóculo 10^5 esporos/mL, temperatura 25°C, tempo de fermentação 120 h, substrato 14% e asparagina 1%, correspondeu a maior atividade volumétrica (2,7498 U/mL) de L-asparaginase. Para a fermentação submersa (FSbm), a condição experimental de maior atividade volumétrica (1,49265 U/mL) de L-asparaginase foi obtida no meio contendo asparagina 10%, substrato 6%, concentração de esporos 10^7 esporos/mL, temperatura 25°C, pH 7 e 120 horas de fermentação. O nível de significância apresentado pela análise de variância no processo de FES demonstrou que os parâmetros: concentração de substrato, concentração de inóculo, temperatura, e tempo de fermentação, influenciaram positivamente ($p < 0,05$) a produção. A concentração de asparagina não exerceu nenhuma influência sobre a variável resposta. As interações entre os parâmetros temperatura por concentração de inóculo e tempo de fermentação por temperatura foram as mais significativas no processo de FES para produção da enzima. Na FSbm, todos os parâmetros avaliados influenciaram positivamente a produção. Neste as interações entre concentração de inóculo e pH, concentração de inóculo e concentração de substrato, concentração de asparagina e tempo de fermentação, concentração de inóculo e concentração de asparagina, concentração de inóculo e temperatura, temperatura e concentração de substrato, temperatura e pH, foram significativas e proporcionaram melhor produção. A L-asparaginase obtida a partir da fermentação submersa foi submetida a ensaios de adsorção, resultando em 4,4 U/mg de enzima parcialmente purificada. Os resultados obtidos nas FES e FSbm com a utilização de substratos alternativos e a cepa de *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 mostraram ser promissores.

Palavras chave: Fermentação sólida. Fermentação submersa. L-asparaginase. *Aspergillus caespitosus*. Ora-pro-nobis. Soro de leite em pó. Purificação por troca iônica.

Abstract

The objective of this work was to optimize the production of L-asparaginase, from *Aspergillus caespitosus* using powdered whey and ora-pro-nobis leaf fiber as substrate in the submerged and solid fermentation processes, respectively. A centered face design was applied in order to evaluate the effect of the parameters inoculum concentration, substrate concentration, asparagine concentration, fermentation time, temperature and pH in the fermentation process, aiming at the production of L-asparaginase. For solid fermentation (FES), the experimental condition with an inoculum concentration of 10^5 spores/mL, temperature 25 °C, fermentation time 120 h, substrate 14% and asparagine 1%, corresponded to the highest volumetric activity (2.7498 U/mL) of L-asparaginase. For the submerged fermentation (FSbm), the experimental condition of greater volumetric activity (1.49265 U/mL) of L-asparaginase was obtained in the medium containing 10% asparagine, 6% substrate, spore concentration 10^7 spores/mL, temperature 25 °C, pH 7 and 120 hours of fermentation. The level of significance presented by the analysis of variance in the FES process demonstrated that the parameters: substrate concentration, inoculum concentration, temperature, fermentation time positively influenced ($p < 0.05$) the production. Asparagine concentration had no influence on the response variable. The interactions between the parameters temperature by inoculum concentration and temperature fermentation time were more significant in the FES process for the production of the enzyme. At FSbm, all parameters evaluated positively influenced production. In the FSbm process, the inoculum and pH concentration, inoculum concentration and substrate concentration, asparagine concentration and fermentation time, inoculum concentration and asparagine concentration, inoculum concentration and temperature, temperature and substrate concentration, temperature and pH, were significant and provided better production. The L-asparaginase obtained from the submerged fermentation was subjected to adsorption tests, resulting in 4.4 U/mg of partially purified enzyme. The results obtained in FES and FSbm with the use of alternative substrates and the strain of *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 showed to be promising.

Keywords: Solid fermentation. Submerged fermentation. L-asparaginase. *Aspergillus caespitosus*. Ora-pro-nobis. Whey powder, Ion exchange purification.

1 INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (L-ANSse), conhecida também como L-asparagina amino-hidrolase, (EC 3.5.1.1) se tornou uma enzima de destaque na indústria farmacêutica e alimentícia por catalisar a hidrólise do grupo amina da cadeia lateral do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspartico e amônia (NADEEM; AL-GHAMDI; KHAN, 2019; PAUL; MONDAL; BANDYOPADHYAY, 2019). Na indústria alimentícia esta enzima atua na redução de acrilamida nos alimentos, por ser uma das formas mais eficientes de atingir esse objetivo. Já na indústria farmacêutica, atua como agente quimioterápico para tratar uma variedade de doenças do sistema linfático e leucemias, sendo utilizada principalmente no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (AGRAWAL; KANGO, 2019; CACHUMBA et al., 2019; ROCHA et al., 2019).

As enzimas microbianas podem ser produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, selvagens ou recombinantes, através dos processos de fermentação em estado líquido (submersa) ou sólido. Dentre esses microorganismos, os fungos filamentosos são considerados agentes ideais de produção de enzimas, pois podem ser manipulados com facilidade, produzem enzimas de forma extracelular ou quando não, é passível de extração intracelular por operações unitárias simples e de baixo custo (SWAPNIL; ARPANA, 2019). Além disso, diversas espécies fúngicas são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS). Até o momento, não foi reportado na literatura a espécie *Aspergillus caespitosus* como produtora de L-asparaginase, embora seja produtora de enzimas como a fosfatase alcalina, xilanases, glicose-oxidase, fosfatase ácida, fitase, pectinase e amilase (ALEGRE et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005).

O processo de fermentação é passível de utilização de substratos alternativos como fonte de carbono. Estes substratos são normalmente gerados na agroindústria e, muitas vezes, sua disposição final representa um problema ambiental, além da perda econômica associada ao não aproveitamento destes subprodutos. O aproveitamento e bioconversão de subprodutos agrícolas contribui com a melhoria da sustentabilidade da cadeia produtiva agroindustrial (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Assim, neste trabalho selecionou-se o soro de leite em pó e a fibra das folhas da ora-pro-nobis como fonte de carbono em processos fermentativos para a obtenção de L-asparaginase.

O soro de leite é um subproduto de laticínios e é empregado em alimentos como embutidos, bebidas, comidas de bebês e doces, visando melhorias no conteúdo proteico e na textura desses alimentos (YOU et al., 2017). O soro em pó foi utilizado como substrato em

processos fermentativos para produção de enzimas como lactulose (WU et al., 2017), β -galactosidase (YOU et al., 2017), D-tagatose (ZHENG et al., 2019).

A ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) é uma planta alimentícia não convencional (PANC) que tem sido bastante estudada devido ao seu alto valor nutricional. Apresenta quantidades significativas de minerais, tais como ferro, cálcio, fósforo e magnésio. Além disso também apresentam em sua composição lisina e mucilagem, dentre outros. Além de apresentar estes compostos vantajosos para a alimentação, cosméticos e medicamentos naturais (TAKEITI et al., 2009), uma fibra rica em celulose, lignina, e cinzas, pode ser extraída das folhas da ora-pro-nobis. Essa fibra pode ser utilizada como substrato para a produção de enzimas a partir de microrganismos.

As aplicações da enzima L-asparaginase nos setores farmacêutico e alimentício exigem um elevado grau de pureza, devido às hipersensibilidades causadas pelas mesmas. Assim, para a disponibilização comercial de uma enzima, necessita-se que seu processo produtivo seja otimizado e apresente um elevado rendimento de produto, além de utilizar técnicas de purificação de alta resolução que resultem em uma biomolécula de alta pureza (ZUO et al., 2015).

Este trabalho destaca-se pelo uso do soro de leite em pó e fibra das folhas da ora-pro-nobis (FOPN) como fonte alternativa de carbono para a produção da enzima L-asparaginase por *Aspergillus caespitosus*, empregando as fermentações submersa e sólida;

Um delineamento de face centrada foi aplicado de modo a otimizar os parâmetros envolvidos nos processos fermentativos: concentração de inóculo, concentração de substrato, concentração de asparagina, tempo de fermentação, pH e temperatura. Por fim, a L-ANSse foi parcialmente purificada em uma coluna de criogel de troca iônica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado, no presente trabalho, o fungo *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593, selecionado anteriormente como linhagem produtora de L-asparaginase pertencente a Coleção de Cultura de Micro-organismos do DCA/UFLA.

