



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

LUCAS ALMEIDA DE FREITAS

BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DESENVOLVIMENTO
DE BIOCATALISADOR ENZIMÁTICO PARA EVITAR FORMAÇÃO DE
ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

FORTALEZA

2024

LUCAS ALMEIDA DE FREITAS

BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DESENVOLVIMENTO DE
BIOCATALISADOR ENZIMÁTICO PARA EVITAR FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM
ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F936b Freitas, Lucas Almeida de.
Bioprocesso de produção de L-asparaginase e desenvolvimento de biocatalisador enzimático para evitar formação de acrilamida em alimentos / Lucas Almeida de Freitas. – 2024.
122 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.
Coorientação: Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
1. Acrilamida. 2. L-asparaginase. 3. Fermentação. 4. Imobilização. I. Título.
- CDD 660.6
-

LUCAS ALMEIDA DE FREITAS

BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DESENVOLVIMENTO DE
BIOCATALISADOR ENZIMÁTICO PARA EVITAR FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA EM
ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 27/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luciano Caseli
Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni, pela excelente orientação, tempo e recursos dedicados à minha formação. À Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves por aceitar me acompanhar novamente nesta jornada, desta vez como coorientadora, desempenhando esta função com excelência e cuidado.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Luciano Caseli e Dr. André Casimiro de Macedo pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões. Ao Prof. Dr. Gilvan Furtado por sempre acompanhar meu trabalho de perto e pelas sugestões sempre pertinentes.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam e me auxiliaram, de diferentes formas nestes dois anos. Em especial, aos meus companheiros de laboratório Liandra, Larisse, Máisa, Virgínia, Darlyson, Jucilene, Gabriel, Samuel e João. Por serem não apenas amigos, mas também professores, me ajudando em todas as etapas dos meus experimentos. Também por todas as caronas, sem vocês eu não teria ido a lugar algum.

Ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Pesquisa e Desenvolvimento da Fiocruz-CE, Rose, Mayara, Marcelo e Camila, por todo o apoio e companheirismo neste percurso.

Aos demais colegas do Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde (GEPeSS) e do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) por todo o auxílio prestado.

RESUMO

O aquecimento de alguns alimentos vegetais na indústria alimentícia induz a produção de acrilamida mediante a reação de Maillard, que ocorre entre açúcares redutores e o aminoácido L-asparagina (Asn). A acrilamida é um composto neurotóxico e genotóxico e provável carcinógeno humano. Os efeitos nocivos da acrilamida na saúde humana são suficientes para suscitar a recomendação de sua mitigação pela Organização Mundial de Saúde, em produtos como as batatas fritas, que são ricos em açúcares disponíveis e Asn. O tratamento desses alimentos com L-asparaginase (L-ASNase), antes do aquecimento, pode reduzir a concentração de Asn, precursor da acrilamida. O objetivo desse trabalho foca a produção L-ASNase em processo fermentativo em altas concentrações no caldo fermentado, e no desenvolvimento de um biocatalisador. O biocatalisador implica na imobilização de L-ASNase em uma sílica mesoporosa, SBA-15. Os genes da L-ASNase II, de *Escherichia coli* (*ansB*, codificando EcAII) e de *Bacillus subtilis* (*ansZ*, codificando BsAII), foram clonados em vetores para expressão constitutiva periplasmática, sendo inseridos em células de *E. coli* e os produtos de expressão foram obtidos do caldo fermentado por precipitação. Obteve-se alto rendimento de enzimas recombinantes nos extratos de caldo fermentado em tubos em shaker, atingindo $14810 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ de atividade de L-ASNase, com resultados inferiores para a expressão em frascos. O extrato de EcAII foi utilizado para os experimentos de imobilização em SBA-15. Diferentes condições de imobilização e recobrimento foram avaliadas. A adsorção de EcAII em SBA-15 foi ineficaz, sem atividade recuperada, comparado a 8% da ligação covalente em SBA-15 ativado. O rendimento global aumentou pela adição de aminoácidos na imobilização, atingindo 39% e 97% com a utilização de L-glutamina (Gln) (SBA-E(Gln)) e Asn (SBA-E(Asn)), respectivamente. De modo geral, SBA-E(Asn) e seu derivado recoberto com polietilenoimina, SBA-E-PEI, mostraram melhor desempenho que a enzima livre em temperaturas mais altas, com aumento na estabilidade térmica, da temperatura ótima de atuação e melhora no perfil de desnaturação. SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI mantiveram acima de 50% de sua atividade inicial após 10 ciclos de reuso na estabilidade operacional a $55 \text{ }^\circ\text{C}$, mostrando ser biocatalisadores adequados para a aplicação industrial. A aplicação das condições de imobilização para BsAII e novos experimentos para melhorar a estabilidade térmica devem ser realizados em trabalhos futuros, bem como a realização de aplicação em batatas para mitigar formação de acrilamida.

Palavras-chave: acrilamida; L-asparaginase; fermentação; imobilização.

ABSTRACT

The heating of some plant-based foods in industry induces the production of acrylamide through the Maillard reaction, that occurs between reducing sugars and the amino acid L-asparagine (Asn). The acrylamide is a neurotoxic and genotoxic compound, and probable human carcinogen. Acrylamide's harmful effects on human health are sufficient to evoke the recommendation of its mitigation by the World Health Organization, in products like French fries, rich and free sugars and Asn. Treating these foods with L-asparaginase (L-ASNase), before heating, can reduce Asn concentration, the precursor of acrylamide. This work aims to produce L-ASNase in high concentration in the fermentation broth through fermentative process, and to develop a biocatalyst. The biocatalyst implies in L-ASNase immobilization on a mesoporous silica, SBA-15. The L-ASNase II genes, from *Escherichia coli* (*ansB*, encoding EcAII) and from *Bacillus subtilis* (*ansZ*, encoding BsAII), were cloned into vectors for periplasmatic constitutive expression, being inserted into *E. coli* cells. The expression products were obtained from the fermented broth through precipitation. It was obtained high yield of recombinant enzymes on the extracts from fermented broth of agitated tubes, reaching 14810 U·L⁻¹ of L-ASNase activity. Inferior results were obtained on agitated flasks. The EcAII extract was used on immobilization experiments on SBA-15. Different immobilization and coating conditions were evaluated. EcAII adsorption on SBA-15 was ineffective, with no recovered activity, compared to 8% from covalent bonding on activated SBA-15. The addition of amino acids in the immobilization increased the global yield, reaching 39% and 97% utilizing L-glutamine (Gln) (SBA-E(Gln)) and Asn (SBA-E(Asn)), respectively. In general, SBA-E(Asn) and its derivative coated with polyethyleneimine, SBA-E-PEI, showed better performance than the free enzyme in higher temperatures, increasing thermal stability and optimal activity temperature and improving denaturation profiles. SBA-E(Asn) and SBA-E-PEI kept above 50% of its initial activity after 10 cycles of reuse on operational stability at 55 °C, proving to be adequate biocatalysts to industrial application. Applying the immobilization condition to BsAII and new experiments to improve the thermal stability should be made in future works, as well as applying the biocatalysts on potatoes to mitigate acrylamide formation.

Keywords: acrylamide; L-asparaginase; fermentation; immobilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Rota bioquímica de formação da acrilamida	17
Quadro 1	– Níveis de acrilamida em alimentos observados em diferentes estudos	19
Figura 2	– Hidrólise da L-asparagina	21
Figura 3	– Representação em <i>cartoon</i> da estrutura quaternária tridimensional da EcAII	23
Figura 4	– Representação esquemática do mecanismo de simples troca da catálise das L-ASNases	24
Figura 5	– Representação esquemática do mecanismo de dupla troca da catálise das L-ASNases	26
Figura 6	– Tipos de imobilização enzimática	34
Figura 7	– Síntese do SBA-15	38
Quadro 2	– Gene <i>ansB</i> e sequência proteica de EcAII	43
Quadro 3	– Gene <i>ansZ</i> e sequência proteica de BsAII	44
Quadro 4	– Sequências de primers utilizados nas amplificações por PCR	45
Figura 8	– Esquema das principais sequências gênicas nos plasmídeos contendo gene da L-ASNase com sequência-His ao final (esquerda) ou no início (direita) do gene	46
Figura 9	– Gel de agarose mostrando a amplificação dos genes de L-ASNase II	60
Figura 10	– Gel de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de bactérias transformadas com construções HisC	61
Figura 11	– Gel de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de bactérias transformadas com construções HisN	62
Figura 12	– Trechos de eletroferograma abrangendo o local de inserção da sequência His provenientes do sequenciamento dos plasmídeos clonados	64
Figura 13	– Trechos do alinhamento global do final das sequências dos genes amplificados com cauda de histidina na posição C-terminal	65

Figura 14	– Trechos do alinhamento global do início das sequências dos genes amplificados com cauda de histidina na posição N-terminal	66
Quadro 5	– Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar das L-ASNases II recombinantes	67
Figura 15	– Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular e extracelular de EcAII	68
Figura 16	– Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular e extracelular de BsAII	69
Figura 17	– Microplacas de 96 poços contendo produto da reação colorimétrica de Nessler do ensaio de atividade dos extratos obtidos no cultivo em tubos em shaker	70
Figura 18	– Western Blot com os produtos da expressão intracelular e extracelular de EcAII	71
Figura 19	– Western Blot com os produtos da expressão intracelular e extracelular de BsAII	72
Figura 20	– Gel de poliacrilamida mostrando perfis proteicos da expressão intracelular e extracelular em frascos em shaker e dos extratos de L-ASNases II	74
Figura 21	– Distribuição de hidrofobicidade na superfície da estrutura tridimensional de EcAII	75
Figura 22	– Representação da superfície da estrutura tridimensional da EcAII destacando os resíduos de lisina	77
Figura 23	– Etapas de funcionalização e ativação do SBA-15 e imobilização covalente ..	78
Figura 24	– Gel de poliacrilamida mostrando a avaliação da interação dos monômeros de EcAII com SBA-15-APTES-GA	82
Figura 25	– Estabilidade operacional em 10 ciclos de reutilização de SBA-E(Asn) a 37 °C	83
Figura 26	– Gráficos de avaliação da temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre	84
Figura 27	– Curvas de cinética enzimática da enzima livre e de SBA-E(Asn)	85

Figura 28 – Perfis de desativação térmica das enzimas a 60 °C	87
Figura 29 – Perfis de razão de fluorescência a 350 nm e 330 nm das enzimas e do suporte	90
Figura 30 – Primeira derivada da razão de fluorescência das enzimas e do suporte	91
Figura 31 – Perfis de desativação térmica das enzimas a 50 °C	92
Figura 32 – Estabilidade operacional em 10 ciclos de reutilização de SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI a 55 °C	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de cultivo bacteriano e produção de L-ASNases II	73
Tabela 2 – Estudo da imobilização por adsorção de EcAII em SBA-15 e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global	76
Tabela 3 – Concentração de proteínas no sobrenadante acompanhada no curso de imobilização por adsorção de EcAII em SBA-15	76
Tabela 4 – Estudo do tempo de imobilização de EcAII em SBA-15-APTES-GA e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global	79
Tabela 5 – Estudo da utilização de protetores da estrutura tetramérica da EcAII e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global	80
Tabela 6 – Redução da quantidade de proteína utilizada para a imobilização e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global	81
Tabela 7 – Constantes cinéticas da enzima livre e de SBA-E(Asn)	85
Tabela 8 – Dados de desativação térmica a 60 °C das enzimas	87
Tabela 9 – Relação entre atividade dos imobilizados recobertos e SBA-E(Asn)	88
Tabela 10 – Dados de desativação térmica a 50 °C das enzimas	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
A	Ampere
Abs	Absorbância
AEI	Intermediário acil-enzima
AHA	Ácido β -hidroxamato L-aspártico
Ala	L-alanina
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APTES	(3-aminopropil)triétoxissilano
Asn	L-asparagina
Asp	Ácido L-aspártico
BSA	Albumina de soro bovino
BsAII	L-asparaginase II de <i>Bacillus subtilis</i>
CE	Ceará
CLE	<i>Cross-linked enzymes</i>
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i>
CLEC	<i>Cross-linked enzyme crystals</i>
cm	Centímetro
DA	Dextrana-aldeído
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EcAII	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ErA	L-asparaginase II de <i>Dickeya chrysanthemi</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FE	Fator de estabilidade
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Aceleração gravitacional
g	Grama

GPeSS	Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde
Gln	L-glutamina
Glu	Ácido L-glutâmico
GPBio	Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
h	Hora
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HTST	<i>High-temperature short-time</i>
IARC	<i>International Agency for Research in Cancer</i>
JECFA	<i>Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ World Health Organization (WHO) Expert Committee on Food Additives</i>
kb	Quilobase
kg	Quilograma
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
L-ASNase	L-asparaginase
LB	Luria-Bertani
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LTLT	<i>Low-temperature long-time</i>
Lys	L-lisina
M	Molar
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
MOE	<i>Margin of exposure</i>
nm	Nanômetro
Ntn	Nucleófilo N-terminais
OGM	Organismos Geneticamente Modificados
OMS	Organização Mundial da Saúde

pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG-PPG-PEG	Plurônico P-123
PEI	Polietilenoimina
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	Concentração de substrato
s	Segundo
SBA-15	<i>Santa Barbara Amorphous-15</i>
Ser	L-serina
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
Tat	<i>Twin-arginine-translocation</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEOS	Tetraetil ortossilicato
Thr	L-treonina
Trp	L-triptofano
Tyr	L-tirosina
U	Unidade de atividade
V	Volt
V_0	Velocidade inicial
$V_{MÁX}$	Velocidade máxima
WHO	<i>World Health Organization</i>
WR	<i>Working reagent</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
Fe^{3+}	Íon férrico
FeCl_3	Cloreto férrico
$^\circ$	Graus
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
HCl	Ácido clorídrico
K_2HgI_4	Tetraiodomercurato (II) de potássio
KCl	Cloreto de potássio
®	Marca Registrada
MgCl_2	Cloreto de magnésio
μ	Mi
NaBH_4	Borohidreto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NH_3	Amônia
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
NH_4F	Fluoreto de amônio
O_2	Oxigênio
%	Porcentagem
™	Trademark symbol
ZnSO_4	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Acrilamida em alimentos industrializados	16
1.2	Enzimas L-asparaginases	20
1.3	Produção de enzimas recombinantes	29
1.4	Imobilização enzimática	32
1.4.1	<i>Suporte Santa Barbara Amorphous-15</i>	37
2	JUSTIFICATIVA	39
3	HIPÓTESES	41
4	OBJETIVOS	42
4.1	Objetivos específicos	42
5	METODOLOGIA	43
5.1	Material biológico	43
5.2	Construção dos plasmídeos de expressão de L-asparaginase II	44
5.3	Transformação das bactérias <i>E. coli</i>	46
5.4	Expressão de proteínas recombinantes em tubos em shaker	47
5.5	Expressão de proteínas recombinantes em frascos em shaker	48
5.6	Obtenção de proteínas do caldo fermentado	48
5.7	Análises eletroforéticas	49
5.8	Quantificação de proteínas	50
5.9	Quantificação de atividade enzimática	50
5.10	Produção do Suporte <i>Santa Barbara Amorphous-15</i>	51
5.11	Funcionalização e ativação do SBA-15	52
5.12	Imobilização enzimática	53
5.12.1	<i>Imobilização por adsorção</i>	53
5.12.2	<i>Imobilização por ligação covalente</i>	54
5.12.3	<i>Aplicação de aminoácidos na imobilização covalente</i>	54
5.12.4	<i>Redução da concentração de proteínas na imobilização covalente</i>	54
5.12.5	<i>Recobrimento dos biocatalisadores</i>	55
5.13	Obtenção dos dados de eficiência de imobilização	55
5.14	Avaliação da estabilidade operacional dos imobilizados	57
5.15	Avaliação da temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre	57

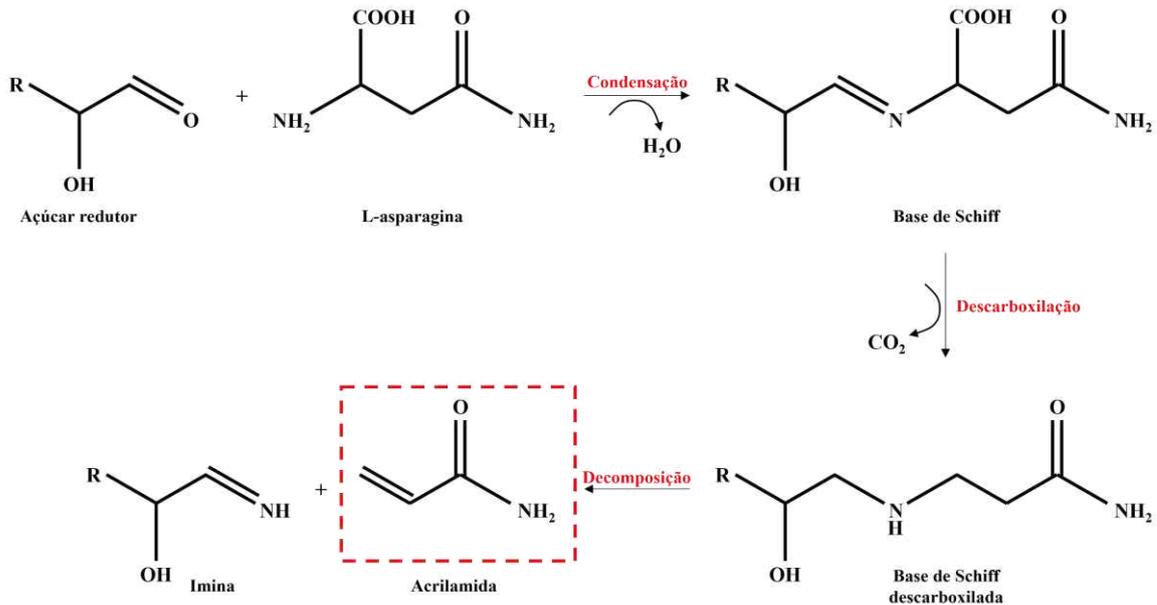
5.16	Cinética enzimática dos biocatalisadores e da enzima livre	58
5.17	Avaliação da estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre ..	58
6	RESULTADOS	60
6.1	Clonagem dos genes de L-asparaginase em vetores RPA/RPC	60
6.2	Sequenciamento dos genes clonados	63
6.3	Expressão de L-ASNase II pelas bactérias transformadas	66
6.4	Processo fermentativo em frascos em shaker	73
6.5	Avaliação da adsorção de EcAII ao SBA-15	74
6.6	Avaliação da ligação covalente de EcAII ao SBA-15 funcionalizado	77
6.7	Imobilização covalente na presença de aminoácidos	79
6.8	Avaliação da imobilização com menor concentração de proteínas	81
6.9	Estabilidade operacional em ciclos de reutilização do biocatalisador	82
6.10	Temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre	83
6.11	Propriedades cinéticas dos biocatalisadores e da enzima livre	85
6.12	Estabilidade térmica a 60 °C dos biocatalisadores e da enzima livre	86
6.13	Recobrimento dos biocatalisadores	88
6.14	Mudanças na estabilidade térmica enzimática	88
6.15	Avaliação da estabilidade operacional em ciclos de reutilização a 55 °C	93
7	DISCUSSÃO	95
7.1	Produção de L-ASNases II em bactérias transformadas	95
7.2	Escolha do tipo de imobilização mais adequado para EcAII em SBA-15	96
7.3	Otimização das condições de imobilização	97
7.4	Temperatura ótima e cinética enzimática	99
7.5	Estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre	100
7.6	Estabilidade operacional em ciclos de reutilização dos biocatalisadores	102
8	CONCLUSÃO	104
9	PERSPECTIVAS	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO BCA	119
	APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AMÔNIA	120
	APÊNDICE C – DADOS DE FLUORESCÊNCIA A 330 nm E 350 nm	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acrilamida em alimentos industrializados

Diversos alimentos de origem vegetal, em seu processamento industrial, são submetidos a altas temperaturas, em operações tais como cozimento, fritura, assadura e torra. Tais alimentos são ricos carboidratos, dentre eles os açúcares redutores, principalmente glicose e frutose, que são formados durante o metabolismo de desenvolvimento dos vegetais e podem ainda ser formados através de hidrólise da sacarose induzida por aquecimento (Bertuzzi *et al.*, 2020). Os processos industriais de aquecimento desses alimentos podem desencadear uma cascata de reações químicas chamada reação de Maillard, que ocorre entre aminoácidos livres e os açúcares redutores presentes no alimento, em temperaturas acima de 120 °C, como exemplificado de forma simplificada na Figura 1 (Abt *et al.*, 2019; Mustăţea; Popa, 2015). Através da reação de Maillard, são formadas várias moléculas envolvidas no desenvolvimento da pigmentação marrom ou dourada dos alimentos e na formação de aromas e realçadores de sabor, contribuindo para a palatabilidade e aceitabilidade desses alimentos, tais como o hidroximetilfurfural, a pentosidina e a carboximetilisina (Murata, 2021; Shibao; Helena; Bastos, 2011). Apesar da importância da reação de Maillard na produção dessas moléculas que aumentam a aceitabilidade dos alimentos para os consumidores, ela possibilita a formação de compostos genotóxicos, como aminas aromáticas heterocíclicas e acrilamida, como mostrado na Figura 1 (Murata, 2021).

Figura 1 – Rota bioquímica de formação da acrilamida



Fonte: o autor. A figura apresenta a principal rota de formação de acrilamida, por meio da cascata de reações que compõem a reação de Maillard. A acrilamida está destacada pelo tracejado vermelho.

A acrilamida é uma molécula com diversos efeitos negativos à saúde humana. Ela tem como principal precursor, na reação de Maillard, o aminoácido asparagina (Asn), que inicia a cascata pela condensação com um açúcar redutor, preferencialmente de cadeia curta (Maan *et al.*, 2022). A condensação entre açúcar redutor e Asn forma uma base de Schiff, que depois passa por uma descarboxilação e uma decomposição para a formação da acrilamida.

Os riscos envolvendo o consumo de acrilamida envolvem principalmente à sua provável capacidade de causar câncer em humanos, mas também envolvem sua neurotoxicidade, genotoxicidade e toxicidade para o sistema reprodutor (Jia *et al.*, 2021). A acrilamida é, desde 1994, classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research in Cancer*, IARC) como pertencente ao grupo 2A, de prováveis carcinogênicos para humanos. Esta atribuição é dada quando as evidências de carcinogenicidade em humanos são insuficientes, mas há evidências experimentais suficientes para provar a carcinogênese em animais, sendo esta mediada por mecanismos que também operam em humanos (*International Agency for Research on Cancer.*, 1994). Desde então, com o surgimento de numerosos estudos epidemiológicos, estudos mecanicistas e bioensaios demonstrativos da carcinogenicidade da acrilamida, o grupo de aconselhamento da IARC recomendou alta prioridade à reavaliação da acrilamida (*International Agency for Research on Cancer*, 2015).

O potencial carcinogênico e genotóxico da acrilamida está ligado a um de seus metabolismos pós-consumo, pois em tecidos de mamíferos ela é prontamente absorvida no trato gastrointestinal e distribuída para os demais tecidos, sendo convertida em glicidamida no fígado, um epóxido mais reativo a DNA e proteínas do que a própria acrilamida (Pedreschi; Mariotti; Granby, 2014). Outra forma de metabolização da acrilamida baseia-se na sua conjugação com glutathione no fígado, para uma rota que leva à excreção, mas que aumenta o estresse oxidativo pelo consumo da glutathione, reduzindo o nível de agentes antioxidantes (Zhao; Zhang; Deng, 2022). O estresse oxidativo é uma das causas da neurotoxicidade decorrente da acrilamida, mas o principal mecanismo que leva a este efeito é a formação de ligações covalentes entre resíduos de cisteína altamente nucleofílicos e acrilamida, cujos produtos são chamados de adutos covalentes e acumulam-se nos neurônios pré-sinápticos, causando o bloqueio da transferência de neurotransmissores (Zhao; Zhang; Deng, 2022). Em outros estudos, foi atestada a toxicidade reprodutiva da acrilamida em ratos, com evidências da redução da reserva de esperma no epidídimo e das concentrações de testosterona e prolactina nos machos, bem como redução do número de corpos-lúteos e da produção de progesterona em fêmeas (Rifai; Saleh, 2020).

Nos últimos anos, foram realizados diversos estudos acerca do conteúdo de acrilamida em alimentos, bem como estimativas do seu consumo pela população de diferentes países (Mueller *et al.*, 2011). Nesta perspectiva mundial, a acrilamida está presente tanto em alimentos de alto consumo diário, quanto em alimentos com consumo mais variado dependendo da cultura local, como comidas regionais. O Quadro 1 traz um compilado de resultados de teor de acrilamida em alguns alimentos de destaque para a presença deste contaminante, obtidos de estudos de diferentes países nas últimas décadas. Em uma perspectiva nacional, o primeiro estudo acerca da ingestão de acrilamida no Brasil, realizado em 2008, concluiu de forma preliminar que as principais fontes de acrilamida para a população eram, em ordem decrescente, batata frita, café, farinha de mandioca torrada, biscoitos salgados e pão francês (Arisseto; Toledo, 2008).

Quadro 1 – Níveis de acrilamida em alimentos observados em diferentes estudos

Alimento	Níveis de acrilamida (µg/kg)	Referências
Batatas fritas	187,6 – 418,4	(Abt <i>et al.</i> , 2019; Arisseto; Toledo, 2008; Barón Cortés; Vásquez Mejía; Suárez Mahecha, 2021; Deribew; Woldegiorgis, 2021; Jeong; Hwang; Kwon, 2020);
Salgadinhos de batata	247,0 – 732,7	(Abt <i>et al.</i> , 2019; Arisseto; Toledo, 2008; Barón Cortés; Vásquez Mejía; Suárez Mahecha, 2021; Deribew; Woldegiorgis, 2021; Jeong; Hwang; Kwon, 2020; Yu <i>et al.</i> , 2023)
Pães	14,7 – 29,1	(Abt <i>et al.</i> , 2019; Arisseto; Toledo, 2008; Barón Cortés; Vásquez Mejía; Suárez Mahecha, 2021)
Biscoitos	116,0 – 274,1	(Abt <i>et al.</i> , 2019; Arisseto; Toledo, 2008; Barón Cortés; Vásquez Mejía; Suárez Mahecha, 2021; Jeong; Hwang; Kwon, 2020; Yu <i>et al.</i> , 2023)
Farinhas	30,0 – 472,8	(Arisseto; Toledo, 2008; Jeong; Hwang; Kwon, 2020)
Pó de café torrado	109,5 – 582,0	(Abt <i>et al.</i> , 2019; Arisseto; Toledo, 2008; Deribew; Woldegiorgis, 2021; Jeong; Hwang; Kwon, 2020; Yu <i>et al.</i> , 2023)

Fonte: o autor. Níveis de acrilamida em alimentos, mostrando a amplitude de médias observadas em diferentes trabalhos, com dados coletados nos Estados Unidos, Brasil, Colômbia, Etiópia, Coreia do Sul e Singapura. Os dados são de diferentes períodos, iniciando na década de 2000.

Na 72ª reunião do *Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ World Health Organization (WHO) Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, em 2010, foram revisados os estudos existentes acerca de certos contaminantes de alimentos, sendo inclusive realizadas estimativas do consumo de acrilamida em diversos países, de quase todos os continentes (Mueller *et al.*, 2011). Na monografia emitida nesta reunião, foi utilizada a abordagem de margem de exposição (*margin of exposure*, MOE), que auxilia na consideração de riscos à saúde quando não se é possível determinar limites de segurança para ingestão, devido à genotoxicidade do contaminante. A MOE é uma razão entre a dose em que uma substância provoca efeitos adversos mensuráveis num modelo animal e o nível de exposição para uma

dada população humana (Benford *et al.*, 2010). A MOE acima de 10000, para compostos carcinogênicos e genotóxicos, indicam baixa preocupação à saúde, e quanto menor a MOE, maior o risco (EFSA, 2023). A MOE para a acrilamida, obtidos pela JECFA, foram de 310 e 78, para exposição média e alta, respectivamente, com base na dose de acrilamida indutora de tumores mamários em ratos. Já com base na dose de indução de tumores da glândula Harderiana em camundongos, a MOE para a acrilamida foram de 180 e 45, para exposição média e alta, respectivamente. Esses valores confirmam que o consumo de acrilamida, através da ingestão de alguns alimentos, é um fator de preocupação à saúde humana, e resultou no reforço de indicações da Organização Mundial da Saúde (OMS) a busca de métodos para mitigação da acrilamida em alimentos, como a utilização da enzima L-asparaginase para reduzir a concentração de um de seus precursores, a Asn (Mueller *et al.*, 2011).

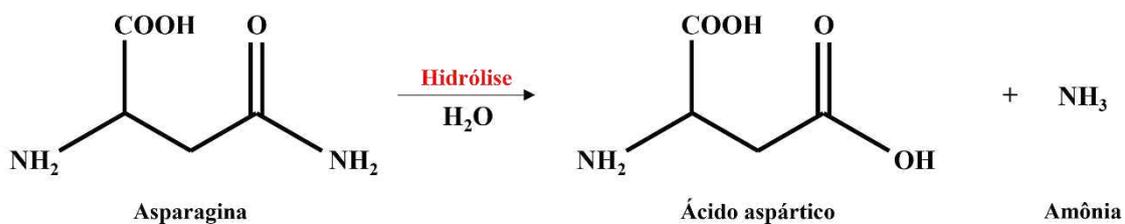
1.2 Enzimas L-asparaginases

A maioria das enzimas são proteínas constituídas por sequências dos 20 aminoácidos naturais, que apresentam a propriedade de catalisar reações metabólicas através da redução da energia de ativação. A atividade catalítica das enzimas é dependente da integridade de suas conformações, da estrutura primária à quaternária, podendo haver perda de atividade em caso de desnaturação ou de dissociação de monômeros, para o caso de enzimas multiméricas (Nelson; Cox, 2013). As enzimas são atualmente classificadas em 7 classes gerais, com base em sua principal função catalítica, podendo ser oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases ou translocases (Benore, 2019). A utilização de enzimas na indústria é favorável devido a características como atuação em condições brandas de temperatura e pH, reduzindo custos energéticos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, e especificidade catalítica, contribuindo para a substituição de catalisadores químicos com potencial perigoso (Moreno *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021). Além disso, as enzimas não são degradadas ao final de uma catálise, nem reagem irreversivelmente com os substratos, podendo ser utilizadas novamente para a catálise de novos substratos, tendo apenas a estabilidade de cada enzima como limite para este reaproveitamento (Kroll *et al.*, 2023).

As L-asparaginases (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1, L-ASNase) são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a reação de hidrólise do aminoácido Asn, produzindo o aminoácido L-aspartato (Asp) e amônia (NH₃) (Batoool *et al.*, 2016). A Figura 2 mostra a representação simplificada da reação catalisada pela L-ASNase. As L-ASNases também possuem atividade catalítica por outros aminoácidos e moléculas afins, como a L-

glutamina (Gln), a D-asparagina, a D-glutamina, o ácido succínico e o ácido β -hidroxamato L-aspártico, embora geralmente em níveis bem inferiores em relação à atividade asparaginásica (Cachumba *et al.*, 2016; Lanvers *et al.*, 2002; Lubkowski *et al.*, 2020). O envolvimento da Asn em diversos fenômenos bioquímicos relevantes implica numa ampla gama de aplicações para a L-ASNases, como a mitigação da produção de acrilamida em alimentos submetidos a altas temperaturas (Xu; Oruna-Concha; Elmore, 2016). Além disso, elas também são utilizadas como biofármacos em tratamentos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e alguns outros tipos de câncer, por depletar o suprimento de Asn circundante no sangue dos pacientes, do qual as células neoplásicas são dependentes para seu funcionamento e proliferação (Broome, 1963; Nunes *et al.*, 2020).

Figura 2 – Hidrólise da L-asparagina



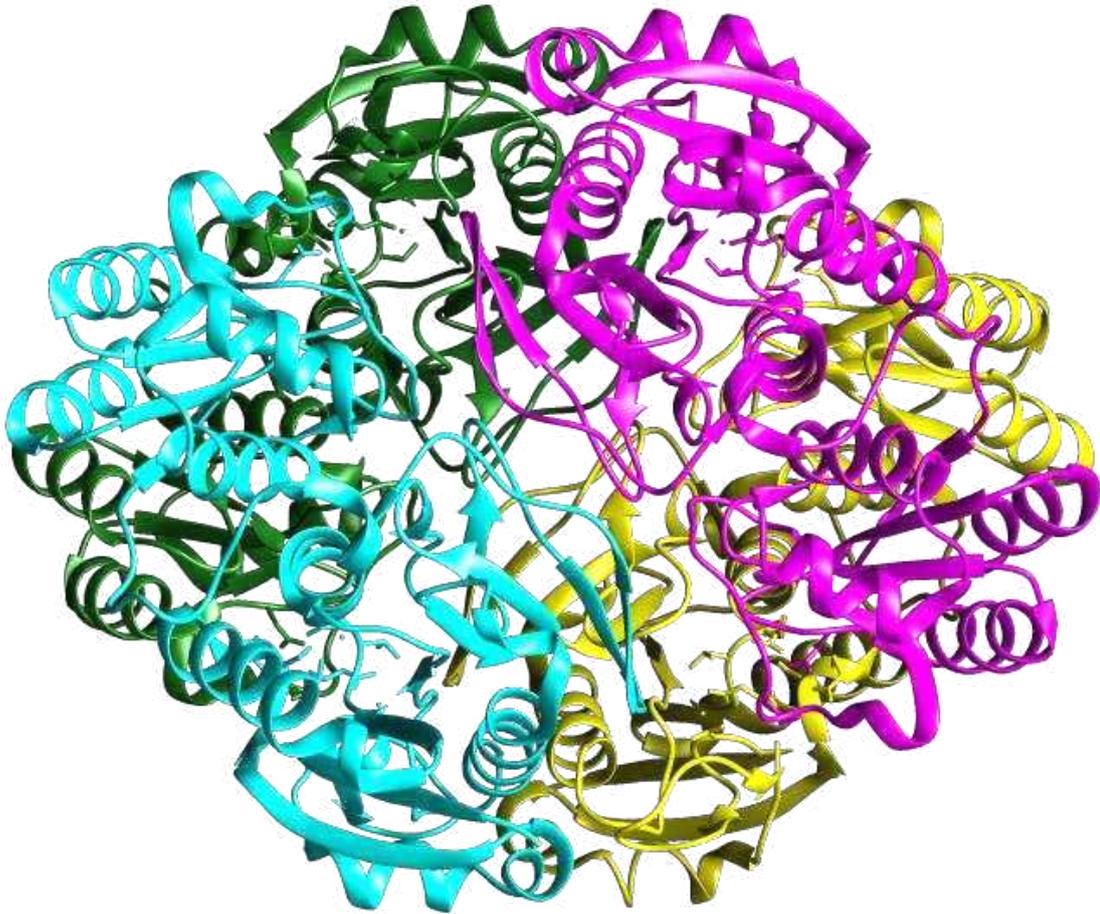
Fonte: o autor. Representação simplificada da reação de hidrólise da Asn.

Diferentes organismos possuem a capacidade de produzir L-ASNases, como microrganismos, vegetais e animais, apresentando-as em diferentes isoformas com eficiência catalítica variada. Atualmente, a classificação mais aceita dessas enzimas baseia-se nas sequências de aminoácidos, características bioquímicas e homologias estruturais e funcionais, considerando a diferenciação evolutiva. Dessa forma, as L-ASNases são divididas em três grandes grupos: tipo bacteriana, tipo vegetal e tipo rizóbia (Jia *et al.*, 2021). As L-ASNases do tipo bacteriana são ainda subdivididas em tipos I e II, enquanto as L-ASNases do tipo vegetal são consideradas do tipo III (Jia *et al.*, 2021). A diferenciação dessas enzimas do tipo bacteriana é baseada na afinidade por Asn ou Gln, dada pela constante de Michaelis-Menten (K_M), bem como pela localização celular. As L-ASNases bacterianas tipo I são enzimas citosólicas, com afinidade pela Asn reduzida (K_M na faixa de milimolar) e atividade glutaminásica específica alta, apresentando-se na forma de dímeros em sua conformação nativa, com um sítio ativo, ou seja, a unidade mínima capaz de exercer sua atividade catalítica (Castro *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2005). Já as L-ASNases bacterianas tipo II são enzimas periplasmáticas ou associadas à membrana celular, com alta afinidade pela Asn (K_M na faixa de micromolar) e atividade

glutaminásica baixa, sendo um homotetrâmero na sua forma nativa, também descrito como um dímero de dímeros contendo quatro sítios ativos (Castro *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2005). Na outra grande classe, as L-ASNases vegetais, tipo III, possuem uma estrutura distinta evolutivamente das bacterianas, sendo um heterodímero na sua forma nativa, com subunidades chamadas α e β . Essas enzimas são parte de uma superfamília de proteínas autoproteolíticas, as hidrolases de nucleófilo N-terminais (Ntn), em que as subunidades são expressas na forma de precursores inativos e passam por um processo de autoclivagem para chegar à conformação ativa (Michalska; Hernandez-Santoyo; Jaskolski, 2008). As L-ASNases do tipo rizóbias apresentam-se como homodímeros, tais como as L-ASNases do tipo I, porém não possuem relação filogenética com as enzimas de nenhuma das outras duas classes (Loch *et al.*, 2021).

