



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

L-asparaginase: Aplicações em Alimentos para Mitigação da
Acrilamida e Técnicas de Imobilização Enzimática

Denise Wibelinger de Melo

Porto Alegre -RS

2023

DENISE WIBELINGER DE MELO

L-asparaginase: Aplicações em Alimentos para Mitigação da Acrilamida e
Técnicas de Imobilização Enzimática

Tese submetida ao Programa
de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos como
requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa
Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Roberto
Fernandez-Lafuente

Porto Alegre - RS

2023

CATÁLOGO BIBLIOGRÁFICO

CIP - Catalogação na Publicação

Wibelinger de Melo, Denise

L-asparaginase: Aplicações em Alimentos para Mitigação da Acrilamida e Técnicas de Imobilização Enzimática / Denise Wibelinger de Melo. -- 2023.
157 f.

Orientador: Rafael Costa Rodrigues.

Coorientador: Roberto Fernandez-Lafuente.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos . 2. Acrilamida. 3. Imobilização enzimática . 4. L-asparaginase . 5. Batatas . I. Costa Rodrigues, Rafael, orient. II. Fernandez-Lafuente, Roberto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Rafael Costa Rodrigues, pela confiança depositada no meu trabalho, pelo auxílio nos momentos de dificuldade, pelo conhecimento compartilhado, incentivo e apoio, e por ser esse exemplo de profissional.

À Profa. Manuela Poletto Klein, agradeço por me proporcionar a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa em acrilamida, pelos ensinamentos, incentivo e empolgação a cada novo resultado. Embora não haja uma formalização oficial, você sabe que te considero minha segunda coorientadora.

Ao Prof. Roberto Fernandez-Lafuente, agradeço por me permitir ser sua coorientada e pela confiança que depositou em meu trabalho. Lamentavelmente, a pandemia impossibilitou que nos encontrássemos presencialmente. Entretanto, espero que em um futuro próximo tenhamos a chance de nos conhecer pessoalmente.

Agradeço aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biocatálise e Tecnologia Enzimática pelos momentos de incentivo e descontração, especialmente à Anike, que enfrentou as dificuldades e incertezas da pandemia ao meu lado.

Meu muito obrigada às minhas colegas e amigas do grupo de pesquisa em acrilamida, Bruna, Daniela, Fernanda e Taline, pelos bons momentos que compartilhamos, e por toda a ajuda e incentivo. Tenho muito orgulho da nossa evolução em cada resultado e do empenho de cada uma para fazer com que este projeto seja um sucesso.

À Professora Poliana Gurak, agradeço por todos os ensinamentos e por estar sempre disposta a ajudar.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem participar da avaliação da minha tese, colaborando assim para a sua melhoria.

Agradeço à Camila Scheid, técnica da UFSCPA, e ao Prof. Josias por toda ajuda nas análises no LC-MS.

À equipe técnica da cozinha experimental da UFCSPA em especial à Fernanda, você faz toda a diferença, você está sempre disposta a ajudar te agradeço por toda dedicação e empatia.

À todos os demais amigos, por todos os momentos compartilhados e pelo incentivo durante esta jornada que é a vida.

À minha família, em especial aos meus amados pais, Fermina e João, pelo amor incondicional, pelo exemplo de caráter e por sempre me apoiarem e incentivarem nas minhas decisões, e por sonharem junto comigo.

Ao Matheus, por iluminar os meus dias e deixá-los mais leve, pelo amor, carinho e companheirismo.

À vida por me dar a oportunidade de viver esses momentos com saúde e sabedoria.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo ensino de qualidade. Assim como a Universidade Federal de Ciências da Saúde pela disponibilidade dos espaços e equipamentos.

À Capes, ao CNPq e à FAPERGS, pelo suporte financeiro.

Denise Wibelinger de Melo

Tese

**L-asparaginase: Aplicações em Alimentos para Mitigação da Acrilamida e
Técnicas de Imobilização Enzimática**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de

DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:/...../.....

Homologada em:/...../.....

Pela Comissão Examinadora:

Por

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Orientador - UFRGS

Coordenador do Programa de Pós-

graduação em Ciência e Tecnologia

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

de Alimentos (PPGCTA)