A cepa foi cultivada em tubo inclinado contendo meio Agar Batata Dextrose (BDA) a 25°C durante 10 dias. A partir das culturas foi obtida a suspensão de esporos, por meio da adição de 10 mL de água destilada estéril em tubos de ensaio. Com o auxílio de uma alça de platina,

foi realizada uma raspagem do fungo crescido na superfície do meio. Posteriormente, os os tubos de ensaios foram submetidos a agitação manual. A quantidade de esporos por mL da suspensão foi padronizada com a utilização de uma câmara de Neubauer, sendo a concentração final inoculada em placa de 10 μ L, 10^5 esporos/mL.

2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

2.2.1 Fibra de ora-pro-nobis utilizada como substrato para a FES

A obtenção da FOPN foi realizada nos Laboratório de Refrigeração e Laboratório de Separação e Purificação de Biomoléculas do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA.

As fibras foram obtidas após a extração da mucilagem presente nas folhas de ora-pro-nobis (LIMA JÚNIOR et al., 2013). Inicialmente, as folhas foram trituradas e homogeneizadas em água, na proporção de 1 kg de matéria-prima para 2,5 L de água, à temperatura de 100°C por 10 min, utilizando-se um liquidificador industrial (Metvisa LG10, Brasil). Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em béquer e permanecidos sob agitação em banho termostático (Quimis, q-215-2) a 65°C por 6 h. O homogeinato resultante foi manualmente filtrado com tecido de organza. O material residual que permaneceu retido nos filtros de organza, denominada fibra de ora-pro-nobis (FOPN), foi seco em estufa convencional a 60°C por três dias. Posteriormente, a FOPN obtida foi aplicada nos ensaios de fermentação sólida.

2.2.2 Caracterização da Fibra de Ora-pro-nobis

Os valores da composição físico-química da fibra de ora-pro-nobis utilizada como substrato para a produção de L-asparaginase no processo de FES são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização físico-química da fibra de ora-pro-nóbis

Constituinte	Conteúdo (%)	Referências
Extrato Total	7,18 ± 1,38	(ABNT, 2010a)
Holocelulose	66,88 ± 0,73	(BROWNING, 1963)
Celulose	55,37 ± 0,54	(KENNEDY; PHILLIPS; WILLIANS, 1987)
Hemicelulose	11,50 ± 1,15	-
Lignina insolúvel	28,76 ± 0,74	(ABNT, 2010b)
Lignina solúvel	3,58 ± 0,20	(GOLDSCHIMID, 1971)
Total de lignina	32,35 ± 0,54	(GOLDSCHIMID, 1971)

Fonte: FERNANDES (2019).

2.2.2 Otimização da produção da enzima L-asparaginase por FES

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, utilizando a proporção de 1:1 (m/v) de substrato e solução de sais de Khanna. A solução salina de Khanna foi utilizada como agente umidificante. Sua composição é: 0,2 g/10mL NH_4NO_3 , 0,13 g/10mL KH_2PO_4 , 0,0098 g/10mL KCl , 0,00138 g/10mL $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0007 g/10mL $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,00066 g/10 mL FeCl_3 e 0,00062 g/10 mL CuSO_4 (KHANNA et al., 1995).

O extrato enzimático bruto foi obtido conforme a metodologia de Pandey et al. (1999). Os filtrados livres de células foram submetidos a dosagens enzimáticas extracelulares e de proteínas totais.

A avaliação do efeito das variáveis independentes na produção de L-asparaginase por fermentação sólida foi realizada por meio do Delineamento de Face Centrada (DFC). As variáveis independentes avaliadas no DFC 2^5 foram: temperatura, concentração do substrato (FOPN), concentração de asparagina, tempo de fermentação, e concentração de inóculo. As variáveis respostas analisadas foram a atividade volumétrica (U/mL) e a atividade específica (U/mg) da L-asparaginase. Os níveis de cada variável estudada estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores utilizados no Delineamento de Face Centrada 2^5 empregado para a otimização da produção de L-asparaginase por FES.

Variáveis independentes	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de Inóculo (esporos/mL)	X ₁	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Temperatura (°C)	X ₂	25	32,5	40

Tempo (h)	X ₃	72	96	120
Concentração de FOPN* (% m/v)	X ₄	2	4	6
Concentração de L-asparagina (% m/v)	X ₅	1	2	3

Fonte: Autor

2.3 Fermentação Submersa (FSbm)

2.3.1 Soro de leite

O soro de leite em pó utilizado na fermentação submersa foi doado pela Laticínio Porto Alegre (Ponte Nova, Minas Gerais). A composição físico-química do soro fornecido pela empresa está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição físico-química do soro de leite em pó fornecido pelo Laticínio Porto Alegre.

Parâmetro	Unidade	Metodologia	Padrão
Umidade	%	FIL 26A: 1993	Máximo 3,5
Proteína	%	FIL 20A: 1993	Mínimo 11,0
Gordura	%	FAO, 1976	Máximo 1,5
Cinzas	%	AOAC 15 th , 1990	Máximo 9,0
Acidez	% ácido láctico	FIL 81: 1981	Máximo 0,16
Cloretos	%	LANARA	Máximo 5
Lactose	%	Cálculo	Mínimo 65
Metais Pesados	mg/Kg	-	
Arsênio			Máximo de 0,05
Cádmio			Máximo de 0,05
Chumbo			Máximo de 0,02
Mercúrio			Máximo de 0,05
pH (sol. % a 20 °C)	Faixa	Adolfo Lutz	Mínimo de 6

Fonte: Laticínio Porto Alegre

2.3.2 Otimização da produção da enzima L-asparaginase por FSbm

A fermentação submersa foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Czapeck Dox modificado, composto por: 2 g de soro de leite em pó, 10 g de L-asparaginase, 1,52 g de KH₂PO₄, 0,52 g de MgSO₄, 0,52 g de KCl, 0,001 g de CuNO₃, 0,001 g

de ZnSO₄, 0,001 g de FeSO₄ (GULATI et al., 1997). O extrato enzimático bruto foi obtido conforme a metodologia de Imada et al (1973). Os filtrados livres de células foram submetidos a dosagens enzimáticas e de proteínas totais.

Empregou-se um Delineamento de Face Centrada 2⁶ com quatro repetições e 4 pontos centrais (Tabela 4) para otimizar a produção de L-asparaginase por FSbm.

Tabela 4 – Fatores e níveis do Delineamento de Face Centrada 2⁶ + 4 pontos centrais empregando para a otimização da produção de L-asparaginase por FSbm

Variáveis independentes	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de L-asparagina (% m/v)	X ₁	10	20	30
Concentração de Soro de leite (% m/v)	X ₂	2	4	6
Concentração de Inóculo (esporos/mL)	X ₃	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Temperatura (°C)	X ₄	25	32,5	40
pH	X ₅	5	6	7
Tempo (h)	X ₆	72	96	120

Fonte: Autor

2.4 Determinação da Atividade enzimática da L-asparaginase e quantificação de proteína total

A atividade enzimática de L-asparaginase foi realizada conforme descrito por Imada et al. (1973), com adaptações. As misturas reacionais compostas por 0,5 mL de L-asparagina (0,04 mol/L), 0,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (50 mmol/L) e 0,5 ml de extrato enzimático, foram incubadas a 37°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético (1,5 mol/L). Uma alíquota de 125 µL da mistura de reação foi diluída em 2 mL de água destilada e 125 µL de reagente de Nessler. A absorbância foi medida a 450 nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão com sulfato de amônio foi usada para quantificar a amônia liberada. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de amônia por minuto em condições padrão de ensaio.

A quantificação das proteínas totais nas amostras foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino como proteína padrão.