Em decorrência da alta afinidade pela Asn, as L-ASNases do tipo II são as mais utilizadas e estudadas, atuando como modelo para a elucidação de mecanismos de catálise e para o desenvolvimento de sua aplicação. Dentro deste tipo, destacam-se as L-ASNases II de *Escherichia coli* (EcAII) e de *Dickeya chrysanthemi* (ErA), que há décadas são utilizadas como biofármacos em tratamentos quimioterápicos (Emerick *et al.*, 2017; Vidya *et al.*, 2011). Embora não haja um detalhamento totalmente acurado do mecanismo de catálise das L-ASNases II, a obtenção de estruturas moleculares através de cristalografia de raios-X e estudos funcionais foram capazes de estabelecer mecanismos de catálise mais prováveis para essas enzimas (Anishkin *et al.*, 2015). A primeira publicação de uma estrutura de EcAII em alta resolução foi feita em 1993, detalhando a sua estrutura, em especial o sítio ativo. A representação em *cartoon* da estrutura da EcAII está mostrada na Figura 3. Através da co-cristalização da enzima junto a um ligante, o ácido L-aspártico, foi possível indicar alguns aminoácidos presentes no sítio ativo, tais como Thr12, Ser58, Gln59, Thr89, Asp90, Ala114 e Glu283, sendo também levantada a hipótese de catálise através de um ataque nucleofílico por parte de um desses aminoácidos ao grupo β -amida da Asn (Swain *et al.*, 1993). Desde então, diversos estudos *in silico* e *in vitro* foram realizados com a tentativa de elucidar o mecanismo de catálise da EcAII, que também são aplicáveis para a maioria das L-ASNases, chegando à descoberta de outros resíduos de aminoácidos participantes da catálise (Tyr25, Lys162 e Asn248) e a dois prováveis mecanismos de ação dessa enzima: simples troca e dupla troca (Anishkin *et al.*, 2015; Lubkowski *et al.*, 2020).

Figura 3 – Representação em *cartoon* da estrutura quaternária tridimensional da EcAII

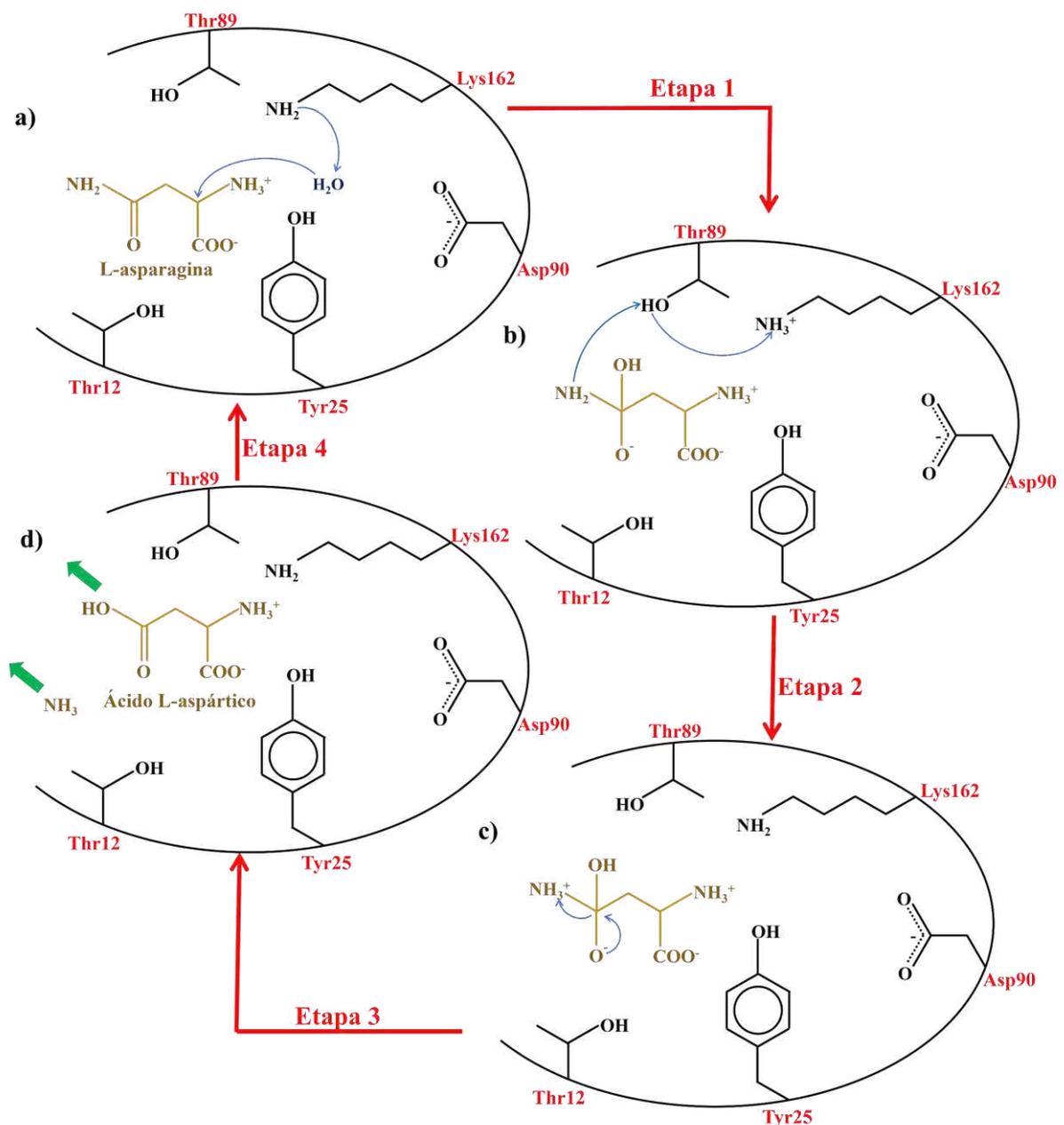


Fonte: Swain *et al.* (1993), modificado pelo autor. Visualização da estrutura tridimensional da L-ASNase de *E. coli* (EcAII), com destaque para os monômeros colorizados individualmente em ciano, magenta, amarelo e verde. Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, sob o código de acesso 3ECA, utilizando o software Chimera 1.17.1.

No mecanismo de simples troca, que está representado de forma simplificada na Figura 4 com etapas numeradas, o ataque nucleofílico inicia-se a partir de uma molécula de água, que se movimenta no sítio ativo e transfere um próton para o grupo amina do resíduo Lys162 de forma simultânea ao ataque da hidroxila ao carbono 2 da cadeia lateral do substrato (Etapa 1). O resíduo Lys162 carregado positivamente transfere então um próton para a cadeia lateral do resíduo Thr89, que por sua vez transfere um próton ao grupo amida do substrato, formando a amônia (Etapa 2). A amônia dissocia-se então do composto intermediário, simultaneamente a um rearranjo eletrônico que cria um grupo carboxílico no recém-formado aspartato (Etapa 3), e os produtos saem do sítio ativo, permitindo que a enzima realize outra catálise (Etapa 4). Os outros resíduos do sítio ativo, neste mecanismo proposto, agem através

de interações com ligações de hidrogênio, possibilitando a criação de um ambiente eletrônico que favorece a reação (Gesto *et al.*, 2013). Este mecanismo possui base em métodos computacionais teóricos, que embora expliquem em detalhes o favorecimento energético de cada etapa, discorda de evidências experimentais posteriores (Anishkin *et al.*, 2015; Gesto *et al.*, 2013).

Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de simples troca da catálise das L-ASNases

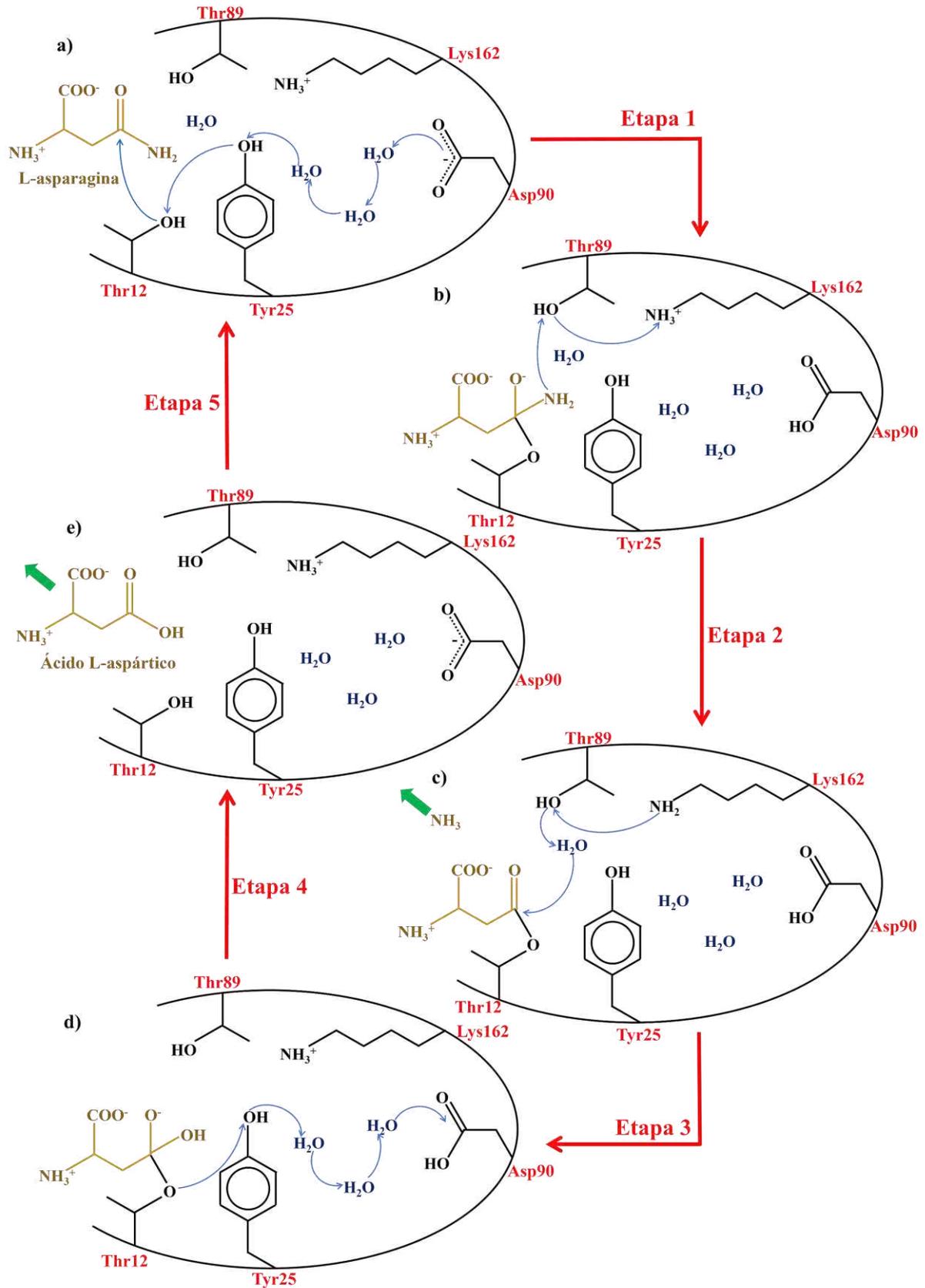


Fonte: o autor. O esquema representa o mecanismo de simples troca da catálise da L-ASNase simplificado em quatro etapas, cujas transições estão representadas pelas setas vermelhas. Os ataques nucleofílicos estão

representados por setas finas azuis, enquanto a saída de produtos está representada por setas grossas verdes. Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo estão representados apenas por suas cadeias laterais, não demonstrando necessariamente sua posição na estrutura tridimensional da enzima.

No mecanismo de dupla troca, também denominado *ping-pong*, há uma sequência de duas substituições nucleofílicas, contando com a formação de um intermediário acil-enzima (AEI), e possui evidências experimentais e computacionais, podendo ser aplicado a toda a família de L-ASNases (Jia *et al.*, 2021; Lubkowski *et al.*, 2020). Este mecanismo está esquematizado do forma simplificada na Figura 5, com etapas numeradas. Inicia-se pela ligação covalente do oxigênio da hidroxila da Thr12 com o carbono γ do substrato, com a extração simultânea de um próton dessa hidroxila para a Asp90 por um escoamento de prótons através de uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo a cadeia lateral da Tyr25 e uma cadeia de moléculas de água (Etapa 1). As mudanças estereoquímicas e eletrônicas decorrentes dessa primeira etapa desencadeiam a saída do nitrogênio da cadeia lateral do substrato, que extrai um próton da Lys162 por intermédio da Thr89, abandonando o complexo na forma de amônia e deixando um intermediário acil-enzima, um processo irreversível (Etapa 2). A Lys162, agora sem carga, extrai um próton de uma molécula de água altamente conservada nas estruturas de L-ASNase, novamente por intermédio da Thr89 (Etapa 3). A hidroxila então liberada realiza o segundo ataque nucleofílico ao grupo éster do AEI. A Asp90, que havia sido protonada, perde então o seu próton através de uma rede de moléculas de água e da cadeia lateral da Tyr25, que volta para a Thr12 (Etapa 4). Dessa forma, a ligação éster do intermediário é enfraquecida e o produto L-aspartato é liberado, permitindo que a enzima realize outra catálise (Etapa 5) (Lubkowski *et al.*, 2020).

Figura 5 – Representação esquemática do mecanismo de dupla troca da catálise das L-ASNases



Fonte: o autor. O esquema representa o mecanismo de dupla troca da catálise da L-ASNase simplificado em cinco etapas, cujas transições estão representadas pelas setas vermelhas. Os ataques nucleofílicos estão representados

por setas finas azuis, enquanto a saída de produtos está representada por setas grossas verdes. Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo estão representados apenas por suas cadeias laterais, não demonstrando necessariamente sua posição na estrutura tridimensional da enzima.

Considerando a reação catalisada pelas L-ASNases, a maioria dos métodos utilizados para quantificar sua atividade funcionam através da medida de um dos produtos formados, Asp ou NH₃. O método colorimétrico de Nessler é o mais utilizado para a quantificação de atividade das L-ASNases, através da medida de concentração de amônia (Imada *et al.*, 1973; Shifrin; Parrott, 1974). O tetraiodomercurato (II) de potássio (K₂HgI₄), presente na solução do reagente de Nessler, é capaz de reagir com NH₃, produzindo uma substância coloidal de cor amarelada cuja absorbância a 436 nm pode ser medida em espectrofotômetro. Embora muito confiável, este método sofre interferência de muitos componentes, como sais, íons metálicos e álcoois, o que suscitou o desenvolvimento de métodos alternativos para a medida de atividade dessas enzimas (Simas *et al.*, 2021). Um desses métodos, o método AHA, nomeado com base no substrato utilizado, tem como parâmetro uma outra atividade da L-ASNase, a catálise da reação de conversão do ácido β-hidroxamato L-aspartico (AHA) em Asn e hidroxilamina, bem como sua reação inversa. Dessa forma, a reação é conduzida pela incubação de L-ASNase com L-Asn, na presença de hidroxilamina, com a adição de cloreto de ferro (FeCl₃) ao final da reação, cujos íons de ferro (Fe³⁺) complexam com o AHA, gerando um composto de cor marrom com boa absorbância a 500 nm (Drainas; Kinghorn; Pateman, 1977; Grossowicz *et al.*, 1950). O método da indooxina baseia-se na mesma reação, utilizando o AHA como substrato para a catálise da L-ASNase, com formação de hidroxilamina, e consegue quantificar atividades muito baixas, com um limite mínimo de $2 \cdot 10^{-5} \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$. É utilizado então uma solução colorimétrica, contendo 8-hidroxiquinolina em meio básico, que é condensada à hidroxilamina produzida e, através de uma série de oxidações sequenciais, forma a indooxina, um corante verde, cuja absorbância pode ser medida a 710 nm (Lanvers *et al.*, 2002). Uma avaliação da eficiência dos métodos, frente a uma quantificação direta de Asp produzido na reação enzimática através de cromatografia líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) mostrou que o método de Nessler é o que fornece uma quantificação mais próxima desse método direto, apesar de superestimar a atividade. Já os métodos AHA e da indooxina, apesar de evitar problemas com interferentes de reação, subestimam o valor da atividade enzimática em comparação à quantificação por HPLC (Magri *et al.*, 2018).

As L-ASNases de *E. coli* são consideradas modelos para o estudo e engenharia de

enzimas aprimoradas, em especial a EcAII, devido a sua alta atividade específica, representada por um baixo valor de K_M , ótima estabilidade e nível de elucidação (Baral *et al.*, 2021). A utilização de EcAII no tratamento de batatas para a redução da formação de acrilamida já demonstrou, em escala laboratorial, mais de 99% de eficiência (Zyzak *et al.*, 2003). Entretanto, a enzima de *E. coli*, embora seja a mais utilizada em tratamentos médicos, não é comumente utilizada em indústrias de alimentos, sendo comercializadas atualmente apenas duas formulações de L-ASNase, Acrilaway® (Novozymes A/S, Dinamarca, produzida por *Aspergillus oryzae*) e PreventASe™ (DSM, Países Baixos, produzida por *Aspergillus niger*) (Castro *et al.*, 2021).

A L-ASNase do tipo II de *Bacillus subtilis* (BsAII), por sua vez, tem atraído mais atenção recentemente, apresentando condições de atuação, como o pH ideal próximo da neutralidade e temperatura ideal para sua atividade, similares à enzima de *E. coli*, embora apresente uma afinidade pelo substrato mais baixa (K_M maior) (Jia *et al.*, 2013; Onishi *et al.*, 2011). A BsAII já é utilizada em ensaios para mitigação da produção de acrilamida em alimentos há anos. Estudos anteriores mostraram capacidades de redução do conteúdo de acrilamida em batatas após o tratamento com BsAII variando em uma faixa de 80% até 95%, em comparação a batatas não tratadas com a enzima previamente à ação térmica (Onishi *et al.*, 2015; Sanghvi *et al.*, 2016).

Para a aplicação das enzimas em processos industriais, é interessante que elas possam ser incluídas na linha de produção sem inserir etapas, uma abordagem do tipo *drop-in*. No caso da linha de produção de batatas fritas, há uma etapa de *blanching* em que as batatas ficam banhadas em água, com aquecimento, necessária à melhoria das propriedades do produto. O *blanching* pode ser realizado num modo de baixa temperatura por tempos longos (*low-temperature long-time* – LTLT), na faixa de 55–75 °C por 10–60 min, ou num modo de alta temperatura por tempo curto (*high-temperature short-time* – HTST), na temperatura de 97 °C por 2 min (Ngobese; Workneh; Siwela, 2017). O *blanching* LTLT é o mais atrativo para aplicação direta da L-ASNase, por ter uma temperatura mais branda. Uma outra forma de aplicação da enzima no processamento de batatas é a realização de um tratamento prévio à etapa de *blanching*, com a presença da L-ASNase, em temperaturas ainda mais brandas, como o descrito por Alam *et al.* (Alam *et al.*, 2021), em que o tratamento enzimático é realizado a 37 °C durante 20 min, seguido de um *blanching* a 65 °C durante 15 min, que resultou em reduções de acrilamida de até 95%. A catálise de Asn do interior dos pedaços de batata nessas aplicações é permitida devido ao equilíbrio de moléculas extraíveis entre o alimento e a solução no entorno, permitindo o acesso das enzimas a moléculas de Asn do interior do alimento (Hendriksen;

Puder; Olsen, 2014).

Devido às particularidades das enzimas, como sua especificidade reacional, nível de atividade catalítica, estabilidade, não toxicidade e sustentabilidade, o uso dessas proteínas tem se tornado cada vez mais atraente ao uso industrial, principalmente em indústrias de alimentos e farmacêuticas, em substituição a catalisadores convencionais, como reagentes químicos e condições extremas de temperatura e pressão (Singh; Singh; Pandey, 2019). Sendo macromoléculas produzidas por seres vivos, elas podem ser obtidas de diferentes fontes de forma nativa, principalmente de microrganismos, por razões técnicas, econômicas e éticas. Entretanto, a simples extração de enzimas produzidas naturalmente não supre a quantidade demandada pela maioria das indústrias (Trono, 2019). Devido a isso, muitas enzimas de uso industrial são produzidas com a utilização da tecnologia do DNA recombinante, que permite a obtenção de resultados de mais rápidos e precisos, aumentando principalmente o nível de produção (Nair; Mary; Yadav, 2021).

1.3 Produção de enzimas recombinantes

O processo de recombinação do DNA consiste na inserção de sequências gênicas codificadoras em vetores de clonagem ou de expressão, permitindo que esse vetor seja transferido a uma plataforma de expressão, ou seja, um organismo hospedeiro, que poderá multiplicar o vetor ou expressar a proteína de interesse (Nair; Mary; Yadav, 2021). A habilidade de combinar a produção de enzimas desejadas com plataformas de expressão mais adequadas são o maior atrativo para a produção de enzimas para a indústria de alimentos, principalmente utilizando microrganismos geneticamente modificados. Dentre eles, as principais plataformas de expressão são bactérias e fungos filamentosos (Deckers *et al.*, 2020).

A maioria das enzimas para alimentos atualmente produzidas utilizam como plataformas de expressão as espécies bacterianas *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* e as espécies de fungos *A. niger* e *A. oryzae*, além de outras espécies bem comuns como *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia pastoris* (Bilal *et al.*, 2019; Olempska-Beer *et al.*, 2006; Spohner *et al.*, 2015). Por serem plataformas usadas para a expressão de enzimas que serão aplicadas em alimentos, que são consideradas aditivos alimentares, mesmo não estando na composição final, a regulação de segurança destas espécies deve ser rigorosa. Excetuando-se os microrganismos GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros, do inglês *Generally Recognized as Safe*), todas as plataformas propostas devem ser submetidas a rígida avaliação por agências regulatórias para garantir a segurança alimentar do seu produto, principalmente

quando são organismos geneticamente modificados (OGM), como é o caso dos produtores de enzimas recombinantes (Hanlon; Sewalt, 2021; Sewalt *et al.*, 2016). A cepa de *Escherichia coli* K-12, embora não amplamente utilizada na produção da maioria das enzimas para alimentos, é uma plataforma bem conhecida para expressão de proteínas recombinantes, tendo sido uma das primeiras utilizadas, na produção de quimosina recombinante (Flamm, 1991). A segurança da *E. coli* K-12 já foi atestada Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, *Environmental Protection Agency*), por já ser uma cepa de laboratório há décadas e ter perdido sua capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano ou causar outras doenças, sendo seu uso recomendado (EPA, 1997). Além disso, mais recentemente, outros aditivos alimentares produzidos pela *E. coli* K-12 tiveram sua segurança atestada e foram aprovados, por não apresentarem em sua composição riscos à saúde humana, como células microbianas ou genes de resistência a antibióticos. Este é o caso da enzima imobilizada D-psicose 3-epimerase e do adoçante glicosídeo de esteviol, como relatado em edições do EFSA Journal (Lambré *et al.*, 2021; Younes *et al.*, 2021).

A expressão de proteínas recombinantes está diretamente ligada à escolha de promotores para a regulação da transcrição dos genes, pois estes são sequências gênicas às quais os fatores de transcrição e a enzima RNA polimerase se ligam, para iniciar a transcrição do gene (Cramer, 2019). Como a afinidade do promotor pela RNA polimerase do organismo é o que define a força desse promotor, a definição do promotor a ser usado é dependente da plataforma de expressão escolhida. Os promotores podem ser classificados em induzíveis, quando necessitam da ligação de um indutor para iniciar o processo de transcrição, em constitutivos, quando ficam na conformação ativa permanentemente, sem necessidade de um ligante, e em promotores de fase estacionária, que mostram atividade apenas na fase estacionária de crescimento dos microrganismos (Duzenli; Okay, 2020). Promotores induzíveis são geralmente utilizados para controlar especificamente o período da fermentação em que o gene deve ser expresso, o que é particularmente útil para evitar a expressão pré-matura e permitir a síntese de proteínas citotóxicas (Chu *et al.*, 2023). Além disso, alguns desses promotores podem apresentar um modo de operação dependente da dose de indutor, o que além de permitir um ajuste mais preciso da concentração de proteínas produzidas, evita a formação de subpopulações de células produtoras e não produtoras (Marschall; Sagmeister; Herwig, 2017). Entretanto, a utilização de indutores para a expressão implica em um custo adicional aos processos industriais de larga-escala, principalmente considerando que alguns indutores possuem valor elevado, além de poderem apresentar efeitos tóxicos às células ou afetar outros processos metabólicos além da expressão desejada (Jervis *et al.*, 2019). Já para os promotores

constitutivos, como os níveis de expressão estão associados diretamente ao nível de crescimento dos microrganismos, não há esses problemas associados, principalmente o de custo. Além disso, eles são estáveis sob diferentes condições externas, e apresentam um baixo nível de ruído na expressão, que é a flutuação de expressão gênica célula-a-célula em um meio homogêneo (Cui *et al.*, 2019; Urchueguía *et al.*, 2021; Yan *et al.*, 2022). A maior limitação associada aos promotores constitutivos é a ausência de formas para ajustar a expressão gênica durante o crescimento, o que demanda um conhecimento prévio de sua forma de atuação para a condução de bioprocessos (Jervis *et al.*, 2019).

A expressão de proteínas em bactérias Gram-negativas, como é o caso da *E. coli*, possui algumas diferenças para a expressão em Gram-positivas. Enquanto as bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa, sendo possível a exportação de proteínas diretamente para o meio extracelular, em bactérias Gram-negativas, a presença dessa membrana faz com que proteínas sejam exportadas para o periplasma, o espaço entre as membranas interna e externa (Miller; Salama, 2018). Dessa forma, a expressão em *E. coli* pode ser citoplasmática ou periplasmática. A exportação de proteínas para o periplasma ocorre mediante a presença de um peptídeo sinal na proteína expressa, geralmente na sua posição N-terminal, que sinaliza para ativação de um sistema de transporte transmembrana, pela via dependente de Sec ou pela via Tat (*Twin-arginine-translocation*). Após o transporte para o periplasma, os peptídeos sinais sofrem uma clivagem proteolítica em locais específicos (Juibari; Ramezani; Rezadoust, 2019). A expressão recombinante de proteínas no citosol em *E. coli* frequentemente leva à formação de corpos de inclusão, devido às altas quantidade e velocidade de produção, o que provoca a agregação das proteínas. Esses corpos de inclusão são agregados insolúveis e densos, sem atividade biológica, que para ser utilizadas posteriormente necessitam passar por etapas de desnaturação e reenovelamento (Taherian *et al.*, 2019). Uma das vantagens da expressão no periplasma é evitar a formação desses corpos de inclusão, transferindo as proteínas para um espaço com menor concentração de proteínas do microrganismo e de proteases, ainda simplificando a purificação, que pode se utilizar de métodos brandos, como o choque osmótico, sem necessidade de rompimento celular através de sonicação ou outros processos mais complexos (Santos *et al.*, 2019). Além disso, como o espaço periplasmático é menos redutor do que o citoplasma, a exportação de proteínas para este ambiente permite a formação de ligações dissulfeto na estrutura, contribuindo para um enovelamento correto (Cairo *et al.*, 2022; Hentrich *et al.*, 2021). A expressão de proteínas no periplasma não se limita a este espaço, já que esses produtos podem atravessar a membrana externa para o meio extracelular em uma segunda etapa da translocação periplasmática, também envolvendo as vias dependente de Sec e Tat. A seleção

do peptídeo sinal, nestes casos, é crucial para garantir uma eficiente secreção das proteínas recombinantes, já que sua simples presença não garante um bom nível de eficiência (Seo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018). Como a purificação de enzimas diretamente do caldo de fermentação, envolvendo etapas como precipitação, extração em sistemas bifásicos, separação por membranas ou técnicas cromatográficas e possíveis combinações entre essas técnicas, é mais simples que a purificação de proteínas intracelulares, essa alternativa de produção mostra-se bastante vantajosa (Chand *et al.*, 2020).

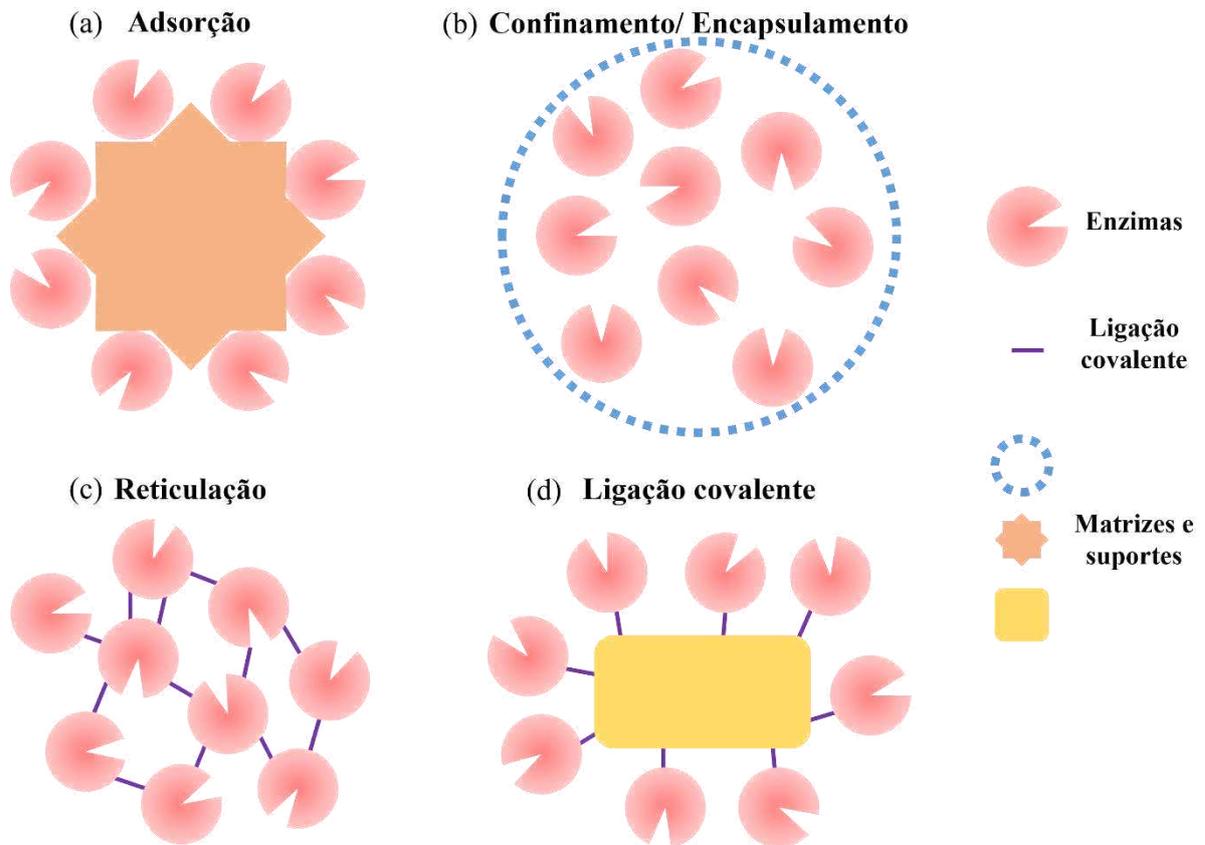
A obtenção de grandes quantidades de enzima recombinante viabiliza o suprimento de demanda industrial, mas a aplicabilidade ainda é dependente de métodos de estabilização e reutilização econômica, que podem ser alcançados por intermédio da imobilização enzimática (Maghraby *et al.*, 2023).

1.4 Imobilização enzimática

As propriedades físico-químicas da maioria das enzimas em sua conformação ativa tornam-nas altamente solúveis em diferentes solventes, o que é um problema quando se deseja recuperá-la para utilização em mais de um processo catalítico. Essa separação, em pequena escala, pode ser realizada por técnicas cromatográficas, mas fica inviável em uma escala industrial. Como a aplicação das enzimas pode representar um alto custo, por serem aplicadas apenas em um ciclo operacional e depois desativadas, é atrativo o uso de tecnologias que viabilizem a recuperação dessas enzimas para sua reutilização, como é o caso da imobilização enzimática (Sheldon; Basso; Brady, 2021). A tecnologia de imobilização enzimática consiste em uma gama de metodologias capazes de converter enzimas solúveis em biocatalisadores insolúveis, presos ou não a uma matriz de natureza que é diferente da proteica, permitindo assim a ocorrência de uma catálise heterogênea (Wahab *et al.*, 2020). Além da solução do problema de reutilização das enzimas na indústria, os usos mais recentes dessa tecnologia estão voltados à melhoria de propriedades das enzimas, tais quais estabilidade térmica e resistência mecânica. O processamento *downstream* de enzimas também pode ser facilitado pela imobilização, que pode auxiliar ou mesmo substituir etapas de purificação (Thangaraj; Solomon, 2019). Outras abordagens podem ser incorporadas a um processo de imobilização enzimática, como a simulação de ambientes celulares pela co-imobilização com cofatores e o direcionamento da enzima para evitar interação com inibidores e reagentes químicos, possibilitando a associação dessa tecnologia a outras metodologias de melhoria de propriedades enzimáticas (Rodrigues *et al.*, 2019).

O estado atual da tecnologia de imobilização é composto de uma ampla variedade de metodologias, que variam principalmente no tipo de interações físico-químicas que promovem a fixação das enzimas em matrizes insolúveis, o que implica em diferentes vantagens e desvantagens em termos catalíticos, operacionais e econômicos dependentes da alternativa escolhida (Lyu *et al.*, 2021). Um esquema dos tipos de imobilização mais comuns está mostrado na Figura 6. A imobilização reversível de enzimas se baseia em interações físicas entre as moléculas com um suporte, através de interações hidrofóbicas, interações iônicas, ligações de hidrogênio e afinidade de grupamentos, constituindo um conjunto de metodologias definidas como imobilização por adsorção física (Figura 6a). A adsorção é um dos métodos mais simples, por não exigir a formação de ligações covalentes, reduzindo mudanças conformacionais nas enzimas e tornando o processo rápido e barato, com alta recuperação de atividade, sendo mais usado com enzimas e suportes lipofílicos. Esse tipo de imobilização é capaz ainda de favorecer a formação de microambientes ideais para a atividade enzimática no interior de matrizes porosas onde as enzimas ficam acomodadas (Jesionowski; Zdarta; Krajewska, 2014; Nguyen; Kim, 2017). Entretanto, por se utilizar de ligações fracas, este método está muito sujeito à dessorção de enzimas, pela ação de moléculas detergentes, variações de temperatura e de pH no meio de reação, ainda que pequenos gradientes internos à matriz, o que limita a reutilização dos biocatalisadores. Essa perda de enzimas pode ainda ser causada por falhas no suporte, com aberturas que permitem a saída das enzimas de seus poros. Esta limitação em alguns casos, pode ser utilizada para recuperação do suporte e regeneração do biocatalisador imobilizado com novas moléculas de enzimas, mas de modo geral é um fator encarecedor do processo, aumentando a deseabilidade por métodos irreversíveis de imobilização (Liu; Chen; Shi, 2018).

Figura 6 – Tipos de imobilização enzimática



Fonte: o autor. A figura mostra a classificação dos tipos de imobilização mais comuns, indicando onde há a presença indispensável de ligações covalentes.

Os métodos irreversíveis de imobilização são bem variados, podendo envolver uma combinação entre suportes e ligações covalentes, ou apenas um desses dois aspectos para transformar a enzima em um biocatalisador insolúvel. As metodologias de confinamento e encapsulação (Figura 6b) são bem semelhantes entre si, métodos físicos que consistem no aprisionamento de enzimas em redes de fibras, géis ou em diferentes matrizes poliméricas, mas que pode haver ou não a formação de ligações covalentes entre enzima e suporte (Maghraby *et al.*, 2023). Essas técnicas são capazes de proteger as enzimas de interferências do meio externo, garantindo uma maior estabilidade para sua atividade, além de possuírem baixo custo de fabricação e uma boa resistência mecânica. Uma diversidade de materiais pode ser aplicada para a encapsulação ou confinamento de enzimas, como hidrogéis de poliacrilamida, redes metalorgânicas e lipossomas, tendo como principal limitação a transferência de massa no processo de condução do substrato à enzima (Imam; Marr; Marr, 2021; Mohammadi *et al.*, 2021). Já os processos de reticulação (Figura 6c) utilizam a formação de ligações covalentes entre as enzimas, na ausência de suportes, para prendê-las umas às outras, formando grandes

aglomerados proteicos incapazes de ser solubilizados. Um grande histórico desses processos envolve os CLEs (*cross-linked enzymes*), em que as enzimas são apenas ligadas pela adição de um agente reticulante bifuncional, os CLECs (*cross-linked enzyme crystals*), que requerem a enzima purificada para a formação de cristais e reticulação destes, e os CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*), a principal forma de reticulação sem suporte utilizada, que envolve a precipitação das enzimas para formação de agregados que então são reticulados (Cao; Van Rantwijk; Sheldon, 2000). A tecnologia de CLEAs apresenta boa reprodutibilidade, alta atividade volumétrica e pode ser associada à purificação de enzimas, porém os imobilizados apresentam baixa resistência mecânica, limitando sua aplicação (Bolivar; Woodley; Fernandez-Lafuente, 2022; Costa *et al.*, 2023).

A utilização de matrizes pré-existentes para a ligação covalente de enzimas (Figura 6d) é uma das tecnologias de imobilização mais utilizadas e bem estabelecidas, aproveitando-se de grupamentos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos para reação com grupamentos presentes no material suporte. Como muitos materiais utilizados são, de preferência, inertes, estes são modificados através de reações com compostos químicos, que os tornam ativados, estando propícios a reagir com resíduos das enzimas, formando ligações de tipo amida, éter, tioéter e carbamato (Romero-Fernández; Paradisi, 2020). A formação de ligações covalentes pode acarretar perda de atividade enzimática, por provocar rigidez em porções das enzimas que podem resultar em dificuldades de mudanças conformacionais na região do sítio ativo, o que é dependente da orientação em que se encontram os resíduos reativos na superfície da macromolécula. Além disso, quando ocorre inativação da enzima, por ser um método irreversível, não é possível recuperar o suporte para sua reutilização com enzimas frescas, como ocorre com os métodos de adsorção (Maghraby *et al.*, 2023). As vantagens desse tipo de imobilização, no entanto, superam as desvantagens, principalmente em termos industriais. Como as enzimas estão ligadas covalentemente ao suporte, os riscos de perda de moléculas são minimizados, o que além de aumentar a vida útil do imobilizado, previne a contaminação do produto industrial com o material biológico. Além disso, a ligação covalente aumenta a estereoespecificidade das enzimas imobilizadas, bem como previnem sua desnaturação frente a altas concentrações reacionais, forças iônicas, temperaturas elevadas e mudanças de pH. A possibilidade ainda de combinação com diferentes suportes, de diferentes composições químicas e estruturais, flexibilidade e porosidade permite a produção de imobilizados com alta resistência mecânica, ideais para a aplicação na indústria (Bolivar; Woodley; Fernandez-Lafuente, 2022; Zahirinejad *et al.*, 2021).