Banca – UFRGS

Prof^a Florencia Cladera Olivera

Prof.^a Dr.^a. Poliana Deyse Gurak

Diretora do Instituto de Ciência e

Banca – UFCSPA

Tecnologia de Alimentos -

ICTA/UFRGS

Prof.^a. Dr.^a. Maria Manuela Camino Feltes

Banca – UFSC

RESUMO

A acrilamida, é uma substância com potencial carcinogênico, naturalmente formada em alimentos ricos em L-asparagina e açúcares redutores durante o processamento em altas temperaturas, como no caso de batatas fritas. Este estudo teve como objetivo reduzir os níveis de acrilamida em quatro cultivares de batatas, especialmente nas batatas-doces, empregando a enzima L-asparaginase. Esta abordagem é fundamental devido ao aumento do consumo desse alimento e à carência de pesquisas sobre acrilamida em batatas-doces. Além disso, a pesquisa se concentrou na imobilização da L-asparaginase em dois suportes: epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose, buscando melhorar sua estabilidade. A modificação da epóxi-agarose com etilenodiamina foi crucial para a imobilização eficaz da enzima. Os melhores resultados foram alcançados com amino-epóxi-agarose, apresentando um rendimento de imobilização de 76%. Os biocatalisadores imobilizados mostraram maior estabilidade em condições ácidas e altas temperaturas, mantendo alta atividade mesmo após 60 dias de armazenamento a 4°C e após 7 ciclos de reutilização. Quando aplicada às batatas, a L-asparaginase reduziu consideravelmente os teores de L-asparagina em todas as amostras tratadas, contribuindo para a redução da acrilamida. A maior redução dessa substância comparada com a amostra controle foi de 96,52% (623,77 ng. g⁻¹) para a batata tradicional (Ágata) e 85,80% (87,56 ng. g⁻¹) para a cultivar de batata-doce Beauregard, sendo importante destacar que a L-asparaginase não interferiu na cor das batatas tratadas mantendo a aparência característica desejada pelo consumidor. Esses resultados evidenciam a L-asparaginase como uma estratégia eficaz para reduzir a acrilamida em alimentos, enquanto sua imobilização em amino-epóxi-agarose contribuiu para a estabilidade e eficiência do biocatalisador. Este avanço ressalta o potencial da L-asparaginase em diversas aplicações biotecnológicas, consolidando-se como uma ferramenta valiosa para a indústria alimentícia.

Palavras-chave: Acrilamida, mitigação, batata-doce, L-asparaginase, imobilização enzimática, amino-epóxi-agarose

ABSTRACT

Acrylamide is a substance with carcinogenic potential, naturally formed in foods rich in L-asparagine and reducing sugars during processing at high temperatures, as in the case of French fries. This study aimed to reduce acrylamide levels in four potato cultivars, especially sweet potatoes, using the enzyme L-asparaginase. This approach is essential due to the increased consumption of this food and the lack of research on acrylamide in sweet potatoes. In addition, the research focused on the immobilization of L-asparaginase in two supports: epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose, seeking to improve its stability. Modification of epoxy-agarose with ethylenediamine was crucial for effective immobilization of the enzyme. The best results were achieved with amino-epoxy-agarose, with an immobilization yield of 76%. The immobilized biocatalysts showed greater stability in acidic conditions and high temperatures, maintaining high activity even after 60 days of storage at 4°C and after 7 cycles of reuse. When applied to potatoes, L-asparaginase considerably reduced L-asparagine levels in all treated samples, contributing to the reduction of acrylamide. The greatest reduction of this substance compared to the control sample was 96.52% (623,77 ng. g⁻¹) for the traditional potato (Ágata) and 85.80% (87.56 ng. g⁻¹) for the Beauregard sweet potato cultivar, and it is important to highlight that L-asparaginase did not interfere with the color of the treated potatoes, maintaining the characteristic appearance desired by the consumer. These results show L-asparaginase as an effective strategy to reduce acrylamide in food, while its immobilization in amino-epoxy-agarose contributed to the stability and efficiency of the biocatalyst. This breakthrough highlights the potential of L-asparaginase in several biotechnological applications, consolidating itself as a valuable tool for the food industry.

Keywords: Acrylamide, mitigate, L-asparaginase, sweet potatoes, enzymatic immobilization, amino-epoxy-agarose.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. ACRILAMIDA	19
3.1.1. Acrilamida em alimentos	21
3.1.2. Mecanismos de ação da acrilamida no organismo	24
3.2. ALIMENTOS SUSCEPTÍVEIS A FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA	26
3.2.1. Batata tradicional (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	26
3.2.2. Batata-doce (<i>Ipomoea batatas</i> Lam)	29
3.3. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA	30
3.3.1. Fritura	31
3.4. MÉTODOS DE MITIGAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS	33
3.5. L-ASPARAGINASE E SEU CONTEXTO HISTÓRICO	34
3.5.1. Características da L-asparaginase	36
3.5.2. Mecanismo de ação da L-asparaginase	38
3.5.3. Estabilidade L-asparaginase	40
3.6. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	42
3.6.1 Técnicas de Imobilização Enzimática	43
3.5.2. Suportes para a imobilização enzimática	47
3.6.3. Imobilização de L-asparaginase	49

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1. MATERIAIS	52
4.2. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	53
4.2.1. Atividade enzimática.....	53
4.2.2. Determinação da concentração de proteínas.....	54
4.2.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	54
4.2.4. pH e temperatura ótima da enzima L-asparaginase.....	54
4.2.5. Estabilidade térmica	54
4.2.6. Estabilidade do pH.....	55
4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA	55
4.3.1. Atividade enzimática.....	55
4.3.2. Determinação da concentração de proteínas.....	56
4.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	56
4.3.5. Estabilidade térmica	57
4.3.6. Estabilidade do pH.....	57
4.4. AMOSTRAS.....	57
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS BATATAS	58
4.5.1. Determinação da umidade	58
4.5.2. Determinação da atividade de água (aw)	58
4.5.3. Determinação dos açúcares redutores	58
4.5.4. Determinação da L-asparagina.....	58
4.5.5. Análise de cores.....	59
4.6. TRATAMENTO ENZIMÁTICO	60
4.7. TRATAMENTO TÉRMICO.....	60
5. CAPÍTULO III - IS L-ASPARAGINASE A PROMISING TREATMENT FOR REDUCING ACRYLAMIDE LEVELS IN SWEET POTATOES AND TRADITIONAL POTATO FRIES?	64