2.5 Purificação parcial da L-asparaginase obtida por FSbm

2.5.1 Ensaios de adsorção em batelada

De modo a determinar a melhor condição de pH e força iônica da solução salina do meio para a adsorção de L-asparaginase, foram realizados ensaios de adsorção em batelada utilizando tubos Falcon de 15 mL. A estes, foram adicionados 0,02 g de criogel funcionalizado com 2-aminoetanossulfônico e 3 mL de solução de meio fermentado em soluções salinas de fosfato de sódio em diferentes concentrações (0,025 mol mL⁻¹; 0,050 mol mL⁻¹ e 0,100 mol mL⁻¹), pH (3,0 e 7,0), na proporção 1:1 (% v/v). Os processos de adsorção foram realizados a 25° C, sob agitação de 50 rpm por 24 h. Após a adsorção os tubos foram centrifugados a 3248×g por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para quantificação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A funcionalização dos criogéis com o ácido 2-aminoetanossulfônico foi realizada via método glutaraldeído, segundo a metodologia de Oliveira et al. (2019).

A capacidade adsortiva ($q/\text{mg g}^{-1}$) do adsorvente foi determinada de acordo com a Equação 1. A quantificação das concentrações de proteínas na solução inicial e nos sobrenadantes foram mensuradas por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), com leitura de absorbância a 595 nm. Uma curva analítica usando solução de proteína albumina do soro bovino padrão foi construída com concentrações variando de 0,10 mg mL⁻¹ a 1,0 mg mL⁻¹.

$$q = \frac{(c_0 - c) \times V}{M} \quad (1)$$

onde q é a quantidade de proteínas adsorvida no criogel funcionalizado (mg g⁻¹); c_0 e c são as concentrações iniciais e finais de proteínas em solução (mg mL⁻¹); M é a massa de criogel seco (g) e V é o volume de solução de meio fermentado (mL).

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições para avaliar o efeito das concentrações de solução fosfato de sódio (0,025 mol mL⁻¹; 0,050 mol mL⁻¹ e 0,100 mol mL⁻¹) e pH (3,0 e 7,0) na adsorção de L-asparaginase.

2.5.2 Purificação parcial da L-asparaginase

Os ensaios de purificação parcial de L-asparaginase foram feitos à temperatura ambiente usando um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Um Monitor UVis-920 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) com um filtro de detecção de UV em 280 nm e uma bomba peristáltica compacta (Traceable® Products, Webster, Texas, EUA) foram utilizados. Primeiramente, a coluna de criogel funcionalizado com ácido 2-aminoetanossulfônico foi

equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão fosfato de sódio ($0,050 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0). Posteriormente, a solução de meio fermentado diluída em fosfato de sódio ($0,050 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0) em proporção 1:1 (%v/v) foi bombeada através da coluna até que a curva de ruptura se formasse. Em seguida, a coluna foi lavada com 3 VC com o tampão de equilíbrio. A absorbância foi monitorada a 280 nm e registrada usando um Arduino Uno R3. A eluição das proteínas foi realizada em modo isocrático a uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1} , bombeando 5 VC de solução aquosa de fosfato de sódio ($0,050 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,0) adicionado de cloreto de sódio ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$). A atividade enzimática da solução inicial e dos eluídos foram mensuradas conforme a metodologia descrita anteriormente.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos a partir do DFC para a FES e FSbm foram submetidos à análise de regressão ao nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SAS[®] University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A confiabilidade do modelo matemático obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo ($p > 0,05$), o coeficiente de determinação R^2 e o nível de significância ($p < 0,05$) dos coeficientes da regressão. As superfícies de resposta foram geradas no software SigmaPlot versão 12 (Systat Software, Inc., San Jose, EUA).

Os resultados obtidos do ensaio de adsorção em batelada da enzima L-asparaginase foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 95% de significância. O pacote estatístico SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) foi usado nas análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fermentação Sólida

3.1.1 Otimização dos parâmetros utilizados no processo de FES para a produção de L-asparaginase

Um delineamento de face centrada 2^5 com quatro pontos centrais e quatro repetições em cada tratamento foi realizado de modo a otimizar os seguintes parâmetros envolvidos na produção da enzima L-asparaginase por meio da fermentação sólida: concentração de inóculo, concentração de L-asparagina, concentração de substrato, temperatura e tempo de fermentação.

As condições experimentais avaliadas neste delineamento estão apresentadas na Tabela 5 (Apêndice A).

Os resultados experimentais foram submetidos à ANOVA e a significância ($p < 0,05$) dos parâmetros são apresentados na Tabela 6 (Apêndice B).

O modelo obtido para a atividade volumétrica de L-asparaginase obtida por FES, o qual apresentou um coeficiente de determinação de 0,96 ($R^2 = 0,96$), é apresentado na Eq. (2):

Eq. (2) – Y (atv. vol.)

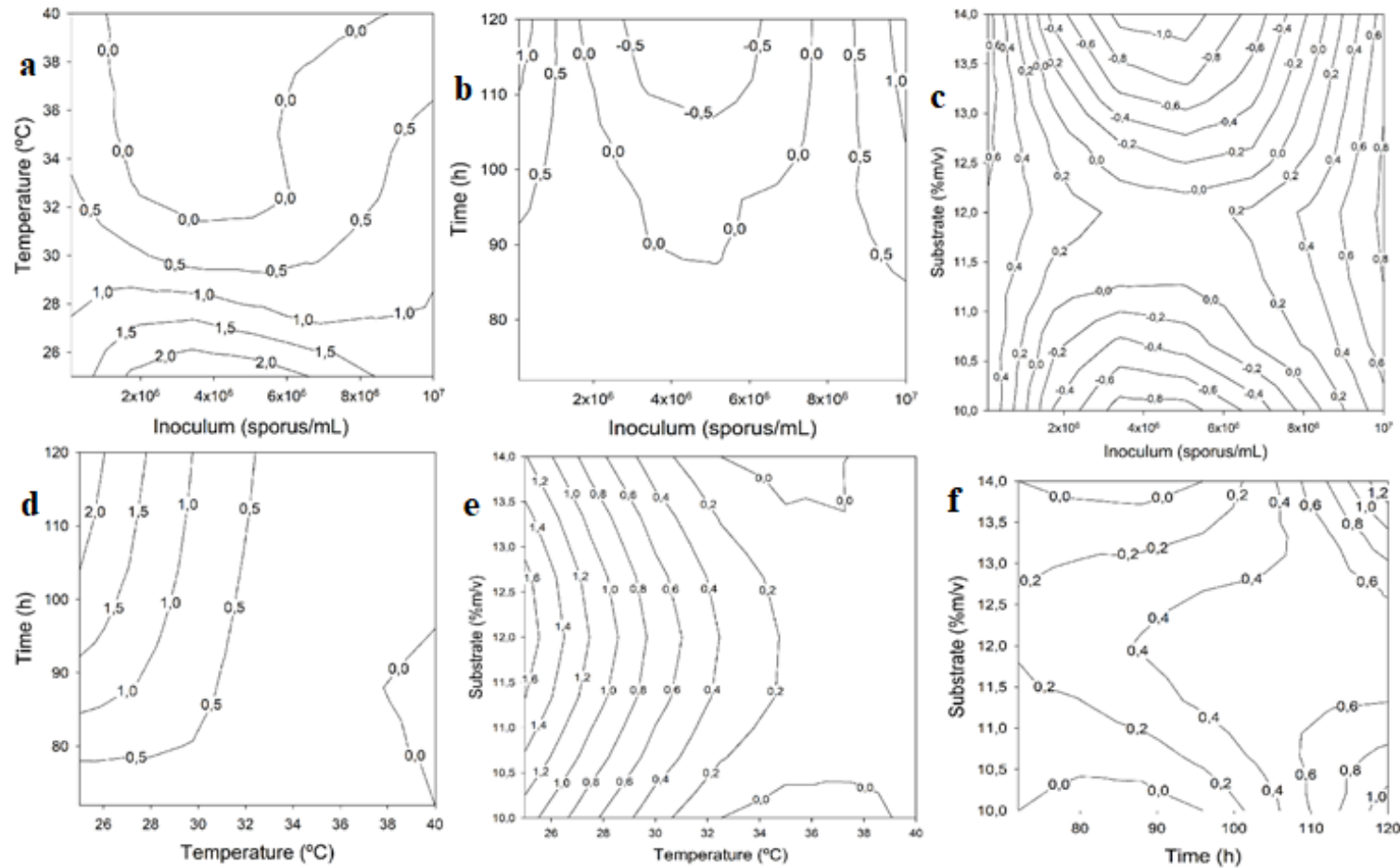
$$\begin{aligned} &= (-1638060869) - (0,00000036 * x_1) - (0,282142220 * x_2) \\ &+ (0,12032465 * x_3) + (2,61479370 * x_4) + (0,0000000 * x_1 * x_1) \\ &+ (0,00755849 * x_2 * x_2) - (0,10773418 * x_4 * x_4) - (0,00294059 \\ &* x_2 * x_3) \end{aligned}$$

Em que, Atv. vol. é a atividade volumétrica (U/mL), X_1 é a concentração de inóculo (esporos/mL), X_2 é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), X_3 o tempo (h) e X_4 a concentração da FOPN (% m/v).