Enzimas multiméricas que possuem atividade dependente da associação de todas

os seus monômeros podem apresentar certa dificuldade para manter sua estabilidade em protocolos de imobilização. No caso de imobilização covalente em matrizes pré-existentes, a geometria do suporte influencia na imobilização destas proteínas, pois certas geometrias proteicas não promovem um contato de todos os monômeros com o suporte, como é o caso frequente de enzimas que apresentam simetria tetraédrica (Rodrigues *et al.*, 2021). Algumas estratégias podem ser tomadas para que o processo de imobilização seja capaz de estabilizar a estrutura quaternária da enzima, evitando perda de monômeros, como o recobrimento com polímeros multifuncionais, a ligação covalente multipontual, a engenharia de proteínas e a proteção em macroestruturas (Bilal *et al.*, 2019). O recobrimento de enzimas imobilizadas com polietilenoimina (PEI), por exemplo, é bastante utilizado para a proteção da estabilidade de enzimas, apresentando também um histórico de sua utilização para o recobrimento de enzimas multiméricas a fim de prevenir a dissociação de seus monômeros. Como o PEI é um polímero de tamanho variado e grande concentração de grupamentos amino, ele é capaz de ligar-se a grupos aniônicos de diferentes monômeros das enzimas, cobrindo-as (Bolivar *et al.*, 2009; Virgen-Ortíz *et al.*, 2017). A dextrana-aldeído (DA), um polímero derivado da oxidação da dextrana, também pode ser utilizada com essa finalidade de recobrimento por ser polifuncional, apresentando múltiplos grupos aldeído reativos que podem formar ligações covalente com resíduos de lisina de diferentes monômeros das enzimas. Essa abundância de grupos dispensa a especificidade de distância entre grupos reativos específicos e a flexibilidade deste agente permite a cobertura de boa parte da enzima (Mateo *et al.*, 2006; Tacias-Pascacio *et al.*, 2019).

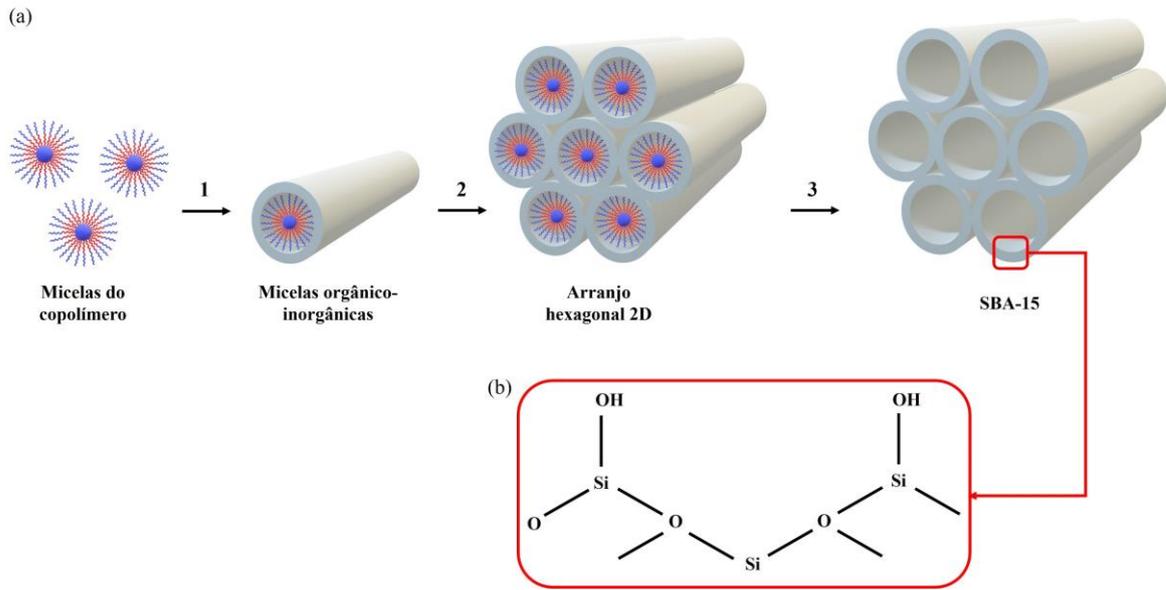
Estão disponíveis para a utilização em imobilização por ligação covalente uma vasta gama de materiais que funcionam como suportes, com característica variáveis que devem ser cuidadosamente analisadas para a seleção do suporte ideal, dependente da enzima a ser imobilizada e da aplicação a que o imobilizado se destina. Essas matrizes podem ser classificadas simplificadaamente entre materiais orgânicos, híbridos ou inorgânicos (Yushkova *et al.*, 2019). Dentre os materiais orgânicos comumente utilizados para imobilização estão a quitosana, a agarose, a celulose e o alginato, bem como novas matrizes, como as redes orgânicas covalentes (Lyu *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2023). Os materiais híbridos são compósitos que incluem partes orgânicas e inorgânicas, podendo mesclar suas vantagens, como biocompatibilidade e resistência mecânica, a fim de produzir um imobilizado com propriedades melhoradas. Alguns desses compósitos são a sílica-lignina, as nanopartículas magnéticas cobertas com quitosana e compósitos sílica/quitosana (Yushkova *et al.*, 2019; Zdarta *et al.*, 2018). Muitos são os suportes inorgânicos com aplicabilidade para a imobilização, como nanopartículas, em especial as magnéticas, matrizes sol-gel, cerâmicas porosas, alumina,

titânia, zircônia e sílicas (Yushkova *et al.*, 2019; Zucca; Sanjust, 2014). As sílicas, em particular, são frequentemente utilizadas para imobilização devido à facilidade de ligação a enzimas e de funcionalização e ativação, devido a apresentarem superfície repleta de grupamentos hidroxila (Romero-Fernández; Paradisi, 2020).

1.4.1 Suporte Santa Barbara Amorphous-15

Os materiais mesoporosos são estruturas com diâmetro de poro em escala nanométrica, em torno de 2 a 50 nm, o que os torna muito desejáveis para a utilização com moléculas biológicas devido ao seu grande volume de poro e grande área superficial. As sílicas mesoporosas são alguns dos mais utilizados dentre esses materiais, devido à sua inércia química, estabilidade e baixo custo, como é o caso do *Santa Barbara Amorphous-15* (SBA-15) (Verma *et al.*, 2020). O SBA-15 em particular possui poros maiores do que a maioria das sílicas mesoporosas, sendo produzido a partir da condensação de íons silicato em volta de micelas de um copolímero tribloco por um mecanismo de automontagem cooperativa, formando uma estrutura altamente ordenada, como esquematizado na Figura 7 (Zhao *et al.*, 1998). O copolímero tribloco utilizado para a produção do SBA-15 é o Plurônico P-123 (PEG-PPG-PEG), que forma micelas esféricas inicialmente, mas que, a partir da deposição dos íons silicato (etapa 1), transformam-se em micelas cilíndricas orgânico-inorgânicas. A ordenação dessas micelas em um arranjo hexagonal 2D (etapa 2) promove a condensação e precipitação das estruturas, que após um tratamento térmico, fixam a estrutura sílica, permitindo a remoção do copolímero (etapa 3) (Zholobenko *et al.*, 2008). O processo final de calcinação densifica a estrutura e aumenta o tamanho dos poros, produzindo um material com múltiplas características favoráveis à sua utilização, como alta estabilidade térmica e hidrotérmica, paredes de poro grossas e alta estabilidade mecânica (Verma *et al.*, 2020; Zholobenko *et al.*, 2008).

Figura 7 – Síntese do SBA-15



Fonte: o autor. Etapas de síntese do SBA-15 a partir do mecanismo de automontagem cooperativa (a), como descrito por Zholobenko *et al.* (2008). As etapas do mecanismo estão numeradas, sendo a deposição de íons silicato (1), a ordenação das micelas no arranjo hexagonal 2D (2) e a remoção do copolímero (3). Destaque para os grupamentos silanol na superfície do SBA-15 (b).

A estrutura superficial do SBA-15, rica em grupos silanol (Figura 7b), bem como seu tamanho de poros, área superficial e inércia, tornam este material muito adequado à imobilização de enzimas por adsorção, reduzindo limitações difusionais de substrato e produto que normalmente ocorre em outros suportes porosos (Ben Shir; Kababya; Schmidt, 2014; Kingchok; Pornsuwan, 2020). Além disso, a funcionalização do SBA-15 pode ser realizada pela adição de grupamentos mais suscetíveis a reações, como amina, tiol, sulfonil e carbonil, permitindo a sua utilização para imobilização covalente de enzimas, o que já foi feito em uma gama de estudos, incluindo para a imobilização de L-ASNase, permitindo trazer para mais tipos de enzimas as vantagens de estabilidade mecânica e térmica e a alta recuperação de atividade catalítica (Cárdenas; Giraldo; Moreno-Piraján, 2022; Khanmohammadi *et al.*, 2020; Noma *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Em uma perspectiva mundial, a preocupação acerca do consumo de acrilamida já tem sido suficiente para suscitar políticas de saúde pública visando a redução da presença de acrilamida nos alimentos industrializados. O comitê de especialistas em aditivos alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)) recomenda, além da continuidade de estudos longitudinais acerca da exposição dietética a acrilamida, a continuidade do desenvolvimento de métodos para mitigação deste contaminante nos alimentos (Mueller *et al.*, 2011). Na Europa, a Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos (EFSA) monitora os níveis de acrilamida nos alimentos desde 2007, e as indústrias passaram a buscar a redução desse composto em seus produtos, baseado em regulamentação (2017/2158) (Mustătea; Popa, 2015; Muttucumaru *et al.*, 2017; Official Journal of the European Union, 2017; Sarion; Codinã; Dabija, 2021). Em 2018, um juiz da Suprema Corte de Los Angeles decidiu que a Starbucks Corp. e outras empresas de café deveriam elaborar avisos de que em seus produtos havia acrilamida, potencialmente carcinogênica (CBS News, 2018).

No Brasil, não há uma legislação acerca do controle da acrilamida presente nos alimentos, apenas informes elaborados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) acerca de seus riscos (ANVISA, 2007). Os métodos de mitigação da acrilamida que têm sido utilizados envolvem a utilização das enzimas L-asparaginases, capazes de clivar o precursor Asn, evitando a formação de acrilamida nos processos de aquecimento dos alimentos. O primeiro estudo de exposição da população brasileira à acrilamida em produtos alimentícios foi realizada em 2008, e através de métodos estatísticos chegou às principais fontes de exposição à acrilamida, sendo elas a batata frita, o café, a farinha de mandioca torrada, o biscoito salgado e o pão francês (Arisseto; Toledo, 2008). O estudo apontou ainda que as margens de consumo de produtos com esse composto no Brasil, relacionadas a seus efeitos carcinogênicos, indicam preocupação à saúde humana.

A aplicação de L-ASNase nas indústrias de alimentos representa uma inovação com potencial de incremento à qualidade de vida da população, por meio da prevenção. A produção dessa enzima por um sistema de expressão em *E. coli* recombinante e, de preferência constitutivo e periplasmática, se justifica pela alta produção que pode ser obtida no caldo fermentado. O produto deste projeto, um biocatalisador formado por L-ASNase imobilizada em SBA-15, será classificado como ingrediente destinado exclusivamente ao uso industrial, para o qual as quantidades máximas de microrganismos em alimentos estabelecidos pela Instrução

Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019 não são aplicáveis, segundo a RDC N° 331, de 23 de dezembro de 2019. Ainda assim, a enzima será separada dos demais produtos da bactéria, bem como de suas células, através de centrifugação e imobilização, podendo ser separada do alimento para reutilização, garantindo a completa segurança da enzima, como já relatado para outras enzimas alimentares imobilizadas produzidas em *E. coli* recombinante (Lambré *et al.*, 2021).

A melhor aplicação, a nível nacional, para a L-ASNase imobilizada é na indústria de batatas-fritas, por ser um dos alimentos que mais contribuem para o consumo de acrilamida da população brasileira. Há inclusive modelos já desenvolvidos de aplicação de L-ASNase imobilizada em batatas, devido à não necessidade de mistura dos biocatalisadores diretamente com o alimento, como seria o caso de massas de pães e biscoitos, para os quais a enzima livre seria mais útil (Hendriksen; Puder; Olsen, 2014).

O Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde (GEPeSS), da Fiocruz-CE, conta com um histórico de estudos de L-ASNases. Tanto as L-ASNases microbianas, de *E. coli* e *B. subtilis*, quanto a L-ASNase humana têm sido estudadas com foco na aplicação em tratamentos contra LLA, em projetos já concluídos e em andamento (Caetano, 2020; Guimarães; Frota; Lourenzoni, 2021; Guimarães, 2019). Este trabalho é o primeiro do grupo a focar na aplicação de L-ASNase para a indústria de alimentos, utilizando-se das enzimas microbianas já estudadas pelo grupo e do sistema de expressão desenvolvido na empresa Verdartis (Lourenzoni *et al.*, 2016). O Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) trabalha em outra frente, na imobilização de enzimas, contando com vasto repertório de trabalhos publicados acerca do tema. O suporte SBA-15 já tem sido trabalhado no grupo de pesquisa e em grupos parceiros, sendo utilizado para lipases em projetos já concluídos e em andamento, sendo também aplicado para L-ASNase neste trabalho (Cipolatti *et al.*, 2021; Rios *et al.*, 2018, 2022).

3 HIPÓTESES

A) É possível alcançar boa produção de L-ASNase de *E. coli* e de *B. subtilis* através da expressão heteróloga em *E. coli*, por meio da aplicação de um modelo de batelada em frascos agitados, usando vetor constitutivo para a expressão no caldo de cultivo.

B) É viável o desenvolvimento de processo de produção de biocatalisadores com L-ASNase imobilizada em suporte, com alta atividade e estável para o uso na indústria de alimentos.

4 OBJETIVOS

Este trabalho almeja a obtenção de uma alta produção de L-ASNases recombinantes e a estruturação de um imobilizado enzimático estável para aplicação no pré-tratamento de batatas fritas.

4.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral deste projeto, é estabelecida uma série de etapas para a produção da enzima e desenvolvimento do produto, L-ASNase imobilizada. Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Clonar a L-ASNase de *E. coli* (EcAII) e de *B. subtilis* (BsAII) em células de *E. coli* com vetor de expressão constitutiva.
- b) Verificar a expressão de L-ASNases em tubos em shaker.
- c) Produzir L-ASNases em frascos em shaker.
- d) Desenvolver etapas *downstream* de recuperação das enzimas recombinantes.
- e) Imobilizar EcAII em SBA-15.
- f) Otimizar condições de imobilização.
- g) Avaliar estabilidade e reutilização de imobilizados.
- h) Caracterizar imobilizados e EcAII quanto a cinética enzimática e condições de atuação.

5 METODOLOGIA

5.1 Material biológico

No presente trabalho, foram utilizados como objeto de estudo as enzimas L-asparaginases II provenientes de *E. coli* (EcAII) e *B. subtilis* (BsAII). O estudo partiu das sequências gênicas codificadoras dessas enzimas para clonagem em plasmídeos de expressão recombinante. Os genes codificadores da EcAII (*ansB*) e da BsAII (*ansZ*) foram obtidos a partir de vetores pET28 transformados pertencentes ao grupo de pesquisa. As sequências dos genes, bem como as sequências de aminoácidos traduzidas a partir deles, estão mostrados nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Gene *ansB* e sequência proteica de EcAII

<p><i>ansB:</i> ATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCACTTGCCGCACTGGTTATGGGTTTTAGTGGTGCAGCATTGGC ATTACCCAATATCACCATTTTAGCAACCGGCGGGACCATTGCCGGTGGTGGTGACTCCGCAACCAA ATCTAACTACACAGCGGGTAAAGTTGGCGTAGAAAATCTGGTTAATGCGGTGCCGCAACTGAAGG ACATTGCGAACGTTAAAGGCGAGCAGGTAGTGAATATTGGCTCCCAGGACATGAACGATGATGTC TGGCTGACACTGGCGAAAAAATTAACACCGACTGCGATAAACTGACGGCTTCGTCATTACCCA CGGTACCGACACGATGGAAGAAACCGCTTACTTCCTCGACCTGACGGTGAAATGCGACAAACCG GTGGTGATGGTCCGGTCAATGCGTCCCGTCCACGTCTATGAGCGCAGACGGTCCATTCAACCTGTAT AACGCGGTAGTGACTGCAGCTGATAAAGCCTCCGCTAATCGTGGCGTACTGGTAGTGATGAACGA CACCGTGCTTGATGGCCGTGATGTCACCAAACCAACACCACCGATGTAGCGACCTTCAAGTCTG TAACTACGGTCCCTCTGGGTTACATTCACAACGGTAAGATTGACTACCAACGTACCCCGGCACGTA AGCACACCAGCGACACGCGTTCGATGTCTCTAAGCTGAATGAACTGCCGAAAGTCGGCATTGTT TATAACTACGCTAACGCATCCGATCTTCCGGCTAAAGCACTGGTAGATGCGGGCTATGATGGCATC GTTAGCGCTGGCGTGGGTAACGGCAACCTGTATAAACCGTATTTGACACCCTTGCAACCGCTGC GAAAAACGGCACTGCAGTAGTGCCTTCCCGCGTACCGACGGGCGCTACCACTCAGGATGCCG AAGTGGATGATGCGAAATACGGCTTCGTCGCCTCTGGCACGTTGAACCCGCAAAAAGCGCGCGTT CTGCTGCAACTGGCTCTGACGCAAACTAAAGATCCGCAGCAGATCCAGCAGATCTTCAATCAGTA CTAA</p>
<p>EcAII: MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKVGVENLVNAVPLKDIA NVKGEQVVNIGSQDMNDDVWLTAKKINTDCDKTDGDFVITHGTDMEETAYFLDLTVKCDKPVVM VGAMRPSTSMSADGPFNLNAVVTAAADKASANRGLVVMNDTVLDGRDVTKTNTTDDVATFKSVNY GPLGYIHNGKIDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGVISAG VGNGNLYKTVFDTLATAAKNGTAVVRRSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLA LTQTKDPQQIQQIFNQY</p>

Fonte: base de dados GenBank®, sob o identificador de acesso EU895745.1.

Quadro 3 – Gene *ansZ* e sequência proteica de BsAII

<p><i>ansZ</i>: ATGAAAAACAACGAATGCTCGTACTTTTTACCGCACTATTGTTTGT TTTTACCGGATGTTACATT CTCCTGAAACAAAAGAATCCCCGAAAGAAAAAGCTCAGACACAAAAGTCTCTTCGGCTTCTGC CTCTGAAAAAAGGATCTGCCAACATTAGAATTTTAGCGACAGGAGGCACGATAGCTGGTGCCG ATCAATCGAAAACCTCAACAACCTGAATATAAAGCAGGTGTTGTCGGCGTTGAATCACTGATCGAG GCAGTTCAGAAATGAAGGACATTGCAAACGTGACGGCGAGCAGATTGTTAACGTCGGCAGCA CAAATATTGATAATAAAATATTGCTGAAGCTGGCGAAACGCATCAACCACTTGCTCGCTTCAGATG ATGTAGACGGAATCGTCGTGACTCATGGAACAGATACATTGGAGGAAACCGCTTATTTTTTGAATC TTACCGTGAAAAGTGATAAACCGGTTGTTATTGTCCGTTTCGATGAGACCTTCCACAGCCATCAGCG CTGATGGGCTTCTAACCTGTACAATGCAGTGAAAAGTGGCAGGTGCCCTGAGGCAAAAAGGGAA AGGGACGCTTGTGTCTTAACGACCCGATTGCCTCAGCCGATATGTCACCAAAACAAACACAA CTACAACAGATACATTTAAATCAGAAGAAATGGGCTTCGTGCGGAACAATTGCAGATGATATCTATT TTAATAATGAGATTACCCGTAAGCATAACGAAGGACACGGATTTCTCGGTTTCTAATCTTGATGAGCT GCCGCAGGTTGACATTATCTATGGATACAAAATGACGGAAGCTACCTGTTTGACGCTGCTGTAAA AGCCGGAGCAAAGGGGATTGTATTGCCGGTTCTGGGAACGGGTCTTTATCTGATGCAGCCGAAA AAGGGCGGACAGCGCAGTCAAAAAGCGGTTACAGTGGTGCCTCTACCCGCACGGGAAATG GTGTCGTCACACCAACCAAGACTATGCGGAAAAGGACTTGCTGGCATCGAACTCTTTAAACCCC CAAAAAGCACGGATGTTGCTGATGCTTGCCTTACCAAAAACAATGATCCTCAAAAATCCAAGC TTATTTCAATGAGTATTAA</p>
<p>BsAII: MKKQRMLVLF TALLFVFTGCSHSPPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLPNIRILATGGTIAGADQS KTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIV VTHGDTLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPSTAISADGPSNLYNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLND RIASARYVTKNTTTTDFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSVSNLDEL PQVDIYGYQN DGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGLSDAAEKGADSAVKKGVTVVRSTRTGNGV VTPNQDYAEK DLLASNSLNPQKARMLLMLALTKTNDPQKIQAYFNEY</p>

Fonte: base de dados European Nucleotide Archive, sob o identificador de acesso AGT62618.1.

A sequência sinal original que está presente nos genes não foi utilizada, pois os cassetes de expressão dos vetores utilizados neste trabalho possuem sua própria sequência sinal para exportação, com códon iniciador da tradução. Dessa forma, tais sequências sinal nativas não foram consideradas na montagem de primers para a amplificação dos genes.

Os plasmídeos utilizados no presente trabalho foram obtidos do estoque do grupo de pesquisa. Os vetores, chamados RPA e RPC, são versões do plasmídeo pT7BsXA, derivado do plasmídeo pT7T3-18U, com modificações na origem de replicação e com a presença de um cassete de expressão constitutiva (Patente BR 102014017026-0 A2) (Lourenzoni *et al.*, 2016). Ambos possuem gene de resistência à ampicilina, antibiótico que foi utilizado para selecionar culturas transformadas com esses vetores.

5.2 Construção dos plasmídeos de expressão de L-asparaginase II

Os primers utilizados no presente trabalho foram obtidos da ThermoFisher Scientific. O gene *ansB*, contido em um vetor pET28, foi utilizado como molde para uma amplificação por PCR, com adição de sequência codificadora para cauda de poli-histidina

(sequência-His) no final da sequência do gene, no que corresponde à posição C-terminal da proteína (produto de PCR chamado *ansB_HisC*). Este produto de PCR foi utilizado como molde para outra amplificação, modificando-se a posição de adição da sequência-His para o início do gene, correspondente à posição N-terminal da proteína (produto de PCR chamado *ansB_HisN*). O gene *ansZ*, contido em um vetor pET28, também foi utilizado como molde para uma amplificação por PCR com adição de sequência-His no correspondente à posição C-terminal da proteína (produto de PCR chamado *ansZ_HisC*). Este produto de PCR também foi utilizado como molde para outra amplificação, com mudança do local de adição de sequência-His para o correspondente à posição N-terminal da proteína (produto de PCR chamado *ansZ_HisN*). As sequências dos primers utilizados estão mostradas no Quadro 4. Foram adicionadas aos primers sequências referentes aos sítios de restrição das enzimas NheI e BamHI, nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente. A PCR foi realizada com a enzima GoTaq® DNA Polymerase, seguindo 35 ciclos de desnaturação a 98 °C/20 s, anelamento a 60 °C/30 s e extensão a 72 °C/1 min. Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose para verificação da amplificação, e foram posteriormente purificados com o Agarose Gel Extraction Kit® (Cellco Biotec do Brasil Ltda).

Quadro 4 – Sequências de primers utilizados nas amplificações por PCR

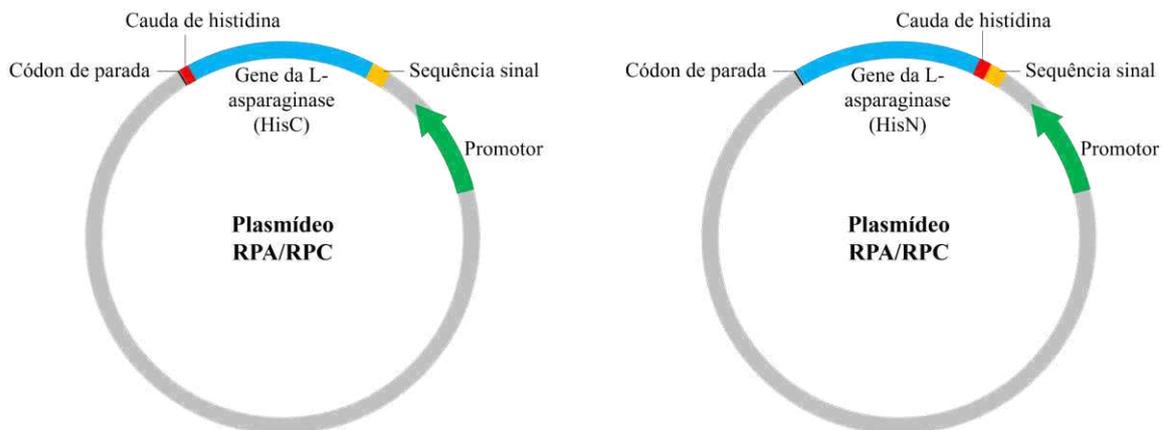
Produto de PCR	Primers
<i>ansB_HisC</i>	Forward: 5'-ATATGCTAGCTTACCCAATATCACCATT-3' Reverse: 5'-ATCAGGATCCTTAATGATGATGATGATGGTACTGATTGAAGATCTG-3'
<i>ansB_HisN</i>	Forward: 5'-ATATGCTAGCCATCATCATCATCATCATTACCCAATATCACCATT-3' Reverse: 5'-ATCAGGATCCTTAGTACTGATTGAAGATCTG-3'
<i>ansZ_HisC</i>	Forward: 5'-ATATGCTAGCCCTGAAACAAAAGAATCC-3' Reverse: 5'-ATCAGGATCCTTAATGATGATGATGATGATACTCATTGAAATAAGC-
<i>ansZ_HisN</i>	Forward: 5'-ATATGCTAGCCATCATCATCATCATCCTGAAACAAAAGAATCC-3' Reverse: 5'-ATCAGGATCCTTAATACTCATTGAAATAAGC-3'

Fonte: o autor. Sequências de primers utilizadas para amplificação dos genes *ansB* e *ansZ* por PCR, com inserção de caudas de histidina. As sequências sublinhadas nos primers referem-se aos sítios de restrição das enzimas NheI (GCTAGC) e BamHI (GGATCC), nos primers *forward* e *reverse*, respectivamente.

Para a montagem dos plasmídeos após a amplificação, tanto os produtos de amplificação *ansB_HisC*, *ansB_HisN*, *ansZ_HisC* e *ansZ_HisN* quanto os vetores RPA e RPC

foram digeridos com as enzimas NheI e BamHI (Promega®), seguindo as etapas em termociclador de 3 h a 37 °C e 15 min a 65 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após digestão, apenas os vetores foram tratados com fosfatase TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega®), em termociclador a 37 °C durante 1 h e a 74 °C durante 15 min. Os vetores digeridos foram então aplicados em gel de agarose 1% para a separação dos vetores vazios de seus insertos prévios, e os vetores vazios foram excisados do gel para purificação com o Agarose Gel Extraction Kit®. Os produtos de amplificação *ansB_HisC*, *ansB_HisN*, *ansZ_HisC* e *ansZ_HisN* digeridos anteriormente foram também purificados com o mesmo kit. Os vetores e genes foram combinados um a um para a reação de ligação, que foi realizada através da incubação do vetor e gene desejado na presença de DNA T4 Ligase (Promega®) a 4° C por 16 horas, seguido de 70 °C por 10 min, em termociclador, de acordo com protocolo do fabricante, gerando os plasmídeos RPA_ansB_HisC, RPC_ansB_HisC, RPA_ansB_HisN, RPC_ansB_HisN, RPA_ansZ_HisC, RPC_ansZ_HisC, RPA_ansZ_HisN e RPC_ansZ_HisN. Uma representação esquemática desses plasmídeos, apresentando a diferença dependente da posição da inserção da cauda de histidina, está apresentada na Figura 8.

Figura 8 – Esquema das principais sequências gênicas nos plasmídeos contendo gene da L-ASNase com sequência-His ao final (esquerda) ou no início (direita) do gene



Fonte: o autor. O esquema mostra a diferença no posicionamento da sequência codificadora da cauda de histidina (em vermelho) adicionada ao gene em relação ao sentido de expressão indicado pelo promotor (em verde). A sequência sinal de 66 pb está indicada em laranja na imagem, e o gene (981 – 1059 pb) está indicado em azul.

5.3 Transformação das bactérias *E. coli*

Os plasmídeos construídos foram inseridos em células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes por choque térmico, na presença de CaCl₂ 5 mM e MgCl₂ 10 mM, pela

sequência de 30 min em gelo, seguido de 40 s a 42 °C e, por fim, mais 1 min em gelo. As células transformadas foram regeneradas durante 1 hora em meio SOC (triptona 20 g·L⁻¹, extrato de levedura 5 g·L⁻¹, NaCl 0,584 g·L⁻¹, KCl 0,186 g·L⁻¹, Mg 0,02 M, glicose 0,02 M) estéril e posteriormente plaqueadas em placas de ágar Luria Bertani (LB ágar) suplementado com ampicilina 100 mg·L⁻¹.

Foi feita PCR de colônia para 10 colônias selecionadas de cada placa, utilizando-se como molde para a PCR metade da superfície das colônias, e utilizando como primers os mesmos utilizados para a amplificação dos genes *ansB* e *ansZ*. Os clones corretos foram confirmados pela verificação do tamanho esperado das sequências amplificadas, em gel de agarose 1%. 3 colônias selecionadas de cada placa foram utilizadas como iniciadoras para o cultivo de pré-inóculo, em caldo Luria Bertani (LB) suplementado com ampicilina 100 mg·L⁻¹. Os pré-inóculos foram mantidos a 37 °C durante 16 h, sob agitação de 200 rpm em plataforma agitadora.

Parte de cada amostra de pré-inóculo foi utilizada para a extração de DNA plasmidial através do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®), enquanto outra parte de cada amostra foi utilizada como base para um estoque em 25% de glicerol, que foi mantido a -80 °C. Os estoques foram nomeados de acordo com os plasmídeos que receberam e com as colônias selecionadas. O DNA plasmidial extraído de todas as amostras foi encaminhado para realização do sequenciamento de Sanger em instituição parceira, com a utilização dos primers M13, padrão para os vetores derivados de pT7T3-18U.

5.4 Expressão de proteínas recombinantes em tubos em shaker

A expressão proteica das cepas transformadas foi verificada através do cultivo das células em tubos Falcon em shaker, utilizando-se raspagens dos estoques mantidos a -80 °C como culturas iniciadoras dos pré-inóculos. Cada pré-inóculo consistiu em 2,5 mL de caldo de expressão complexo (triptona 35 g·L⁻¹, extrato de levedura 20 g·L⁻¹, cloreto de sódio 10 g·L⁻¹), suplementado com ampicilina 100 mg·L⁻¹, aos quais foram adicionadas as culturas iniciadoras dos estoques de RPA_ansB_HisC, RPC_ansB_HisC, RPA_ansB_HisN, RPC_ansB_HisN, RPA_ansZ_HisC, RPC_ansZ_HisC, RPA_ansZ_HisN e RPC_ansZ_HisN. Os pré-inóculos foram cultivados em tubos de 50 mL com tampas perfuradas, em estante de tubos inclinada (ângulo de 63,4 °) fixa em shaker New Brunswick™ Innova® 44/44R, a 200 rpm e 37 °C durante 16 h.

De cada pré-inóculo foram retirados 100 μL para início da expressão em novos tubos inclinados contendo 10 mL de caldo de expressão complexo suplementado com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foram mantidos durante 48 horas sob agitação de 200 rpm a 37 °C. Após 24 horas de cultivo, foi realizada nova suplementação com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. As culturas foram centrifugadas a 8000 x g e 4 °C durante 10 min para separação das células e do caldo fermentado. As células foram ressuspensas em tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, em volume igual ao do caldo inicial. As amostras de células e de caldo fermentado foram então analisadas por eletroforese.

5.5 Expressão de proteínas recombinantes em frascos em shaker

Raspagens dos estoques de RPC_ansB_HisN e RPC_ansZ_HisN foram utilizadas para inocular placas de LB ágar suplementado com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foram incubadas a 37 °C em estufa durante 24 h. Uma colônia de cada placa foi utilizada como cultura iniciadora de pré-inóculos, em 5 ml de caldo de expressão complexo suplementado com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foi incubado em tubos agitados em shaker a 200 rpm e 37 °C, durante 16 h. De cada pré-inóculo foram retirados 2,5 mL para inocular 250 mL de caldo de expressão complexo suplementado com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em erlenmeyers de 1 L, que foram então incubados em shaker, a 200 rpm e 37 °C, durante 48 h. Após 24 h de cultivo, foi realizada nova suplementação com ampicilina 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ao final da expressão, foram retiradas alíquotas dos cultivos para a medida de densidade óptica, avaliação de massa seca e avaliação da expressão por eletroforese. As culturas foram centrifugadas a 8000 x g e 4 °C durante 10 min para obtenção do caldo fermentado livre de células.

A densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) foi medida em espectrofotômetro, com utilização do caldo de expressão complexo não inoculado para realizar o branco do equipamento. A massa seca foi obtida através da centrifugação de 1,5 mL de cada cultura em microtubos previamente pesados. O caldo de cada microtubo foi descartado e o *pellet* celular foi seco em estufa a 60 °C durante 72 h, com medidas da massa em balança analítica até estabilização da medida.

5.6 Obtenção de proteínas do caldo fermentado

Para a separação das proteínas presentes no caldo fermentado, após a centrifugação para retirada das células, as amostras foram submetidas a uma etapa de floculação com sulfato

de zinco (ZnSO_4), a uma concentração metálica de 1 g/L. As amostras foram mantidas em mesa agitadora, em gelo, durante 10 min e depois novamente centrifugadas a $8000 \times g$ e 4°C durante 10 min, para a retirada dos flocos formados por restos de células. As amostras foram então precipitadas com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 50% m/v, que foi adicionado lentamente sob agitação constante a 4°C . Após uma incubação durante 16 horas, as amostras foram centrifugadas a $10000 \times g$ e 4°C durante 30 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de proteínas formado foi ressolubilizado em tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, em volume correspondente a 10% do volume inicial de caldo fermentado, constituindo assim extratos proteicos de EcAII (proveniente da cultura de RPC_ansB_HisN) e de BsAII (proveniente da cultura de RPC_ansZ_HisN).

5.7 Análises eletroforéticas

As análises de DNA realizadas nos procedimentos de PCR e digestão foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, sob voltagem fixa de 80 V. Foi adicionado nas amostras e no marcador de peso molecular o tampão 6X DNA Loading Buffer (TransGen Biotech Co.®) contendo GelRed®, para a marcação fluorescente das bandas de DNA. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia®). Os resultados das eletroforeses de DNA foram analisados e as imagens capturadas no fotodocumentador Invitrogen™ iBright FL1000 Imager, no modo “Nucleic acid gel”.

As análises dos perfis de proteínas nas diferentes amostras foram realizadas através de eletroforeses em gel de poliacrilamida 12,5%, com coloração azul de Coomassie. Utilizou-se como marcador de peso molecular para essas análises o TrueColor High Range Protein Marker S2600 (9-245 kDa) (Sinapse Biotecnologia). As amostras foram preparadas através da mistura de 20 μL de amostra de proteínas com 5 μL de tampão de amostra 5X (com β -mercaptoetanol 1% v/v), com incubação a 100°C durante 10 min. A cada poço do gel, foram aplicados 10 μL das amostras preparadas. As corridas foram realizadas em cuba vertical, com amperagem fixa de 0,025 A, por gel. O fotodocumentador iBright FL1000 foi utilizado para a realização de uma quantificação relativa por densitometria em amostras de gel de proteínas, para a estimativa da abundância de determinada banda em algumas amostras.

Foram realizadas também algumas análises de proteínas expressas através de Western Blotting, com a marcação de caudas de poli-histidina. Para isso, realizou-se a transferência das amostras de um gel de eletroforese, logo após sua corrida, para uma membrana de nitrocelulose (Nitrocellulose Membrane 0,45 Micron, Thermo Scientific). Para isso, o gel

foi posto acima da membrana de nitrocelulose, entre folhas de papel de filtro umedecidas com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, metanol 20% (v/v)), e esse conjunto foi inserido no equipamento de eletrotransferência Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, sob as condições de 1,3 A e 25 V durante 12 min. A membrana foi então incubada em solução Tampão fosfato-salino (PBS) adicionado de Tween 0,05% (PBS-T) e suplementado com leite desnatado em pó 5% m/v (PBS-T Milk) durante 16 h a 4 °C. Posteriormente a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T e incubada durante 1 hora em solução do anticorpo anti-poli-histidina conjugado a fosfatase alcalina (Anti-polyHistidine–Alkaline Phosphatase antibody, Mouse monoclonal, SigmaAldrich®) em proporção 1:5000 em PBS-T. Após a incubação, a membrana foi lavada mais 3 vezes com PBS-T e revelada através da recirculação de 1 mL de Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega®) na sua superfície, até o aparecimento de bandas.

5.8 Quantificação de proteínas

As proteínas produzidas durante este trabalho foram quantificadas através do Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific), seguindo as orientações do manual do usuário. Foi preparada uma solução de trabalho (WR) através da mistura do reagente A e do reagente B fornecidos no kit na proporção de 50:1, respectivamente. As amostras foram então analisadas através da mistura de 25 µL de cada amostra com 200 µL de WR em microplaca de 96 poços, com incubação a 37 °C durante 30 min, sob abrigo da luz. Foi feito um branco da reação pela mistura de 25 µL da solução tampão nas quais as amostras estavam contidas com 200 µL de WR. Foi utilizado o procedimento de microplaca, com leitura de absorbância a 562 nm em leitora de placas (EnVision® 2105, PerkinElmer®), e as absorbâncias foram analisados com base em curva padrão de albumina de soro bovino (BSA), preparada de acordo com os materiais e orientações fornecidas no kit. A curva padrão feita com o padrão de BSA está contida no Apêndice A.