6. CAPÍTULO IV – ENHANCING BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF L-ASPARAGINASE: IMMOBILIZATION ON AMINOEPOXY- AGAROSE FOR IMPROVED CATALYTIC EFFICIENCY AND STABILITY	98
7. CAPÍTULO V - DISCUSSÃO GERAL.....	136
8. CAPITULO VI – CONCLUSÃO.....	140
REFERÊNCIAS.....	141

INTRODUÇÃO

A acrilamida (C_3H_5NO) é um monômero que pode ser produzido sinteticamente ou gerado naturalmente nos alimentos durante o tratamento térmico. Quando é sintetizada quimicamente pela indústria, a acrilamida é amplamente utilizada em uma variedade de processos devido às suas propriedades versáteis. Sua estrutura molecular de amida insaturada contribui para suas diversas aplicações, desde a produção de polímeros como a poliacrilamida (não tóxica), até o tratamento de água e efluentes (ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

Entretanto, em 1994, a Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer classificou a acrilamida como um potencial carcinogênico humano nível 2A (IARC, 1994). Além disso, ela também foi considerada neurotóxica e genotóxica (ARAS et al., 2017; HUANG et al., 2018; ZHAO; ZHANG; DENG, 2022). Sua presença em alimentos foi descoberta em 2002 por um grupo de pesquisadores da Universidade de Estocolmo juntamente com a Agência Estatal de Alimentos da Suécia (LÖFSTEDT, 2003).

O estudo inicial tinha como objetivo avaliar a exposição ocupacional à acrilamida após um desastre ambiental em um túnel ferroviário na região da Escandinávia, onde a substância era utilizada em selantes contra infiltração. Surpreendentemente, os resultados não revelaram diferenças significativas em comparação com o grupo controle. Em busca de uma compreensão mais aprofundada, a pesquisa foi ampliada para analisar outras possíveis formas de exposição, tendo como resposta uma concentração significativa de acrilamida em diversos alimentos submetidos a tratamento térmico em altas temperaturas (LÖFSTEDT, 2003; HUANG et al., 2022).

A acrilamida é formada principalmente como subproduto da reação de Maillard, em alimentos ricos em açúcares redutores e o aminoácido asparagina, quando preparados em temperaturas superiores a 120°C, como é o caso do assamento e da fritura. O café, os produtos de panificação e confeitaria como pães, bolos e biscoitos e as batatas fritas são os alimentos com os maiores índices de acrilamida (BACHIR et al., 2023).

Dentre os alimentos mencionados, as batatas fritas à base de batata tradicionais (*Solanum tuberosum*) se destacam como o segundo produto com maior concentração global de acrilamida, perdendo apenas para o café. O processo de fritura, frequentemente realizado em temperaturas superiores a 180°C, juntamente com a composição das batatas, cria um ambiente propício para a formação dessa substância (LIYANAGE et al., 2021; KUMARI et al., 2023). No entanto, ainda existem poucos estudos sobre as concentrações e mitigação da acrilamida em diferentes cultivares de batatas-doces processadas em altas temperaturas (NGUYEN et al., 2022).

Na última década, houve um aumento considerável no consumo de batata doce, tanto em refeições cotidianas quanto como aperitivos em bares e restaurantes. Essa popularização pode ser atribuída às suas qualidades nutricionais e ao sabor adocicado, que a torna sensorialmente agradável (QIN et al., 2022).

Diante desse cenário preocupante para a saúde dos consumidores, diversos pesquisadores têm se dedicado a encontrar formas eficientes de mitigação da acrilamida em alimentos. Estratégias como o melhoramento genético da matriz-alimentar, mudanças nos protocolos de cocção, utilização de pré-tratamentos como branqueamento, utilização de hidrocoloides e modificação do

pH com aplicação ácidos orgânicos, bem como o uso de aditivos naturais e a aplicação da enzima L-asparaginase, são algumas das técnicas que têm sido estudadas (BAŞARAN; TURK, 2021; LIYANAGE et al., 2021; HUANG et al., 2022).

A enzima L-asparaginase tem uma atribuição de extrema relevância como uma ferramenta biotecnológica de destaque. Sua ação principal consiste na eliminação da presença de L-asparagina do meio reacional, conferindo-lhe um papel promissor na redução dos níveis desse aminoácido nos alimentos. Tal abordagem desempenha uma função significativa na mitigação da formação da acrilamida, tendo como vantagem a preservação das características nutricionais e sensoriais do produto alimentício tratado (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

No entanto, apesar de bastante eficiente a utilização da L-asparaginase ainda enfrenta desafios significativos que exigem contínuo aprimoramento e pesquisa para otimizar a eficácia deste biocatalisador, a estabilidade operacional da enzima pode ser afetada por vários fatores, como pH e temperatura do meio, bem como pode perder sua atividade devido à competição com compostos inibidores presentes nos alimentos (ULU; ATES, 2017; AGRAWAL et al., 2018).