Verificou-se que concentração de inóculo, concentração de substrato, tempo de fermentação e temperatura, afetaram significativamente ($p < 0,05$) a produção da enzima L-asparaginase. O parâmetro concentração de L-asparagina não exerceu nenhuma influência significativa ($p > 0,05$) sobre a variável resposta.

As curvas de contorno (Figura 1) apresentam os resultados da atividade volumétrica (U/mL), em função das variáveis independentes estudadas.

Figura 1 – Resultados experimentais da atividade volumétrica (U/mL) da L-asparaginase em função das variáveis independentes avaliadas na produção da enzima por FES.



Fonte: autor

Como pode ser observado na Figura 1a, a condição ótima da temperatura na produção da L-asparaginase por FES utilizando o *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 se deu quando a concentração de inóculo esteve entre 2×10^6 a 6×10^6 esporos/mL e a temperatura em 25°C, produzindo 2,0 U/mL. Acima e abaixo dessa faixa de valores de temperatura, a atividade volumétrica da L-asparaginase é significativamente reduzida em toda a faixa de concentração de inóculo. As Figuras 1a, 1d, e 1e, confirmam a afirmativa anterior, evidenciando que a condição ótima para a produção da enzima se deu quando a temperatura esteve em 25°C.

A temperatura é um parâmetro que possui bastante influência sobre o crescimento do microrganismo. Cada espécie possui uma condição favorável de temperatura. Esta, denominada temperatura ótima para o crescimento, é onde o microrganismo cresce de forma mais acelerada. Nela, o metabolismo e as reações enzimáticas do microrganismo acontecem, aumentando o crescimento do fungo e, conseqüentemente, a produção de metabólitos de interesse (MADIGAN et al. 2009). Neste presente estudo, a condição ótima da temperatura para a produção da L-asparaginase por FES através do fungo *Aspergillus caespitosus*, apresentada na Figura 1, foi de 25°C. Nas Figuras 1b, 1d, e 1f, pode-se observar as interações entre tempo de fermentação e concentração de inóculo, tempo de fermentação e temperatura e, concentração de substrato e tempo, respectivamente. Nota-se que a produção da enzima foi maior quando o tempo de fermentação foi de 120 horas. Esta observação vai de acordo com a literatura, onde é relatado que o pico máximo de produção da L-asparaginase a partir de fungos filamentosos por FES, utilizando substratos alternativos, acontece acima de 96 horas de produção (CACHUMBA et al., 2019; ELSHAFEI; EI-GHONEMY, 2015; FARAG et al., 2015; KUMAR; RAMASAMY; KRISHNAN, 2013).

Segundo Asgher et al. (2016) e Amin et al. (2017) o aumento da produção de metabólitos desejáveis está diretamente ligado à capacidade do microrganismo de se adaptar às condições de crescimento no qual é inoculado, além de suas características genéticas. Na literatura, associa-se a necessidade de um maior tempo de produção de metabólitos ao fato dos fungos estarem em uma condição diferente do seu habitat natural. É entendido também que o fato dos substratos não estarem dispersos no meio durante o processo de FES pode dificultar o início do metabolismo primário. Sendo assim, há relatos de que os fungos podem necessitar de um tempo de adaptação maior para atingir o seu crescimento exponencial, onde começam a produzir os metabólitos de interesse. Essa necessidade de adaptação pode também se dar devido à influência dos fatores físico-químicos do meio onde estão inoculados. Outra explicação que suporta essa afirmativa é dada por Pagarra et al., (2018). Neste trabalho, relatados autores relataram que um tempo reduzido de incubação pode ocasionar baixa produção enzimática,

devido ao reduzido crescimento do microrganismo. Neste presente estudo, a adaptação do fungo ocorreu de forma tardia, visto que a produção ótima do fungo *A. caespitosus* CCDCA 11593 se deu há um tempo elevado, de 120h. A Figura 1c mostra a influência entre os parâmetros concentração de inóculo e concentração de substrato na produção da enzima. Quando a concentração de inóculo esteve na faixa de valores abaixo de 2×10^6 e acima de 8×10^6 esporos/mL, as diferentes concentrações de substrato avaliadas não promoveram alterações significativas na atividade da enzima produzida.

De acordo com o modelo matemático da FES, somente a interação temperatura e tempo foi significativa. A interação entre os dois parâmetros pode ser visualizada na Figura 1d. Observa-se que a condição ideal de produção de L-asparaginase em FES é obtida na temperatura de 25°C e tempo de fermentação de 120 h, obtendo 2,0 U/mL de enzima produzida (Figura 1d).

O trabalho realizado por Dorya e Kumar (2018), utilizou *Aspergillus* sp. para a produção de L-asparaginase. A produção foi feita a partir de fermentação sólida com substratos provenientes de agroindústrias, como caroço de algodão, farelo de trigo e casca de grama vermelha, sendo otimizados os parâmetros de temperatura, pH e teor de umidade. Após 6 dias de fermentação com a mistura dos substratos, obteve-se 12,57 U/mL de enzima produzida na temperatura de 35°C, pH 8 e 70% de umidade. O presente trabalho realizado com o *Aspergillus caespitosus* produziu 2,0 U/mL de enzima, na condição de 25°C e 26°C, durante 105-120 horas. No geral, a temperatura aqui foi mais baixa e gastou-se menos tempo para a produção da enzima.

Cachumba et al. (2019) avaliaram a produção da L-asparaginase utilizando *Aspergillus terreus* CCT7693 pelo processo de fermentação sólida nas condições de 30°C, durante 96 horas. Os autores também utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como material de suporte. A análise estatística indicou que a utilização de 0,54% de amido, 0% de maltose, 0,44% de asparagina e 1,14% de glutamina no meio resultou em 120,723 U/L (0,1207 U/mL) de enzima produzida. Assim como neste presente trabalho, foi feito uso de espécies do gênero *Aspergillus* e substratos alternativos classificados como lignocelulósicos. As diferenças entre os dois trabalhos foram a suplementação de fontes de indução para produção da enzima de interesse e o tempo ótimo para produção observado. O presente trabalho obteve uma melhor produção da L-asparaginase, sem a utilização de suplementação, porém com um tempo maior de produção. Isso nos permite afirmar que a utilização do substrato (FOPN) para a produção de L-asparaginase a partir do *Aspergillus caespitosus* é promissora.

A concentração de asparagina não afetou significativamente ($p>0,05$) o processo de produção de L-asparaginase por fermentação sólida utilizando *A. caespitosus* CCDCA 11593. Este fato pode ser validado com o estudo realizado por Costa-Silva et al. (2018). Neste, os autores relatam que os fungos filamentosos normalmente necessitam de uma repressão de nitrogênio em relação à fonte de carbono para a produção de metabólitos secundários.

3.2 Fermentação Submersa

3.2.1 Otimização dos parâmetros utilizados no processo de FSbm para a produção de L-asparaginase

A produção da enzima L-asparaginase pelo processo de fermentação submersa foi avaliada pelo delineamento de face centrada 2^6 com quatro repetições e quatro pontos centrais. Os valores de atividade volumétrica obtidos a partir desse delineamento estão apresentados na Tabela 7 (Apêndice C).

Os resultados experimentais (Tabela 7, Apêndice C) foram submetidos à ANOVA (Tabela 8, Apêndice D). Foi verificado que as variáveis de concentração de inóculo, concentração de substrato, tempo de fermentação pH, concentração de asparagina e temperatura influenciaram significativamente ($p<0,05$) a atividade volumétrica de L-asparaginase.