5.9 Quantificação de atividade enzimática

A atividade asparaginásica das amostras utilizadas neste trabalho foi avaliada através do método de Nessler, como estabelecido por Shifrin *et al.* (1974), com modificações. O método consiste em duas etapas, sendo a primeira a reação enzimática. Nela, foram adicionados a microtubos de centrífuga 700 µL de solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM

pH 8,0, 250 µL de solução de Asn 100 mM dissolvida no mesmo tampão e 50 µL de amostra de enzima. Foi feito também o preparo de um Branco da reação, microtubo em que os 50 µL de amostra são substituídos por solução tampão. Para algumas amostras de enzima imobilizada, os valores foram ajustados para 650 µL de solução Tampão e 100 µL de suspensão de imobilizado. As misturas foram incubadas a 37 °C durante 30 min, havendo posteriormente a adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M, para parar a reação. A segunda etapa do método é uma reação colorimétrica, onde 75 µL de cada solução resultante da primeira etapa foram diluídos em 1050 µL de água ultrapura, sendo então adicionados 75 µL de Reagente de Nessler (Supelco®) aos microtubos, com inversão para misturar e formar cor. 300 µL de cada microtubo da segunda reação foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, onde foi lida a absorbância a 436 nm em leitora de placas EnVision® 2105. Após subtração do valor do Branco, as absorbâncias obtidas foram aplicadas em uma curva padrão de amônia (Apêndice B) para quantificação da amônia presente na segunda etapa do método. Foi determinado como uma unidade (U) de atividade a quantidade de L-ASNase necessária para produzir 1 µmol de amônia (NH₃) por minuto. O valor da concentração de amônia foi então aplicado na equação de atividade (1) para quantificação da atividade presente na amostra:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{[\text{NH}_3](\mu\text{mol/mL}) \cdot V_2(\text{mL}) \cdot V_1(\text{mL})}{t(\text{min}) \cdot V_{1 \rightarrow 2}(\text{mL}) \cdot V_E(\text{mL})} \quad (1)$$

Onde a variável é a concentração de amônia na segunda etapa ([NH₃]). Os demais termos da equação são o volume total da segunda etapa (V₂ = 1,2 mL), o volume total ao final da primeira etapa (V₁ = 1,1 mL), o tempo de reação (t = 30 min), o volume transferido da primeira para a segunda etapa (V_{1→2} = 0,075 mL) e o volume de amostra adicionado na primeira etapa (V_E = 0,05 mL). Para o cálculo de atividade das enzimas imobilizadas, o volume de enzima (V_E) é substituído pela massa estimada de imobilizado (M_D, em gramas) dependente da proporção e do volume de suspensão adicionado, e o valor de atividade é dado em U/g.

5.10 Produção do Suporte *Santa Barbara Amorphous-15*

O suporte *Santa Barbara Amorphous-15* (SBA-15) foi produzido através de síntese hidrotérmica, seguindo a metodologia de Rios (2016). Dissolveu-se 4,6 g de Pluronic® P-123 (Poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol)) e 0,052 g de fluoreto de amônio (NH₄F) em 160 mL de HCl 1,3 M, com agitação magnética branda. Após

dissolução completa, foram adicionados 9,76 g de tetraetil ortossilicato (TEOS) lentamente à solução. Após o ponto de virada de cor da solução, de transparente para branco, seguiu-se agitação magnética por 24 h. A mistura foi então transferida para autoclave de teflon, que foi mantida em estufa a 100 °C durante 48 h. A mistura foi então coletada e lavada com 400 mL de água destilada com auxílio de funil e papel de filtro, até completa retirada do excesso de reagentes. O suporte sintetizado foi então seco em estufa a 100 °C durante 24h, e posteriormente calcinado em mufla. O processo de calcinação iniciou pelo aquecimento do suporte da temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C) até 100 °C, a uma taxa de 10 °C·min⁻¹, mantendo-se nessa temperatura durante 2 min, e depois aquecendo a 550 °C a uma taxa de 1 °C·min⁻¹, mantendo-se nessa temperatura durante 6 horas. O suporte foi então lentamente resfriado até a temperatura ambiente, sendo armazenado em dessecador.

5.11 Funcionalização e ativação do SBA-15

O suporte sintetizado (SBA-15 puro) foi funcionalizado com (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES), seguindo metodologia pós-síntese estabelecida por Rios (2016), para adição de grupamentos amino ao suporte. 1 g de SBA-15 puro foi adicionado a uma solução contendo 40 mL de tolueno, 20 mL de etanol absoluto e 3 mL de APTES. A mistura foi submetida a agitação em processador ultrassônico Q500 Sonicator® (QSonica), em um modo de 3 agitações de 5 min (amplitude 30%, ON 1 OFF 0), com intervalos de 10 min entre agitações. Após, o suporte foi lavado 1 vez com metanol, seguido de 3 vezes com etanol absoluto. O SBA-15 funcionalizado (SBA-15-APTES) foi então armazenado em dessecador.

Para a utilização em experimentos de imobilização por ligação covalente, o SBA-15-APTES foi ativado com glutaraldeído seguindo a metodologia de Rios (2016). Foram utilizados 0,5 g de SBA-15-APTES para ressuspensão em 5 mL de solução de glutaraldeído 15% (v/v, diluído em solução tampão fosfato de sódio 200 mM pH 7,0). A mistura foi mantida sob agitação magnética durante 15 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o suporte ativado (SBA-15-APTES-GA) foi lavado 5 vezes em solução tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 para a retirada do excesso de glutaraldeído. O SBA-15-APTES-GA foi prontamente utilizado para os experimentos de imobilização covalente.

5.12 Imobilização enzimática

A imobilização de L-asparaginase no suporte SBA-15 foi testada por duas vias: pela adsorção física e por ligação covalente. Os ensaios de imobilização iniciaram-se com a utilização do extrato proteico de EcAII em concentração fixa de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, passando-se posteriormente para $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentração utilizada nos tópicos a seguir, com obtenção da atividade oferecida para diferentes extratos. Os processos de imobilização se deram em tubos de centrífuga de 5 mL, sob rotação em agitador de tubos a 50 rpm e 4°C . Para fins de compreensão, neste trabalho, os biocatalisadores imobilizados serão referidos apenas como biocatalisadores ou imobilizados, enquanto a enzima solúvel será especificada como enzima livre.

5.12.1 Imobilização por adsorção

Os ensaios de imobilização por adsorção se deram através da incubação de 100 mg do SBA-15 puro, sem passar pela funcionalização, com 2 mL do extrato proteico em solução tampão fosfato de sódio 25 mM. Foram testadas 3 diferentes condições de pH relativas ao ponto isoelétrico (pI) teórico da enzima, obtido através do recurso ProtParam do portal online ExpASy. As condições testadas foram abaixo, igual a e acima do pI teórico, nos valores de pH 6,0, 6,7 e 8,0, respectivamente. O tempo de imobilização foi fixado em 3 h para as condições testadas, e os imobilizados foram recuperados através de centrifugação (5000 rpm, 10 min, 4°C), retirando-se alíquotas da suspensão total e sobrenadante ao final do processo para medida de atividade enzimática presente nas frações, bem como para medida de concentração de proteínas e eletroforese do sobrenadante (fração não imobilizada). Ao final do processo, o imobilizado foi lavado 4 vezes com solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0 para a retirada de proteínas não ligadas.

Para a condição de imobilização no pI teórico da enzima, foi acompanhado também o curso de imobilização, com retirada de alíquotas da suspensão e do sobrenadante da imobilização a cada 30 min para a realização de medida de atividade e acompanhamento do processo de adsorção.

5.12.2 Imobilização por ligação covalente

Os ensaios de imobilização por ligação covalente foram realizados através da incubação de 100 mg do SBA-15-APTES-GA em suspensão com 2 mL do extrato proteico em solução tampão fosfato de sódio 25 mM pH 8,0. Foram testados diferentes tempos de imobilização: 0,5, 1, 3, 5 e 24 h. Os imobilizados foram recuperados por centrifugação (5000 rpm, 10 min, 4 °C), com retirada de alíquota do sobrenadante para eletroforese e medidas de atividade enzimática e concentração de proteínas. Ao final do processo, o imobilizado foi lavado 4 vezes com solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0 para a retirada de proteínas não ligadas.

5.12.3 Aplicação de aminoácidos na imobilização covalente

Foi realizada a inclusão de duas condições de incubação durante o processo de imobilização, com a utilização do substrato da enzima, a Asn, e de um inibidor competitivo, a Gln, ao tampão de imobilização. O extrato proteico foi preparado em solução tampão fosfato de sódio 25 mM pH 8,0 sem suplementação ou suplementado com Asn 100 mM ou com Gln 100 mM, sendo incubados 2 mL do extrato com 100 mg de SBA-15-APTES-GA durante 30 min, produzindo os imobilizados SBA-AE, SBA-AE(Asn) e SBA-AE(Gln), respectivamente. Ao final do processo, foi realizado o processo de lavagem dos imobilizados com a presença das mesmas moléculas contidas no tampão de imobilização, em mesma concentração.

5.12.4 Redução da concentração de proteínas na imobilização covalente

Para a imobilização covalente, foi realizada modificação na concentração de proteínas no extrato proteico, passando de 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a fim de atingir a concentração de proteínas oferecidas de 2 mg por grama de suporte. Os ensaios de imobilização foram conduzidos da mesma forma que os anteriores, com incubação de 30 min, com a utilização do tampão de imobilização sem aditivos, com Asn 100 mM e com Gln 100 mM, para produzir os imobilizados SBA-E, SBA-E(Asn) e SBA-E(Gln), respectivamente, seguidos das lavagens dos imobilizados.

5.12.5 Recobrimento dos biocatalisadores

Foi preparada uma solução de polietilenoimina (PEI) 10% (m/v) através da dissolução de 1 g de PEI em água destilada, para um volume total de 10 mL. O pH da solução foi ajustado para 7,0 mantendo-se a temperatura a 4 °C durante a aferição do pH. Foi também preparada uma solução de dextrana-aldeído (DA) através da dissolução de 1,65 g de dextrana (450000-650000 Da, obtida de *Leuconostoc* spp.) em 50 mL de água e sua posterior oxidação com 3,85 g de metaperiodato de sódio, durante 90 min sob agitação magnética. A solução foi então dialisada 5 vezes contra 5 L de água ultrapura, com 2 horas de intervalo entre cada troca, e armazenada a 4 °C.

Após a imobilização, algumas amostras de SBA-E(Asn) foram submetidas a um processo de recobrimento com moléculas de alta massa molecular, PEI e DA. Para o recobrimento com PEI, após a última lavagem do imobilizado, este foi submetido a incubação em 1 mL de solução de PEI 10% (m/v) pH 7,0, sob agitação rotativa a 50 rpm e 4 °C durante 24 h. Após, o imobilizado (SBA-E-PEI) foi lavado 4 vezes com solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0. Para o recobrimento com DA, após a última lavagem do imobilizado, este foi submetido a incubação em 500 µL de tampão fosfato de sódio 200 mM pH 7,0 e 500 µL de solução de DA, sob agitação rotativa a 50 rpm e 4 °C durante 16 h. Após, foi adicionado 1 mg de borohidreto de sódio (NaBH₄) para reduzir os grupos reativos restantes da DA, e foi mantida incubação por mais 1 h nas mesmas condições. O imobilizado (SBA-E-DA) foi então lavado 4 vezes com solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0.

5.13 Obtenção dos dados de eficiência de imobilização

O rendimento de imobilização das amostras produzidas foi obtido de duas formas: pela concentração de proteínas totais e pela atividade enzimática residual. A concentração de proteínas foi utilizada para obtenção do rendimento de imobilização dos experimentos de imobilização por adsorção e de obtenção do tempo ótimo para imobilização covalente, através da equação 2:

$$RI_P (\%) = \left(\frac{[P]_{\text{ext}}(\mu\text{g/mL}) - [P]_{\text{sob}}(\mu\text{g/mL})}{[P]_{\text{ext}}(\mu\text{g/mL})} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde o rendimento de imobilização (RI_P) é uma função da concentração de proteínas totais no extrato proteico ($[P]_{ext}$) e da concentração de proteínas no sobrenadante da imobilização ($[P]_{sob}$). A atividade enzimática residual foi utilizada para obtenção do rendimento de imobilização dos experimentos restantes, já que a presença dos aminoácidos e NH_3 causaram interferência no ensaio de BCA. Para isso, foi utilizada a equação 3:

$$RI_E (\%) = \left(\frac{Atv_{VEL}(U/mL) - Atv_{sob}(U/mL)}{Atv_{EL}(U/mL)} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde o rendimento de imobilização (RI_E) é uma função da atividade enzimática no extrato proteico (Atv_{VEL}) e da atividade enzimática residual presente no sobrenadante da imobilização (Atv_{sob}).

A atividade teórica dos imobilizados foi determinada considerando o rendimento de imobilização, sendo a atividade enzimática que deveria ser apresentada pelo imobilizado a partir da atividade oferecida e da porção de proteínas que se ligaram ao suporte, calculada a partir da equação 4:

$$AtvT(U/g) = RI(\%) \cdot \left(\frac{Atv_{VEL}(U/mL) \cdot VI(mL)}{M_S(g)} \right) \quad (4)$$

Onde a atividade teórica do imobilizado ($AtvT$) é uma função do rendimento de imobilização (RI), da atividade enzimática no extrato (Atv_{VEL}), do volume durante a imobilização ($VI = 2$ mL) e da massa de suporte oferecida na imobilização ($M_S = 0,1$ g).

A partir da atividade teórica, pode-se calcular a atividade que foi de fato recuperada no processo de imobilização enzimática através da equação 5:

$$AtvR (\%) = \left(\frac{Atv_{IMOB}(U/g)}{AtvT(U/g)} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde a atividade recuperada ($AtvR$) é uma razão entre a atividade do imobilizado (Atv_{IMOB}) e a atividade teórica ($AtvT$).

O rendimento global de imobilização é definido como o atividade recuperada no imobilizado em relação à atividade oferecida, e é calculado pela equação 6:

$$RG (\%) = \left(\frac{Atv_{IMOB}(U/g) \cdot M_S(g)}{Atv_{EL}(U/mL) \cdot VI(mL)} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde o rendimento global (RG) é dado pela razão entre a atividade total presente no imobilizado, obtido através da atividade do imobilizado (At_{VIMOB}) e da massa de suporte oferecida ($M_S = 0,1$ g), e a atividade oferecida no extrato, obtida a partir da atividade da enzima livre no extrato (At_{VEL}) e do volume da imobilização ($VI = 2$ mL).

5.14 Avaliação da estabilidade operacional dos imobilizados

A estabilidade operacional de uma enzima imobilizada refere-se à sua capacidade de manter-se ativa após sucessivos ciclos de reutilização. A estabilidade operacional do biocatalisador SBA-E(Asn) foi avaliada através de 10 ciclos de hidrólise de Asn, cada um com duração de 1 hora. A cada ciclo, foram utilizados 5 mL de Asn 100 mM, preparada em tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, mantido a 37 °C em estufa, sob agitação rotativa de 50 rpm. A massa inicial de imobilizado utilizada para cada experimento foi de 50 mg, e a cada ciclo ela foi separada da solução hidrolisada por centrifugação a 5000 rpm e 4 °C por 10 min. A conversão ao final de cada ciclo foi medida pela reação colorimétrica do reagente de Nessler, e calculada em porcentagem relativa à conversão no primeiro ciclo. O ensaio foi também conduzido nas mesmas condições, para os imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, alterando-se apenas a temperatura para 55 °C.

5.15 Avaliação da temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre

A temperatura ótima dos biocatalisadores e da enzima livre foi avaliada através da realização de ensaios de atividade pelo método de Nessler, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C, com EcAII livre e os imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI. Após obtenção do melhor resultado de atividade entre os 5 pontos para cada enzima, foram realizados ensaios também em temperaturas adjacentes, 5 °C acima e abaixo do melhor ponto. O melhor resultado de atividade para cada imobilizado foi considerado como 100 %, e a atividade nas outras temperaturas foi definida como atividade residual relativa à máxima obtida. Os dados foram então analisados no software OriginPro® 8.5 para construção de gráficos de atividade residual em função da temperatura.

5.16 Cinética enzimática dos biocatalisadores e da enzima livre

A avaliação cinética dos biocatalisadores e da enzima livre foi avaliada através de ensaios de atividade pelo método de Nessler, com variação da concentração do substrato Asn, com EcAII livre e o imobilizado SBA-E(Asn). Foi utilizada concentração proteica de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente à presente nas amostras de imobilizado. As concentrações de substrato utilizadas foram de 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 e 22 mM. Os resultados de concentração de amônia produzida foram tratados na forma de Velocidade inicial (V_0), realizando-se a razão entre concentração de $[\text{NH}_3]$ e o tempo do ensaio de atividade (30 min), dando um resultado em $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$. Os dados foram então analisados no software OriginPro® 8.5 para construção de gráficos de V_0 em função da concentração de Asn, utilizando-se a equação 7, de Michaelis-Menten, para a construção da curva:

$$V_0 = \frac{V_{\text{MÁX}} \cdot S}{K_M + S} \quad (7)$$

Onde a velocidade inicial (V_0) é dada em função da concentração de substrato (S) e das constantes cinéticas velocidade máxima da reação ($V_{\text{MÁX}}$) e constante de Michaelis-Menten (K_M). Com base na curva construída, K_M e $V_{\text{MÁX}}$ foram fornecidos pelo software.

5.17 Avaliação da estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre

Foi realizada uma análise de estabilidade térmica da enzima livre e dos biocatalisadores SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI a nível molecular, com base na emissão de fluorescência por resíduos de triptofano, no equipamento Tycho® NT.6 (NanoTemper® Technologies). Foi obtida a fluorescência a 350 nm e 330 nm no curso de aquecimento de 35 a 95 °C, para obtenção de um perfil de razão de fluorescência nos comprimentos de onda 330 nm e 350 nm.

Para os ensaios de estabilidade térmica em termos de atividade com os biocatalisadores imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, foram ressuspensos 100 mg de imobilizado em 1 mL de tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, previamente aquecido nas temperaturas de 50 e 60 °C, na ausência de substrato. Para a enzima livre, o extrato proteico utilizado para imobilização teve sua concentração ajustada para 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 1 mL de tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, sendo misturada a mais 1 mL do mesmo tampão

previamente aquecido a 50 °C e a 60 °C, na ausência de substrato. As soluções e suspensões foram mantidas a temperatura constante, com a retirada de amostras para medida de atividade através do ensaio de Nessler nos tempos de 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos. As curvas relacionando atividade residual como porcentagem da atividade inicial ao tempo foram construídas no software OriginPro® 8.5, utilizando um modelo de desativação enzimática previamente descrito por Sadana e Henley (1987) para determinar os parâmetros de desativação enzimática, segundo a equação de desativação (8):

$$Y = 100 \cdot ((1 - \alpha) \cdot e^{(-K_d \cdot t)} + \alpha) \quad (8)$$

Onde K_d é o coeficiente de velocidade de desativação térmica, que descreve o processo de desenovelamento da enzima, e α é uma razão entre a atividade específica da enzima após desativação e a atividade específica inicial, que descreve o nível de estabilização da atividade. Esses parâmetros são gerados pelo software após a construção da curva de acordo com as variáveis dependente e independente, a atividade relativa à inicial (Y) e o tempo de incubação (t), respectivamente. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado utilizando os parâmetros obtidos pelo software, através da equação (9):

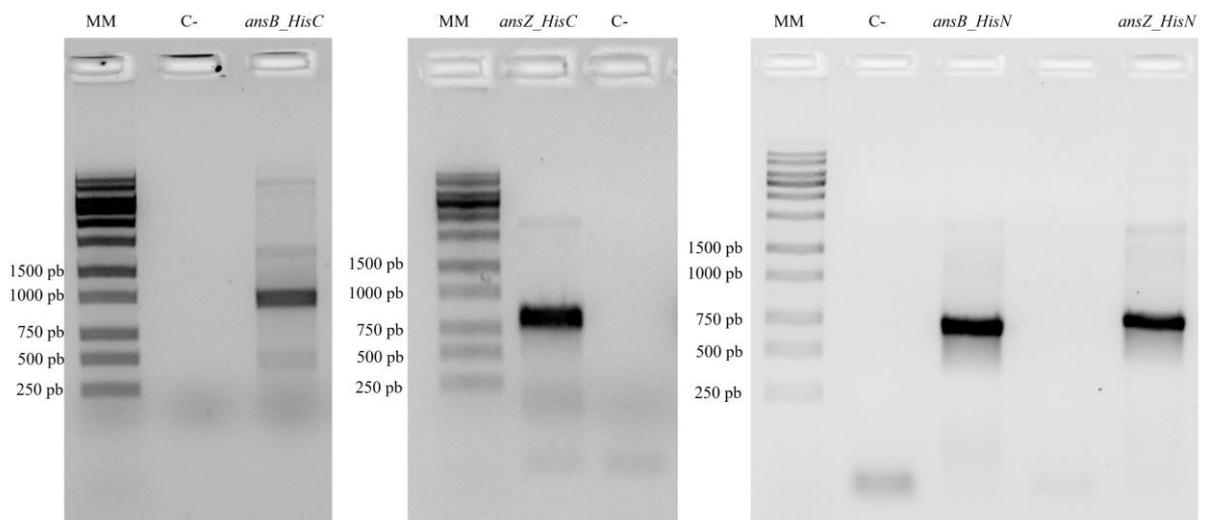
$$t_{1/2} = \frac{-\ln\left(\frac{0,5-\alpha}{1-\alpha}\right)}{K_d} \quad (9)$$

6 RESULTADOS

6.1 Clonagem dos genes de L-asparaginase em vetores RPA/RPC

A amplificação dos genes *ansB* e *ansZ* através de PCR, com os diferentes primers, foi bem-sucedida, como é mostrado pela presença de bandas positivas no gel de agarose com marcação fluorescente na Figura 9, com respectiva ausência de bandas nos controles negativos, onde não houve a adição de DNA molde às reações de amplificação.

Figura 9 – Gel de agarose mostrando a amplificação dos genes de L-ASNase II



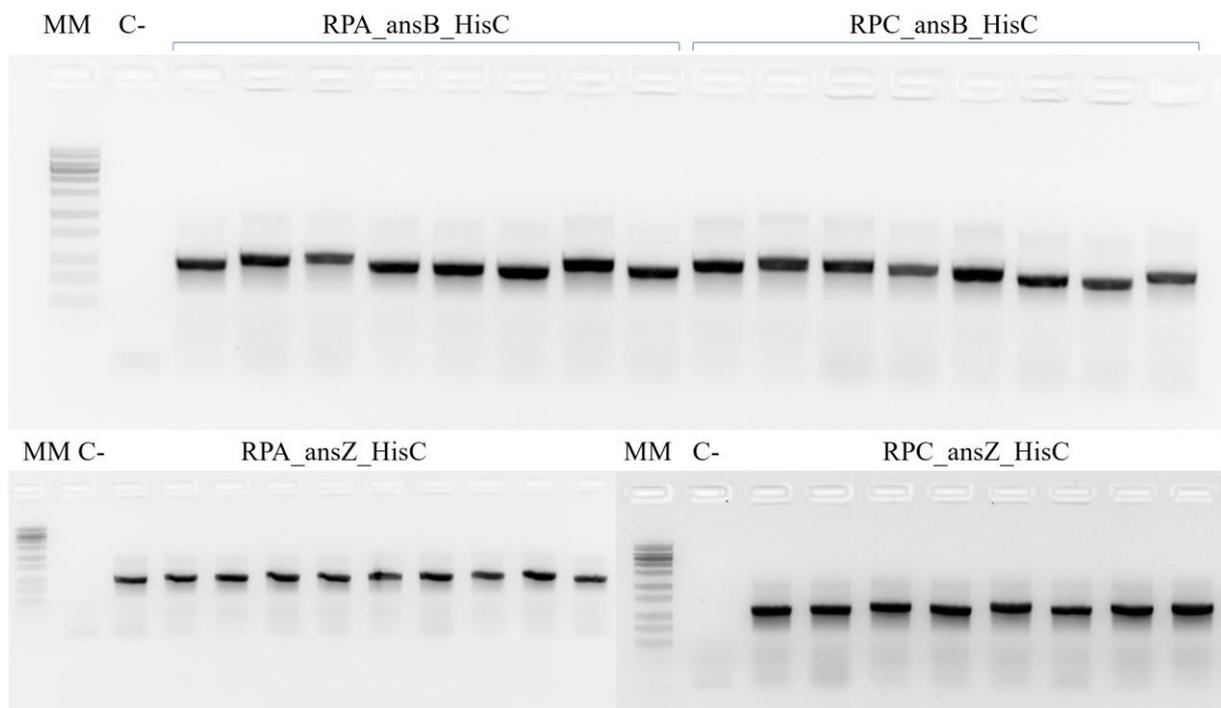
Fonte: o autor. Géis de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas reações de PCR, capturados no equipamento iBright FL1000. Os nomes dos produtos de PCR derivados dos genes amplificados estão indicados acima das raiais correspondentes de cada gel, indicando os genes *ansB* e *ansZ* amplificados com inserção de seqüências codificadoras para cauda de histidina no final (HisC) ou no início (HisN) da seqüência do gene. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia®)); C-: controles negativos de cada amplificação.

A presença das bandas no gel na altura esperada, de aproximadamente 1000 pares de base, considerando também os primers utilizados, confirma que os genes amplificados são de fato os genes de interesse, mas não permite a identificação do sucesso de inserção da cauda de histidina nas seqüências, por ser de tamanho pequeno para provocar alguma mudança significativa na posição das bandas no gel. Devido a isso, ao final da clonagem, o sequenciamento dos genes é necessário para averiguar esta questão, bem como atestar a ausência de possíveis mutações decorrentes de erros na amplificação. A amplificação permitiu também que fossem adicionados às seqüências os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas

NheI e BamHI, as mesmas que reconhecem sítios nos vetores RPA e RPC, sendo o sítio para clivagem da NheI presente ao final da sequência sinal do cassete de expressão, garantindo que o gene seja traduzido logo após a produção do peptídeo sinal (Lourenzoni *et al.*, 2016). Dessa forma, tanto insertos quanto vetores puderam ser digeridos com as mesmas enzimas, produzindo extremidades coesivas para garantir a orientação correta durante a realização da reação de ligação.

As diferentes amostras de células de *E. coli* DH5 α transformadas por choque térmico com oito construções de plasmídeos apresentaram todas bom crescimento em placa de LB-ágar suplementada com ampicilina. O crescimento das colônias em placa com antibiótico garante que as células foram transformadas com os plasmídeos que possuem o gene de resistência à ampicilina, mas não atesta a presença dos genes de interesse nesses vetores, motivo pelo qual foi realizada a PCR de colônia, selecionando-se colônias aleatórias para a amplificação do gene de interesse por PCR. Como é mostrado nas Figuras 10 e 11, as placas de todas as oito construções apresentaram colônias positivas para a presença do gene da L-asparaginase.

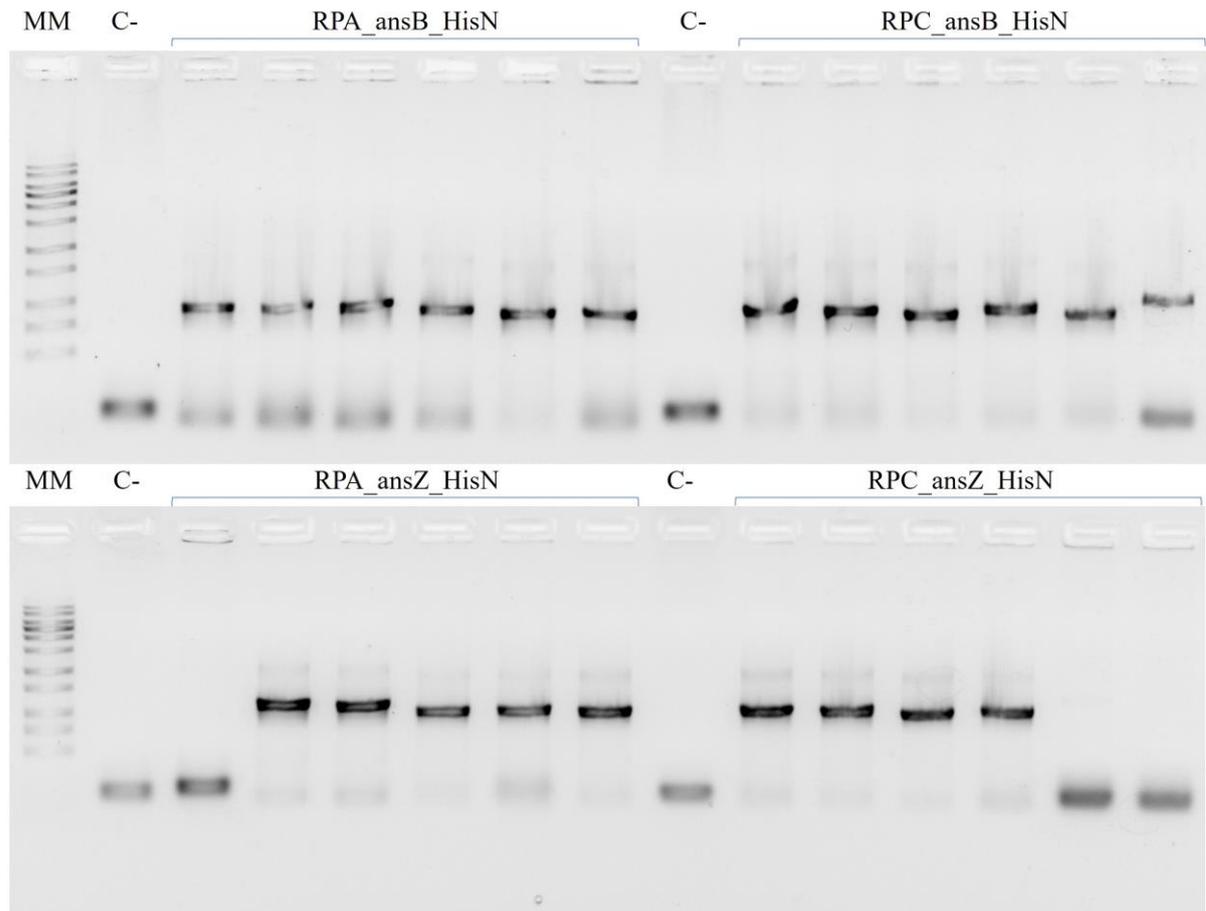
Figura 10 – Gel de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de bactérias transformadas com construções HisC



Fonte: o autor. Géis de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas PCRs de colônia, provenientes das placas com bactérias transformadas com genes contendo a sequência codificadora para cauda de histidina ao final do gene (HisC), capturados no equipamento iBright FL1000. Cada construção apresenta oito

raias correspondentes, com a indicação da construção acima do gel. Os géis mostrados correspondem às construções RPA_ansB_HisC e RPC_ansB_HisC; RPA_ansZ_HisC; e RPC_ansZ_HisC. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia®)); C-: controles negativos de cada amplificação.

Figura 11 – Gel de agarose mostrando a PCR de colônia das culturas de bactérias transformadas com construções HisN



Fonte: o autor. Géis de agarose 1% mostrando a presença dos genes amplificados pelas PCRs de colônia, provenientes das placas com bactérias transformadas com genes contendo a sequência codificadora para cauda de histidina no início do gene (HisN), capturados no equipamento iBright FL1000. Cada construção apresenta seis raias correspondentes, com a indicação da construção acima do gel. Os géis mostrados correspondem às construções RPA_ansB_HisN e RPC_ansB_HisN; RPA_ansZ_HisN e RPC_ansZ_HisN. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA Ladder (LGC Biotecnologia®)); C-: controles negativos de cada amplificação.

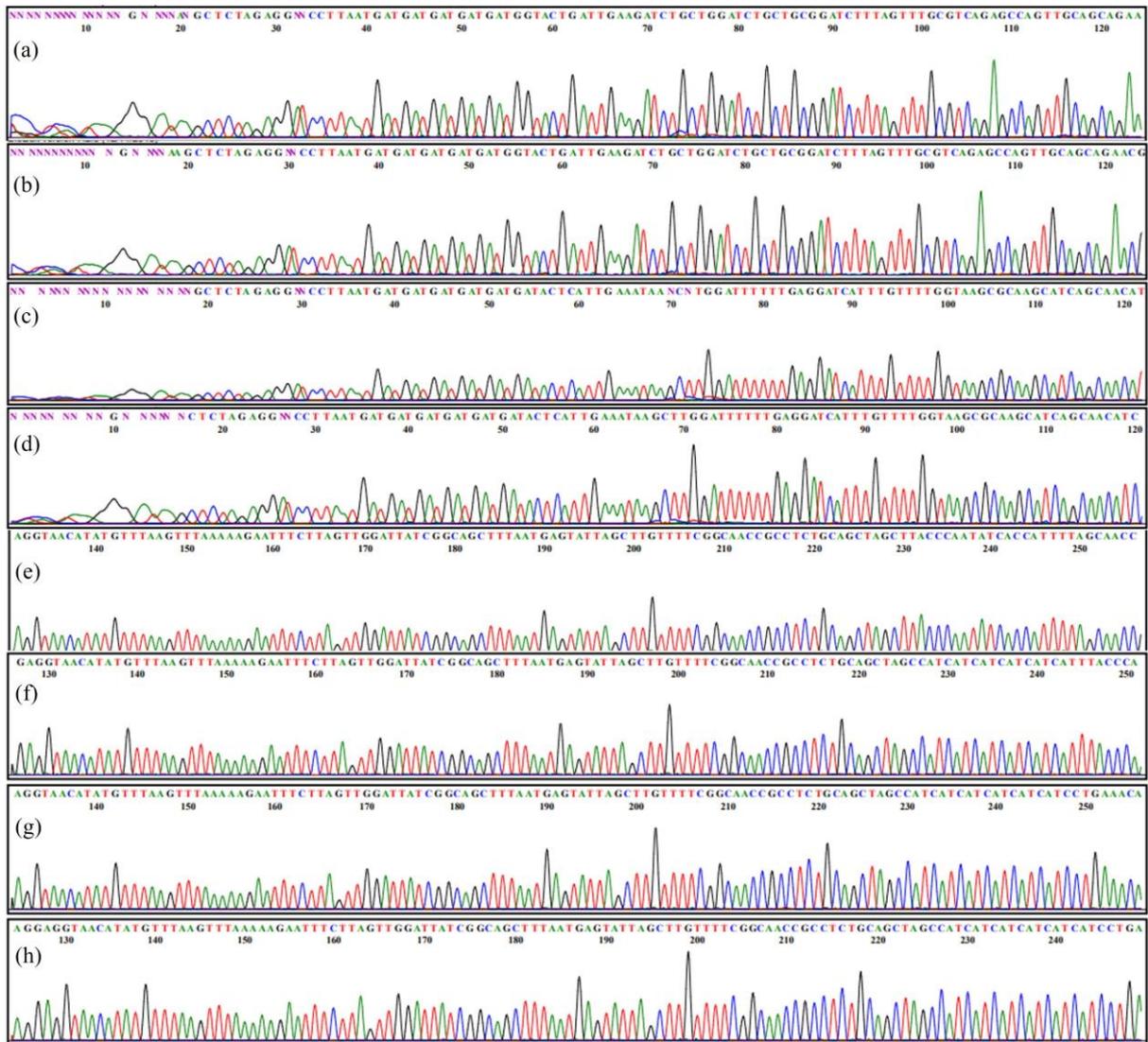
Com a identificação de colônias positivas para a presença do gene da L-asparaginase II, realizou-se a seleção de três colônias de cada placa, e estas foram inoculadas em meio líquido para a produção de estoque bacteriano em criotubos armazenados a -80 °C. A extração dos plasmídeos das bactérias cultivadas em meio líquido permitiu a obtenção de

material genético para a realização do sequenciamento das amostras, para a identificação das colônias cujos genes clonados eram viáveis, sem mutações e com sequência-His correta.

6.2 Sequenciamento dos genes clonados

O sequenciamento com utilização de primers M13 *forward* e *reverse* permitiu a cobertura de toda a extensão dos genes codificadores da L-ASNase II, seja o de *E. coli* (*ansB*) ou o de *B. subtilis* (*ansZ*). O sequenciamento das amostras de DNA foi obtido com boa qualidade para todas as oito construções, como mostrado pelos trechos de eletroferograma das porções inicial ou final dos genes, para as construções HisN e HisC respectivamente, na Figura 12. Nas posições onde houve incerteza da base nitrogenada presente, a análise dos eletroferogramas permitiu distinguir a base detectada pelo sequenciador.

Figura 12 – Trechos de eletroferograma abrangendo o local de inserção da sequência-His provenientes do sequenciamento dos plasmídeos clonados



Fonte: o autor. Trechos de eletroferograma provenientes do sequenciamento e analisados no software Bioedit®. Cada trecho de eletroferograma refere-se a uma amostra de plasmídeo sequenciado, abrangendo o local de inserção da sequência-His (final das sequências HisC e início das sequências HisN): RPA_ansB_HisC (a); RPC_ansB_HisC (b); RPA_ansZ_HisC (c); RPC_ansZ_HisC (d); RPA_ansB_HisN (e); RPC_ansB_HisN (f); RPA_ansZ_HisN (g); RPC_ansZ_HisN (h).

As sequências-His foram inseridas no local intencionado na maioria das construções, como mostrado nas Figuras 13 e 14. Na construção RPA_ansB_HisN, todas as amostras sequenciadas apresentaram a sequência-His na posição final do gene (HisC), o que indica que as bactérias foram transformadas com o DNA molde (RPA_ansB_HisC) em vez do produto de PCR amplificado, apesar do tratamento com a enzima de restrição DpnI para degradação do DNA molde metilado. Por outro lado, de cada uma das sete construções exitosas,

Figura 14 – Trechos do alinhamento global do início das sequências dos genes amplificados com cauda de histidina na posição N-terminal



Fonte: o autor. Trechos de alinhamento global analisados no software Bioedit®, pela ferramenta de alinhamento ClustalW. Os trechos de alinhamento global mostrados correspondem às porções iniciais dos genes de L-asparaginase II (*ansB* e *ansZ*) contidos em plasmídeos com construções HisN. As bases codificadoras da cauda de histidina estão sublinhadas em vermelho. Os trechos de alinhamento mostrados são referentes às amostras: RPA_ansB_HisN (a); RPC_ansB_HisN (b); RPA_ansZ_HisN (c); RPC_ansZ_HisN (d).

