

## ANÁLISE DAS DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, USANDO COMO SUBSTRATO A PELÍCULA DA AMÊNDOA DO CACAU E CASCA DO CAFÉ.

Jabson Meneses Teixeira<sup>1\*</sup> Danrlei Santos Soares<sup>2</sup>, Nívio Batista Santana<sup>3</sup>, Thamara Louisy Santos Brito<sup>4</sup> Iasnaia Maria de Carvalho Tavares<sup>5</sup>, Marcelo Franco<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Doutorando em Biotecnologia, UFBA/RENORBIO, ICS;

<sup>2</sup>Licenciatura em Ciências Biológicas, UESB, DCEN;

<sup>3</sup>Docente/pesquisador, UESB, DTRA;

<sup>4</sup>Doutoranda em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos, UESC, DCB;

<sup>5, 6</sup> Docente/pesquisador, Grupo de Pesquisa de Biotransformação e Biocatálise Orgânica, UESC DCE.

\*E-mail: jabsonmeneses@gmail.com

### Resumo

A L-asparaginase é uma biomolécula de suma importância no setor alimentício devido à sua aplicação na redução dos níveis de acrilamida em alimentos, como batatas fritas, café moído e pão francês. No intuito da produção desta enzima a partir de fontes alternativas, este trabalho objetivou avaliar a produção de L-asparaginase por meio da fermentação em estado sólido através do fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, utilizando como substratos os resíduos da película de amêndoa do cacau e da casca de café. Além disso, investigamos o impacto de diferentes fontes de nitrogênio, incluindo extrato de levedura, peptona, extrato de malte, cloreto de amônio, sulfato de amônio e asparagina na concentração de 1%. As fermentações foram conduzidas utilizando apenas a película de amêndoa com as diferentes fontes de nitrogênio, bem como a mistura dos resíduos na proporção 1:1, com um teor de umidade de 70%, durante um período de 144 horas. Como resultado, observou-se que a peptona aumentou em 16,03% o rendimento da enzima, alcançando uma atividade de (18,24 U/g) na película de amêndoa. Na mistura dos substratos, o grupo de controle (sem fonte de nitrogênio) apresentou valores superiores em comparação com as fontes de nitrogênio, demonstrando o potencial da mistura na síntese da L-asparaginase. Considerando os resultados encontrados os substratos demonstra ser uma alternativa viável e de baixo custo para a produção da L-asparaginase.

**Palavras-chave:** Bioprocesso; Indutor; Fungo filamentoso.

### 1. Introdução

Responsável pela hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio, a L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é uma enzima encontrada em plantas, animais e microrganismos (Huang *et al.* 2014). Essa biomolécula, quando aplicada na indústria alimentícia, é utilizada para reduzir a acrilamida, uma substância formada como resultado da reação de Maillard em alimentos contendo L-asparagina e açúcares redutores, como glicose e frutose, quando submetidos a altas temperaturas e baixa umidade (Xu *et al.* 2016; Elsaba *et al.* 2022). A acrilamida é considerada prejudicial à saúde humana, sendo

classificada como neurotóxica, genotóxica e carcinogênica (Meghavarnam; Janakiraman, 2018). Nesse contexto, os produtos que contêm acrilamida são submetidos a tratamento enzimático antes do processamento térmico, com o objetivo de hidrolisar a L-asparagina presente e, assim, promover a remoção do precursor na formação do composto. Esse processo elimina até 90% dos níveis de acrilamida, além de manter as características e a qualidade final do alimento (Dias *et al.* 2016).

As formulações da L-asparaginase abrangem 40% do mercado mundial das enzimas, movimentando milhões de dólares anualmente (Jia *et al.* 2021). No entanto, apesar da importância da enzima, sua produção em larga escala não é suficiente para atender a demanda mundial (Chand *et al.* 2020). Na fermentação submersa para a produção da L-asparaginase os substratos sintéticos equivalem 30% do custo final da biomolécula e os métodos de purificação são custosos e há baixa concentração final da enzima (Sharma; Mishra, 2021). Nesse sentido, obter a L-asparaginase através da fermentação em estado sólido (FES) mostra-se um método alternativo e viável para obtenção da enzima, sobretudo pela capacidade de maior concentração do metabólito desejado, menor consumo de energia, recuperação relativamente fácil dos produtos finais e uso de subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes para o microrganismo (Novelli *et al.* 2016; Castro; Sato, 2015). Portanto, este trabalho visa avaliar a da L-asparaginase através resíduos casca do café e película da amêndoa do cacau e a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção enzimática.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Preparo inóculo e substrato

O fungo filamentoso utilizado no bioprocesso sólido foi o *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* IPEC 18/02, da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), cedido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil). Para a fermentação em estado sólido as amostras dos resíduos da película da amêndoa e casca do café foram secas em estufa de secagem (Solab, SL-102/1600) 48h a 65°C. A película da amêndoa e a casca do café passaram pelo processo de Trituração em moinho de facas tipo Wiley (SP labor, SP-32.1) com granulometria de 2mm.