O modelo matemático obtido pela análise de regressão e que descreve a relação entre as variáveis independentes (os parâmetros $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$) e a variável dependente (atividade volumétrica), considerando os termos estatisticamente significativos ($p<0,05$) é apresentado na Eq. (3). O modelo obtido (Eq. 3) apresentou um coeficiente de determinação de $R^2 = 0,64$.

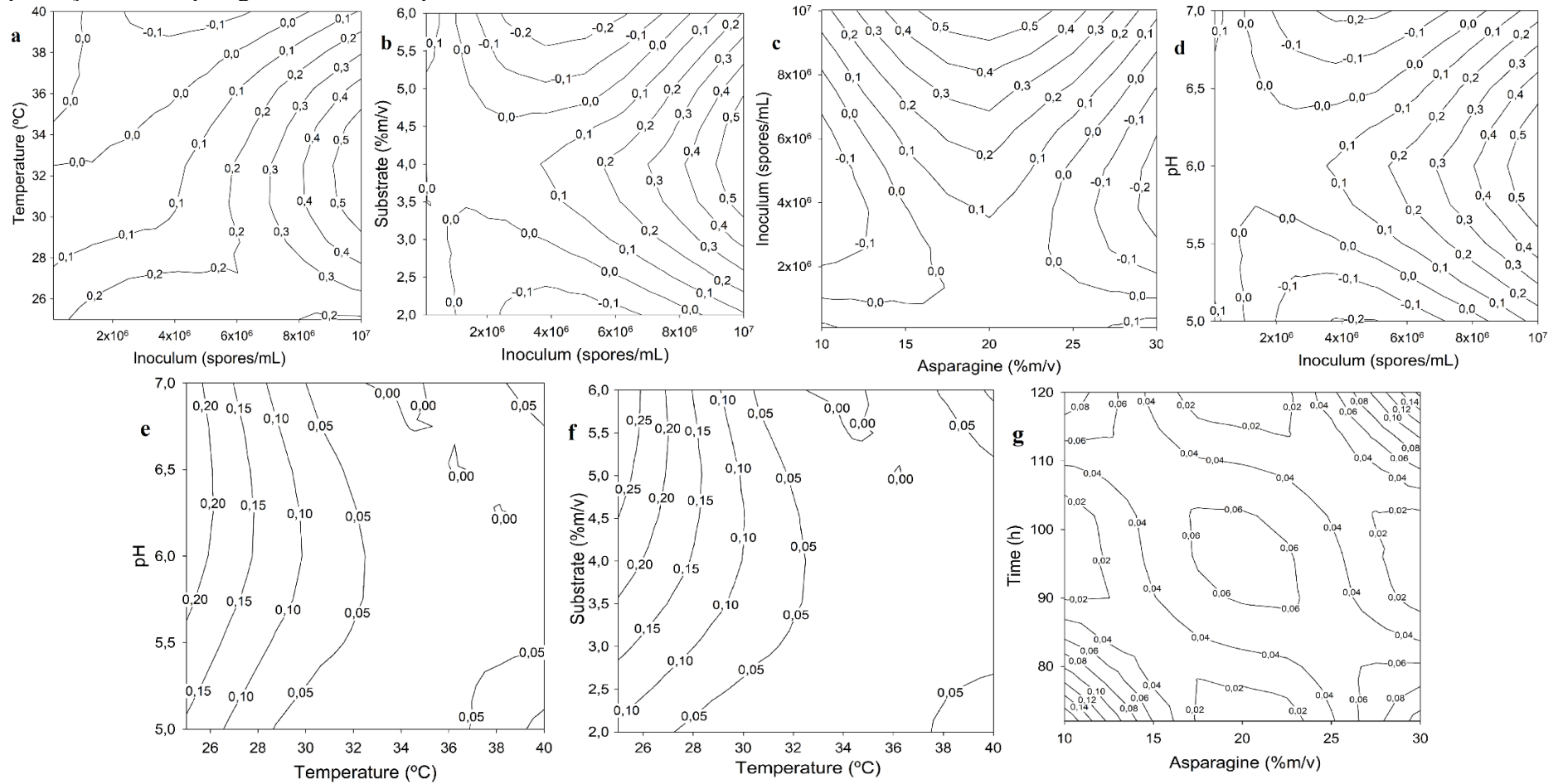
Eq. 2 – Y(Atv. vol.)

$$\begin{aligned} &= (-2,041002563) - (0,030530055 * x_1) + (0,0218688758 * x_2) \\ &+ (0,0000000034 * x_3) + (0,083746041 * x_4) + (0,355620550 * x_5) \\ &- (0,007607069 * x_6) - (0,000000002 * x_3 * x_1) - (0,000000002 \\ &* x_3 * x_4 + (0,000000012 * x_3 * x_5) + (0,000000006 * x_3 * x_2) \\ &- (0,006119979 * x_4 * x_2) + (0,000334705 * x_6 * x_1) \\ &- (0,010805979 * x_4 * x_5) \end{aligned}$$

Em que, Atv. Vol. é a atividade volumétrica (U/mL), X_1 é a concentração de asparagina (%m/v), X_2 é a concentração de soro de leite em pó (%m/v), X_3 é a concentração de inóculo (esporos/mL), X_4 é a temperatura (°C), X_5 é o pH e X_6 é o tempo de fermentação (h).

Os gráficos de contorno apresentados na Figura 2, permitem visualizar a atividade volumétrica (U/mL) de L-asparaginase, em função das variáveis independentes significativas ($p < 0,05$) estudadas.

Figura 2 – Resultados experimentais da atividade volumétrica (U/mL) da L-asparaginase em função das variáveis independentes avaliadas na produção de L-asparaginase da enzima por FSbm.



Fonte: Autor

De acordo com as Figuras 2a, 2b, 2c, e 2d, a concentração ótima de inóculo para a produção da L-asparaginase por FSbm foi de 7×10^6 a 10^7 esporos/mL. Quando a concentração de inóculo esteve abaixo de 4×10^6 esporos/mL, não houve produção enzimática. A Figura 1a indica que, quando a temperatura esteve entre 29,8°C a 34,8°C e a concentração de inóculo esteve acima de 7×10^6 esporos/mL, a produção de L-asparaginase foi maior, com atividade enzimática de 0,5 U/mL. Contudo, quando a temperatura se manteve entre os níveis intermediários de 25°C a 26°C, verificou-se uma redução da atividade volumétrica da enzima para 0,25 U/mL e 0,2 U/mL, respectivamente (Figuras 2e e 2f).

Na Figura 2b, pode-se observar a interação entre concentração de substrato e concentração inóculo. Nota-se que, quando a concentração de substrato se manteve em níveis intermediários (entre 3,3 a 4,7% m/v) e a concentração de inóculo acima de 7×10^6 (Figura 2b), houve aumento na produção enzimática, resultando em 0,5 U/mL de atividade volumétrica.

Estudos relatados na literatura revelam que os substratos presentes no meio de cultivo ativam o metabolismo energético do fungo e favorecem seu crescimento mais rápido. À medida que os micélios fúngicos crescem, aumenta-se a quantidade celular do meio. Assim, o microrganismo necessita de mais substrato para continuar seu metabolismo basal. Em consequência, o metabolismo secundário acontece quando estes fungos secretam enzimas extracelulares. Estas enzimas catalisam a hidrólise dos carboidratos disponíveis no meio em moléculas menores que servem como nutrientes para sua manutenção e, principalmente, para produção de metabólitos de interesse (HOLKER; LENZ, 2005).

Os resultados das Figuras 2b e 2f, demonstram que a quantidade de substrato e sua composição foram suficientes para que ocorresse a conversão de substrato em metabólitos. Assim, a utilização de uma pequena quantidade de substrato (entre 3,3% a 4,7%) foi o suficiente para o fungo produzir a enzima. Portanto, o substrato soro de leite em pó é um candidato promissor para a produção de L-asparaginase a partir do *Aspergillus caespitosus*, por FSbm.

A Figura 2c apresenta a interação entre concentração de inóculo e concentração de asparagina. Observa-se que, quando a concentração de asparagina no meio se manteve intermediária (entre 16 a 24% m/v) e a concentração de inóculo foi superior a 8×10^6 esporos/mL, a produção da enzima foi alta, produzindo 0,5 U/mL (Figura 2c). Porém, nas demais condições, a produção da enzima diminuiu consideravelmente, com a produção de 0,14 U/mL de enzima (Figura 2g).