6.3 Expressão de L-ASNase II pelas bactérias transformadas

As sequências obtidas através do sequenciamento foram submetidas a análise no portal online ExpASy, com utilização dos recursos Translate e ProtParam para a obtenção da sequência polipeptídica traduzida, da massa molecular do monômero, do pI teórico e do coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes. Como há incerteza quanto ao ponto exato de clivagem da sequência sinal traduzida no início do polipeptídeo, a sequência sinal foi mantida para a obtenção desses resultados (Seo *et al.*, 2019). As sequências traduzidas dos monômeros das enzimas recombinantes e suas características estão sumarizadas no Quadro 5. A expressão das enzimas recombinantes foi avaliada em tubos em shaker, utilizando-se meio complexo, com a obtenção dos perfis de expressão intracelular, representados pelas amostras de *pellet* celular pós-centrifugação da fermentação, e extracelular, representados pelas amostras de caldo fermentado, como mostrado nos géis de eletroforese apresentados nas Figuras 15 e 16. Esta avaliação permitiu verificar se as enzimas estavam de fato sendo transportadas para o caldo fermentado, através da passagem das enzimas expressas pelo periplasma. Foi utilizada também uma amostra de caldo fermentado de uma cultura de bactérias transformadas com o vetor RPC

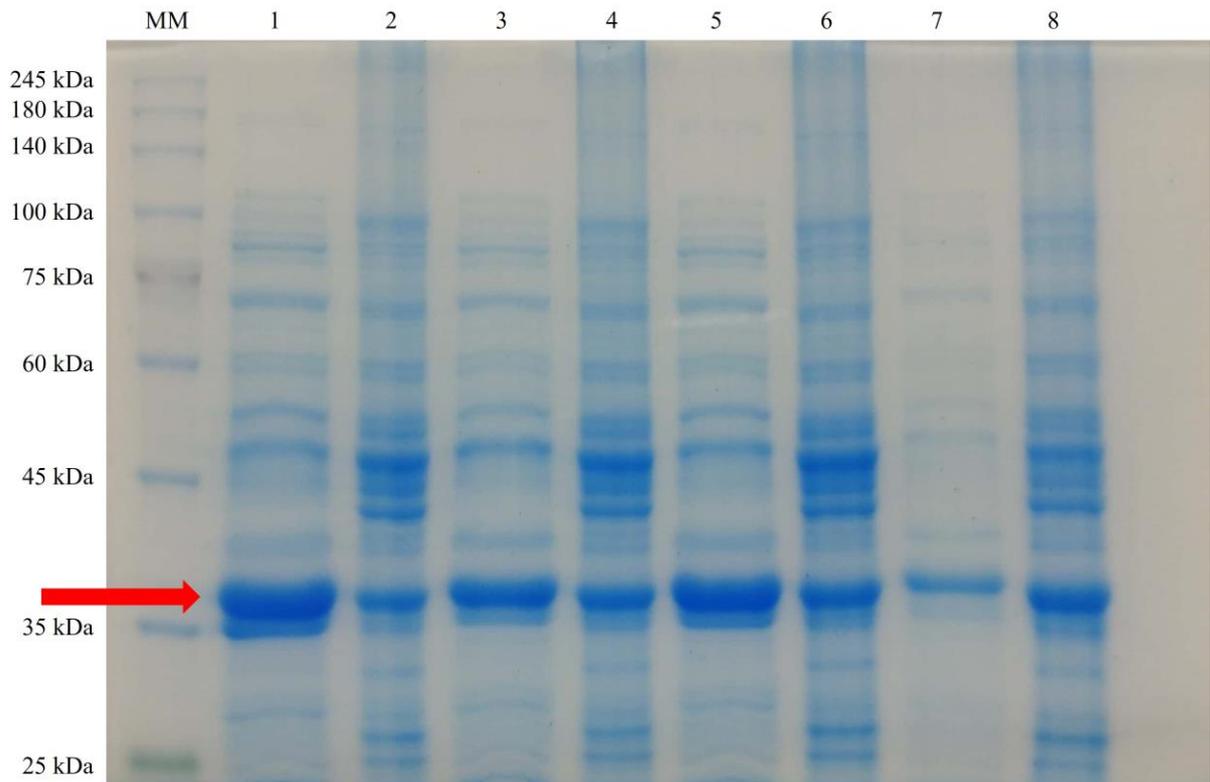
sem o gene codificador para qualquer das L-ASNases II (Figura 16), a fim de evidenciar a ausência da enzima.

Quadro 5 – Sequências polipeptídicas, massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar das L-ASNases II recombinantes

EcAII recombinante		
Sequência polipeptídica (construção HisC): MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASLPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKVGVENLVNAVPLKDIA NVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTLAKKINTDCDKTDGDFVITHGDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPS TSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGLVVMNDTVLDGRDVTKTNTDVAATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQR TPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGLYKTVFDTLATAAKNGT AVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQIQIFNQYHHHHHH		
Sequência polipeptídica (construção HisN): MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASHHHHHHLPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKVGVENLVNAVPL QLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNDDVWLTLAKKINTDCDKTDGDFVITHGDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVG AMRPS TSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGLVVMNDTVLDGRDVTKTNTDVAATFKSVNYGPLGYIHNGK IDYQRTPARKHTSDTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIVSAGVGNGLYKTVFDTLATAA KNGTAVVRSSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTKDPQIQIFNQY		
Massa molecular do monômero: 38538,49 Da	pI teórico: 6,75	Coeficiente de extinção molar*: 23505 M ⁻¹ cm ⁻¹
BsAII recombinante		
Sequência polipeptídica (construção HisC): MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLNIRILATGGTIAGADQSKT STTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKAKRINHLLASDDVDGIVVTHGDTLEE TAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPSTAISADGPSNLYNAVKVAGAPEAKGKGLVVLNDRIASARYVTKTNTTTD TFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSVSNLDELQPVDIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGN GSLSDAAEKGADSAVKKGVTVVRSTRGTNGVVTNPQDYAEKDLLASNSLNPQKARMLLMLALTKTNDPQKIQA YFNEYHHHHHH		
Sequência polipeptídica (construção HisN): MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASHHHHHHPETKESPKEKAQTQKVSSASASEKKDLNIRILATGGTIA GADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKAKRINHLLASDDVDGIVVT HGTDTLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPSTAISADGPSNLYNAVKVAGAPEAKGKGLVVLNDRIASARYVT KTNTTTTDTFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSVSNLDELQPVDIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAK GIVFAGSGNGSLSDAAEKGADSAVKKGVTVVRSTRGTNGVVTNPQDYAEKDLLASNSLNPQKARMLLMLALTK TNDPQKIQAYFNEY		
Massa molecular do monômero: 41407,65 Da	pI teórico: 6,52	Coeficiente de extinção molar: 16390 M ⁻¹ cm ⁻¹

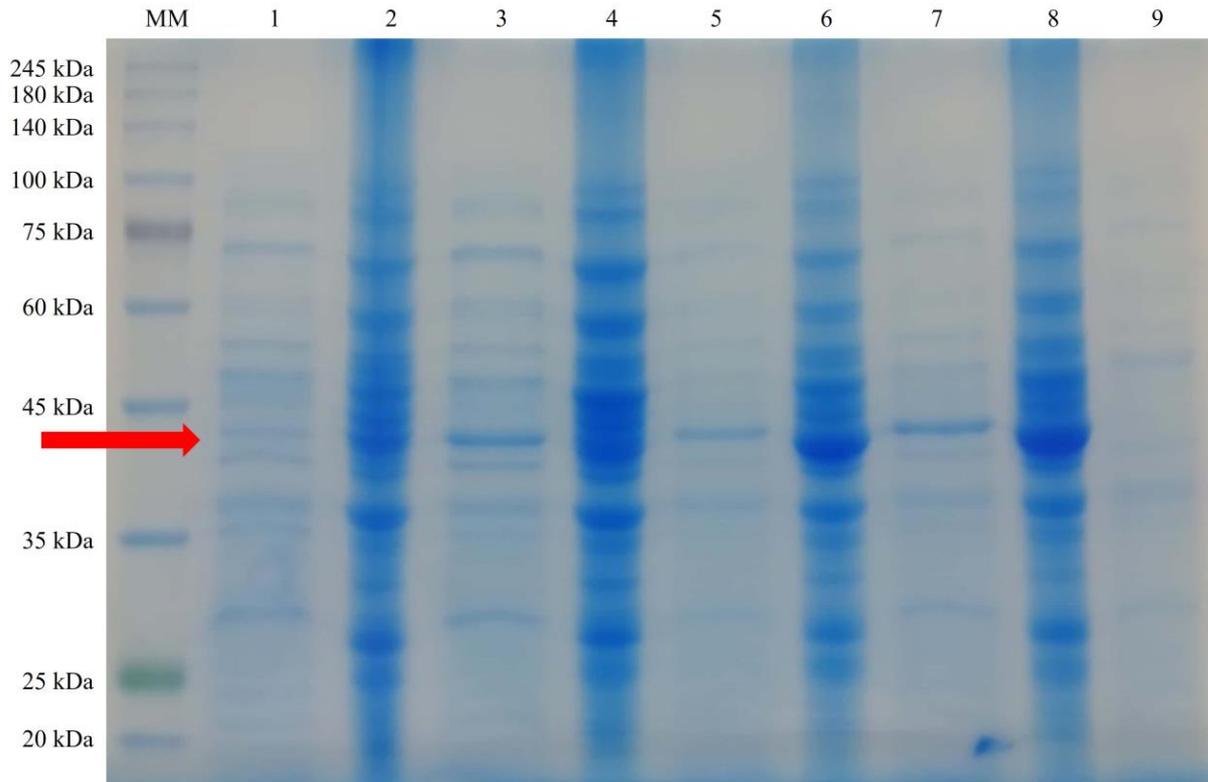
Fonte: o autor. Sequências polipeptídicas das enzimas recombinantes e seus valores de massa molecular, pI teórico e coeficiente de extinção molar analisados nas ferramentas ExPASy Translate e ExPASy ProtParam, com destaque para a sequência sinal em azul e para a cauda de histidina em vermelho. *O coeficiente de extinção molar da EcAII foi calculado considerando que todos os pares de resíduos de cisteína (Cys) formam cistinas.

Figura 15 – Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular e extracelular de EcAII



Fonte: o autor. Gel de poliacrilamida 12,5% da eletroforese da expressão intracelular e extracelular das construções de EcAII em tubos. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da EcAII (38,5 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: caldo fermentado de RPA_ansB_HisC; 2: *pellet* celular de RPA_ansB_HisC; 3: caldo fermentado de RPC_ansB_HisC; 4: *pellet* celular de RPC_ansB_HisC; 5: caldo fermentado de RPA_ansB_HisN; 6: *pellet* celular de RPA_ansB_HisN; 7: caldo fermentado de RPC_ansB_HisN; 8: *pellet* celular de RPC_ansB_HisN.

Figura 16 – Gel de poliacrilamida mostrando a expressão intracelular e extracelular de BsAII

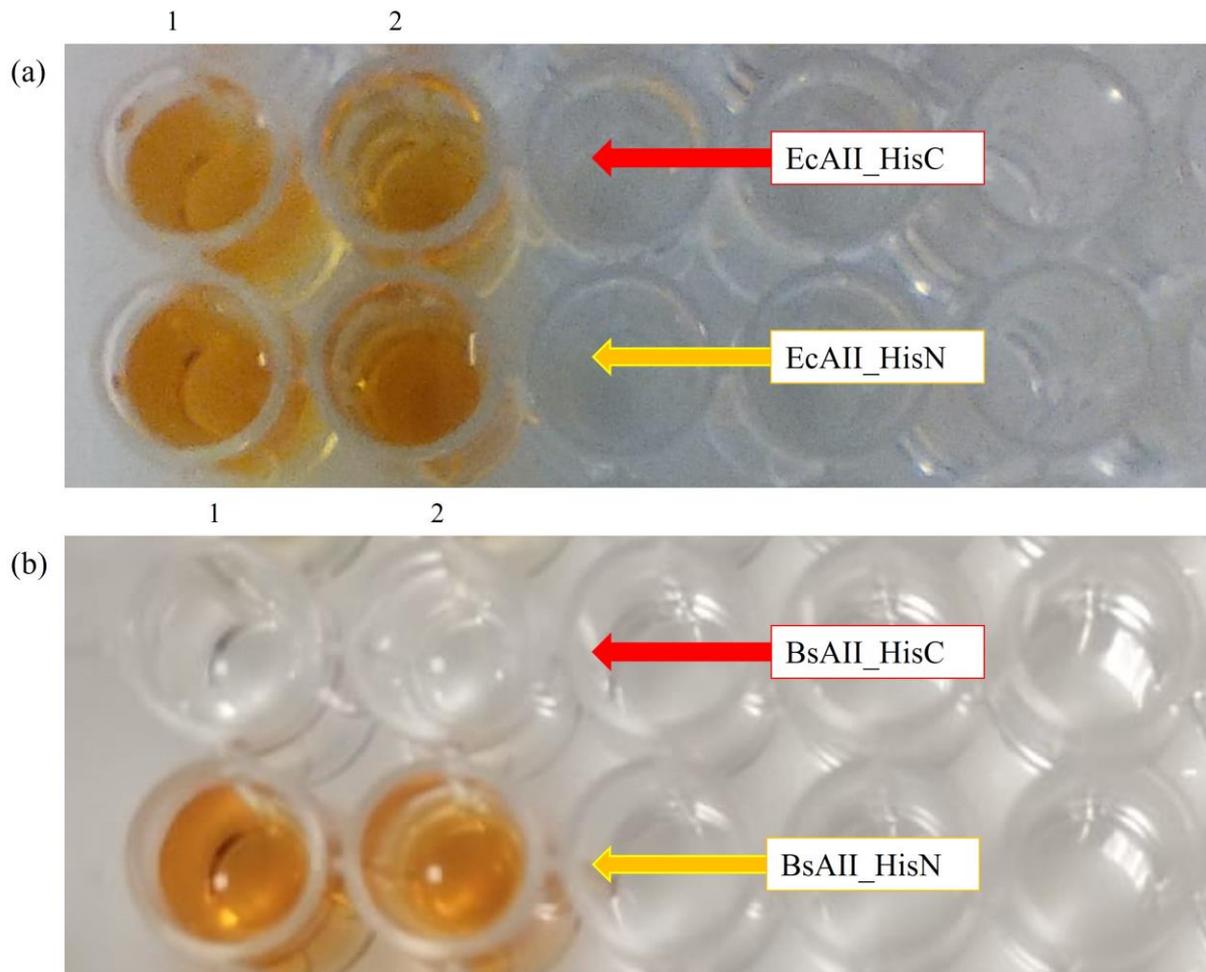


Fonte: o autor. Gel de poliacrilamida 12,5% da eletroforese da expressão intracelular e extracelular das construções de BsAII em tubos. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da BsAII (41,4 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: caldo fermentado de RPA_ansZ_HisC; 2: *pellet* celular de RPA_ansZ_HisC; 3: caldo fermentado de RPC_ansZ_HisC; 4: *pellet* celular de RPC_ansZ_HisC; 5: caldo fermentado de RPA_ansZ_HisN; 6: *pellet* celular de RPA_ansZ_HisN; 7: caldo fermentado de RPC_ansZ_HisN; 8: *pellet* celular de RPC_ansZ_HisN; 9: caldo fermentado de RPC_vazio.

O experimento inicial de expressão mostrou uma produção de $14810 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, em termos de atividade relativa ao volume de caldo utilizado no cultivo nas amostras transformadas com o gene codificador da EcAII, com uma significativa exportação da enzima para o caldo fermentado, com bandas em geral mais densas que as presentes nas amostras de *pellet* celular (Figura 15). Além disso, nessas amostras de caldo fermentado, a EcAII é a banda predominante em relação às outras bandas de proteínas diversas presentes, como constatado com auxílio do fotodocumentador iBright FL1000. Já na expressão de BsAII, uma parte da enzima ficou retida no meio intracelular, mas o caldo fermentado ainda ficou constituído majoritariamente pela enzima recombinante em todas as frações (Figura 16). Foi constatado que as construções de BsAII com cauda de histidina na posição C-terminal não possuíam atividade enzimática,

enquanto as construções de BsAII_HisN, e todas as de EcAII, possuíam atividade, como mostrado no ensaio de Nessler qualitativo realizado, cujo resultado está mostrado na Figura 17.

Figura 17 – Microplacas de 96 poços contendo produto da reação colorimétrica de Nessler do ensaio de atividade dos extratos obtidos no cultivo em tubos em shaker



Fonte: o autor. Produtos da reação colorimétrica de Nessler provenientes do ensaio de atividade qualitativo realizado com os extratos proteicos obtidos a partir do cultivo em tubos em shaker das bactérias transformadas. Na placa (a) estão presentes os resultados para as construções contendo o gene *ansB*. Apontados pela seta vermelha estão os resultados dos extratos de EcAII_HisC, produzidos em vetores RPA (1) e RPC (2). Apontados pela seta amarela estão os resultados dos extratos de EcAII_HisN, produzidos em vetores RPA (1) e RPA (2). Na placa (b) estão presentes os resultados para as construções contendo o gene *ansZ*. Apontados pela seta vermelha estão os resultados dos extratos de BsAII_HisC, produzidos em vetores RPA (1) e RPC (2). Apontados pela seta amarela estão os resultados dos extratos de BsAII_HisN, produzidos em vetores RPA (1) e RPA (2).

A mudança da posição da cauda de histidina causou uma diferença na atividade de BsAII, como apresentado na Figura 17. Portanto, decidiu-se realizar uma análise da presença dessa cauda na enzima expressa, já que poderia afetar a viabilidade de realizar a purificação das

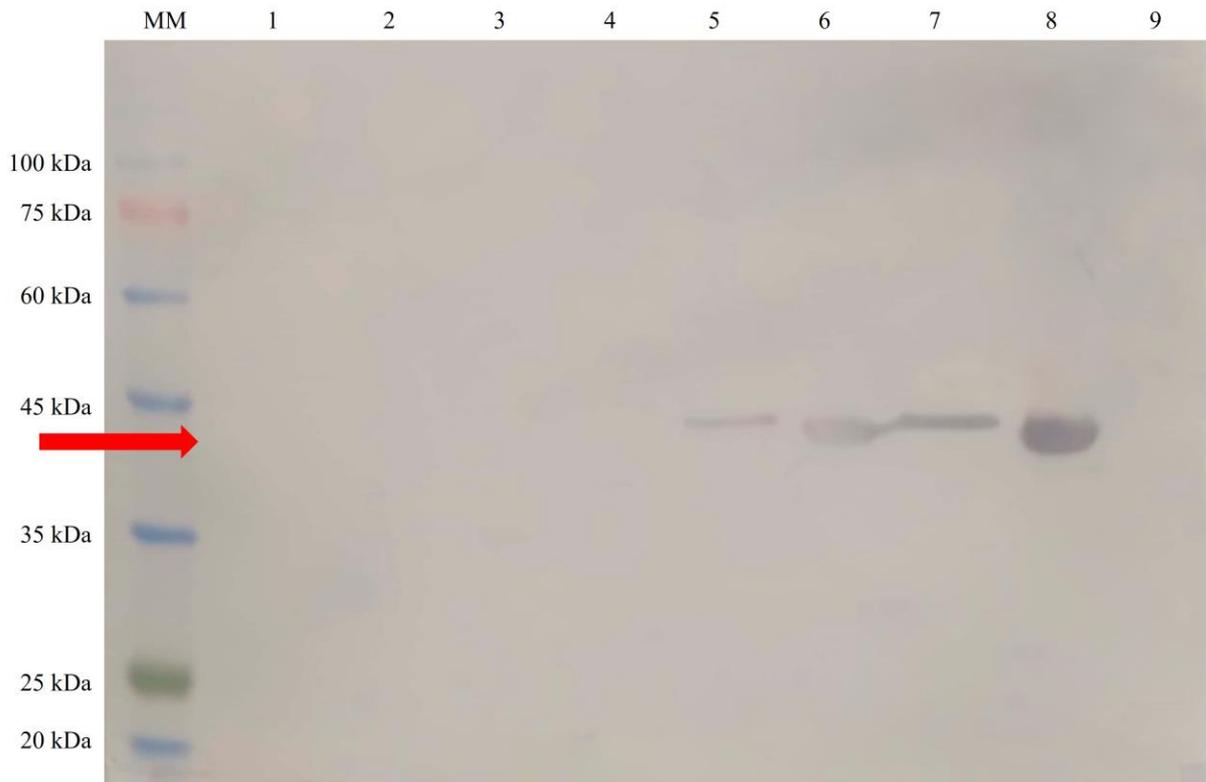
enzimas por afinidade em coluna de níquel em aplicações futuras. Foi realizado então um Western Blotting com as proteínas intracelulares e extracelulares expressas pelas bactérias transformadas, utilizando um anticorpo anti-poli-histidina, que se liga a caudas de histidina, para verificação de sua presença nas construções, como mostrado nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 – Western Blot com os produtos da expressão intracelular e extracelular de EcAII



Fonte: o autor. Western Blot da expressão das construções de EcAII em tubos em shaker. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da EcAII (38,5 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: caldo fermentado de RPA_ansB_HisC; 2: *pellet* celular de RPA_ansB_HisC; 3: caldo fermentado de RPC_ansB_HisC; 4: *pellet* celular de RPC_ansB_HisC; 5: caldo fermentado de RPA_ansB_HisN; 6: *pellet* celular de RPA_ansB_HisN; 7: caldo fermentado de RPC_ansB_HisN; 8: *pellet* celular de RPC_ansB_HisN.

Figura 19 – Western Blot com os produtos da expressão intracelular e extracelular de BsAII



Fonte: o autor. Western Blot da expressão das construções de BsAII em tubos em shaker. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da BsAII (41,4 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: caldo fermentado de RPA_ansZ_HisC; 2: *pellet* celular de RPA_ansZ_HisC; 3: caldo fermentado de RPC_ansZ_HisC; 4: *pellet* celular de RPC_ansZ_HisC; 5: caldo fermentado de RPA_ansZ_HisN; 6: *pellet* celular de RPA_ansZ_HisN; 7: caldo fermentado de RPC_ansZ_HisN; 8: *pellet* celular de RPC_ansZ_HisN; 9: caldo fermentado de RPC_vazio.

Como mostrado nos Western Blots, as únicas amostras que foram marcadas com o anticorpo anti-poli-histidina foram aquelas que continham a cauda de histidina na posição N-terminal. Juntando-se a isso o fato das construções HisC de BsAII não terem apresentado atividade, decidiu-se adotar as construções HisN como as utilizadas neste trabalho para as expressões subsequentes. Além disso, como a inserção da cauda de histidina na posição N-terminal não foi bem-sucedida para a construção de EcAII em RPA, decidiu-se também continuar apenas com os vetores RPC transformados, trabalhando-se apenas com as construções RPC_ansB_HisN e RPC_ansZ_HisN deste ponto em diante, cujos produtos de expressão serão chamados simplesmente de EcAII e BsAII, respectivamente, sem indicação adicional da presença da cauda de histidina na posição N-terminal.

6.4 Processo fermentativo em frascos em shaker

O cultivo das cepas transformadas RPC_ansB_HisN e RPC_ansZ_HisN, aqui abreviados para Ec_ansB e Ec_ansZ, respectivamente, foi realizado em frascos Erlenmeyer agitados em shaker, em um período de 48 h a 37 °C, para a obtenção de grande volume de enzima. As condições finais de cultivo obtidas, bem como a produção de enzimas recombinantes, estão sumarizadas na Tabela 1, em termos relativos ao volume de cultivo e massa final de células. Após a floculação seguida de precipitação com sulfato de amônio dos caldos fermentados, foram obtidos extratos de EcAII e de BsAII em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, em volume correspondente a 10% do volume inicial de cultivo.

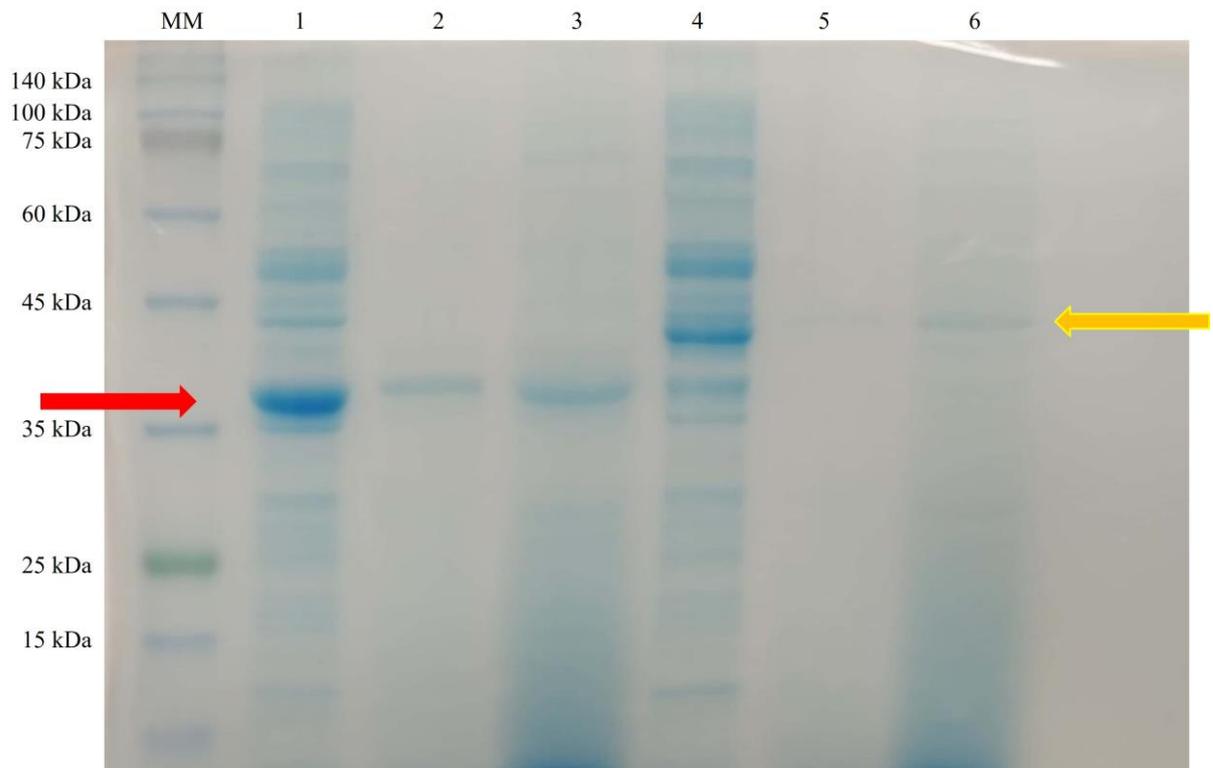
Tabela 1 – Dados de cultivo bacteriano e produção de L-ASNases II

Cultivo	DO ₆₀₀	Massa seca (g·L ⁻¹)	Produção (U·L ⁻¹)	Produção (U·g ⁻¹)
Ec_ansB	4,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	274,5 ± 08,4	100,4 ± 3,1
Ec_ansZ	5,0 ± 0,0	3,0 ± 0,3	109,3 ± 10,2	36,0 ± 3,4

Fonte: o autor. Dados de crescimento bacteriano em frascos, representados pela densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) e massa seca de células ao final do cultivo, e produtividade de L-ASNase II (EcAII ou BsAII) em termos de atividade enzimática produzida por volume de cultivo e por massa de células.

Os perfis proteicos dos extratos de EcAII e de BsAII estão apresentados em gel de eletroforese junto aos perfis obtidos nos caldos fermentados e *pellets* celulares brutos dos cultivos, na Figura 20. Uma quantificação relativa de bandas no gel, realizada em fotodocumentador, mostrou que os extratos são constituídos majoritariamente pela enzima recombinante, correspondendo a 52% e 46% nos extratos de EcAII e BsAII, respectivamente.

Figura 20 – Gel de poliacrilamida mostrando perfis proteicos da expressão intracelular e extracelular em frascos em shaker e dos extratos de L-ASNases II



Fonte: o autor. Gel de eletroforese dos perfis proteicos da expressão das construções RPC_ansB_HisN e RPC_ansZ_HisN em frascos. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da EcAII (38,5 kDa) e na correspondente ao peso molecular estimado do monômero da BsAII (41,4 kDa) estão apontadas pelas setas vermelha e amarela, respectivamente. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: *pellet* celular de RPC_ansB_HisN; 2: caldo fermentado de RPC_ansB_HisN; 3: extrato de EcAII; 4: *pellet* celular de RPC_ansZ_HisN; 5: caldo fermentado de RPC_ansZ_HisN; 6: extrato de BsAII.

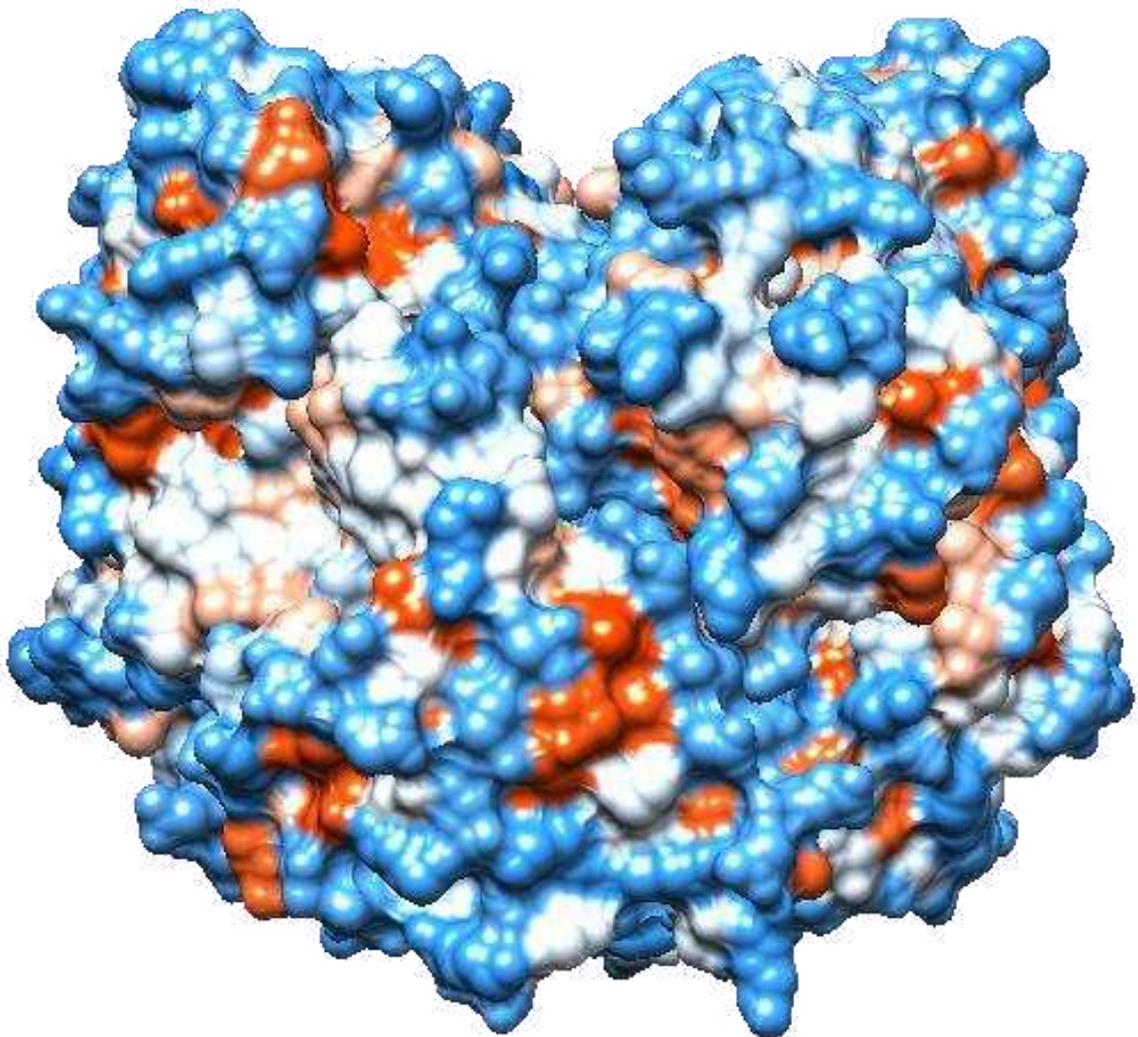
Como a produção de enzimas recombinantes em tubos foi mais expressiva do que em frascos, decidiu-se utilizar os extratos provenientes de cultivos em tubos para a obtenção de enzimas para experimentos de imobilização enzimática. Devido à similaridade das duas enzimas, decidiu-se realizar os experimentos de imobilização de L-ASNase II apenas com a enzima EcAII, partindo-se do extrato não purificado, com o objetivo de aplicar as melhores condições de imobilização, futuramente, também para BsAII.

6.5 Avaliação da adsorção de EcAII ao SBA-15

Apesar da EcAII ser uma enzima que possui uma predominância de grupamentos hidrofílicos na sua superfície, como pode ser visualizado na Figura 21, foi realizada a avaliação

de um processo de adsorção da enzima ao SBA-15, para verificar a viabilidade de imobilização através deste método. Como o pI teórico da enzima indica o pH em que a carga líquida da proteína é mais próxima de zero, o que deve favorecer a interação com superfícies hidrofóbicas, costuma-se realizar experimentos de adsorção nesse pH (Salis *et al.*, 2005). Os experimentos de adsorção foram então conduzidos em três diferentes pHs: acima, igual e abaixo do pI teórico, para avaliar a adsorção também em pHs adjacentes.

Figura 21 – Distribuição de hidrofobicidade na superfície da estrutura tridimensional da EcAII



Fonte: Swain *et al.* (1993), modificado pelo autor. Visualização da estrutura tridimensional da EcAII, colorizada segundo a escala de hidrofobicidade Kyte-Doolittle, onde a intensidade da cor azul indica hidrofiliicidade, branco indica o meio-termo na escala e a intensidade da cor vermelha indica hidrofobicidade. Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, sob o código de acesso 3ECA, utilizando o software Chimera 1.17.1.

Nas três condições de pH testadas, o rendimento de imobilização baseado em concentração de proteínas foi alto, como mostrado na Tabela 2. Entretanto, nenhuma das condições gerou imobilizados com atividade. Quando testados pelo ensaio de atividade de Nessler, todos apresentaram absorvância abaixo da faixa de detecção espectrofotométrica. Além disso, no curso de imobilização acompanhado para a condição de pH 6,7, foi observado um aumento de concentração de proteínas totais no sobrenadante da imobilização ao longo do tempo, como mostrado na Tabela 3. Dessa forma, constatou-se que a interação entre a enzima e o suporte por adsorção não é forte o suficiente, além de resultar em perda quase absoluta de atividade catalítica da enzima. Seguindo as propriedades da enzima e do suporte, bem como os resultados aqui obtidos, a imobilização por adsorção foi descartada como uma possibilidade viável para a imobilização da EcAII, decidindo-se seguir para a imobilização covalente em SBA-15 funcionalizado.

Tabela 2 – Estudo da imobilização por adsorção de EcAII em SBA-15 e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global

pH	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento global (%)
6,0	91,5 ± 1,0	0	0	0
6,7	88,0 ± 1,3	0	0	0
8,0	80,3 ± 0,1	0	0	0

Fonte: o autor. A tabela mostra os resultados de imobilização para as diferentes amostras de EcAII imobilizada por adsorção em SBA-15, com variação do pH do tampão de imobilização. O rendimento de imobilização foi calculado com base na concentração de proteínas. A atividade presente em cada imobilizado está exposta e atividade recuperada é uma razão em relação à atividade teórica calculada. O rendimento global é uma razão direta entre a atividade do imobilizado e a atividade oferecida na imobilização.

Tabela 3 – Concentração de proteínas no sobrenadante acompanhada no curso de imobilização por adsorção de EcAII em SBA-15

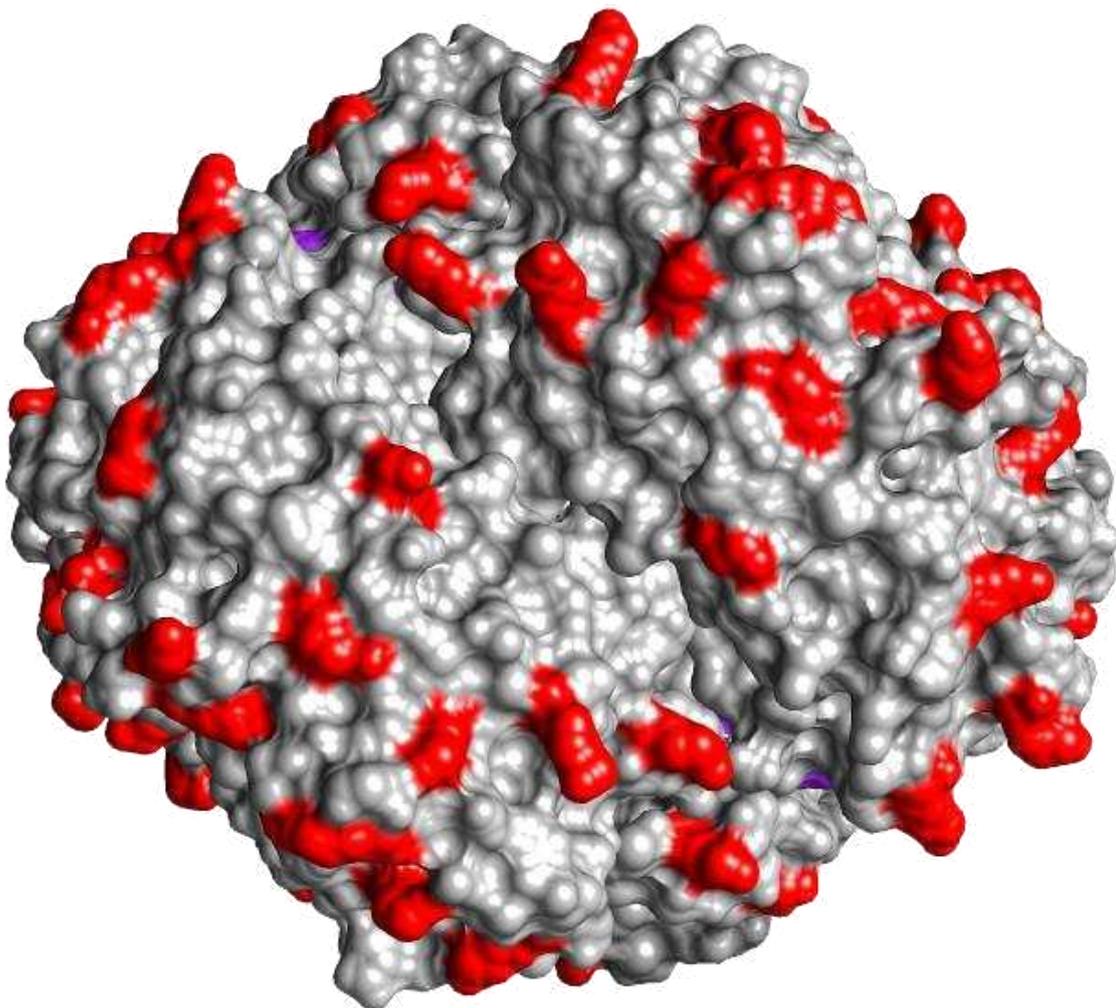
Tempo (min)	[Proteínas totais] (µg/mL)
60	1,1
120	5,2
180	50,2

Fonte: o autor. A tabela mostra a concentração de proteínas presente no sobrenadante da imobilização de EcAII em SBA-15, acompanhada durante 180 min.