### 2.2 Fermentação em estado sólido

As fermentações foram realizadas em triplicata contendo 5 g do substrato previamente esterilizados em autoclave por 15 min (121°C; 1,5 atm). Em seguida, inoculados a  $10^7$  esporos por grama de substrato conforme o item 2.3.

### 2.3 Variação da fonte de nitrogênio

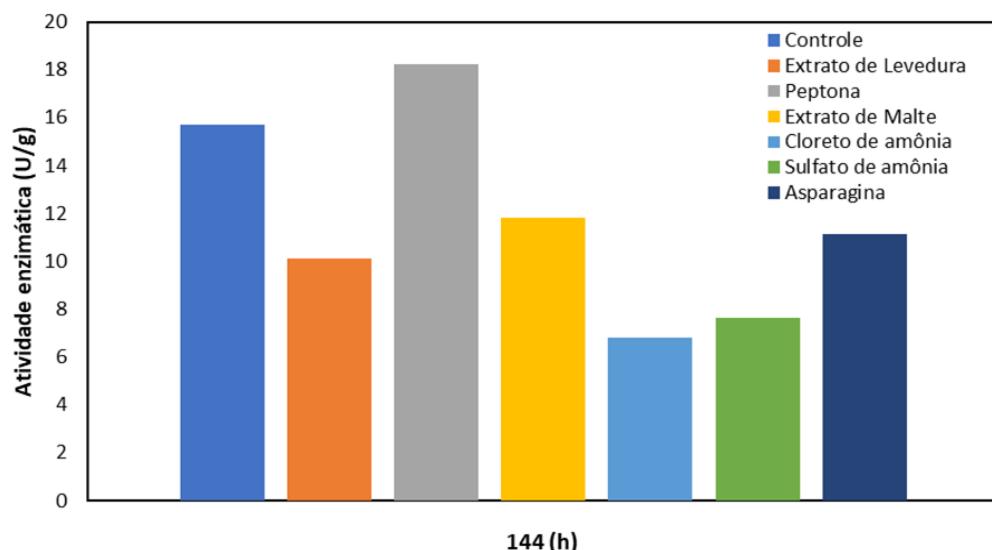
Na fermentação foram avaliadas a influência de 6 fontes de nitrogênio com concentração de 1% na produção da L-asparaginase com o resíduo película da amêndoa (5 g) e a mistura da película com a casca de café (2,5g/ 2,5g). O tempo de fermentação foi de 144h na umidade de 70% com as fontes testadas extrato de levedura, peptona, extrato de malte, cloreto de amônia, sulfato de amônia e asparagina. O controle continha água destilada.

### 2.4 Obtenção do extrato bruto enzimático e determinação enzimática da L-asparaginase

Após a fermentação, o extrato enzimático bruto foi obtido adicionado 25 mL de água destilada autoclavada. Esta suspensão permaneceu sob agitação realizada em shaker (Solab, SL 222), a 30°C, a 160 rpm, por 30 minutos. Posteriormente, a remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica em gaze para separar o sólido do extrato enzimático. O filtrado foi coletado em tubo Falcon (TECNAL) e centrifugado a 6000 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática. Os ensaios foram conduzidos em tubos de ensaio, incluindo L-asparagina, hidroxilamina, tampão tris-HCl e amostra do extrato. Um grupo de controle, sem o extrato, seguiu o mesmo procedimento. Após incubação e interrupção da reação, as amostras foram centrifugadas e a atividade da L-asparaginase medida a 500 nm, baseada na formação de  $\beta$ -hidroxamato aspártico. A quantificação da L-asparaginase extracelular é definida como a unidade de atividade de L-asparaginase (U) necessária para a enzima catalisar um  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -hidroxamato aspártico por minuto, nas condições de ensaio.