Além disso, a aplicação eficaz da L-asparaginase na indústria alimentícia demanda a otimização de protocolos de pré-tratamento e processamento para cada tipo de matriz alimentar, visando assegurar que a enzima desempenhe seu papel de forma eficiente na redução dos níveis de L-asparagina. Esse processo pode ser um desafio técnico para a indústria alimentícia (ULU; ATES, 2017; JIA et al., 2021).

Pensando nisso, torna-se necessário a aplicação de abordagens que visem maximizar a efetividade da L-asparaginase. Isso inclui não apenas a adequação do protocolo para a matéria-prima, mas também a aplicação da técnica como a imobilização enzimática. A imobilização do biocatalisador oferece algumas vantagens, incluindo a possibilidade de aumentar a estabilidade da enzima, prolongar seu tempo de armazenamento e permitir sua reutilização (MOHAMAD et al., 2015; DE ANDRADES et al., 2019). Portanto, o presente estudo teve como principais objetivos otimizar o processo operacional de aplicação da L-asparaginase na sua forma nativa em três cultivares de batatas-doces (Beauregard, Rubissol e Cuia) e na batata tradicional (Ágata), reconhecendo a importância de reduzir os níveis de acrilamida nesses alimentos. Além disso, o estudo também buscou imobilizar a L-asparaginase em dois suportes diferentes, epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose, com o propósito de proteger a enzima e melhorar sua estabilidade operacional.

A combinação desses objetivos visa não apenas otimizar a eficácia da enzima na redução de L-asparagina garantindo a segurança do alimento e do consumidor, mas também contribuir para os avanços biotecnológicos em âmbito de imobilização que representa um passo importante na melhoria da aplicação prática da L-asparaginase.

A tese de doutorado foi estruturada em conformidade com as diretrizes do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sendo apresentado na forma de artigos científicos. O Capítulo I oferece uma revisão bibliográfica detalhada que explora os pontos fundamentais propostos na tese. No Capítulo II é apresentado os materiais e métodos utilizados nos artigos I e II, nos Capítulos III e IV os resultados são apresentados conforme foram submetidos

para publicação em periódicos internacionais. Finalmente, no Capítulo V e VI, são apresentadas a discussão geral do trabalho e as principais conclusões obtidas.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo visa otimizar o processo operacional da aplicação da L-asparaginase livre para reduzir a acrilamida em diferentes tipos de batatas-doces e tradicional, testando sua eficiência nas cultivares específicas. Além de, imobilizar a L-asparaginase em dois suportes diferentes, epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose, com o propósito de proteger a enzima e melhorar sua estabilidade operacional.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a enzima comercial (Acrylaway® G – preparado sólido de L-asparaginase), em termos atividade, pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica, bem como em termos de suas constantes cinéticas;
- Determinar as concentrações dos componentes das diferentes cultivares das batatas-doces e tradicional e do óleo de fritura que favorecem a formação da acrilamida durante o processamento térmico (açúcares redutores, umidade, a_w , teor de L-asparagina e índice de peróxido);
- Aplicar a L-asparaginase na sua forma nativa nas diferentes cultivares de batatas-doces Beauregard, Rubissol, Cuia, e na batata tradicional Ágata e avaliar o seu efeito na redução dos níveis de acrilamida após o processamento térmico;
- Realizar a caracterização e a imobilização da L-asparaginase (Acrylaway® L – preparado líquido de L-asparaginase) em dois suportes diferentes:

epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose, utilizando diversos parâmetros de pH e molaridade para a imobilização;

- Avaliar a estabilidade operacional da L-asparaginase imobilizada em comparação com a enzima livre, considerando parâmetros como pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica e ao pH, inativação térmica, armazenamento, reutilização, bem como suas constantes cinéticas.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo de revisão bibliográfica é realizada uma análise abrangente dos mecanismos de formação da acrilamida em alimentos e são exploradas as estratégias desenvolvidas para sua redução eficaz, com ênfase na enzima L-asparaginase. A evolução histórica desta enzima, desde sua descoberta pioneira no campo oncológico até seu papel crucial como método de mitigação da acrilamida em alimentos, é examinada em detalhes. Além disso, o processo de imobilização enzimática e sua aplicação na L-asparaginase são abordados, destacando-se como uma técnica inovadora que tem transformado a maneira como as enzimas são utilizadas, especialmente no contexto alimentar.

3.1. ACRILAMIDA

A acrilamida C_3H_5NO , também conhecida como 2-propenamida, é uma molécula reativa α , β -carbonil insaturada. Ela é uma substância monomérica frequentemente produzida por síntese, através da hidratação da acrilonitrila. A acrilamida em temperatura ambiente se apresenta na forma de um sólido branco cristalino inodoro, sendo altamente solúvel em água e em solventes orgânicos. Essa substância é muito utilizada por diversas indústrias, dentre elas a indústria química, onde é empregada como floculante no tratamento de efluentes e como precursor da poliacrilamida, um polímero não tóxico que é formado por reações de polimerização. Além disso, também é bastante utilizada na indústria têxtil e de papel durante o seu processamento e no condicionamento do solo para a construção de represas e túneis (MORI et al., 2022; ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