6.6 Avaliação da ligação covalente de EcAII ao SBA-15 funcionalizado

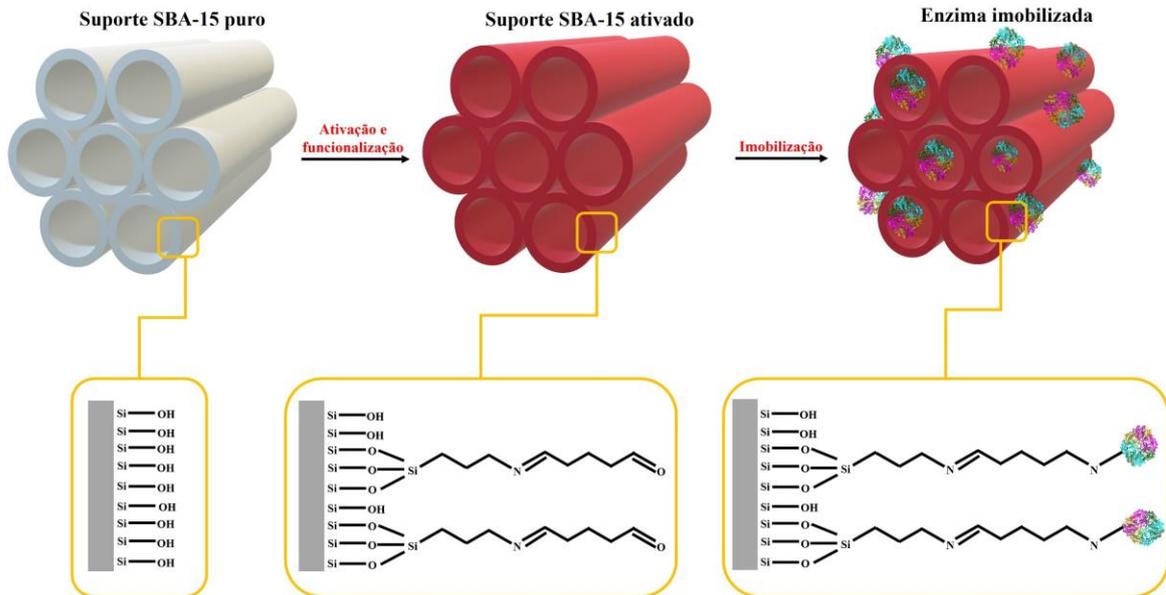
A superfície da EcAII possui grande quantidade de resíduos de lisina, bem espaçados entre si, como mostrado na Figura 22, o que possibilita a realização de imobilização covalente utilizando as cadeias laterais desses resíduos. A viabilidade da imobilização covalente foi verificada com a utilização de SBA-15 ativado, cujos passos estão representados na Figura 23. Foi utilizado SBA-15 funcionalizado com APTES, para a adição de grupamentos amino, e ativado com glutaraldeído, um agente bifuncional com dois grupamentos aldeído reativos, capazes de formar ligações covalentes com os grupamentos amino do SBA-15-APTES e das cadeias laterais dos resíduos de lisina da enzima, formando uma ponte entre o suporte e a enzima.

Figura 22 – Representação da superfície da estrutura tridimensional da EcAII destacando os resíduos de lisina



Fonte: Swain *et al.*(1993), modificado pelo autor. Visualização da estrutura tridimensional da EcAII, colorizada em cinza, com destaque para os resíduos de lisina em vermelho. As regiões de sítio ativo estão marcadas em roxo. Este modelo foi obtido do Protein Data Bank, sob o código de acesso 3ECA, utilizando o software Chimera 1.17.1.

Figura 23 – Etapas de funcionalização e ativação do SBA-15 e imobilização covalente



Fonte: o autor. Desenho esquemático dos processos de ativação e funcionalização do SBA-15 e da imobilização covalente de EcAII. A parte superior representa a estrutura nanométrica do suporte e do imobilizado. A parte inferior mostra detalhes da estrutura química da superfície em cada etapa, rica em grupos silanos no suporte SBA-15 puro, com os grupamentos aldeído reativos no suporte ativado e com as enzimas ligadas covalentemente no imobilizado. A EcAII está representada na forma *cartoon* do seu modelo 3D. A representação não está em escala.

A quantidade de enzimas que um suporte é capaz de carregar, comumente chamado de carga enzimática, é dependente da natureza de ambos enzima e suporte utilizado, e pode influenciar na atividade recuperada, na estabilidade térmica e na estabilidade a condições desnaturantes (Fernandez-Lopez *et al.*, 2017). Como não há um estudo prévio na literatura da quantidade máxima de L-ASNase que é capaz de ligar-se ao SBA-15, o primeiro estudo foi realizado com uma concentração comumente utilizada em experimentos de imobilização de 2 mg proteína/g suporte (Bebić *et al.*, 2020; Benítez-Mateos; Contente, 2021; Kornecki *et al.*, 2020). Dessa forma, utilizou-se o extrato de EcAII na concentração de 100 µg/mL em um volume de 2 mL, em contato com 100 mg de suporte. Este estudo inicial, no entanto, gerou imobilizados cujos ensaios de atividade resultaram em absorbâncias abaixo do limite de confiança de leitura espectrofotométrica. Desta forma, decidiu-se realizar o estudo inicial com uma alta concentração de enzima, indicada nos imobilizados com o símbolo AE, passando-se para um extrato de 300 µg/mL, correspondente a 6 mg proteína/g suporte. O estudo da

imobilização covalente da EcAII em SBA-15 foi então realizado para determinar a viabilidade do processo e o tempo mais adequado para sua realização. Os tempos estudados e os resultados de imobilização associados estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Estudo do tempo de imobilização de EcAII em SBA-15-APTES-GA e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global

Tempo (min)	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento global (%)
30	100	11,2 ± 0,9	8,1 ± 0,6	8,1 ± 0,6
60	100	10,9 ± 0,8	7,9 ± 0,6	7,9 ± 0,6
180	100	7,7 ± 1,4	5,6 ± 1,0	5,6 ± 1,0
300	100	4,3 ± 1,4	3,1 ± 1,0	3,1 ± 1,0
1440	100	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1

Fonte: o autor. A tabela mostra os resultados de imobilização para as diferentes amostras de EcAII imobilizada em SBA-15-APTES-GA, com variação do tempo de imobilização. O rendimento de imobilização foi calculado com base na concentração de proteínas. A atividade presente em cada imobilizado está exposta com seu valor calculado de desvio padrão e atividade recuperada é uma razão em relação à atividade teórica calculada. O rendimento global é uma razão direta entre a atividade do imobilizado e a atividade oferecida na imobilização.

Em todos os tempos observados, a incorporação de proteínas ao suporte foi total, observado pelo rendimento de imobilização, não havendo proteínas nem atividade residual nos sobrenadantes de imobilização. Foi percebida uma tendência à menor recuperação de atividade da enzima com o aumento do tempo de incubação entre a enzima e o suporte ativado (Tabela 4), sendo o menor tempo aquele que conseguiu uma maior atividade recuperada. Dessa forma, a incubação de 30 minutos foi definida como a ideal para a condução dos experimentos de imobilização covalente. Como a atividade recuperada neste tempo de incubação foi abaixo de 10%, seguiram-se experimentos visando melhorar as condições de imobilização e evitar a perda de atividade enzimática.

6.7 Imobilização covalente na presença de aminoácidos

A fim de aumentar o rendimento global da imobilização covalente, decidiu-se adicionar ao tampão de imobilização moléculas que induzem a formação do tetrâmero de EcAII, de forma a manter essa estrutura quaternária preservada durante todo o curso de imobilização. Foram então escolhidos para esta avaliação o substrato primário da enzima, a Asn, e o inibidor competitivo Gln, que também é hidrolisado pela enzima. Os experimentos foram então

conduzidos em alta concentração (100 mM) desses aminoácidos, cujos resultados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Estudo da utilização de protetores da estrutura tetramérica da EcAII e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global

Amostra	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento global (%)
SBA-AE	99,7 ± 0,5	11,2 ± 00,0	8,3 ± 00,4	8,3 ± 00,3
SBA-AE(Asn)	46,4 ± 2,4	57,0 ± 15,9	97,8 ± 28,4	45,0 ± 10,8
SBA-AE(Gln)	96,0 ± 3,8	31,9 ± 04,9	23,9 ± 05,0	23,0 ± 05,8

Fonte: o autor. A tabela mostra os resultados de imobilização para as diferentes amostras de EcAII imobilizada em SBA-15-APTES-GA, sem (SBA-AE) e com aditivos na imobilização (SBA-AE(Asn) e SBA-AE(Gln)). O rendimento de imobilização foi calculado com base na atividade enzimática. A atividade presente em cada imobilizado está exposta com seu valor calculado de desvio padrão e atividade recuperada é relativa à atividade teórica calculada. O rendimento global é uma razão direta entre a atividade do imobilizado e a atividade oferecida na imobilização.

Os resultados de imobilização mostram um alto rendimento de imobilização para a amostra que não recebeu aditivos na imobilização (SBA-AE), como já havia sido demonstrado no estudo anterior de tempo ótimo de imobilização, acompanhado de uma baixa atividade recuperada. A amostra que foi incubada junto a Gln, o SBA-AE-Gln, obteve um rendimento de imobilização próximo ao de SBA-AE, mas já alcançou um aumento significativo na atividade recuperada. Já a amostra que foi incubada com Asn obteve o menor rendimento de imobilização, abaixo de 60%, mas em compensação, obteve um atividade recuperada perto de 100%, o que indica que a maioria das enzimas imobilizadas permaneceram ativas.

A combinação de rendimento de imobilização e atividade recuperada resultou em nenhuma das amostras atingindo um rendimento global superior a 50%, o que indica ainda uma perda de enzimas que não estão sendo incorporadas ou ativas no suporte.

Uma vez que o extrato proteico dessas imobilizações estava com concentração de 300 µg/mL, o valor de concentração de proteínas oferecida se encontrava em 6 mg/g suporte. Como este poderia ser o motivo para o baixo rendimento de imobilização na condição de SBA-AE(Asn), havendo uma sobra de enzimas, decidiu-se realizar os experimentos aplicando-se uma redução da concentração de proteínas oferecida.

6.8 Avaliação da imobilização com menor concentração de proteínas

Houve uma redução da concentração de proteínas utilizadas na imobilização para 2 mg/g suporte, de forma que o extrato proteico de EcAII teve a sua concentração ajustada para 100 µg/mL, e os experimentos anteriores foram repetidos nessa nova condição. Os resultados de imobilização para as condições sob concentração menor de proteínas estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Redução da quantidade de proteína utilizada para a imobilização e sua relação com o rendimento de imobilização, atividade do biocatalisador, atividade recuperada e rendimento global

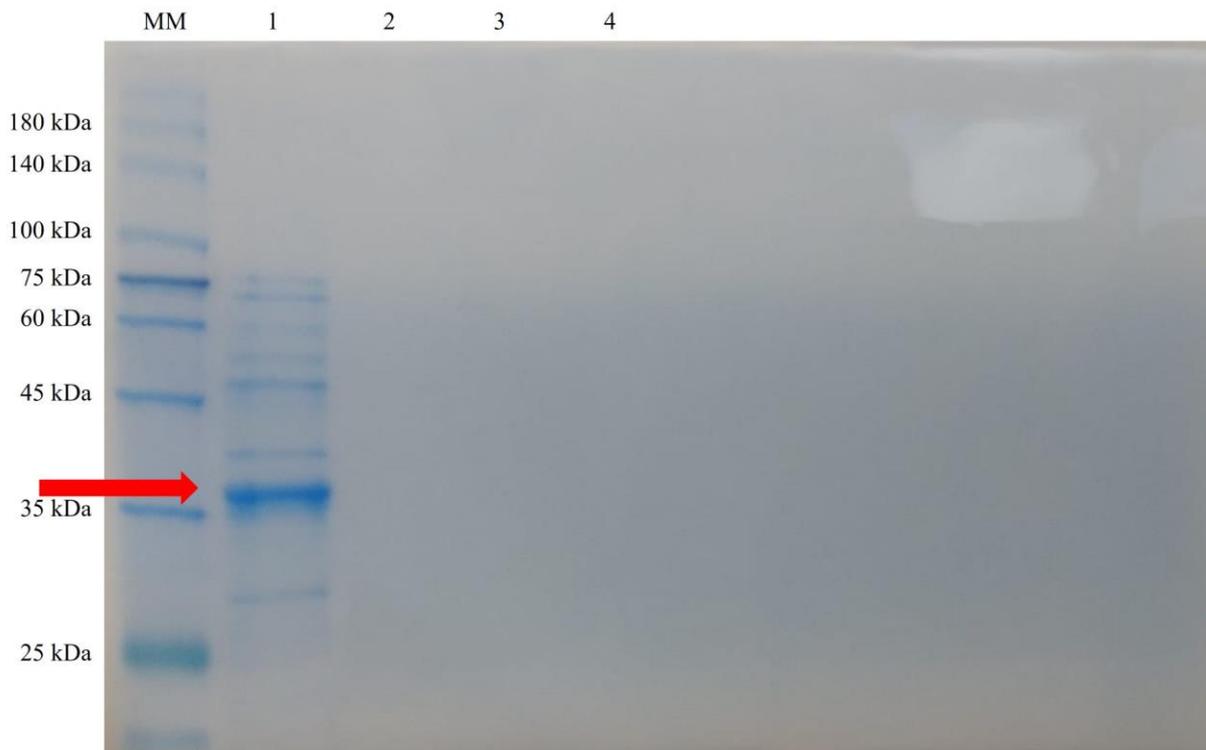
Amostra	Rendimento de imobilização (%)	Atividade do imobilizado (U/g)	Atividade recuperada (%)	Rendimento global (%)
SBA-E	93,0 ± 9,1	1,2 ± 0,3	8,3 ± 06,9	7,3 ± 05,3
SBA-E(Asn)	96,3 ± 3,4	28,7 ± 3,4	101,8 ± 27,9	97,4 ± 23,5
SBA-E(Gln)	99,1 ± 1,6	10,8 ± 4,6	39,4 ± 16,5	38,9 ± 15,9

Fonte: o autor. A tabela mostra os resultados de imobilização para as diferentes amostras de EcAII imobilizada em SBA-15-APTES-GA, com concentração do extrato a 100 µg/mL, sem (SBA-E) e com aditivos na imobilização (SBA-E(Asn) e SBA-E(Gln)). O rendimento de imobilização foi calculado com base na atividade enzimática. A atividade presente em cada imobilizado está exposta com seu valor calculado de desvio padrão e atividade recuperada é relativa à atividade teórica calculada. O rendimento global é uma razão direta entre a atividade do imobilizado e a atividade oferecida na imobilização.

A nova condição permitiu que a condição com incubação em tampão suplementado de Asn aumentasse seu rendimento de imobilização para 96%, mantendo o nível da sua atividade recuperada. O rendimento global do imobilizado produzido na presença de Gln também foi beneficiado pela nova condição, mas foi ofuscado pelo rendimento global do imobilizado produzido com Asn, que chegou próximo a 100%.

Os imobilizados produzidos foram também submetidos a uma análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de β-mercaptoetanol e com aquecimento a 100 °C, para verificar a força da imobilização dos monômeros de EcAII. Esta análise de eletroforese está mostrada na Figura 24. A eletroforese mostrou que em nenhum dos imobilizados houve dissociação de proteínas imobilizadas, o que mostra que nas três condições, todas os monômeros estão imobilizados, seja formando tetrâmeros, dímeros ou na forma de monômeros.

Figura 24 – Gel de poliacrilamida mostrando a avaliação da interação dos monômeros de EcAII com SBA-15-APTES-GA



Fonte: o autor. Gel de poliacrilamida 12,5% da eletroforese do extrato de EcAII a 100 $\mu\text{g/mL}$ e dos imobilizados, para verificação da dissociação de monômeros da L-ASNase II. As bandas na altura correspondente ao peso molecular estimado do monômero da EcAII (38,5 kDa) estão apontadas pela seta vermelha. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor High Range Protein Marker); 1: extrato de EcAII; 2: SBA-E; 3: SBA-E(Asn); 4: SBA-E(Gln).

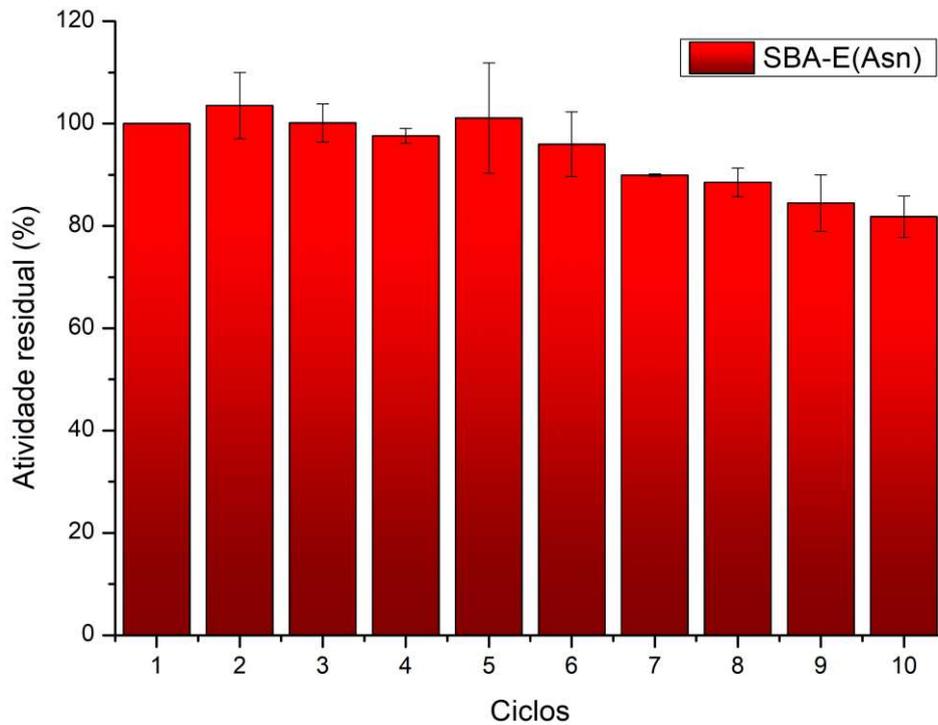
Uma vez que a principal diferença entre os imobilizados foi observada no rendimento global da imobilização, com uma clara superioridade de SBA-E(Asn) frente aos outros dois imobilizados, este foi selecionado como o melhor biocatalisador para a utilização nos experimentos subsequentes.

6.9 Estabilidade operacional em ciclos de reutilização do biocatalisador

Partindo-se do resultado de recuperação de atividade observada no biocatalisador SBA-E(Asn), bem como a ausência de dissociação de monômeros em condições desnaturantes, foi realizada uma avaliação da sua reutilização em ciclos subsequentes de um processo, chamada estabilidade operacional. O imobilizado SBA-E(Asn) foi submetido a esta avaliação

utilizando a temperatura normalmente utilizada nos ensaios de atividade de L-ASNase, a 37 °C. O perfil ao longo de 10 ciclos de reutilização está mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Estabilidade operacional em 10 ciclos de reutilização de SBA-E(Asn) a 37 °C



Fonte: o autor. Estabilidade operacional de SBA-E(Asn) ao longo de 10 ciclos de reutilização, de 1 hora de duração cada, analisada no software OriginPro® 8.5. As bateladas de hidrólise subsequentes foram realizadas em solução de Asn 100 mM preparada em solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, a 37 °C. A atividade residual é uma porcentagem relativa à atividade apresentada no primeiro ciclo.

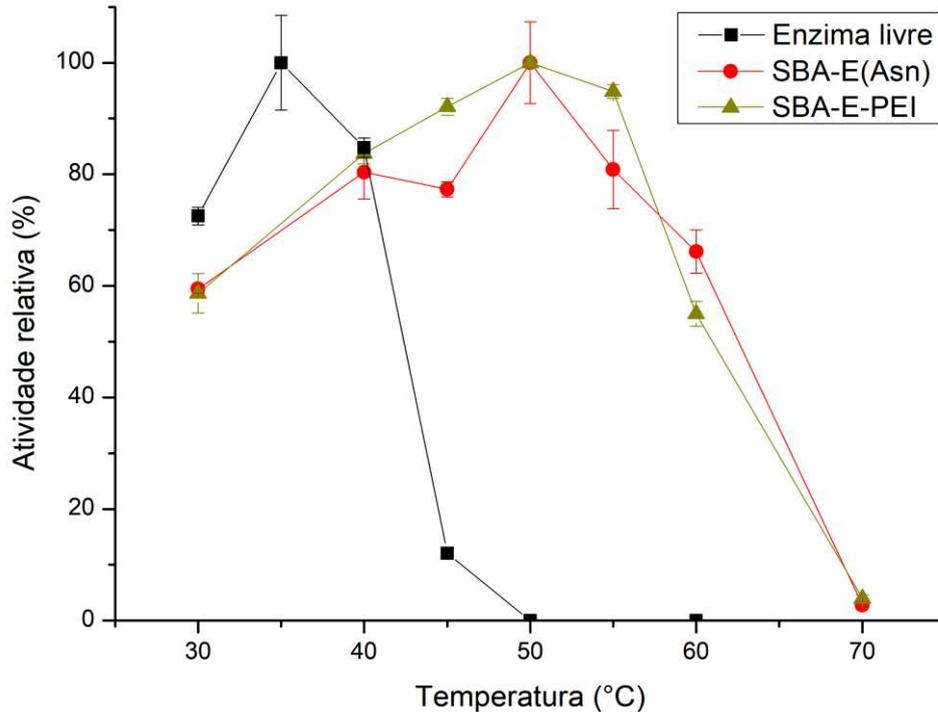
O SBA-E(Asn) mostrou-se bem estável ao longo de sua reutilização, mantendo até o 5º ciclo a totalidade de sua atividade catalítica, iniciando um lento decaimento apenas a partir do 6º ciclo. Ao final dos 10 ciclos, o imobilizado ainda retinha 81% de sua atividade inicial, demonstrando ótima capacidade de reutilização a 37 °C.

6.10 Temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre

O imobilizado SBA-E(Asn) foi avaliado quanto à sua temperatura ótima de atuação, para verificar se o processo de imobilização provocou alguma mudança em relação à enzima

livre, para definir as melhores condições de temperatura para os experimentos seguintes. Enzima livre e imobilizado foram testados em temperaturas variando de 30 a 70 °C, e os perfis obtidos de atividade relativa à maior obtida para cada enzima estão mostrados na Figura 26.

Figura 26 – Gráficos de avaliação da temperatura ótima dos biocatalisadores e enzima livre



Fonte: o autor. Avaliação da temperatura ótima de atuação catalítica dos biocatalisadores e da enzima livre diante do substrato Asn, analisada no software OriginPro® 8.5. Os ensaios foram conduzidos em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, em diferentes temperaturas, durante 30 min. A atividade relativa foi calculada como uma porcentagem em relação à maior atividade observada, individualmente para cada enzima.

Foi constatado que o imobilizado apresentou um perfil de atividade dependente da temperatura deslocado para a direita em relação à enzima livre, aumentando a temperatura na qual a enzima atinge sua atividade máxima. A temperatura que proporcionou maior atividade à EcAII livre foi de 35 °C, enquanto para SBA-E(Asn), a melhor temperatura foi de 50 °C. Ambas apresentaram um rápido decaimento da atividade cerca de 15 a 20 °C acima de sua respectiva temperatura ótima.

6.11 Propriedades cinéticas dos biocatalisadores e da enzima livre

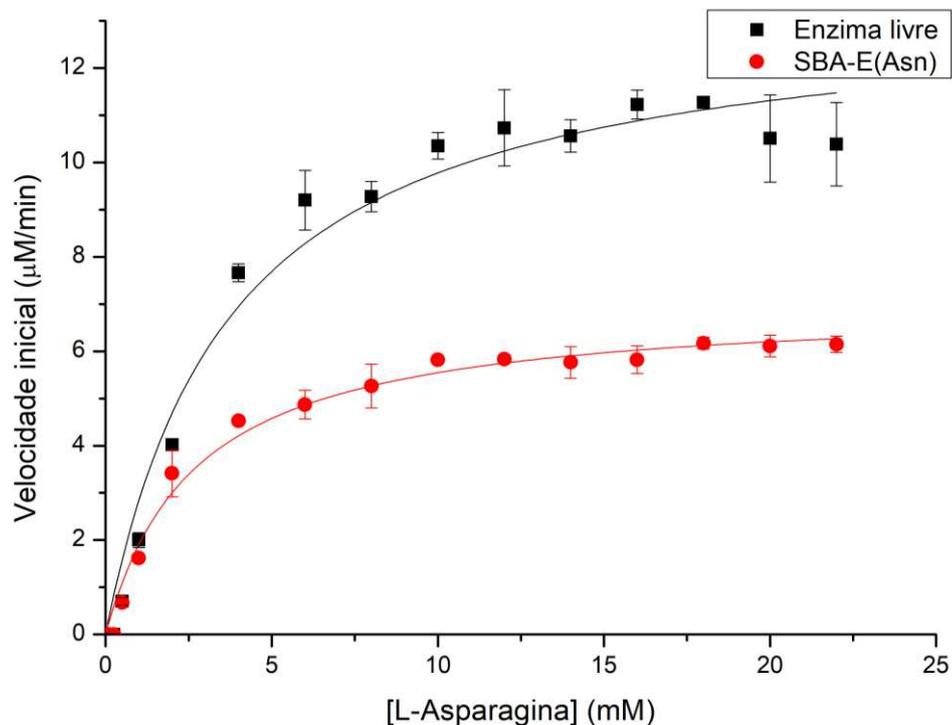
O imobilizado SBA-E(Asn) foi também comparado à EcAII livre em termos cinéticos, o que permite fazer uma avaliação do efeito da imobilização na velocidade de catálise do substrato. A velocidade inicial de catálise, medida nos primeiros 30 min de reação enzimática, foi obtida para as duas enzimas em diferentes concentrações de substrato, até atingir um platô. Os resultados foram utilizados para a obtenção do K_M e da Velocidade inicial máxima ($V_{MÁX}$) através da construção da curva de Michaelis-Menten no software OriginPro® 8.5. Os K_M e $V_{MÁX}$ obtidos estão sumarizados na Tabela 7 e as curvas mostradas na Figura 27.

Tabela 7 – Constantes cinéticas da enzima livre e de SBA-E(Asn)

Amostra	K_M (mM)	$V_{MÁX}$ ($\mu\text{M min}^{-1}$)
Enzima livre	$3,7 \pm 0,7$	$13,4 \pm 0,6$
SBA-E(Asn)	$2,7 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,2$

Fonte: o autor. Dados obtidos através da análise das curvas de Michaelis-Menten, gerados pelo software OriginPro® 8.5. Os ensaios foram conduzidos na temperatura ótima de cada enzima, em solução Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, pH 8,0. K_M é a constante de Michaelis-Menten; $V_{MÁX}$ é a velocidade inicial máxima de catálise enzimática.

Figura 27 – Curvas de cinética enzimática da enzima livre e de SBA-E(Asn)



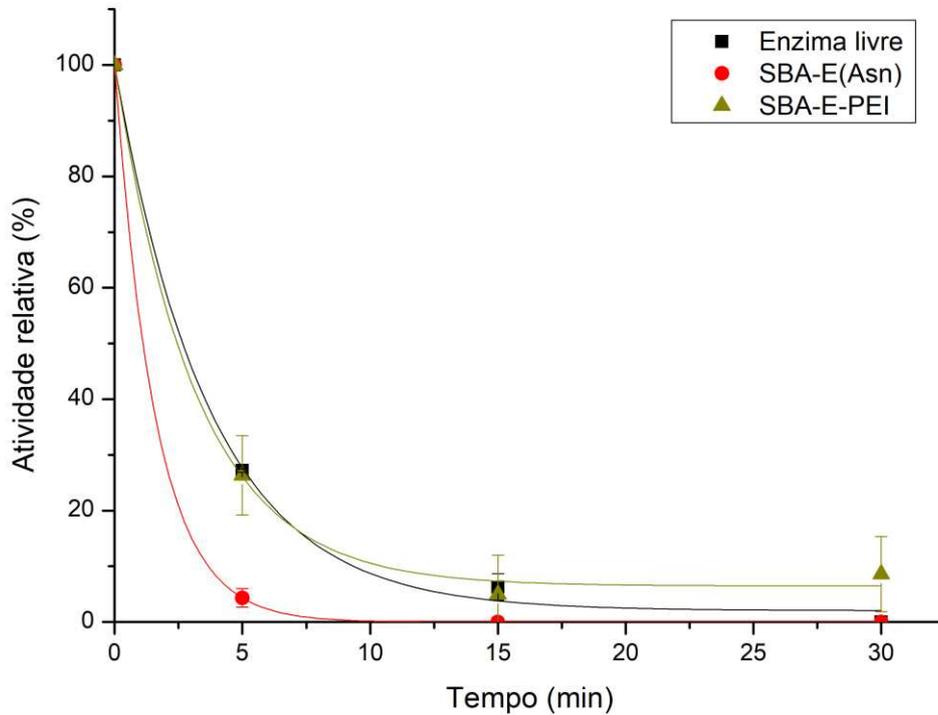
Fonte: o autor. Avaliação da velocidade inicial de catálise da enzima livre e do biocatalisador imobilizado SBA-E(Asn), diante da mudança de concentração do substrato Asn. Análise feita no software OriginPro® 8.5. Os ensaios foram conduzidos em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, na temperatura ótima de cada enzima, 35 °C para a enzima livre e 50 °C para SBA-E(Asn).

Foi observado nos perfis que a $V_{MÁX}$ de SBA-E(Asn) foi menor em relação à de EcAII livre, apesar da condução do experimento ser realizada em concentrações proteicas iguais aos ensaios de atividade (seção 5.16). Quanto ao K_M , houve uma ligeira redução no SBA-E(Asn) em relação à enzima livre (Tabela 7). Ainda que não tão significativa, a diferença mostra uma tendência à redução do K_M .

6.12 Estabilidade térmica a 60 °C dos biocatalisadores e da enzima livre

No processamento da batata, há um processo prévio ao processo de fritura, etapa de *blanching* em 55-75 °C em período de 1 hora (Ngobese; Workneh; Siwela, 2017). Foi então avaliada a capacidade das enzimas de resistir a temperaturas semelhantes. Foi testada inicialmente essa estabilidade térmica a uma temperatura de 60 °C, na ausência de substrato, apenas em Tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM, pH 8,0, utilizando a enzima livre e o imobilizado SBA-E(Asn), cujos perfis de decaimento térmico estão mostrados na Figura 28, e dados de desativação térmica estão mostrados na Tabela 8.

Figura 28 – Perfis de desativação térmica das enzimas a 60 °C



Fonte: o autor. Perfis de desativação térmica a 60 °C da enzima livre e dos imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos. Análise feita no software OriginPro® 8.5. A incubação foi conduzida em solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0.

Tabela 8 – Dados de desativação térmica a 60 °C das enzimas

Amostra	R ²	t _{1/2} (min)	FE	α	K _d (min ⁻¹)
Enzima livre	0,99	2,66	-	0,02	0,27
SBA-E(Asn)	1,00	1,10	0,41	0,00	0,63
SBA-E-PEI	0,99	2,45	0,92	0,06	0,31

Fonte: o autor. Dados do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica enzimática, aplicados para a enzima livre e imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI. As condições empregadas para desativação foram solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, a 60 °C. R² é o fator de correlação das curvas; t_{1/2} é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre t_{1/2} do imobilizado e t_{1/2} da enzima livre; α representa a razão entre as atividades específicas da enzima depois e antes da desativação; K_d é a constante de desativação térmica.

Tanto a enzima livre quanto o SBA-E(Asn) apresentaram perfis de rápido decaimento a 60 °C, mostrando que a imobilização não foi capaz de melhorar a estabilidade térmica da enzima a esta temperatura, apresentando tempos de meia-vida de poucos minutos.

Diante deste cenário, decidiu-se realizar o recobrimento do imobilizado com moléculas poliméricas, a fim de obter um aumento na estabilidade térmica do biocatalisador.

6.13 Recobrimento dos biocatalisadores

Neste trabalho, foi testado o recobrimento com duas moléculas poliméricas, polietilenoimina (PEI) e dextrana-aldeído (DA). Os imobilizados recobertos com esses polímeros tiveram sua atividade avaliada para verificar a possível redução de atividade frente ao imobilizado original, cujos resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Relação entre atividade dos imobilizados recobertos e SBA-E(Asn)

Amostra	Atividade do imobilizado (U/g)	Atividade relativa (%)
SBA-E(Asn)	22,6 ± 1,1	-
SBA-E-PEI	16,9 ± 3,5	74,8 ± 15,3
SBA-E-DA	7,6 ± 1,9	33,8 ± 08,3

Fonte: o autor. Estão mostradas as atividades para o imobilizado original SBA-E(Asn) e os recobertos com PEI e DA, SBA-E-PEI e SBA-E-DA, respectivamente. A atividade relativa é uma razão entre a atividade dos imobilizados recobertos e o imobilizado original.

O recobrimento, como esperado, reduziu parcialmente a atividade catalítica presente no imobilizado, havendo uma maior viabilidade no recobrimento com PEI, que reteve cerca de 75% da atividade original. O imobilizado SBA-E-PEI também apresentou um perfil de atividade frente à temperatura similar ao de SBA-E(Asn), com uma temperatura ótima de atuação de 50 °C, como já mostrado na Figura 26. Como a redução de atividade provocada pelo recobrimento com PEI foi bem inferior à redução provocada pela DA, decidiu-se prosseguir os experimentos com o imobilizado SBA-E-PEI, excluindo-se a amostra SBA-E-DA dos futuros ensaios.

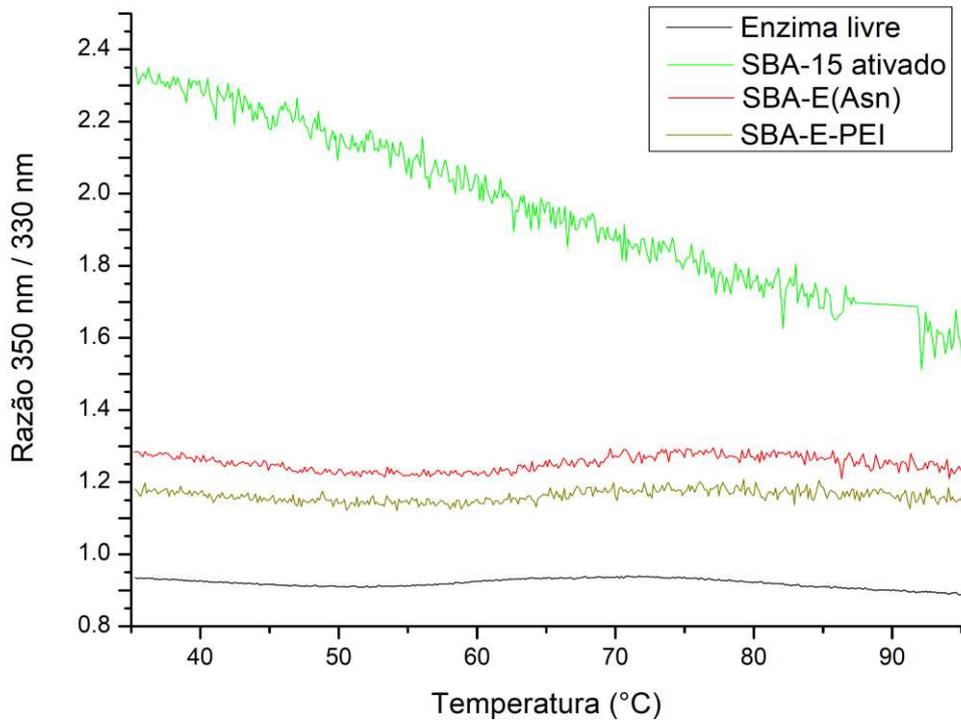
6.14 Mudanças na estabilidade térmica enzimática

Como mostrado na Figura 28 e na Tabela 8, o recobrimento com PEI foi capaz de promover um ligeiro aumento na estabilidade térmica do imobilizado, atingindo um $t_{1/2}$ similar ao da enzima livre, com fator de estabilidade próximo a 1. Porém, a estabilidade a 60 °C ainda

é bem insatisfatória para alcançar o objetivo de aplicação industrial. Foi realizada então uma avaliação da estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre através da fluorescência de resíduos de triptofano das enzimas, a fim de detectar alterações no perfil de mudança estrutural dependente da temperatura, a nível molecular. Inicialmente, a análise forneceu os dados brutos de fluorescência (*brightness*) a 330 nm e a 350 nm pelas amostras de enzima livre, de SBA-GA-APTES e dos imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, que estão reunidos no Apêndice C. Esses dados brutos apresentaram confirmações importantes, como a ausência de proteínas no suporte ativado, por uma queda de fluorescência geral com o aumento de temperatura, e a menor fluorescência emitida pelos imobilizados em relação à enzima livre, devido à ocultação de moléculas no interior dos poros do suporte.