### 3. Resultados e Discussão

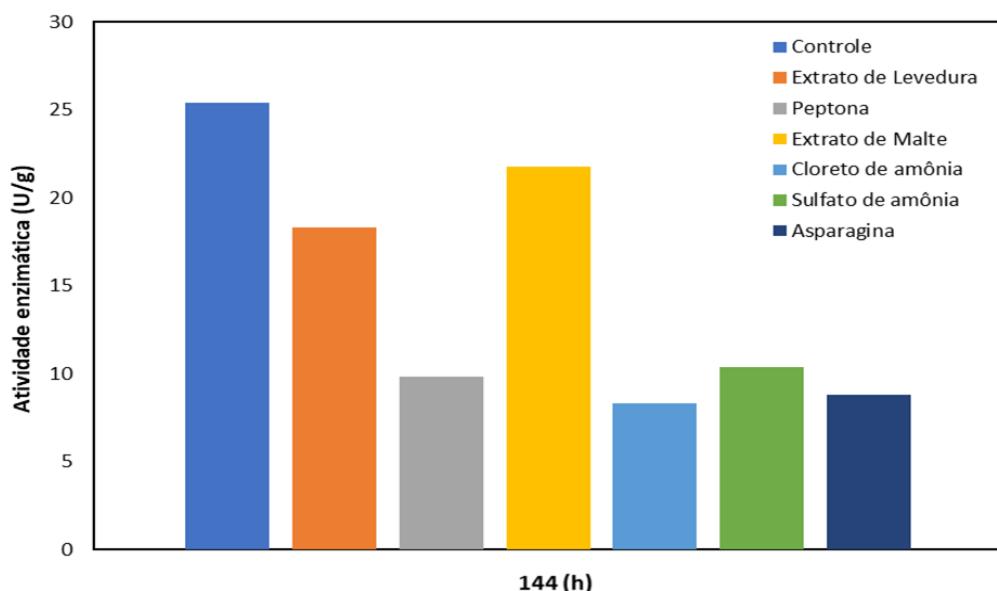
A Figura 1 apresenta o resultado das diferentes fontes de nitrogênio na FES com o substrato película da amêndoia. Conforme os dados, a peptona influenciou na síntese da L-asparaginase (18,24 U/g), com um aumento de 16,03% quando comparado com o controle (sem indutor). O mesmo ocorreu na investigação de Khalil *et al.* (2021) com diferentes fontes de nitrogênio, onde a peptona destacou-se com a melhor capacidade de aumentar a atividade asparaginolítica em comparação com outras suplementações. Tais fatos corroboram o potencial da peptona aliada com resíduo da película da amêndoia do cacau como uma alternativa na FES para aprimorar a produção da L-asparaginase pelo fungo filamentoso.



**Figura 1.** Análise das diferentes fontes de nitrogênio na FES com a película da amêndoia.

A Figura 2 demonstra que as fontes de nitrogênio investigadas não induziram o aumento da atividade da L-asparaginase na mistura dos substratos. No controle, obtivemos uma atividade de 25,43 U/g, valor superior quando comparado com as fermentações suplementadas. A

produção da biomolécula é principalmente condicionada pela presença de nitrogênio no meio, no entanto, níveis inadequados desse elemento têm o potencial de afetar o rendimento da enzima, como evidenciado pelos valores na Figura 2. Notavelmente, a fonte que menos afetou negativamente a produção enzimática foi o extrato de malte, que apresentou uma queda de 16,61% na produção.



**Figura 2.** Fermentação em estado sólido com a mistura dos resíduos (película da amêndoia/casca do café) em diferentes fontes de nitrogênio.

Concluir-se, que a mistura dos resíduos exibiu características ideais na sua composição de fonte de carbono e nitrogênio para o metabolismo microbiano, e, consequentemente, para a produção da L-asparaginase pelo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, eliminando a necessidade de estudos posteriores sobre o uso de indutores.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos indicam que a mistura dos substratos, assim como, as diferentes fontes de nitrogênios investigadas demonstraram resultados promissores para o uso do *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* como produtor da L-asparaginase. Nesse sentido, conclui-se que os substratos investigados têm potencial para se tornarem uma alternativa viável e de baixo custo para aquisição da L-asparaginase, tal como, sua pesquisa no uso na aplicação industrial contra acrilamida.

#### Referências

Castro, R. J. S.; Sato, H. H. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agroindustrial Wastes Valorization. *Waste Biomass Valorization*, v. 6, p. 1085–1093, 2015.



Chand, S.; Mahajan, RV.; Prasad, JP.; Sahoo, DK.; Mihooliya, KN.; Dhar, MS.; Sharma, G. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. *Biotechnol Appl Biochem*, v. 67, n. 4, p. 619-647, 2020.

Dias, F. F.; Sato, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 6, p. 33-39, 2016.

Elsaba, Y. M.; Salama, W. H.; Soliman, E. R. In silico and biochemical analysis on a newly isolated *Trichoderma asperellum* L-asparaginase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102309, 2022.

Huang, L.; Liu, Y.; Sun, Y.; Yan, Q.; Jiang, Z. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 5, p. 1561-1569, 2014.

Jia, R.; Wan, X.; Geng, X.; Xue, D.; Xie, Z.; Chen, C. Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: Current research status and future perspectives. *Microorganisms*, v. 9, n. 8, p. 1659, 2021.

Khalil, N. M.; Rodríguez-Couto, S.; El-Ghany, M. N. A. Characterization of *Penicillium crustosum* L-asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non-cytotoxic levels. *Arch Microbiol*, v. 203, p. 2625–2637, 2021. doi: 10.1007/s00203-021-02198-6.

Meghavarnam AK, Janakiraman S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP- 87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 124-130, 2017.

Novelli, P. K.; Barros, M. M.; Fleuri, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, v. 198, p. 119-124, 2016.

Sharma, D.; Mishra, A. L-asparaginase production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*: process modeling by artificial neural network approach. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-12, 2021.

Xu, F.; Oruna-Concha, M. J.; Elmore, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, v. 210, p. 163-171, 2016.

Autor a ser contatado: Jabson Meneses Teixeira, UFBA, jabsonmeneses@gmail.com