Segundo Costa-Silva et al. (2018) a privação da asparagina no meio fermentado para a produção de L-asparaginase é benéfica por causar a desrepressão de amônio e consequentemente, o aumento da atividade enzimática no meio.

A partir destes resultados (Figura 2c), pode-se observar que a diminuição da concentração de asparagina e o aumento da concentração de inóculo favoreceu a produção da L-asparaginase. Sendo assim, pode ser uma opção comercialmente vantajosa por diminuir o custo da produção da enzima.

As Figuras 2d e 2e evidenciam que a melhor condição para produção se deu quando o valor do pH esteve acima de 5,7. Segundo Uzma, Murthy, Srinivas, (2016), o pH é um parâmetro importante para o cultivo de microrganismo e, também, para a produção de metabólitos. Este parâmetro pode influenciar na disponibilidade dos nutrientes, que são vitais para a síntese de biomoléculas. Além disso, pode também afetar a atividade das enzimas por meio da desnaturação e inativação das mesmas. Estas são cruciais para o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, para seu crescimento e produção de metabólitos. O pH também influencia na osmolaridade das células. Quando estão muito os microrganismos estão em um meio com pH acima das condições adequadas de crescimento, pode ocorrer o rompimento celular, levando-a à morte (PAGARRA et al., 2018).

A concentração de inóculo superior a 8×10^6 esporos/mL, o conteúdo de substrato entre 3,3 a 4,7 %m/v, a concentração de asparagina entre 16 a 24 %m/v, um pH acima de 5,7, temperatura de 25 °C e tempo de fermentação superior a 116 horas de fermentação, revelaram ser as melhores condições para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus caespitosus* por FSbm. Sendo que esta amostra obtida nesta condição experimental foi submetida a ensaios de purificação parcial em uma coluna cromatográfica de troca iônica.

Os trabalhos a seguir apresentam condições experimentais de produção da enzima próximas às obtidas neste presente trabalho.

Os pesquisadores Dias, Aguiar e Sato em (2019) utilizaram o fungo *Aspergillus oryzae* LBA 01 e o meio Czapeck Dox modificado para produção da L-asparaginase através da FSbm. Sua melhor produção aconteceu quando às condições foram: pH 6,5, temperatura 30°C e tempo 120 h, obtendo 20 U/mL de enzima. Estas condições de produção foram bem próximas das obtidas neste presente trabalho. Porém, a atividade enzimática foi mais elevada, o que pode ser explicado pela diferença entre as espécies *A. oryzae* e *A. caespitosus*.

O trabalho realizado por Gurunathan e Sahadevan (2012) fez uso do fungo *Aspergillus terreus* e o meio Czapeck Dox modificado para a produção de L-asparaginase por FSbm. A melhor atividade enzimática ocorreu a 35 °C, pH 6,3, e tempo de fermentação de 58,5 h. Neste trabalho foi observada uma maior atividade enzimática de 43,29U/mL, do que a obtida aqui (0,5 U/mL). A diferença entre esses resultados pode ser explicada pela utilização de espécie e temperatura diferentes. Além disso, o trabalho citado não utilizou substrato alternativo.

Os pesquisadores Ahmed et al. (2015) utilizaram o meio Czapeck Dox modificado para a produção da L-asparaginase a partir de *Fusarium* sp. por FSbm. Foi relatada uma melhor produção nas condições de pH 6 e temperatura de 27 °C, produzindo 32,54 U/mL de enzima. A atividade da enzima obtida neste trabalho é superior à obtida aqui. Neste caso, a diferença de atividade pode ser explicada pela utilização de outra espécie de fungo e a não utilização de substrato alternativo.

3.3 Purificação parcial da L-asparaginase

3.3.1 Ensaios de adsorção em batelada

Os resultados médios para a capacidade adsortiva ($\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{criogel}}$) dos criogéis funcionalizados com o trocador catiônico ácido 2-aminoetanossulfônico nas diferentes condições de pH e concentração de fosfato de sódio são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Capacidades adsortivas médias dos criogéis funcionalizados com ácido 2-aminoetanossulfônico

Tratamentos	Concentração de Fosfato de sódio (mg/mL^{-1})	pH	q ($\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{criogel}}$)
1	0,025	7,0	$21,911 \pm 2,382^b$
2	0,050	7,0	$23,834 \pm 0,425^{ab}$
3	0,100	7,0	$14,653 \pm 1,596^c$
4	0,025	3,0	$24,381 \pm 1,190^{ab}$
5	0,050	3,0	$26,621 \pm 0,513^a$
6	0,100	3,0	$26,124 \pm 0,515^a$

*Os valores médios seguidos de mesma letra para cada tipo sal indicam que não há diferença estatística entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Autor

Os tratamentos 2, 4, 5, e 6 não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 9). No entanto, por apresentar maior resultado de capacidade adsortiva, o tratamento 5 foi escolhido para ser utilizado no procedimento de adsorção da enzima L-ANSase, nas condições de $0,050 \text{ mg}/\text{mL}^{-1}$ e pH 3,0, para o processo de adsorção em coluna.

Os trabalhos apresentados na literatura utilizaram condições de pH e concentração da solução salina para o ensaio de adsorção bastante divergentes, em relação às condições selecionadas como melhor resultados neste presente trabalho. Isso pode ser confirmado nos trabalhos discutidos abaixo.

O trabalho realizado por Patro e Grupta (2012), foram utilizadas as condições de 0,05 M de tampão Tris-HCl no pH de 8,5 para purificação a enzima L-asparaginase obtida pelo processo de fermentação submersa, obtida a partir de *Penicillium* sp. A diferença das condições pode ser explicada pela utilização de espécies de fungos diferentes.

Os pesquisadores Lincoln, Niyonzima e More (2015), purificaram a enzima L-asparaginase obtida pelo fungo *Trichoderma viride* obtida pelo processo de fermentação submersa. As melhores condições de adsorção foram observadas sob as condições de 0.05 M de tampão fosfato, com pH 7.0. A diferença das condições também pode ser explicada pela utilização de espécies diferentes.

3.3.2 Ensaio de adsorção de L-asparaginase em coluna de criogel de troca catiônica

Os resultados obtidos para a purificação parcial de L-asparaginase produzida em FSbm estão representados na Tabela 10. Os ensaios cromatográficos foram realizados à temperatura ambiente (~ 25 °C).

Tabela 10 – Conteúdo de proteína (mg/mL), atividade específica (U/mg) e volumétrica (U/mL) do extrato bruto contendo L-asparaginase obtida por FSbm e das amostras eluídas da coluna de troca catiônica.

Amostras	Proteína Total mg/mL	Atividade específica (U/mg)	Atividade volumétrica (U/mL)
Solução Inicial	0,088	2,779	0,21853
Eluído	0,008	4,400	0,776377

Fonte: Autor

Patro et al. (2013) produziram L-asparaginase de *Aspergillus flavus* em fermentação submersa e após a purificação da enzima por troca iônica, foi obtido uma atividade volumétrica de 12,69 U/mg da enzima L-asparaginase.

Issac e Abu-Tahon (2016), produziram L-asparaginase de *Fusarium solani* por fermentação sólida e após a purificação da enzima por troca iônica, foi relatada uma atividade de 4,314 U/mg.

Os resultados obtidos neste estudo, indicam que as estratégias adotadas para a produção e purificação parcial de L-asparaginase de *A. caespitosus* foram satisfatórios a atraentes do

ponto de vista comercial e biotecnológico por explorar espécies novas do fungo *Aspergillus* e por utilizar um substrato de baixo custo na FSbm.

4 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os substratos FOPN e soro de leite em pó utilizados no processo de FES e FSbm, respectivamente, são alternativas promissoras para a produção extracelular da enzima L-asparaginase por *Aspergillus caespitosus*.

A partir da metodologia de superfície de resposta foi possível otimizar a produção da L-asparaginase de *Aspergillus caespitosus* utilizando substratos alternativos nos processos fermentativos.