No entanto, em 1994, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a acrilamida como uma substância com potencial carcinogênico para os seres humanos, atribuindo-lhe a classificação 2A (IARC, 1994). Além disso, estudos em animais também evidenciam a neurotoxicidade e mutagenicidade dessa substância, levantando uma grande preocupação sobre os riscos à saúde associados à acrilamida (ARAS et al., 2017; HUANG et al., 2018). Inicialmente a contaminação por acrilamida foi atribuída apenas a exposição ocupacional e ambiental (CHAMPRASERT; ORFILA; SUWANNAPORN, 2022; ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

Mais tarde em 2002, um grupo de pesquisadores do *Swedish National Food Authority* da Suécia (SNFA) e da Universidade de Estocolmo realizaram um estudo onde inicialmente investigavam a exposição de trabalhadores que manipularam selantes contendo acrilamida ligados a um desastre ambiental ocorrido em um túnel ferroviário na região da Escandinávia. Durante esse experimento, os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre os indivíduos expostos a essa substância no ambiente de trabalho e o grupo controle. Essa descoberta apontou que a acrilamida não era apenas proveniente do ambiente ocupacional, mas também de uma outra fonte de exposição, e que essa estava provavelmente relacionada à alimentação. A partir dessa hipótese o estudo foi expandido e diversos alimentos foram investigados, onde foi identificada uma quantidade significativa de acrilamida em produtos amiláceos e café que foram submetidos ao processamento térmico em altas temperaturas (FDA, 2016; LÖFSTEDT, 2003).

Essa descoberta evidenciou a necessidade de desenvolver estratégias eficazes para detectar e mitigar a formação da acrilamida em alimentos, além de

compreender melhor os mecanismos reacionais dessa substância no organismo (TAREKE et al., 2002).

3.1.1. Acrilamida em alimentos

A acrilamida em alimentos é gerada principalmente através da reação de Maillard, quando matrizes alimentares ricas em açúcares redutores e o aminoácido asparagina são processadas em altas temperaturas, como é o caso das batatas fritas e assadas, o café, e os produtos de panificação e confeitaria (BAŞARAN; AYDIN; KABAN, 2020; CHAMPRASERT et al., 2021; HUANG et al., 2022).

O escurecimento enzimático ou Maillard é uma rede complexa de reações químicas em cadeia responsáveis pelas características sensoriais como aroma, cor e sabor de muitos produtos tratados termicamente, esses processos estão relacionados ao desenvolvimento de melanoidinas e aldeídos. No entanto, o resultado de algumas dessas interações pode gerar compostos tóxicos como a acrilamida quando em temperatura superior a 120 °C (RUFÍÁN-HENARES; PASTORIZA, 2016).

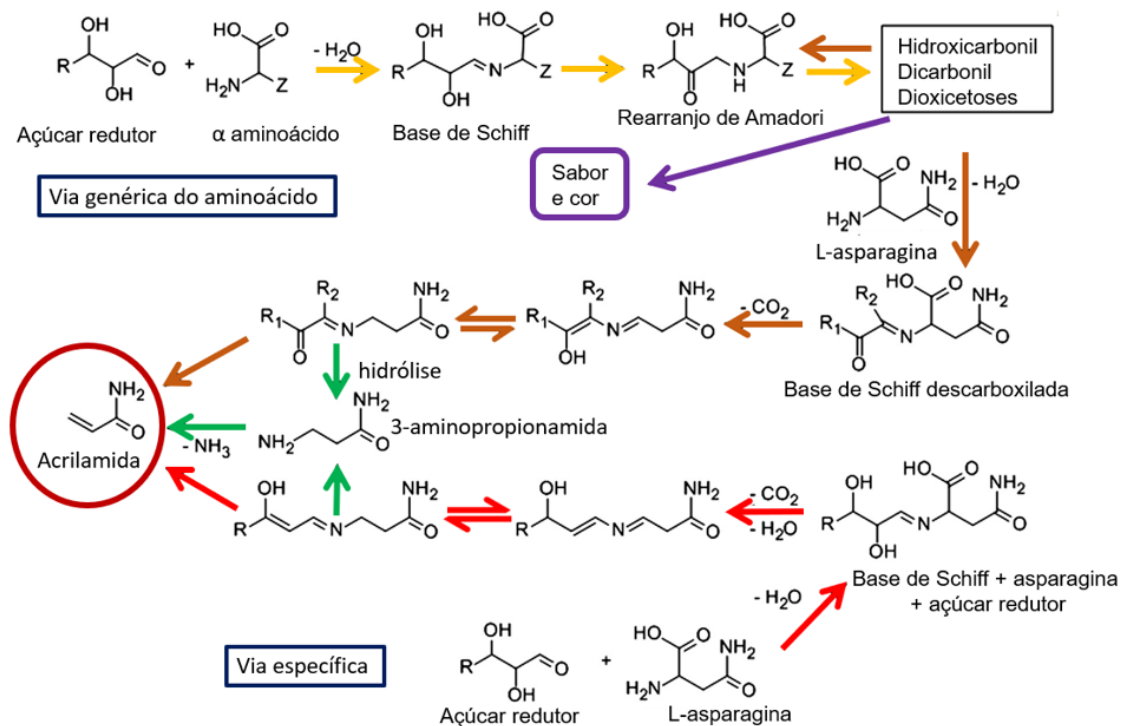
A principal via de formação da acrilamida (Figura 1) ocorre durante a reação de Maillard e envolve a condensação nucleofílica de um grupo carbonila com um grupo amino. O grupo amino pode ser derivado da cadeia lateral de um aminoácido livre, ou do último aminoácido de uma proteína, nesse caso a L-asparagina. Os grupos carbonila são predominantemente provenientes dos açúcares redutores como a glicose, frutose e maltose. Inicialmente, esses compostos reagem, formando uma base de Schiff instável. Essa base passa por um rearranjo químico chamado rearranjo de Amadori, transformando-se em uma