A principal forma de análise dessa fluorescência é a razão entre a emissão a 350 nm e a emissão a 330 nm, que indica a mudança de espectro no perfil de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano (Trp). A análise da razão 350 nm / 330 nm bruta, como mostrado na Figura 29, mostra perfis relativamente semelhantes para a enzima livre e para os imobilizados, indicando uma similaridade no modo de desenovelamento frente a temperatura. Novamente, o decréscimo relativamente constante da razão 350 nm / 330 nm para o suporte SBA-15-APTES-GA mostra a ausência de proteínas nessa amostra, e a sua comparação com as amostras enzimáticas demonstra que sua presença nos imobilizados não provoca uma mudança significativa no perfil da razão 350 nm / 330 nm.

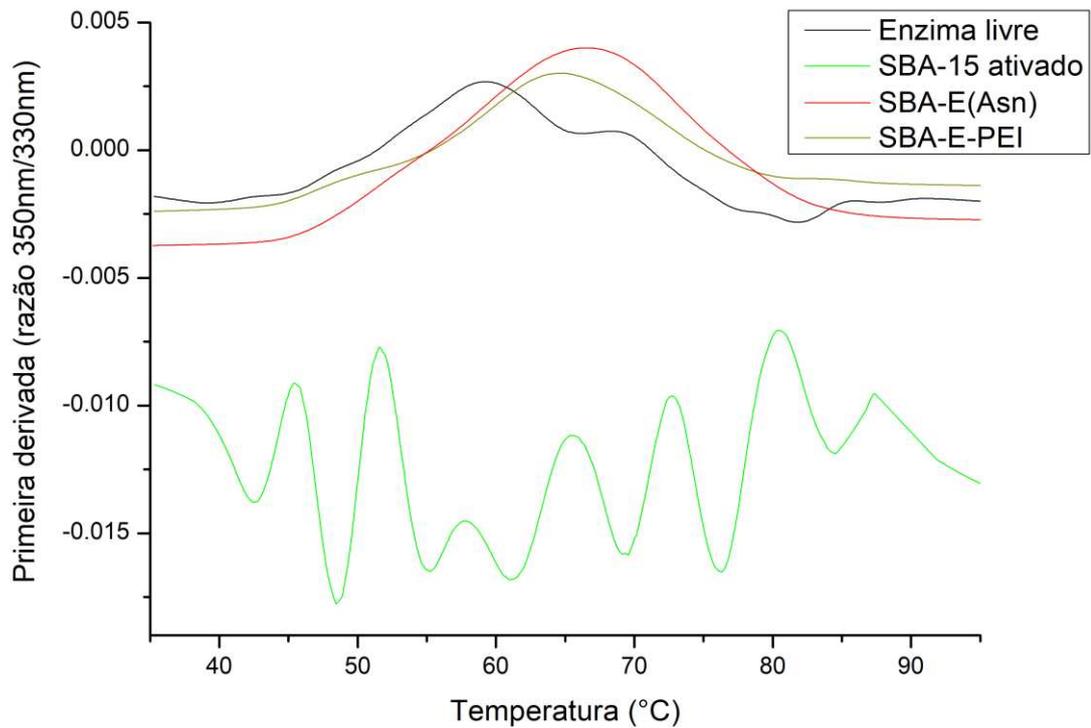
Figura 29 – Perfis de razão de fluorescência a 350 nm e 330 nm das enzimas e do suporte



Fonte: o autor. Gráfico mostrando como a razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura nas amostras de enzima livre, SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, bem como do suporte ativado SBA-15-APTES-GA. Os dados foram obtidos no Tycho® NT.6 e analisados no software OriginPro® 8.5.

Além da razão bruta entre as fluorescências nesses comprimentos de onda, a visualização da primeira derivada desta razão permite a obtenção de detalhes não facilmente vistos nos dados brutos, como os pontos de inflexão, que correspondem a temperaturas em que há mudanças muito significativas na conformação tridimensional das proteínas. Esses pontos de inflexão (T_i) são obtidos pelos picos nas curvas de primeira derivada, e fornecidos automaticamente pelo equipamento. As curvas de primeira derivada dos biocatalisadores, da enzima livre e do suporte ativado estão mostradas na Figura 30. A análise forneceu dois pontos de inflexão para a enzima livre, sendo o primeiro a 59,3 °C e o segundo a 81,8 °C, e um ponto de inflexão para SBA-E(Asn), a 66,5 °C. Não foi detectado ponto de inflexão para SBA-E-PEI.

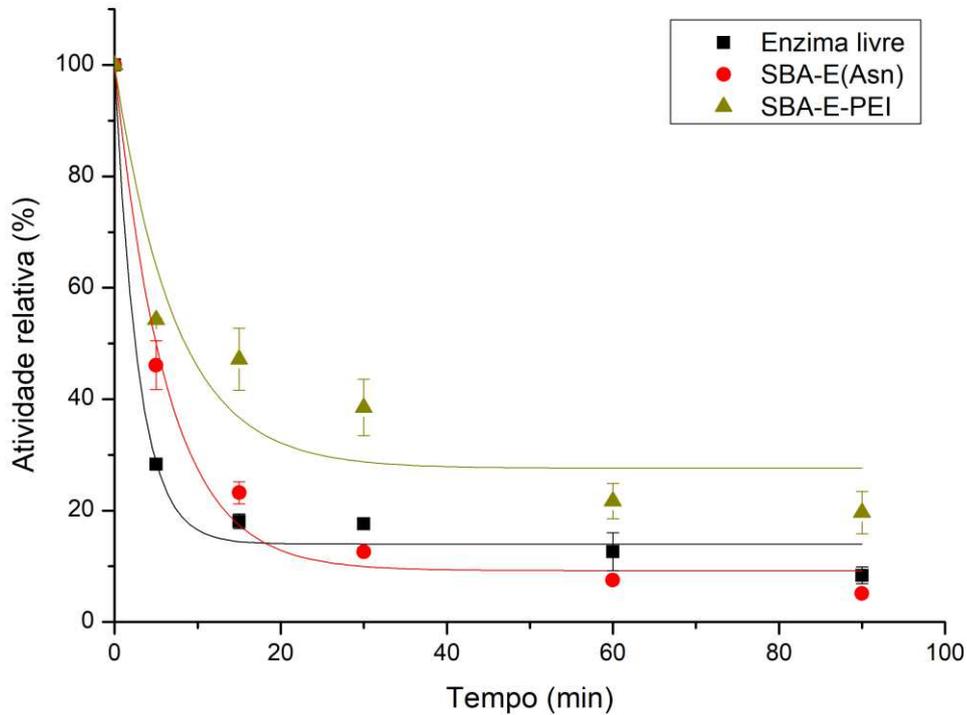
Figura 30 – Primeira derivada da razão de fluorescência das enzimas e do suporte



Fonte: o autor. Gráfico mostrando como a primeira derivada da razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura nas amostras de enzima livre, SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, bem como do suporte ativado SBA-15-APTES-GA. Dados obtidos no Tycho® NT.6 e analisados no software OriginPro® 8.5.

Tendo então indicativos de uma estabilização da enzima nos imobilizados, foram conduzidos novos ensaios de estabilidade térmica, desta vez em uma temperatura um pouco mais baixa, a 50 °C, para verificar a resistência térmica das enzimas. Os resultados destes ensaios estão mostrados na Figura 31 e na Tabela 10.

Figura 31 – Perfis de desativação térmica das enzimas a 50 °C



Fonte: o autor. Perfis de desativação térmica a 50 °C da enzima livre e dos imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, em termos de atividade relativa à inicial por tempo em minutos, analisada no software OriginPro® 8.5. A incubação foi conduzida em solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0.

Tabela 10 – Dados de desativação térmica a 50 °C das enzimas

Amostra	R ²	t _{1/2} (min)	FE	α	K _d (min ⁻¹)
Enzima livre	0,99	2,45	-	0,14	0,35
SBA-E(Asn)	0,98	4,98	2,03	0,09	0,16
SBA-E-PEI	0,88	8,49	3,46	0,28	0,14

Fonte: o autor. Dados do modelo de Sadana e Henley para a desativação térmica enzimática, aplicados para a enzima livre e imobilizados SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI. As condições empregadas para desativação foram solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, a 60 °C. R² é o fator de correlação das curvas; t_{1/2} é o tempo de meia-vida da enzima; FE é o fator de estabilidade, a razão entre t_{1/2} do imobilizado e t_{1/2} da enzima livre; α representa a razão entre as atividades específicas da enzima depois e antes da desativação; K_d é a constante de desativação térmica.

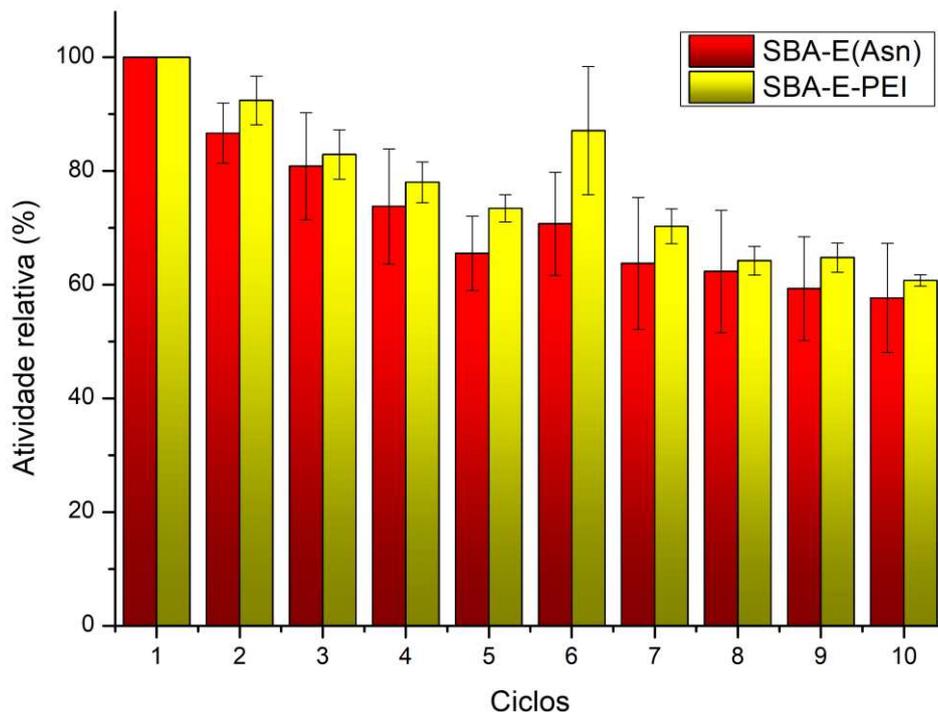
Nesta temperatura, houve uma maior diferenciação entre a enzima livre e os imobilizados, em especial o SBA-E-PEI, que alcançou um t_{1/2} mais de três vezes superior ao da enzima livre. Para avaliar a resistência térmica na presença do substrato, situação mais próxima

à industrial, decidiu-se verificar a capacidade de reutilização dos biocatalisadores quando aplicados em temperatura elevada.

6.15 Avaliação da estabilidade operacional em ciclos de reutilização a 55 °C

Como nas condições dos ensaios de estabilidade térmica, a enzima está apenas em solução tampão, sem a presença do substrato, diferente do que ocorreria em sua aplicação industrial, decidiu-se avaliar novamente a estabilidade operacional de SBA-E(Asn), desta vez acompanhado do imobilizado recoberto, SBA-E-PEI, a uma temperatura comumente utilizada na etapa de *blanching* das batatas, 55 °C, e com alta concentração de Asn. O resultado para este ensaio de reutilização está mostrado na Figura 32.

Figura 32 – Estabilidade operacional em 10 ciclos de reutilização de SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI a 55 °C



Fonte: o autor. Estabilidade operacional de SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI ao longo de 10 ciclos de 1 hora de duração cada, analisada no software OriginPro® 8.5. As bateladas de hidrólise subsequentes foram realizadas em solução de L-Asn 100 mM preparada em solução tampão Tris 50 mM NaCl 300 mM pH 8,0, a 55 °C. A atividade residual é uma porcentagem relativa à atividade apresentada no primeiro ciclo.

A utilização dos biocatalisadores imobilizados em temperatura elevada na presença do substrato demonstrou que há uma maior resistência da enzima à desativação, permitindo que ela seja reutilizada por 10 ciclos sem chegar a perder nem metade de sua atividade inicial. Comparando os imobilizados entre si, apesar de em média o SBA-E-PEI ter mantido uma maior atividade residual em cada ciclo do que SBA-E(Asn), a diferença não é tão significativa, sendo abrangida pelos desvios de cada amostragem.

7 DISCUSSÃO

7.1 Produção de L-ASNases II em bactérias transformadas

O sequenciamento das amostras de DNA, provenientes das bactérias transformadas, ratifica a inserção dos genes *ansB* e *ansZ* nos vetores RPA e RPC, contendo sequência-His. Constata-se o posicionamento dos genes logo após a sequência sinal para exportação pelo periplasma, garantindo a transcrição e tradução dessa sequência e do gene como um único polipeptídeo. O posicionamento da cauda de histidina, na extremidade C-terminal ou N-terminal, provoca alterações observadas na marcação das enzimas por Western Blotting (Figuras 18 e 19). As enzimas com cauda de histidina na posição C-terminal (HisC) não interagem com o anticorpo anti-poli-histidina, o que não permite sua visualização através do Western Blotting. Já as enzimas com cauda de histidina na posição N-terminal (HisN) apresentam interação com o anticorpo. Sugere-se que, nas enzimas HisC, há uma ocultação da cauda de histidina no interior da estrutura tetramérica ou uma forte interação atrativa com a enzima, enquanto nas enzimas HisN, não há essa ocultação, o que provoca essa diferença na interação com o anticorpo. A dificuldade de acesso à cauda é relatada no trabalho de Effer *et al.* (2019) com uma L-ASNase de *D. chrysanthemi*, o que prejudica a produção extracelular da enzima. Como mostrado na Figura 17, a posição da cauda de histidina afeta a atividade enzimática de BsAII, que não apresenta atividade com a cauda inserida na posição C-terminal, apenas com a cauda na posição N-terminal. Para EcAII, no entanto, esta diferença de atividade não é observada. Devido às diferenças observadas, tanto em interação das caudas com o anticorpo anti-poli-histidina quanto em atividade enzimática, constata-se que as enzimas HisN apresentam melhor desempenho em relação às enzimas HisC.

A expressão das enzimas em vetor RPA ou RPC não apresenta diferenças significativas na produção, medida por atividade enzimática, como mostrado na Figura 17, sendo possível utilizar ambos para a expressão de L-ASNase II recombinante. Entretanto, não foi possível obter EcAII com cauda de histidina na posição N-terminal em vetor RPA, apenas em vetor RPC, pois a tentativa de obtenção da construção RPA_ansB_HisN não foi bem-sucedida, como mostrado no alinhamento global (Figura 14). Para BsAII_HisN, as construções em ambos os vetores foram bem-sucedidas (Figura 14), mas para fins de padronização, a produção de enzimas é conduzida apenas com utilização do vetor RPC.

As bactérias *E. coli* transformadas apresentam produção de L-ASNases tanto de forma intracelular quanto extracelular, ratificando o funcionamento da sequência sinal para

exportação para o periplasma, apesar de ainda haver retenção de enzimas dentro das células (Figuras 15 e 16), o que é natural para esse vetor (Lourenzoni *et al.*, 2016). O cultivo em agitação orbital usando tubos Falcon, com tampa perfurada, permite um alcance de produção de EcAII $14810 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto em frascos, a produção de EcAII é de apenas $275 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 1) e para BsAII, a produção é ainda menor, de $109 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. Baseado na produção de xilanase recombinante obtida a partir do mesmo sistema de expressão e condições de cultivo por Mendonça *et al.* (2020), de aproximadamente $92000 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, a produção de L-ASNase ainda se encontra baixa, mesmo em tubos. O cultivo em frascos alcançou DO_{600} de 4,72 e 5,05 para as culturas RPC_ansB_HisN e RPC_ansZ_HisN, respectivamente. Esses resultados estão em concordância com o crescimento observado por Mendonça *et al.* (2020) utilizando culturas de *E. coli* transformadas com vetor pT7BsXA para produção de xilanase, em frascos com meio de cultura de mesma composição que a utilizada neste trabalho, atingindo DO_{600} próxima a 4,00 ao final de 72 h de cultivo. Como a atividade enzimática obtida é menor em frascos do que em tubos, infere-se que o crescimento em frascos pode estar limitado, já que são vetores constitutivos. Nesses casos, a produção ocorre simultaneamente ao crescimento das bactérias, dependendo da multiplicação dos plasmídeos (Cui *et al.*, 2019). O crescimento e produção no cultivo em frascos podem estar limitados, em relação ao cultivo em tubos, devido à limitação de trocas gasosas nos frascos. Em seu trabalho, Takahashi *et al.* (2020) monitoram os níveis de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) dissolvidos em culturas de *E. coli* em frascos Erlenmeyer, atestando que o O_2 sendo reduzido ao longo do processo, sem reposição, é um fator limitante do crescimento, sendo depletado em 6 h de cultivo. O crescimento em tubos, no entanto não possui essa limitação devido à perfuração de suas tampas, que permite a troca de gases durante todo o processo, sendo a forma mais adequada de produção de L-ASNase II neste trabalho.

7.2 Escolha do tipo de imobilização mais adequado para EcAII em SBA-15

O suporte SBA-15 possui propriedades hidrofóbicas, sendo muito utilizado para a imobilização de lipases, o que torna interessante a utilização de técnicas de adsorção para a imobilização enzimática nesse suporte (Salis *et al.*, 2005). A imobilização de L-ASNase por adsorção é relatada com sucesso na literatura, na imobilização de EcAII em nanotubos de carbono por Cristóvão *et al.* (2020). Entretanto, em outro suporte, epóxi-agarose, é relatado fracasso de imobilização da L-ASNase comercial Acrilaway® L por adsorção, sendo necessária a funcionalização do suporte para a realização de uma imobilização covalente (de Melo; Fernandez-Lafuente; Rodrigues, 2023). No estudo da imobilização da L-ASNase em SBA-15

por adsorção, conduzida nos pHs 6,0, 6,7 e 8,0 (abaixo, igual e acima do pI da enzima), constata-se que em nenhuma das condições há detecção de atividade (Tabela 2). Além disso, constata-se no curso de imobilização (Tabela 3) que enzimas entram no suporte, mas desprendem-se facilmente ao longo do processo. Os experimentos de imobilização por adsorção costumam ser realizados em pH igual ao pI da enzima, pois a proximidade da carga líquida da enzima de zero deve favorecer a interação com superfícies hidrofóbicas (Salis *et al.*, 2005), mas os resultados aqui apresentados mostram que esta condição não favorece a interação entre EcAII e SBA-15, nem as outras testadas. Como a EcAII possui superfície muito hidrofílica (Figura 21), atesta-se a inviabilidade da imobilização por adsorção em SBA-15.

A outra opção de imobilização em SBA-15, envolvendo ligações covalentes entre o suporte ativado e as cadeias laterais de resíduos da EcAII, mostra-se viável, como mostrado na Tabela 4. A superfície da EcAII possui grande quantidade de resíduos Lys, bem espaçados entre si, como mostrado na Figura 22, portanto mostram ser alvos eficientes para imobilização covalente devido aos grupamentos amino livre, que podem reagir com grupos reativos dos suportes, como já visto em relatos na literatura para outras enzimas (Barbosa *et al.*, 2014). A funcionalização e a ativação do suporte, com APTES e glutaraldeído, respectivamente, permitem a incorporação de grupos aldeído reativos ao SBA-15, que se tornam capazes de ligar-se aos resíduos Lys da enzima (Cipolatti *et al.*, 2021), como mostrado na Figura 23. Dessa forma, a imobilização covalente apresenta-se como o melhor tipo de imobilização para a EcAII em SBA-15, necessitando apenas de estratégias para aumento da atividade recuperada nos biocatalisadores.

7.3 Otimização das condições de imobilização

Nos experimentos iniciais de imobilização covalente de EcAII, os resultados de rendimento global são inferiores a 10%, como mostrado na Tabela 4. Estes rendimentos são baixos em comparação aos rendimentos relatados na literatura para a imobilização covalente de L-ASNase II (Alam *et al.*, 2021; Noma *et al.*, 2020). Uma hipótese para justificar a baixa atividade recuperada apresentada nesses experimentos é a de que a enzima está sendo imobilizada majoritariamente em sua forma monomérica, prejudicando a formação dos sítios ativos que ocorre pela associação de dímeros e de tetrâmeros, estes necessários para a maior atividade catalítica da enzima. Alguns trabalhos de imobilização de L-ASNase II já consideram este efeito no processo de imobilização, observando a dissociação e reassociação de monômeros em ambiente controlado, ou empregando estratégias de reticulação de monômeros após a

imobilização inicial (Balcão *et al.*, 2001; Mezentsev *et al.*, 2006). Estes resultados apontam a necessidade do emprego de uma estratégia para preservar a estrutura tetramérica durante a imobilização covalente, fixando-as na sua conformação mais ativa.

A abordagem escolhida neste trabalho é a utilização dos aminoácidos Asn e Gln durante o processo de imobilização covalente. A utilização dos aminoácidos de fato promove um aumento da atividade recuperada nos biocatalisadores, com uma melhor performance da utilização de Asn em comparação a Gln, como mostrado na Tabela 5. Já é relatado na literatura desde a elucidação da estrutura da EcAII que tanto Asn, o substrato primário da enzima, quanto Gln, um inibidor competitivo também hidrolisado pela enzima, induzem a formação do tetrâmero de EcAII (Shifrin; Parrott, 1974; Yassin *et al.*, 2022). A Gln não é tão eficiente quanto a Asn para promover a formação do tetrâmero, como observado por Shifrin; Parrott (1974), formando poucos tetrâmeros e mais dímeros. Ainda assim, permite uma maior atividade catalítica do que na condição sem aminoácido algum. Embora apresentando uma maior atividade recuperada e maior rendimento global, o biocatalisador SBA-AE(Asn) apresenta um menor rendimento de imobilização em relação ao SBA-AE e ao SBA-AE(Gln) (Tabela 5). Essa característica está provavelmente relacionada à forma como os monômeros da enzima entram nos poros do suporte, de forma que a estrutura tetramérica, mais protegida com a utilização de Asn no tampão de imobilização, ocupa mais espaço no suporte do que os monômeros e dímeros imobilizados separadamente, limitando a quantidade de moléculas de enzimas imobilizadas. Enquanto isso, as condições com menor proteção da estrutura tetramérica, com Gln ou sem aminoácido algum, permitiram uma maior incorporação de moléculas de enzimas ao suporte, mas sem a vantagem da atividade proporcionada pelo tetrâmero. Na literatura, não são encontrados relatos de imobilização de L-ASNase na presença de seu substrato para proteção da estrutura quaternária, o que indica uma inovação neste trabalho.

A redução da concentração do extrato de EcAII oferecido à imobilização permite que o rendimento de imobilização da condição que utiliza Asn seja superior a 90%, como mostrado na Tabela 6, mantendo o nível da sua atividade recuperada. O rendimento global da imobilização nas condições de imobilização com Gln e sem aminoácido (SBA-E(Gln) e SBA-E) são muito inferiores ao rendimento global da condição de imobilização na presença de Asn (SBA-E(Asn)) (Tabela 6). A nova condição de concentração corrobora a hipótese de que os tetrâmeros, induzidos pela presença da Asn, ocupam mais espaço nos poros do SBA-15.

A imobilização covalente de EcAII em SBA-15 não permite a liberação de monômeros dos biocatalisadores, mesmo nas condições desnaturantes da presença de β -mercaptoetanol e aquecimento a 100 °C, como observado em gel de eletroforese (Figura 24).

Dessa forma, quanto ao aspecto de fixação das enzimas no suporte, não se faz necessário o emprego de estratégias de imobilização multipontual, utilização de suportes heterofuncionais ou recobrimento e reticulação de monômeros, como é realizado em imobilizações relatadas de outras enzimas multiméricas (Mateo *et al.*, 2006). Portanto, as condições ótimas de imobilização definidas para o trabalho são de 2 mL de extrato de EcAII $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 100 mg de SBA-15-APTES-GA, na presença de Asn 100 mM, durante 30 min a 4°C , sob agitação rotativa de 50 rpm.

7.4 Temperatura ótima e cinética enzimática

Observa-se que o biocatalisador SBA-E(Asn) apresenta uma temperatura ótima de catálise de 50°C , acima do obtido para a enzima livre, que é de 35°C , bem como todo o perfil de atividade em relação à temperatura é deslocado para a direita, de modo geral (Figura 26). O deslocamento da temperatura ótima de catálise da L-ASNase II para uma temperatura maior já é reportado em alguns trabalhos, quando a enzima imobilizada é comparada em relação à enzima livre, ocorrendo de forma semelhante o deslocamento de todo o perfil de atividade frente à temperatura (Baluchi; Homaei, 2024; Noma *et al.*, 2020, 2021).

O biocatalisador SBA-E(Asn) apresenta tanto a $V_{\text{MÁX}}$ quanto o K_{M} inferiores aos $V_{\text{MÁX}}$ e K_{M} da enzima livre (Tabela 7). A diferença na $V_{\text{MÁX}}$ pode decorrer da condição de temperatura utilizada em cada experimento, com condução na temperatura ótima de cada enzima, o que não foi realizado para a obtenção dos dados de eficiência de imobilização, ou mesmo de variações intrínsecas de amostras de origem biológica. Esse efeito pode também ser derivado do aumento da limitação difusional do substrato no imobilizado, já que as moléculas de Asn precisam percorrer maiores caminhos nos poros do biocatalisador para atingir o sítio ativo das enzimas (Malar *et al.*, 2020). A diferença observada no K_{M} é um indicativo direto da mudança de afinidade entre enzima e substrato, como relatado por Srinivasan (2022), portanto indicando que a imobilização promoveu um aumento da afinidade da enzima pela Asn. A literatura sobre imobilização de L-ASNases mostra uma tendência à manutenção do valor de K_{M} após o processo de imobilização, ou do seu aumento, havendo menos casos de redução desse valor. Nas ocorrências de redução de K_{M} , alguns resultados assemelham-se ao resultados aqui obtidos, com apenas uma pequena redução ou tendência à redução do K_{M} (Monajati *et al.*, 2018; Özdemir *et al.*, 2023).

A EcAII livre, neste trabalho, apresenta K_{M} de 3,7 mM, como mostrado na Tabela 7, sendo essa a concentração necessária de Asn para que a enzima atinja metade de sua $V_{\text{MÁX}}$

de catálise. Alguns resultados na literatura, para a EcAII já amplamente utilizada como biofármaco, apontam um K_M variando de 11,5 a 15 μM (Derst; Henseling; Röhm, 2000; Swain *et al.*, 1993). Esta diferença aponta uma menor afinidade da EcAII livre produzida neste trabalho em comparação às já utilizadas para aplicação em saúde. Porém, em outros trabalhos que utilizam a EcAII para imobilização já observam na enzima livre um K_M similar ao reportado neste trabalho, em mesma ordem de grandeza, variando de 0,3 a 6,1 mM (Alam *et al.*, 2021; Monajati *et al.*, 2018; Noma *et al.*, 2020).

7.5 Estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre

A avaliação da estabilidade térmica do biocatalisador SBA-E(Asn) e da enzima livre a 60 °C é relevante, por ser uma temperatura intermediária na faixa de 55-75 °C, em que normalmente ocorre a etapa de *blanching*, antes da fritura no processamento industrial das batatas (Ngobese; Workneh; Siwela, 2017). Como observado na Figura 28 e na Tabela 8, não há uma estabilização da enzima no biocatalisador SBA-E(Asn), que tem um $t_{1/2}$ ainda inferior ao da enzima livre. Estes resultados são dissonantes de alguns outros relatados na literatura, em que a imobilização de L-ASNase II foi capaz de aumentar, significativa ou sutilmente, a estabilidade térmica da enzima, aumentando o $t_{1/2}$ em relação à enzima livre (de Melo; Fernandez-Lafuente; Rodrigues, 2023; Özdemir *et al.*, 2023). Portanto, evidencia-se a necessidade de recobrimento do biocatalisador SBA-E(Asn), a fim de melhorar os resultados de estabilidade.

As moléculas utilizadas para o recobrimento, PEI e DA, apresentam diferentes efeitos na atividade dos biocatalisadores, como mostrado na Tabela 9, em que o SBA-E-DA apresenta maior perda de atividade do que o SBA-E-PEI em relação ao biocatalisador original SBA-E(Asn). A maior redução de atividade observada após o recobrimento do imobilizado com DA pode estar relacionada ao grande número de ligações covalentes realizadas com resíduos de lisina na superfície das enzimas, o que enrijece a estrutura e limita movimentos necessários à atividade catalítica (Vasić; Knez; Leitgeb, 2020). Essa redução de atividade pode também estar relacionada ao aumento da limitação difusional resultante do grande volume das moléculas de dextrana-aldeído, que podem chegar a ter até 650 kDa (Rodrigues *et al.*, 2009). Como a redução de atividade do SBA-E-PEI é menos expressiva que a de SBA-E-DA, este recobrimento é considerado mais viável ao propósito do trabalho.

Como mostrado na Tabela 8, o recobrimento com PEI é capaz de aumentar a estabilidade térmica do biocatalisador, porém, o $t_{1/2}$ é ainda inferior ao da enzima livre. O

recobrimento de enzimas imobilizadas, com macromoléculas com alto grau de ramificação ou com capacidade de reagir com grupamentos das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, é capaz de promover uma proteção térmica ao biocatalisador através de uma estabilização da sua estrutura tridimensional frente a mudanças de temperatura (Guisan *et al.*, 2022). Porém, o aumento de estabilidade a 60 °C promovido pelo recobrimento com PEI indica uma estabilidade ainda insatisfatória para alcançar o objetivo de aplicação industrial (Ngobese; Workneh; Siwela, 2017), o que suscita a busca por outra temperatura em que o biocatalisador pode ser aplicado.

Para uma varredura geral da estabilidade térmica dos biocatalisadores e da enzima livre, é verificada a emissão de fluorescência pelas amostras quando submetidas ao aquecimento, baseada na emissão dos resíduos de Trp. A mudança da razão de emissão a 350 nm e a 330 nm frente à temperatura fornece uma curva cuja primeira derivada é muito útil para a observação de pontos onde há uma desnaturação crítica na estrutura da enzima, chamados pontos de inflexão (Garidel *et al.*, 2008). Uma análise cuidadosa das curvas de derivadas da razão de emissão a 350 nm / 330 nm, mostradas na Figura 30, apresenta uma mudança no perfil da enzima, comparando os biocatalisadores com a enzima livre, trazendo o ponto de inflexão para uma temperatura mais alta, de 59,3 °C na enzima livre para 66,5 °C no SBA-E(Asn). Não há detecção de ponto de inflexão na amostra SBA-E-PEI devido à maior suavidade da curva de primeira derivada, indicando a ausência de uma mudança drástica no perfil de fluorescência. Isso pode indicar tanto uma maior estabilização da enzima quanto uma interferência de detecção provocada pelo PEI que está recobrindo as enzimas. Como os resíduos de Trp estão normalmente no interior hidrofóbico das enzimas, onde emitem fluorescência mais intensamente a 330 nm, a desnaturação térmica expõe esses resíduos, que passam a emitir fluorescência mais intensamente a 350 nm, provocando uma mudança de espectro que tende a aumentar a razão 350 nm / 330 nm, que é acompanhada nessa análise (Yudkina *et al.*, 2023). O retardo no crescimento da razão 350 nm / 330 nm implica numa demora maior na deformação da conformação tridimensional das enzimas. Logo, o aumento da temperatura em que há o ponto de inflexão indica que a imobilização promoveu um efeito de estabilização térmica na EcAII.

Uma vez mostrada, a nível molecular, uma estabilização térmica da enzima no biocatalisador, em comparação à enzima livre, é interessante a avaliação da estabilidade térmica novamente a uma temperatura mais branda, ainda próxima à faixa aplicada na etapa de *blanching* das batatas (Ngobese; Workneh; Siwela, 2017). Os imobilizados, quando incubados a 50 °C superam a estabilidade da enzima livre, como mostrado na Tabela 10. Apesar disso, o $t_{1/2}$ ainda é muito pequeno para a viabilização de uma aplicação direta do biocatalisador na etapa

de *blanching* da indústria de batatas, já que este processo pode durar 1 h e o maior $t_{1/2}$ obtido é de 8,49 min para o SBA-E-PEI. Alguns fatores podem estar relacionados à baixa estabilidade observada, tais como a baixa concentração de enzimas presente no suporte ou a ausência do substrato nas condições do experimento, que poderia promover uma maior estabilização das enzimas (Ahmed *et al.*, 2020).

7.6 Estabilidade operacional em ciclos de reutilização dos biocatalisadores

A estabilidade operacional é uma das características mais importantes de uma enzima imobilizada, já que a diferencia da enzima livre, que não pode ser facilmente reutilizada em mais de um ciclo de operação. Na análise inicial, realizada apenas com o biocatalisador SBA-E(Asn), à temperatura de 37 °C, em que não há necessidade de recobrimento, o biocatalisador apresenta uma capacidade de reutilização alta, perdendo menos de 20% de sua capacidade catalítica mesmo após 10 ciclos de reutilização, como mostrado na Figura 25. Este resultado apresenta perfil de perda de atividade semelhante aos obtidos por Özdemir *et al.* (2023) na imobilização de L-ASNase em nanotubos de carbono magnéticos, mantendo a atividade catalítica inalterada nos primeiros 4 ciclos, chegando a 90% ao final do 10º ciclo, operando na temperatura ótima da enzima. Noma *et al.* (2020) também apresentam resultados semelhantes de reutilização dos imobilizados, de L-ASNase em SBA-15 com outra metodologia de ativação do suporte, apresentando uma atividade residual de 87% ao final do 10º ciclo, também na temperatura ótima. Outros resultados na literatura mostram estabilidades operacionais ligeiramente inferiores à observada neste trabalho para SBA-E(Asn), considerando as condições da reação de atividade enzimática da L-ASNase, a 37 °C, com retenção de 70% de atividade residual em menos de 10 ciclos (Alam *et al.*, 2021; de Melo; Fernandez-Lafuente; Rodrigues, 2023).

Já operando-se a uma temperatura mais elevada, de 55 °C, que está na faixa utilizada na etapa de *blanching* de batatas, são avaliados os dois biocatalisadores, SBA-E(Asn) e SBA-E-PEI, observando-se uma queda (Figura 32) que não é constatada na estabilidade operacional quando avaliada a 37 °C. Os biocatalisadores não apresentaram diferença significativa entre eles, mas nota-se uma tendência à maior retenção de atividade no SBA-E-PEI. A queda na estabilidade operacional aproxima os resultados de reutilização daqueles observados nos trabalhos de Alam *et al.* (2021) e Melo *et al.* (2023), com perda de mais de 20% da atividade em 5 ciclos. Como a concentração de substrato no experimento é alta, o que pode não ser uma realidade no ambiente industrial, faz-se necessária a adoção de novas estratégias

para o aumento de estabilidade térmica do imobilizado. Uma alternativa para esta questão apresentada é a aplicação dos imobilizados em temperatura mais branda, a cerca de 37 °C, em uma nova etapa prévia ao *blanching* das batatas, como já relatado por Alam *et al.* (2021) com um sucesso na redução de acrilamida das batatas de até 95%.

8 CONCLUSÃO

A produção recombinante de EcAII e BsAII no caldo fermentado de cultivos bacterianos de *E. coli* mostrou-se exitosa, através da utilização de uma sequência sinal para exportação da enzima expressa para o caldo de cultivo. As condições para produção das enzimas em frascos Erlenmeyer não se mostraram favoráveis ao crescimento bacteriano nem à produção de L-ASNase, mas a produção em tubos com tampa perfurada conseguiu alcançar uma produção de quase 15000 U·L⁻¹. Com base em trabalhos anteriores com mesmo sistema de expressão, essa produção ainda é baixa, indicando necessidade de otimização.

A imobilização enzimática de EcAII em SBA-15 obteve sucesso, alcançado um rendimento global de quase 100% em relação à atividade da enzima livre aplicada na imobilização, com a estratégia inovadora de utilização do substrato Asn como protetor da estrutura tetramérica no processo de imobilização covalente. A L-ASNase imobilizada, frente à enzima livre, apresentou-se mais estável a 50 °C e aumentou sua temperatura ótima de atuação. O recobrimento do imobilizado com o polímero PEI estabilizou a enzima em comparação ao imobilizado não recoberto. A queda de atividade decorrente do recobrimento, no entanto, indica que o aumento na estabilidade não é o suficiente para justificar a inclusão desta etapa na obtenção do imobilizado final. A EcAII imobilizada obteve um ótimo reaproveitamento, não chegando a perder nem metade de sua atividade após 10 ciclos de utilização a 55 °C, na presença do substrato, indicando boa capacidade de aplicação na produção de batatas fritas.

9 PERSPECTIVAS

A produção de L-ASNase recombinante neste trabalho indica a necessidade de um escalonamento adequado da produção, para aumentar a quantidade de enzima obtida. Essa produção pode se beneficiar da utilização de um sistema de batelada alimentada com aeração, de forma a estimular o crescimento com controle da concentração de substrato no meio e injeção de O₂, aumentando ainda mais a produção. Essa produção deve também se beneficiar da aplicação de um meio de cultivo de composição definida.