Os parâmetros concentração de inóculo, concentração de substrato, temperatura e tempo afetaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade volumétrica de L-asparaginase. No entanto, a concentração de asparaginase não influenciou significativamente ($p > 0,05$) a atividade da enzima. A partir da metodologia de superfície de resposta concluímos que a interação entre temperatura e tempo foi a mais significativa dentre as interações avaliadas na FES. A temperatura de 25 °C e o tempo de fermentação de 120 h favoreceram a produção da enzima.

O processo de FSbm teve influência significativa de todos os parâmetros avaliados (concentração de inóculo, concentração de substrato, concentração de asparagina, pH, temperatura e tempo). A concentração de inóculo superior a 8×10^6 esporos/mL, concentração de substrato entre 3,3 a 4,7 %m/v, conteúdo de asparagina entre 16 a 24 %m/v, temperatura de 25 °C, pH acima de 5,7, e tempo de fermentação superior a 116 horas resultou em maior produção da L-asparaginase.

A enzima produzida a partir do fungo filamentosos pelo processo de FSbm foi purificada utilizando um crigel de troca catiônica. A purificação parcial da enzima promoveu um aumento da atividade específica de 2,779 U/mg para 4,4 U/mg, o que indica uma purificação satisfatória.

Este estudo abre novas perspectivas para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus caespitosus* utilizando substratos alternativos. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a utilização da folha dae ora-pro-nobis como substratos para produção da enzima e até mesmo outros metabólitos a partir de *A. caespitosus* e outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; KANGO, N. Development and catalytic characterization of L-asparaginase nano-bioconjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 1142-1150, aug. 2019.
- AHMED, M. M. A. et al. Production, Purification and Characterization of L-asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under Submerged and SolidState Fermentation. **Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 3, p. 165-172, 2015.
- ALEGRE, A. C. P. et al. Production of Thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, may 2009.
- AMIN, F. et al. Purification, Kinetic, and Thermodynamic Characteristics of an Exopolysaccharidase from *Penicillium notatum* with Industrial Perspective. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 183, p. 426-443, 2017.
- ASGHER, M. et al. Optimization of Lignocellulolytic Enzyme Production by *Pleurotus eryngii* WC 888 utilizing Agro-Industrial Residues and Bio-ethanol Production. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 1, p. 11133-11143, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14853: madeira: determinação do material solúvel em etanol-tolueno e em diclorometano e em acetona: método de ensaio. Rio de Janeiro: ABNT, p. 3, 2010a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 7989: pasta celulósica e madeira - determinação de lignina insolúvel em ácido: método de ensaio. Rio de Janeiro: ABNT, p. 6, 2010b.
- 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. 12, p. 248-254, 1976.
- BROWING, B. L. The chemistry of wood. New York: Interscience, p. 574, 1963.
- CACHUMBA, J. J. M. et al. Extracellular L-asparaginase production in solid-state fermentation by using sugarcane bagasse as support material. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, fev. 2019.
- COSTA-SILVA, T. A. et al. Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95-104, nov. 2018.
- DIAS, F. F. G.; AGUIAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. L-asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech.**, v. 9, n. 289, p. 1-10, jun. 2019.

DORYA, 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.

ELSHAFEI, A. M.; EL-GHONEMY, D. H. Screening and Media Optimization for Enhancing L-asparaginase Production, an Anticancer Agent, from Different Filamentous Fungi in Solit State Fermentation. **British Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2015.

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

FERNANDES, M. L. P. Agroindustrial low-cost sources as substrate for production of l-asparaginase by filamentous fungi. 2019. 68 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

GOLDSCHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Ed.). Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. New York: John Wiley Interprice, p. 241-298, 1971.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Effect of carbono source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 210-217, jun. 2003.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, jul 2005.

GULATI, R.; SAXENA, R.; 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 Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n. 7, p. 923-929, apr. 2012.

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

ISSAC, G. S.; ABU-TAHON, M. A. Production of Extracellular Anti-leukemic Enzyme L-asparaginase from *Fusarium solani* AUMC 8615 Grown under Solid-State Fermentation conditions: Purification and Characterization of The Free and Immobilized Enzyme. **Egypt. J. Bot.**, v. 56, n. 3, p. 799-816, 2016.

KENNEDY, F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, E. P. A. Wood and cellulotics: industrial utilization, biotechnology, structure and properties, ellis horwood. Chichester: E. Horwood, p. 1130, 1987.

KHANNA, P. et al. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995.

KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; KRISHNAN, M. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. Using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150-158, may 2013.

LAUFENBERG, G.; KUN, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, apr. 2003.

LIMA, F. A. Jr. et al. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, 33, p. 38-47, 2013.

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, dec. 2015.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of microorganisms**. 12ed. 2009.

NADEEM, M. S.; AL-GHAMDI, M.; KHAN, J. A. Studies on the Recombinant Production in *E. coli* and Characterization of Pharmaceutically Important Thermostable L-asparaginase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Pakistan Journal Zool.**, v. 51, n. 4, p. 1235-1241, 2019.

OLIVEIRA, A. C. F de. et al. Capture of lysozyme on macroporous cryogels by hydrophobic affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 54, n. 18, p. 1–13, 2019.

PAGARRA, H. et al. Optimization and characterization of exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured via solid state fermentation. **Journal Teknologi**, v. 81, n. 1, 2018.

PAUL, T.; MONDAL, A.; BANDYOPADHYAY, T. K. Isolation, Purification, Characterisation and Application of L-asparaginase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, 2019.

PANDEY, A. et al. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

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

PATRO, K. R. et al. Development of new médium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, p. 295-300, jan. 2013.

ROCHA, W. R. V. da. et al. Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, 2019.

SWAPNIL, S. J.; ARPANA, H. J. Isolation, Identification and Susceptibility Testing of Potencial Lipase producing Bacterial and Fungal Strains from soil. **Research Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 8, p. 1-8, aug. 2019.

- TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 148-160, 2009.
- UZMA, F.; MURTHY, K. N.; SRINIVAAS, C. Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. **Eur. J. Exp. Biol.**, v. 6, p. 37–45, 2016.
- VERÍSSIMO, L. A. A. et al. Preparation of an affinity cryogel column for lysozyme purification. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 1973–1982, 2017.
- WU, L. et al. Efficient production of lactulose from whey powder by cellobiose 2-epimerase in a enzymatic membrane reactor. *Bioresource Technology*, v. 233, p. 305-312, 2017.
- YOU, S. et al. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of β -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1271-1276, dec. 2017.
- ZHENG, Z. et al. Elegant and Efficient Biotransformation for Dual Production of DTagatose and Bioethanol from Cheese Whey Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, n. 3, p. 829-835, jan. 2019.
- ZUO, S. et al. Recent research progress on microbial L-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069-1079, feb. 2015.

APÊNDICE A

Tabela 5 – Atividade extracelular de L-asparaginase para cada experimento do delineamento fatorial completo 2^5 , produzido por *Aspergillus caespitosus* em fermentação em estado sólido.

<i>ENSAIO</i>	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	<i>ATIVIDADE VOLUMÉTRICA (U/ML)</i>
1	10^5	25,0	72	10	1,0	0,0000
2	10^5	25,0	72	10	3,0	0,0000
3	10^5	25,0	72	14	1,0	0,0000
4	10^5	25,0	72	14	3,0	0,0000
5	10^5	25,0	120	10	1,0	2,1238
6	10^5	25,0	120	10	3,0	2,3414
7	10^5	25,0	120	14	1,0	2,7498
8	10^5	25,0	120	14	3,0	2,1465
9	10^5	40,0	72	10	1,0	0,0000
10	10^5	40,0	72	10	3,0	0,0000
11	10^5	40,0	72	14	1,0	0,0000
12	10^5	40,0	72	14	3,0	0,0000
13	10^5	40,0	120	10	1,0	0,0000
14	10^5	40,0	120	10	3,0	0,2521
15	10^5	40,0	120	14	1,0	0,2598
16	10^5	40,0	120	14	3,0	0,3145
17	10^7	25,0	72	10	1,0	0,0000
18	10^7	25,0	72	10	3,0	0,0000
19	10^7	25,0	72	14	1,0	0,0000
20	10^7	25,0	72	14	3,0	0,0000
21	10^7	25,0	120	10	1,0	1,9689
22	10^7	25,0	120	10	3,0	2,2877
23	10^7	25,0	120	14	1,0	2,1872
24	10^7	25,0	120	14	3,0	2,6295
25	10^7	40,0	72	10	1,0	0,0000
26	10^7	40,0	72	10	3,0	0,0000
27	10^7	40,0	72	14	1,0	0,0000