N-glicosilamina substituída ou imina, que é a base de Schiff para que os açúcares redutores realizem a descarboxilação (RUFÍÁN-HENARES; PASTORIZA, 2016; BALAGIANNIS et al., 2019).

Posteriormente, a base de Schiff descarboxilada resultante passa por uma série de reações de degradação, incluindo desidratação e fragmentação. Esse processo é chamado de degradação de Strecker é uma etapa crucial que levam a formação de intermediários reativos que podem interagir para produzir a acrilamida, diferentes ramificações são propostas através da base de Schiff dentre elas uma forma direta de transaminação do açúcar/carbonil e a via da 3-aminopropanamida (3-APA) (PARKER et al., 2012; RUFÍÁN-HENARES; PASTORIZA, 2016; XU et al., 2014).

A rota da 3-aminopropanamida também pode acontecer mesmo na ausência de compostos carbonílicos, isso ocorre através da descarboxilação enzimática da L-asparagina livre, sendo esses alguns dos mecanismos propostos como via de geração de acrilamida no contexto da reação de Maillard (BALAGIANNIS et al., 2019; XU et al., 2014).

Figura 1. Formação de acrilamida pela Reação de Maillard



Fonte: Adaptado de Parker et al. (2012).

A acrilamida também pode ser gerada por uma segunda via, que está relacionada com a desidratação e degradação dos triglicerídeos e do glicerol. Essa degradação ocorre durante o aquecimento do óleo de fritura gerando acroleína e ácido acrílico, estes em presença de amônia formam acrilamida. Portanto, o processo de fritura pode estar relacionado a teores de acrilamida ainda mais elevados nos alimentos (KERAMAT et al., 2011; LIM et al., 2014; CHAMPRASERT et al., 2021).

Outros fatores importantes que influenciam no teor de acrilamida formação e devem ser monitorados são o pH, a umidade, a atividade de água, o tempo e a temperatura de processamento, e principalmente a quantidade de asparagina e açúcares redutores presentes na matriz alimentar. Isso pode variar bastante de matéria-prima para matéria-prima, pois estão relacionadas a diferentes causas como condições climáticas de plantio, características do solo e fertilização, bem

como as práticas de armazenamento pós-colheita (BAŞARAN; TURK, 2021; CHAMPRASERT et al., 2021; SADEGHI et al., 2022).

3.1.2. Mecanismos de ação da acrilamida no organismo

Nas últimas décadas, houve uma investigação significativa sobre os efeitos da exposição à acrilamida, incluindo sua neurotoxicidade, genotoxicidade e potencial carcinogenicidade. Esses efeitos foram comprovados em estudos *in vivo* (ARAS et al., 2017; HUANG et al., 2018; ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

Devido à sua natureza hidrofílica, a acrilamida é facilmente absorvida pelo trato gastrointestinal o que resulta na sua distribuição por todo sistema circulatório, inclusive pode atravessar a barreira hematoencefálica, afetando o sistema nervoso e contribuindo para o desenvolvimento de problemas neurodegenerativos. Existem duas vias metabólicas principais para o metabolismo da acrilamida (ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

A rota metabólica mais preocupante é aquela em que a acrilamida é transformada em glicidamida, uma substância com capacidade neurotóxica e mutagênica significativamente maior do que a própria acrilamida, o que a torna ainda mais alarmante em termos de seu potencial impacto na saúde (PUNDIR; YADAV; CHHILLAR, 2019).

A transformação em glicidamida ocorre quando a acrilamida atinge o sistema sanguíneo e reage com a glutatona, tendo como catalisador o citocromo P4502E1 (CYP2E1), sendo epoxidada em glicidamida. A glicidamida, por sua vez, pode se ligar ao DNA e formar adutos de *Michael* com grupos SH, OH e NH₂ do DNA, levando a danos genéticos, além de causar prejuízos na estrutura nervosa que afetam a liberação dos neurotransmissores, tornando esta via a principal

causa de e genotoxicidade causada pela acrilamida (WATZEK et al., 2012). Ademais, o acúmulo dessa substância no organismo pode favorecer diversas condições, incluindo disfunção mitocondrial, doenças do sistema reprodutivo, doenças neurológicas e doenças do sistema tireoidiano, entre outros (ZHANG et al., 2020; YIN et al., 2021).