Os biocatalisadores desenvolvidos devem ainda ser avaliados frente ao alimento ao qual se destina, as batatas, para que se avalie sua efetiva capacidade de redução dos níveis de Asn presentes, e conseqüentemente de acrilamida após sua fritura. Duas opções se apresentam para as avaliações que ainda devem ser realizadas: a aplicação do biocatalisador na mesma etapa de *blanching* das batatas, a 55 °C, ou previamente a esta etapa, a 37 °C, condição na qual o biocatalisador se mostra mais estável. Estudos futuros podem ser realizados para obtenção de formas de melhor estabilização térmica da enzima ou com a utilização de L-ASNases termotolerantes. As condições ótimas de imobilização devem ainda ser testados para a BsAII, a fim de avaliar sua viabilidade.

REFERÊNCIAS

- ABT, Eileen *et al.* Acrylamide levels and dietary exposure from foods in the United States, an update based on 2011-2015 data. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1475–1490, 2019.
- AHMED, Samia A. *et al.* Catalytic, kinetic and thermal properties of free and immobilized *Bacillus subtilis* -MK1 α -amylase on Chitosan-magnetic nanoparticles. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 26, 2020.
- ALAM, Shahenvaz *et al.* Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 339, 2021.
- ALI NOMA, Samir Abbas *et al.* L-asparaginase immobilized p(HEMA-GMA) cryogels: A recent study for biochemical, thermodynamic and kinetic parameters. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 93, 2021.
- ANISHKIN, Andriy *et al.* Catalytic Role of the Substrate Defines Specificity of Therapeutic L-Asparaginase. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 427, n. 17, p. 2867–2885, 2015.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe nº 28 de 2007: orientações sobre acrilamida. Orientações sobre Acrilamida. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_28de2007. Acesso em: 25 out. 2023.
- ARISSETO, Adriana Pavesi; TOLEDO, Maria Cecília de Figueiredo. **Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil**. [S. l.: s. n.], 2008.
- BALCÃO, V. M. *et al.* Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 537–542, 2001.
- BALUCHI, Ayeshi; HOMAEL, Ahmad. Immobilization of L-asparaginase on chitosan nanoparticles for the purpose of long-term application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 257, 2024.
- BARAL, Adesh *et al.* Selection of the Optimal L-asparaginase II Against Acute Lymphoblastic Leukemia: An In Silico Approach. **JMIRx Med**, [s. l.], v. 2, n. 3, 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.13.337097v1>.
- BARBOSA, Oveimar *et al.* **Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization**. [S. l.: s. n.], 2014.
- BARÓN CORTÉS, Wilson Roberto; VÁSQUEZ MEJÍA, Sandra Milena; SUÁREZ MAHECHA, Héctor. Consumption study and margin of exposure of acrylamide in food consumed by the Bogotá population in Colombia. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 100, 2021.

BATOOL, Tahira *et al.* **A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications.** [S. l.]: Humana Press Inc., 2016.

BEBIĆ, Jelena *et al.* Amino-modified kraft lignin microspheres as a support for enzyme immobilization. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 36, p. 21495–21508, 2020.

BEN SHIR, Ira; KABABYA, Shifi; SCHMIDT, Asher. Molecular details of amorphous silica surfaces determine binding specificity to small amino acids. **Journal of Physical Chemistry C**, [s. l.], v. 118, n. 15, p. 7901–7909, 2014.

BENFORD, Diane *et al.* Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 48, n. SUPPL. 1, 2010.

BENÍTEZ-MATEOS, Ana I.; CONTENTE, Martina L. Agarose vs. Methacrylate as material supports for enzyme immobilization and continuous processing. **Catalysts**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2021.

BENORE, Marilee Ann. **What is in a name? (or a number?): The updated enzyme classifications.** [S. l.]: John Wiley and Sons Inc., 2019.

BERTUZZI, Terenzio *et al.* Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 303, 2020.

BILAL, Muhammad *et al.* **Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design.** [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2019.

BOLIVAR, Juan M. *et al.* Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *In:* , 2009. **Biomacromolecules**. [S. l.]: American Chemical Society, 2009. p. 742–747.

BOLIVAR, Juan M.; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. **Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization.** [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2022.

BROOME, B£] D. EVIDENCE THAT THE L-ASPARAGINASE OF GUINEA PIG SERUM IS RESPONSIBLE FOR ITS ANTILYMPHOMA EFFECTS*, \$ I. PROPERTIES OP THE L-ASPARAGINASE OF GUINEA PIG SERUM IN RELATION TO THOSE O~ THE ANTILYM~PHOMA SUBSTANCE. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 118, n. 1, 1963. Disponível em: <http://rupress.org/jem/article-pdf/118/1/99/1649875/99.pdf>.

CACHUMBA, Jorge Javier Muso *et al.* **Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production.** [S. l.]: Elsevier Editora Ltda, 2016.

CAETANO, Ludmilla Freire. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE VARIANTES DE LASPARAGINASE II DE Escherichia coli DE MENOR POTENCIAL IMUNOGÊNICO: COMBINAÇÃO DE ESTUDOS IN SILICO E IN VITRO.** 2020. - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em:

<http://www.fichacatalografica.ufc.br/>.

CAIRO, João Paulo L. Franco *et al.* The periplasmic expression and purification of AA15 lytic polysaccharide monooxygenases from insect species in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 190, 2022.

CAO, Linqiu; VAN RANTWIJK, Fred; SHELDON, Roger A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. **Organic Letters**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 1361–1364, 2000.

CÁRDENAS, Lady Johana; GIRALDO, Liliana; MORENO-PIRAJÁN, Juan Carlos. Physicochemical Characterization of Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15) and Its Functionalization with Polyaniline for Phenol Adsorption. **Processes**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2022.

CASTRO, Daniel *et al.* L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11359-y>.

CBS NEWS. Cbs Interactive Inc.. Starbucks, others must carry cancer warning in California, judge rules. Cbs News. 30 mar. 2018. Disponível em: <https://www.cbsnews.com/news/starbucks-cancer-warning-judge-rules-on-coffee-carcinogen-acrylamide/>. Acesso em: 25 out. 2023.

CHAND, Subhash *et al.* **A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications.** [S. l.]: Blackwell Publishing Ltd, 2020.

CHU, Phuong Thi Bich *et al.* Potent IPTG-inducible integrative expression vectors for production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 6, 2023.

CIPOLATTI, Eliane Pereira *et al.* Synthesis of lipase/silica biocatalysts through the immobilization of CALB on porous SBA-15 and their application on the resolution of pharmaceutical derivatives and on nutraceutical enrichment of natural oil. **Molecular Catalysis**, [s. l.], v. 505, 2021.

COSTA, Isabela Oliveira *et al.* Enzyme immobilization technology as a tool to innovate in the production of biofuels: A special review of the Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) strategy. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 170, 2023.

CRAMER, Patrick. **Organization and regulation of gene transcription.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019.

CRISTOVAO, Raquel O. *et al.* Development and characterization of a novel l-asparaginase/MWCNT nanobioconjugate. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 52, p. 31205–31213, 2020.

CUI, Xiangwei *et al.* Efficient glutathione production in metabolically engineered *Escherichia coli* strains using constitutive promoters. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 289, p. 39–45, 2019.

- DE MELO, Denise W.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C. Enhancing biotechnological applications of L-asparaginase: Immobilization on amino-epoxy-agarose for improved catalytic efficiency and stability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 52, 2023.
- DECKERS, Marie *et al.* **Genetically modified micro-organisms for industrial food enzyme production: An overview**. [S. l.]: MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020.
- DERIBEW, Henok Ashagrie; WOLDEGIORGIS, Ashagrie Zewdu. Acrylamide levels in coffee powder, potato chips and French fries in Addis Ababa city of Ethiopia. **Food Control**, [s. l.], v. 123, 2021.
- DERST, Christian; HENSELING, Johannes; RÖHM, Klaus-Heinrich. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. **Protein Science**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 2009–2017, 2000.
- DRAINAS, C; KINGHORN, J R; PATEMAN, J A. **Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*** *Journal of General Microbiology*. [S. l.: s. n.], 1977.
- DUZENLI, Ozgun Firat; OKAY, Sezer. Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. **AIMS Bioengineering**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 62–81, 2020. Disponível em: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/bioeng.2020007>.
- EFFER, Brian *et al.* L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 679–685, 2019.
- EFSA, European Food Safety Authority. Margin of Exposure. 2023. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/margin-exposure>. Acesso em: 15 out. 2023.
- EMERICK, Maria Celeste *et al.* **COORDENAÇÃO DE GESTÃO TECNOLÓGICA-GESTEC / VICE-PRESIDÊNCIA DE PRODUÇÃO E INOVAÇÃO EM SAÚDE-VPPIS / FIOCRUZ-PRESIDÊNCIA EQUIPE TÉCNICA ENVOLVIDA**. [S. l.: s. n.], 2017.
- EPA, US. **US EPA, ATTACHMENT I--FINAL RISK ASSESSMENT OF ESCHERICHIA COLI K-12 DERIVATIVES**. [S. l.: s. n.], 1997.
- FERNANDEZ-LOPEZ, Laura *et al.* Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 98, p. 18–25, 2017.
- FLAMM, Eric L. How FDA approved chymosin: a case history. **Nature Biotechnology**, [s. l.], p. 349–351, 1991.
- GARIDEL, Patrick *et al.* A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 3, n. 9–10, p. 1201–1211, 2008.
- GESTO, Diana S. *et al.* Unraveling the enigmatic mechanism of l-asparaginase II with

QM/QM calculations. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 135, n. 19, p. 7146–7158, 2013.

GROSSOWICZ, Nathan *et al.* **THE ENZYMATIC FORMATION OF HYDROXAMIC ACIDS FROM GLUTAMINE AND ASPARAGINE***. [S. l.: s. n.], 1950.

GUIMARÃES, Danilo Vasconcelos. **ESTUDO COMPARATIVO DA L-ASPARAGINASE DE E. coli E Phaseolus vulgaris UTILIZANDO DINÂMICA MOLECULAR**. 2019. - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

GUIMARÃES, Ana Virginia Frota; FROTA, Natália Fernandes; LOURENZONI, Marcos Roberto. Molecular dynamics simulations of human L-asparaginase1: Insights into structural determinants of enzymatic activity. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s. l.], v. 109, 2021.

GUISAN, Jose M. *et al.* **Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022.

HANLON, Paul; SEWALT, Vincent. **GEMs: genetically engineered microorganisms and the regulatory oversight of their uses in modern food production**. [S. l.]: Bellwether Publishing, Ltd., 2021.

HENDRIKSEN, Hanne Vang; PUDER, Katja; OLSEN, Anne Goldbech. **METHOD FOR REDUCING THE LEVEL OF ASPARAGINE IN A FOOD MATERIAL**. Concessão: 2014.

HENTRICH, Christian *et al.* Periplasmic expression of SpyTagged antibody fragments enables rapid modular antibody assembly. **Cell Chemical Biology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 813-824.e6, 2021.

IMADA, A *et al.* **Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms** *Journal of General Microbiol*. [S. l.: s. n.], 1973.

IMAM, Hasan T.; MARR, Patricia C.; MARR, Andrew C. **Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, France: [s. n.], 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some industrial chemicals**. [S. l.]: International Agency for Research on Cancer, 1994.

JEONG, Hyojin; HWANG, Soomee; KWON, Hoonjeong. Survey for acrylamide in processed foods from Korean market and individual exposure estimation using a non-parametric probabilistic model. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 916–930, 2020.

JERVIS, Adrian J. *et al.* SelProm: A Queryable and Predictive Expression Vector Selection

Tool for Escherichia coli. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1478–1483, 2019.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. **Enzyme immobilization by adsorption: A review**. [S. l.]: Kluwer Academic Publishers, 2014.

JIA, Mingmei *et al.* Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated Bacillus subtilis B11-06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 39, p. 9428–9434, 2013.

JIA, Ruiying *et al.* **Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: Current research status and future perspectives**. [S. l.]: MDPI AG, 2021.

JUIBARI, Aref Doozandeh; RAMEZANI, Sina; REZADOUST, Mohammad Hosein. Bioinformatics analysis of various signal peptides for periplasmic expression of parathyroid hormone in E.coli. **Journal of Medicine and Life**, [s. l.], v. 2019, n. 2, p. 184–191, 2019.

KHANMOHAMMADI, Faezeh *et al.* SBA-15 with short channels for laccase immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, [s. l.], v. 309, 2020.

KINGCHOK, Sarawut; PORNSUWAN, Soraya. Comparison of spherical and rod-like morphologies of SBA-15 for enzyme immobilization. **Journal of Porous Materials**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1547–1557, 2020.

KORNECKI, Jakub F. *et al.* Influence of phosphate anions on the stability of immobilized enzymes. Effect of enzyme nature, immobilization protocol and inactivation conditions. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 95, p. 288–296, 2020.

KROLL, Alexander *et al.* Turnover number predictions for kinetically uncharacterized enzymes using machine and deep learning. **Nature Communications**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2023.

LAMBRÉ, Claude *et al.* Safety evaluation of the food enzyme d-psicose 3-epimerase from the genetically modified Escherichia coli strain K-12 W3110 (pWKLP). **EFSA Journal**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2021.

LANVERS, Claudia *et al.* **Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L L-asparaginase in human serum ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** *Analytical Biochemistry*. [S. l.: s. n.], 2002. Disponível em: www.academicpress.com.

LIU, Dong Mei; CHEN, Juan; SHI, Yan Ping. **Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

LOCH, Joanna I. *et al.* Crystal structures of the elusive Rhizobium etli l-asparaginase reveal a peculiar active site. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.

LOURENZONI, Marcos Roberto *et al.* **MÉTODO DE OBTENÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR DE EXPRESSÃO E SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA A PRODUÇÃO CONSTITUTIVA E SECREÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS**. BR 102014017026-0 A2. Concessão: 2016.

LUBKOWSKI, Jacek *et al.* Mechanism of Catalysis by L-Asparaginase. **Biochemistry**, [s. l.], v. 59, n. 20, p. 1927–1945, 2020.

LYU, Xingyi *et al.* **Immobilization of enzymes by polymeric materials**. [S. l.]: MDPI, 2021.

MAAN, Abid Aslam *et al.* **Acrylamide Formation and Different Mitigation Strategies during Food Processing—A Review**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2022.

MAGHRABY, Yasmin R. *et al.* **Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications**. [S. l.]: American Chemical Society, 2023.

MAGRI, Agnes *et al.* A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 410, n. 27, p. 6985–6990, 2018.

MALAR, Carlin Geor *et al.* **Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

MARSCHALL, Lukas; SAGMEISTER, Patrick; HERWIG, Christoph. **Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints**. [S. l.]: Springer Verlag, 2017.

MATEO, Cesar *et al.* **Stabilization of Multimeric Enzymes Stabilization of Multimeric Enzymes Via Immobilization and Further Cross-Linking With Aldehyde-Dextran**. [S. l.: s. n.], 2006.

MENDONÇA, Elenira H.M. *et al.* Recombinant xylanase production by Escherichia coli using a non-induced expression system with different nutrient sources. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 29–39, 2020.

MEZENTSEV, Y. V. *et al.* Oligomerization of L-asparaginase from Erwinia carotovora. **Biomeditsinskaya Khimiya**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 258–271, 2006.

MICHALSKA, Karolina; HERNANDEZ-SANTOYO, Alejandra; JASKOLSKI, Mariusz. The mechanism of autocatalytic activation of plant-type L-asparaginases. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 19, p. 13388–13397, 2008.

MILLER, Samuel I.; SALAMA, Nina R. **The gram-negative bacterial periplasm: Size matters**. [S. l.]: Public Library of Science, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Instrução Normativa Nº 60, de 23 de dezembro de 2019. 249. ed. Seção 1, p. 133.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/DIRETORIA COLEGIADA. Resolução nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Resolução: RDC Nº 331, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019. 249. ed. Seção 1, p. 96.

- MOHAMMADI, Adeleh *et al.* Liposomal/Nanoliposomal Encapsulation of Food-Relevant Enzymes and Their Application in the Food Industry. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 14, p. 23–38, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02513-x>.
- MONAJATI, Maryam *et al.* Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 354, p. 1153–1163, 2018.
- MORENO, Antonio D. *et al.* **Laccases as versatile enzymes: from industrial uses to novel applications**. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2020.
- MUELLER, U *et al.* **Safety evaluation of certain contaminants in food**. [S. l.]: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011.
- MURATA, Masatsune. MINI REVIEW Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 38, p. 283–292, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09943-x>.
- MUSTĂȚEA, Gabriel; POPA, Mona Elena. Acrylamide in Food – EU versus FDA Approaches. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology**, [s. l.], v. 72, n. 2, 2015.
- MUTTUCUMARU, Nira *et al.* Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 220, p. 76–86, 2017.
- NAIR, Aditya M; MARY, Anslet; YADAV, Saanya. A META-REVIEW ON PRINCIPLES OF RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY. **Certified Journal | Nair et al. World Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 10, 2021. Disponível em: www.wjpr.net.
- NELSON, David L; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2013.
- NGOBESE, Nomali Ziphorah; WORKNEH, Tilahun Seyoum; SIWELA, Muthulisi. Effect of low-temperature long-time and high-temperature short-time blanching and frying treatments on the French fry quality of six Irish potato cultivars. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 507–517, 2017.
- NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017.
- NOMA, Samir Abbas Ali *et al.* Comparative study of ASNase immobilization on tannic acid-modified magnetic Fe₃O₄/SBA-15 nanoparticles to enhance stability and reusability. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 4440–4451, 2020.
- NUNES, João C.F. *et al.* **Recent Strategies and Applications for L-Asparaginase Confinement**. [S. l.]: MDPI, 2020.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION.

COMMISSION REGULATION (EU) 2017/ 2158 - of 20 November 2017 - establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. Document 32017R2158, 21 nov. 2017.

OLEMPСКА-BEER, Zofia S. *et al.* Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 144–158, 2006.

ONISHI, Yohei *et al.* Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. **3 Biotech**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 783–789, 2015.

ONISHI, Yohei *et al.* Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. **Annals of Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 517–524, 2011.

ÖZDEMİR, F. İnci *et al.* Immobilization of recombinant L-asparaginase from *Geobacillus kaustophilus* on magnetic MWCNT-nickel composites. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 127, p. 10–20, 2023.

PEDRESCHI, Franco; MARIOTTI, María Salomé; GRANBY, Kit. **Current issues in dietary acrylamide: Formation, mitigation and risk assessment.** [S. l.: s. n.], 2014.

RIBEIRO, Livia M.O. *et al.* Immobilization of the enzyme invertase in SBA-15 with surfaces functionalized by different organic compounds. **Journal of Porous Materials**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 77–89, 2019.

RIFAI, Lubna; SALEH, Fatima A. **A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies.** [S. l.]: SAGE Publications Inc., 2020.

RIOS, Nathália Saraiva *et al.* Applicability of mesoporous silica type SBA-15 as feasible support for the immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase and *Candida antarctica* lipase B. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1013–1021, 2022.

RIOS, Nathalia Saraiva. **ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DO TIPO B DE *Candida antarctica* EM SILICATO MESOPOROSO NANOESTRUTURADO (SBA-15) VISANDO A APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE ELEVADO INTERESSE INDUSTRIAL.** 2016. - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RIOS, Nathalia Saraiva *et al.* Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 129, p. 12–24, 2018.

RODRIGUES, Rafael C. *et al.* **Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2019.

RODRIGUES, Rafael C. *et al.* Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 144, n. 2, p. 113–119, 2009.

RODRIGUES, Rafael C. *et al.* **Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2021.

ROMERO-FERNÁNDEZ, María; PARADISI, Francesca. **2 General Overview on Immobilization Techniques of Enzymes for Biocatalysis.** [S. l.: s. n.], 2020.

SADANA, Ajit; HENLEY, James P. Single-Step Unimolecular Non-First-Order Enzyme Deactivation Kinetics. **BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING**, [s. l.], v. 30, p. 717–723, 1987.

SALIS, Andrea *et al.* Physical and chemical adsorption of mucor javanicus lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. **Langmuir**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 5511–5516, 2005.

SANGHVI, Gaurav *et al.* Mitigation of acrylamide by l-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2016.

SANTOS, Bryan D. *et al.* Optimizing Periplasmic Expression in *Escherichia coli* for the Production of Recombinant Proteins Tagged with the Small Metal-Binding Protein SmbP. **Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 451–460, 2019.

SARION, Cristina; CODINĂ, Georgiana Gabriela; DABIJA, Adriana. **Acrylamide in bakery products: A review on health risks, legal regulations and strategies to reduce its formation.** [S. l.]: MDPI, 2021.

SEO, Hogyun *et al.* Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 508, n. 1, p. 250–255, 2019.

SEWALT, Vincent *et al.* **The Generally Recognized as Safe (GRAS) process for industrial microbial enzymes.** [S. l.]: Mary Ann Liebert Inc., 2016.

SHARMA, Anshula *et al.* **Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives.** [S. l.]: Bellwether Publishing, Ltd., 2021.

SHELDON, Roger A.; BASSO, Alessandra; BRADY, Dean. **New frontiers in enzyme immobilisation: Robust biocatalysts for a circular bio-based economy.** [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2021.

SHIBAO, Julianna; HELENA, Deborah; BASTOS, Markowicz. **Maillard reaction products in foods: implications for human health R E S U M O** *Rev. Nutr.* [S. l.: s. n.], 2011.

SHIFRIN, S.; PARROTT, C. L. In vitro assembly of L asparaginase subunits. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 249, n. 13, p. 4175–4180, 1974.

SHIFRIN, Sidney; PARROTT, Catherine L; LUBORSKY, Samuel W. **Substrate Binding and Intersubunit Interactions in L-Asparaginase** *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. [S. l.: s. n.], 1974.

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

SINGH, Ram Sarup; SINGH, Taranjeet; PANDEY, Ashok. Microbial Enzymes—An Overview. *In: ADVANCES IN ENZYME TECHNOLOGY, FIRST EDITION*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 1–40.

SPOHNER, Sebastian C. *et al.* Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 202, p. 118–134, 2015.

SRINIVASAN, Bharath. **A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond**. [S. l.]: John Wiley and Sons Inc, 2022.

SWAIN, Amy L *et al.* **Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy (amidohydrolase/leukemia/active site/aspartate)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. [S. l.: s. n.], 1993. Disponível em: <https://www.pnas.org>.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. *et al.* **Dextran aldehyde in biocatalysis: More than a mere immobilization system**. [S. l.]: MDPI, 2019.

TAHERIAN, Elham *et al.* Cloning, Optimization of Periplasmic Expression and Purification of Recombinant Granulocyte Macrophage-Stimulating Factor in *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Advanced Biomedical Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 71, 2019.

TAKAHASHI, Masato; AOYAGI, Hideki. Analysis and effect of conventional flasks in shaking culture of *Escherichia coli*. **AMB Express**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj. **Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization**. [S. l.]: Wiley-Blackwell, 2019.

TRONO, Daniela. Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. *In: BIOMASS, BIOFUELS, BIOCHEMICALS: ADVANCES IN ENZYME TECHNOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 349–387.

URCHUEGUÍA, Arantxa *et al.* Genome-wide gene expression noise in *Escherichia coli* is condition-dependent and determined by propagation of noise through the regulatory network. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 19, n. 12, 2021.

VASIĆ, Katja; KNEZ, Željko; LEITGEB, Maja. Immobilization of alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* onto carboxymethyl dextran-coated magnetic nanoparticles: a novel route for biocatalyst improvement via epoxy activation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

VERMA, Priyanka *et al.* **Functionalized mesoporous SBA-15 silica: Recent trends and catalytic applications**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2020.

VIDYA, Jalaja *et al.* Cloning, Functional Expression and Characterization of L-Asparaginase II from *E. coli* MTCC 739. **Food Technol. Biotechnol**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 286–290, 2011.

VIRGEN-ORTÍZ, Jose J. *et al.* **Polyethylenimine: A very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts.** [*S. l.*]: Royal Society of Chemistry, 2017.

WAHAB, Roswanira Abdul *et al.* **On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview.** [*S. l.*]: Elsevier B.V., 2020.

XU, Fei; ORUNA-CONCHA, Maria Jose; ELMORE, J. Stephen. **The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food.** [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2016.

YAN, Chunxiao *et al.* **Expanding the promoter toolbox for metabolic engineering of methylotrophic yeasts.** [*S. l.*]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022.

YAO, Min *et al.* Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [*s. l.*], v. 61, n. 3, p. 294–301, 2005.

YASSIN, Marwa A *et al.* Short Review on Microbial L- methioninase and its Applications. **Bulletin of Faculty of Science, Zagazig University**, [*s. l.*], v. 2022, n. 3, p. 43–58, 2022.

YOUNES, Maged *et al.* **Safety evaluation of steviol glycoside preparations, including rebaudioside AM, obtained by enzymatic bioconversion of highly purified stevioside and/or rebaudioside A stevia leaf extracts.** [*S. l.*]: John Wiley and Sons Inc, 2021.

YU, Wesley Zongrong *et al.* Occurrence and Dietary Exposure to Acrylamide from Foods Consumed within and outside Main Meals in Singapore. **Foods**, [*s. l.*], v. 12, n. 16, 2023.

YUDKINA, A. V. *et al.* Factors Affecting the Stability of the Trimer of 2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate Nucleotide Hydrolase from *Escherichia coli*. **Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 57, n. 2, p. 312–319, 2023.

YUSHKOVA, Ekaterina D. *et al.* Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 67, n. 42, p. 11553–11567, 2019.

ZAHIRINEJAD, Sahar *et al.* **Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives.** [*S. l.*]: Elsevier B.V., 2021.

ZDARTA, Jakub *et al.* **A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility.** [*S. l.*]: MDPI, 2018.

ZHANG, Weiqing *et al.* Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. **Microbial Cell Factories**, [*s. l.*], v. 17, n. 1, 2018.

ZHAO, Dongyuan *et al.* Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**, [*s. l.*], v. 279, p. 548–552, 1998.

ZHAO, Mengyao; ZHANG, Boya; DENG, Linlin. **The Mechanism of Acrylamide-Induced Neurotoxicity: Current Status and Future Perspectives.** [*S. l.*]: Frontiers Media S.A., 2022.

ZHOLOBENKO, Vladimir L. *et al.* **Initial stages of SBA-15 synthesis: An overview.** [*S. l.*: *s. n.*], 2008.

ZHU, Qianqian *et al.* Enzyme immobilization on covalent organic framework supports. **Nature Protocols**, [*s. l.*], v. 18, n. 10, p. 3080–3125, 2023.

ZUCCA, Paolo; SANJUST, Enrico. **Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms.** [*S. l.*]: MDPI AG, 2014.

ZYZAK, David V. *et al.* Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], v. 51, n. 16, p. 4782–4787, 2003.

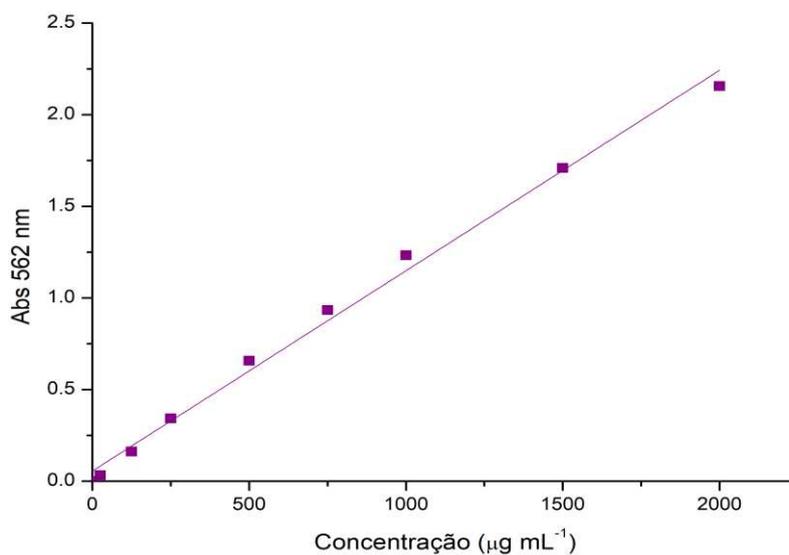
APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO BCA

Curva de calibração do Pierce™ BCA Protein Assay Kit

Concentração de BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância
0	0
25	0,032
125	0,162
250	0,343
500	0,657
750	0,934
1000	1,233
1500	1,710
2000	2,156

Fonte: elaborada pelo autor.

Curva de calibração do Pierce™ BCA Protein Assay Kit



Fonte: o autor.

Para obtenção da concentração de proteínas, as absorbâncias são aplicadas de acordo com a seguinte equação:

$$[\text{Proteínas}] (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs} - 0,0558}{0,0011}, \text{ onde Abs é o valor de absorbância a } 562 \text{ nm.}$$

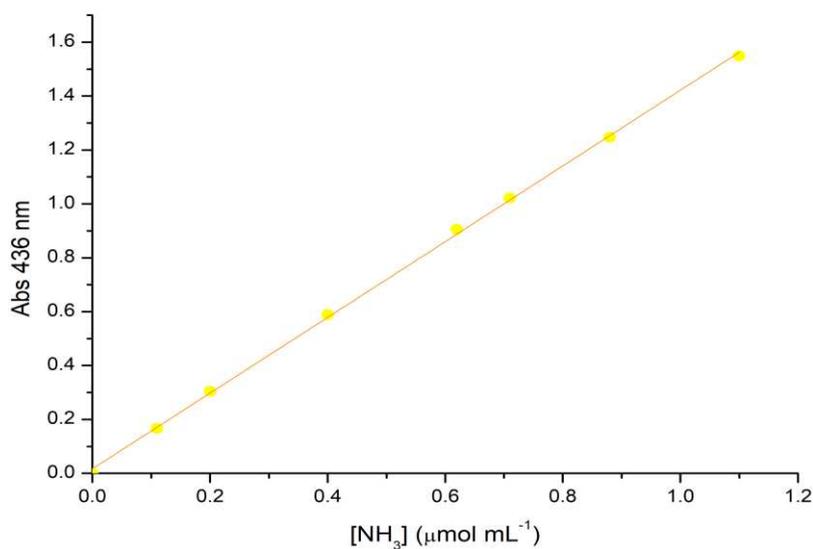
APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AMÔNIA

Curva de calibração da amônia para o método colorimétrico de Nessler

Concentração de amônia ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbância
0	0
0,11	0,1665
0,20	0,3045
0,40	0,5895
0,62	0,9055
0,71	1,0215
0,88	1,2470
1,10	1,5485

Fonte: elaborada pelo autor.

Curva de calibração da amônia para o método colorimétrico de Nessler



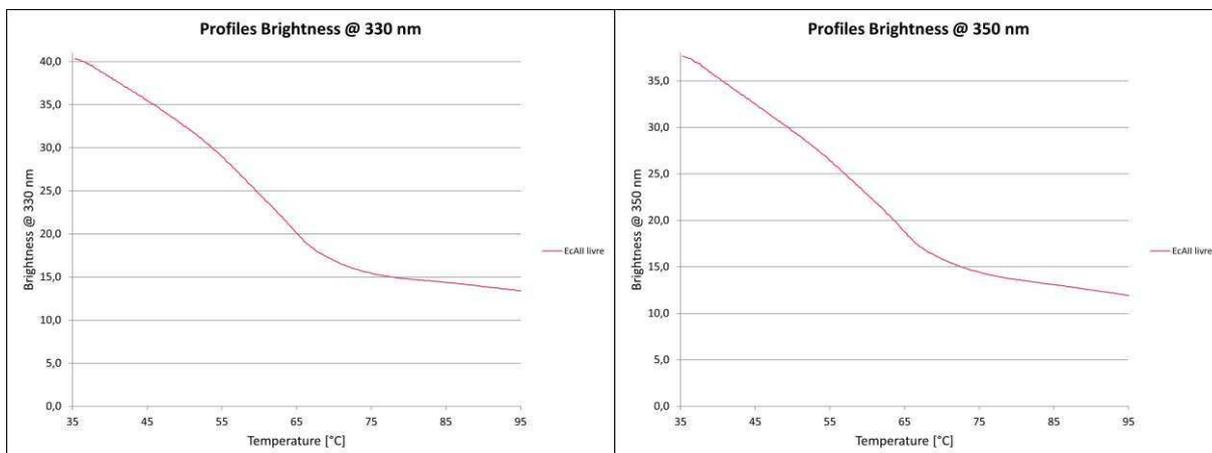
Fonte: o autor.

Para obtenção da concentração de amônia, as absorbâncias são aplicadas de acordo com a seguinte equação:

$$[\text{NH}_3] (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{Abs} - 0,0168}{1,4052}, \text{ onde Abs é o valor de absorbância a 436 nm.}$$

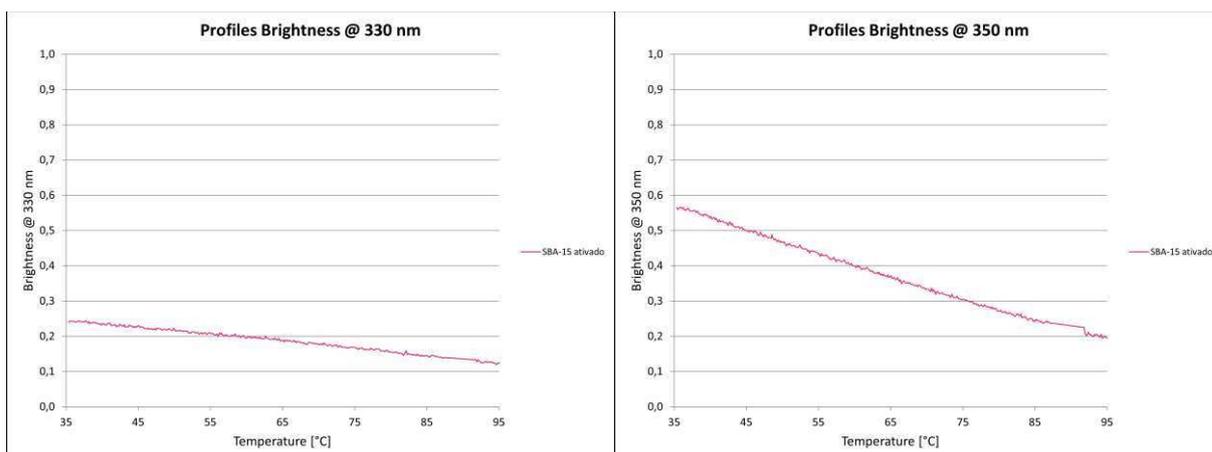
APÊNDICE C – DADOS DE FLUORESCÊNCIA A 330 nm E 350 nm

Dados de fluorescência a 330 nm e 350 nm de EcAII livre



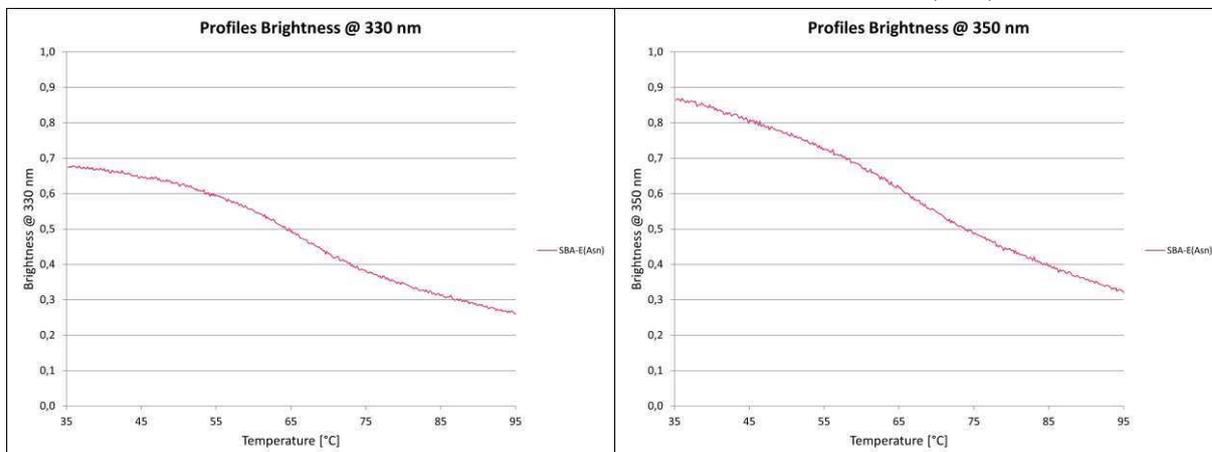
Fonte: o autor.

Dados de fluorescência a 330 nm e 350 nm de SBA-15-APTES-GA



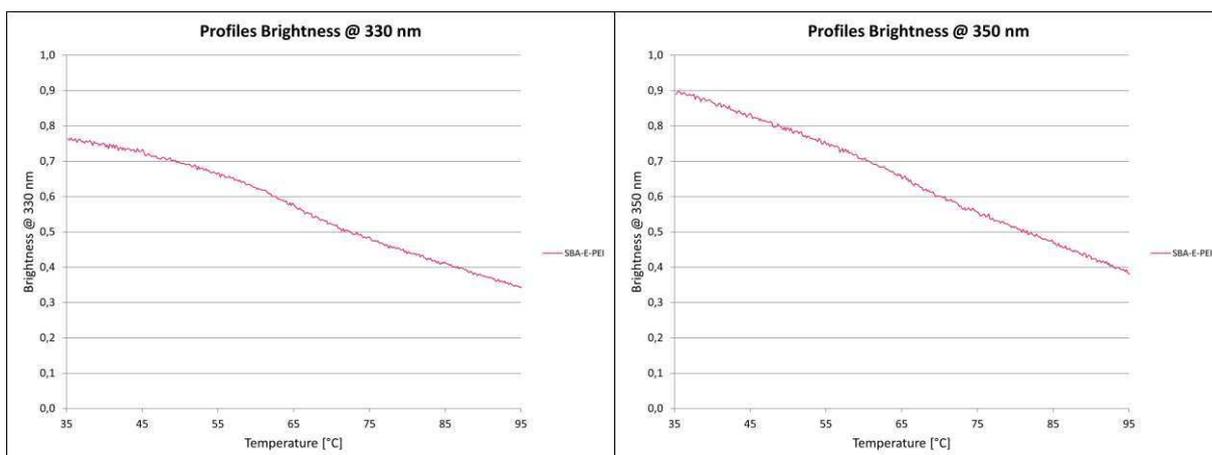
Fonte: o autor.

Dados de fluorescência a 330 nm e 350 nm de SBA-E(Asn)



Fonte: o autor.

Dados de fluorescência a 330 nm e 350 nm de SBA-E-PEI



Fonte: o autor.