28	10^7	40,0	72	14	3,0	0,0000
29	10^7	40,0	120	10	1,0	0,0000
30	10^7	40,0	120	10	3,0	0,0000
31	10^7	40,0	120	14	1,0	0,3011
32	10^7	40,0	120	14	3,0	0,3693
33	10^5	32,5	96	12	2,0	0,5757
34	10^7	32,5	96	12	2,0	0,8455
35	10^6	25,0	96	12	2,0	1,7122
36	10^6	40,0	96	12	2,0	0,0000
37	10^6	32,5	72	12	2,0	0,2147
38	10^6	32,5	120	12	2,0	0,4835
39	10^6	32,5	96	10	2,0	0,0000
40	10^6	32,5	96	14	2,0	0,0000
41	10^6	32,5	96	12	1,0	0,4109
42	10^6	32,5	96	12	3,0	0,2099
43	10^6	32,5	96	12	2,0	0,3059

Fonte: Autor

APÊNDICE B

Tabela 6 – Resultado da ANOVA da regressão para a produção de L-asparaginase (atividade volumétrica U/mL) com os parâmetros que exerceram influência, empregando o delineamento fatorial completo de 2^5 com quatro repetições e quatro pontos centrais

Fonte de Variação	*GL ^a	*SQ ^b	*QM ^c	<i>Pr>F</i>
Concentração de inóculo (X_1)	1	0,08317445	0,08317445	0,1336
Temperatura (X_2)	1	10,23009151	10,23009151	<,0001
Tempo (X_3)	1	12,00165473	12,00165473	<,0001
Concentração de FOPN (X_4)	1	0,11574864	0,11574864	0,0785
$X_1 * X_1$	1	0,58954091	0,58954091	0,0002
$X_2 * X_2$	1	0,19947375	0,19947375	0,0228
$X_3 * X_3$	1	0,53352126	0,53352126	<,0001
$X_4 * X_4$	1	8,96529717	8,96529717	0,0004
Modelo	8	32,71850243	4,08981280	<.0001
Erro	37	1,30830705	0,03535965	
Total	45	34,02680948		

*GL^a: grau de liberdade; *SQ^b: soma de quadrados; *QM^c: quadrado médio

Fonte: Autor

APÊNDICE C

Tabela 7 – Atividade extracelular de L-asparaginase para cada experimento do delineamento fatorial completo 2^6 , produzido por *Aspergillus caespitosus* em fermentação em estado submerso.

<i>Ensaio</i>	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	<i>Atividade volumétrica</i> (U/mL)
1	10	2	10^5	25	5	72	0
2	10	2	10^5	25	5	120	0
3	10	2	10^5	25	7	72	0
4	10	2	10^5	25	7	120	0
5	10	2	10^5	40	5	72	0,24637
6	10	2	10^5	40	5	120	0
7	10	2	10^5	40	7	72	0,20349
8	10	2	10^5	40	7	120	0
9	10	2	10^7	25	5	72	0
10	10	2	10^7	25	5	120	0
11	10	2	10^7	25	7	72	1,25645
12	10	2	10^7	25	7	120	0
13	10	2	10^7	40	5	72	0,26558
14	10	2	10^7	40	5	120	0
15	10	2	10^7	40	7	72	0,20925
16	10	2	10^7	40	7	120	0
17	10	6	10^5	25	5	72	0,22717
18	10	6	10^5	25	5	120	0
19	10	6	10^5	25	7	72	0,28286
20	10	6	10^5	25	7	120	0,40288
21	10	6	10^5	40	5	72	0,20220
22	10	6	10^5	40	5	120	0
23	10	6	10^5	40	7	72	0,30782
24	10	6	10^5	40	7	120	0
25	10	6	10^7	25	5	72	1,21156
26	10	6	10^7	25	5	120	0,64196
27	10	6	10^7	25	7	72	1,43120
28	10	6	10^7	25	7	120	1,49265
29	10	6	10^7	40	5	72	0,20221
30	10	6	10^7	40	5	120	0,41152

31	10	6	10^7	40	7	72	0,19645
32	10	6	10^7	40	7	120	0
33	30	2	10^5	25	5	72	0
34	30	2	10^5	25	5	120	0,45761
35	30	2	10^5	25	7	72	0
36	30	2	10^5	25	7	120	0
37	30	2	10^5	40	5	72	0,29820
38	30	2	10^5	40	5	120	0
39	30	2	10^5	40	7	72	0,20030
40	30	2	10^5	40	7	120	0
41	30	2	10^7	25	5	72	0
42	30	2	10^7	25	5	120	0
43	30	2	10^7	25	7	72	0,20600
44	30	2	10^7	25	7	120	0,63810
45	30	2	10^7	40	5	72	0
46	30	2	10^7	40	5	120	0
47	30	2	10^7	40	7	72	0
48	30	2	10^7	40	7	120	0
49	30	6	10^5	25	5	72	0,21370
50	30	6	10^5	25	5	120	0,35580
51	30	6	10^5	25	7	72	0
52	30	6	10^5	25	7	120	0,81286
53	30	6	10^5	40	5	72	0
54	30	6	10^5	40	5	120	0
55	30	6	10^5	40	7	72	0
56	30	6	10^5	40	7	120	0
57	30	6	10^7	25	5	72	0,22461
58	30	6	10^6	25	5	120	0
59	30	6	10^7	25	7	72	0,36930
60	30	6	10^7	25	7	120	1,10670
61	30	6	10^7	40	5	72	0,22720
62	30	6	10^7	40	5	120	0
63	30	6	10^7	40	7	72	0
64	30	6	10^7	40	7	120	0,21570
65	10	4	10^6	32,5	6	96	0
66	30	4	10^6	32,5	6	96	0

67	20	2	10^6	32,5	6	96	0
68	20	6	10^6	32,5	6	96	0
69	20	4	10^5	32,5	6	96	0
70	20	4	10^7	32,5	6	96	0,59970
71	20	4	10^6	25	6	96	0,22530
72	20	4	10^6	40	6	96	0
73	20	4	10^6	32,5	5	96	0
74	20	4	10^6	32,5	7	96	0
75	20	4	10^6	32,5	6	72	0
76	20	4	10^6	32,5	6	120	0
77	20	4	10^6	32,5	6	96	0
78	20	4	10^6	32,5	6	96	0
79	20	4	10^6	32,5	6	96	0
80	20	4	10^6	32,5	6	96	0

Fonte: Autor

APÊNDICE D

Tabela 8 – Resultado da ANOVA da regressão para a produção de L-asparaginase (atividade volumétrica) com os parâmetros que exerceram influência, empregando o delineamento fatorial completo de 2^6 com quatro repetições e quatro pontos centrais.

Fonte de variação	*GL ^a	*SQ ^b	*QM ^c	<i>Pr>F</i>
Concentração de Asparagina (X_1)	1	0,22639928	0,22639928	0,0369
Concentração de Soro de leite em pó (X_2)	1	0,65103086	0,65103086	0,0006
Concentração de inóculo (X_3)	1	1,02828694	1,02828694	<,0001
Temperatura (X_4)	1	1,06157504	1,06157504	<,0001
pH (X_5)	1	0,26048502	0,26048502	0,0255
Tempo de fermentação (X_6)	1	0,3168704	0,3168704	0,4284
$X_3 * X_1$	1	0,36660575	0,36660575	0,0086
$X_3 * X_4$	1	0,47671873	0,47671873	0,0029
$X_3 * X_5$	1	0,22473887	0,22473887	0,0376
$X_3 * X_2$	1	0,23519019	0,23519019	0,0335
$X_4 * X_2$	1	0,53933963	0,53933963	0,0016
$X_6 * X_1$	1	0,41297752	0,41297752	0,0054
$X_4 * X_5$	1	0,42036907	0,42036907	0,0050
Modelo	10	4,34251527	0,43425153	<.0001
Erro	69	3,31686785	0,04807055	
Total	79	7,65938312		

*GL^a: grau de liberdade; *SQ^b: soma de quadrados; *QM^c: quadrado médio

Fonte: Autor