Por outro lado, a segunda via metabólica da acrilamida ocorre no fígado, onde é biotransformada pela glutathione S-transferase, resultando na formação de N-acetil-S-cisteína, que é subsequentemente degradada em ácido mercaptúrico e excretada na urina. No entanto, um desequilíbrio na concentração de glutathione no fígado pode contribuir para a redução dos níveis de antioxidantes, levando a um estresse oxidativo que corrobora para o acúmulo e aumento da toxicidade da acrilamida. Danos ao fígado associados ao alcoolismo, hepatite, cirrose e outras desordens hepáticas, bem como um baixo consumo de aminoácidos sulfurados essenciais para a síntese da glutathione, favorecem essas condições (ZHAO; ZHANG; DENG, 2022).

A acrilamida foi considerada mutagênica em estudos com camundongos, levando a problemas reprodutivos, como diminuição da fertilidade e danos ao DNA dos espermatozoides. A exposição dos oócitos das cobaias à acrilamida resultou em toxicidade significativa devido à formação de glicidamida (ARAS et al., 2017).

Além disso, a acrilamida contribui para problemas no desenvolvimento cardíaco. Um estudo em embriões de peixe-zebra mostrou que ela afeta o desenvolvimento cardíaco e a expressão dos genes cruciais durante a formação da válvula atrioventricular. Portanto, devido à sua natureza tóxica e potencialmente carcinogênica, o monitoramento e a redução dos níveis de acrilamida é essencial (HUANG et al., 2018).

3.2. ALIMENTOS SUSCEPTÍVEIS A FORMAÇÃO DE ACRILAMIDA

Alimentos que contêm os principais precursores da acrilamida, como a L-asparagina e os açúcares redutores, são particularmente mais propensos à formação dessa substância quando sujeito a altas temperaturas durante o processamento, especialmente se forem submetidos a fritura, assamento, ou torrefação, por atingirem temperaturas superiores a 120 °C e uma rápida desidratação (PUNDIR; YADAV; CHHILLAR, 2019).

Os principais alimentos que estão entre os maiores contribuintes para a exposição à acrilamida são as batatas fritas, batatas assadas, os produtos de panificação e confeitaria como, pães, bolos, biscoitos, cereais matinais e o café. Esses alimentos são consumidos diariamente em todo o mundo, tornando a exposição à acrilamida algo comum em nossas dietas. Portanto, a necessidade de reduzir a presença de acrilamida nesses alimentos é de extrema importância para a proteção da saúde pública (XU et al., 2014).

Diante desse cenário, o presente estudo norteia seu foco para a formação da acrilamida em batatas-doces e tradicionais, para isso realizou-se uma análise bibliográfica direcionada para esses alimentos.

3.2.1. Batata tradicional (*Solanum tuberosum* L.)

A *Solanum tuberosum* L., batata tradicional popularmente conhecida como batata-inglesa é um tipo de tubérculo pertencente à família das Solanaceae, sendo considerado um dos alimentos mais amplamente consumidos em todo o mundo, ocupando a quarta posição entre as commodities de maior relevância na

alimentação global, com uma produção média anual de cerca de 322 milhões de toneladas, situando-se logo após o milho, trigo e arroz (FAO, 2021).

Dentre as batatas tradicionais, a variedade Ágata é amplamente reconhecida como a principal cultivar do Brasil, apresenta uma dormência curta e uma maturação precoce. Essa batata se caracteriza por ter uma casca de coloração amarela e se destaca devido ao seu alto potencial de produção e aparência atrativa, sendo extremamente versátil na culinária (SILVA et al., 2014).

A batata é uma excelente fonte de energia devido ao seu elevado teor de amido. Além disso, algumas cultivares apresentam quantidades significativas de vitaminas e minerais, entretanto, elas também podem conter substâncias antinutricionais como os glicoalcalóides, que são metabólitos secundários tóxicos produzidos naturalmente como mecanismo de defesa contra patógenos nas cultivares de batata tradicional (MUSITA; OKOTH; ABONG', 2019; EMRAGI; KALITA; JAYANTY, 2022).

Para assegurar a segurança alimentar durante o consumo da batata tradicional, é imprescindível submetê-la a tratamentos térmicos, como fritura, assamento ou cocção em água, a fim de desativar os glicoalcalóides (MUSITA; OKOTH; ABONG', 2019). No entanto, é importante salientar que o processamento térmico, além de aprimorar características sensoriais como sabor, aroma e textura, também pode induzir a formação de compostos indesejáveis, como a acrilamida. Esse fenômeno é atribuído à presença dos constituintes essenciais, como açúcares redutores e asparagina, nas batatas, fatores que propiciam a geração deste composto durante a reação de Maillard ao serem submetidos a temperaturas superiores a 120 °C (MESIAS et al., 2021).

Estudos demonstraram que alguns fatores podem contribuir para o aumento dos níveis de acrilamida gerada na batata tradicional processada, uma delas está relacionada a forma de armazenamento pós-colheita (MUTTUCUMARU et al., 2017; DATIR; REGAN, 2022).

Segundo Datir e Regan (2022), quando as batatas são armazenadas em temperaturas mais baixas, entre 6 e 9 °C, existe a possibilidade de ocorrer a clivagem da sacarose em açúcares redutores, como frutose e glicose, por meio da ação das invertases. Esse fenômeno é conhecido popularmente como adoçamento induzido pelo frio. É importante notar que a presença de maiores concentrações de açúcares redutores no contexto reacional aumenta a probabilidade de uma elevação nos níveis de acrilamida durante o processamento térmico dessas batatas (DATIR; REGAN, 2022).

Outros fatores que interferem na quantidade de acrilamida produzida em alimentos, incluindo as modificações bioquímicas resultantes das condições climáticas, as características do solo, as práticas de manejo, o estágio de maturação no momento da colheita do alimento em questão, bem como a cultivar de batata utilizada. Além disso, o teor de umidade, a atividade de água, a oxidação lipídica e os parâmetros de tempo e temperatura e pH durante o processamento também desempenham papéis cruciais nesse processo (SANSANO et al., 2015; HSU et al., 2016; MUTTUCUMARU et al., 2017).

Conforme a *European Food Safety Authority* (EFSA), os valores de referência sugeridos para a presença de acrilamida em batatas fritas e produtos à base de batatas são de 750 µg.kg⁻¹. A exposição do consumidor a essa substância está diretamente relacionada à faixa etária e aos níveis presentes nos alimentos ingeridos. Isso é fator preocupante, já que produtos com maiores teores de

acrilamida são consumidos cotidianamente (KERAMAT et al., 2011; EFSA, 2015). As crianças são identificadas como o grupo mais vulnerável, com uma exposição média diária variando de 0,5 a 1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, seguidas por adolescentes, adultos e idosos, que consomem diariamente entre 0,4 e 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (EFSA, 2015; YIN et al., 2021).

3.2.2. Batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam)

A batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam) é um tubérculo comestível originário das Américas, mas suas cultivares são altamente difundidas em todos os continentes principalmente o asiático e africano, sendo a sétima cultivar mais importante do mundo, tendo uma produção aproximada de 92 milhões de toneladas por ano (WANG et al., 2018; DE ALBUQUERQUE; SAMPAIO; DE SOUZA, 2019).

A batata-doce, assim como a batata tradicional é rica em amido, no entanto apresenta maior quantidade de fibra alimentar e algumas de suas cultivares podem conter alto nível de carotenoides, compostos fenólicos, vitamina C, além de proteínas e minerais como ferro (AHMED; AKTER; EUN, 2010; XU et al., 2018; MUSITA; OKOTH; ABONG', 2019; EMRAGI; KALITA; JAYANTY, 2022). Esses tubérculos são classificados pelo formato, tamanho, cor da casca e da polpa. Quando categorizada pela cor da casca, as batatas doces podem ser denominadas amarelas, brancas, roxas ou laranjas (DE ALBUQUERQUE; SAMPAIO; DE SOUZA, 2019).

O tubérculo de batata-doce é bastante utilizado na alimentação humana, assim como a batata tradicional, devido ao seu alto valor energético e nutricional, tendo como vantagem a ausência de glicoalcalóides, podendo ser consumidas de

diversas formas, como cozida, frita, assada em forma de chips, tiras e palitos ou até mesmo ser utilizada como ingrediente em receitas culinárias. No entanto, existem poucos estudos disponíveis sobre as concentrações de acrilamida nesse alimento (LIM et al., 2014).

As cultivares de batata doce com maior desempenho produtivo segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) são as BRS Cuia, BRS Rubissol e BRS Beauregard (SILVA et al., 2014). Essas desempenham um papel fundamental no consumo alimentar dos brasileiros e, portanto, a investigação da presença de acrilamida nessas cultivares assume uma importância significativa para garantir a segurança alimentar e a qualidade dos produtos derivados da batata-doce.

3.3. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA

Durante o processamento dos alimentos, várias características sensoriais desejáveis, como aroma, cor, textura e sabor, são desenvolvidas, ao mesmo tempo em que agentes antinutricionais e algumas toxinas são inativadas (SAMTIYA; ALUKO; DHEWA, 2020). Como é o caso dos glicoalcalóides presente na batata tradicional crua, que devem ser minimizados por meio da cocção (MUSITA; OKOTH; ABONG, 2019).

Além disso, o processamento térmico adequado desempenha um papel crucial na inativação e morte dos microrganismos deteriorantes e patogênicos. Dentre os tratamentos térmicos mais empregados para o preparo dos alimentos estão a fritura, o cozimento em água e a vapor, a pasteurização, a esterilização e o assamento. Esses processos não apenas aprimora as qualidades sensoriais dos

alimentos, mas também garante sua segurança e qualidade para o consumo humano (MICHALAK et al., 2020; MOGOL; HAMZALIOĞLU; GÖKMEN, 2021).

No contexto das batatas (tradicional e doces), os métodos de cocção mais comumente utilizados são o cozimento em água, a fritura em óleo e o assamento. Esses dois últimos métodos favorecem a caramelização e a reação de Maillard (HABINSHUTI; MU; ZHANG, 2021; NAIK; WANG; SELOMULYA, 2022). Os produtos resultantes da reação de Maillard são os principais responsáveis pelas características sensoriais distintivas das batatas fritas e assadas e também pela formação da acrilamida (HABINSHUTI; MU; ZHANG, 2021).

Dentre os processamentos térmicos mencionados anteriormente a fritura em imersão em óleo apresenta um agravante que é a oxidação lipídica, esta é considerada o agente precursor para a segunda via de formação da acrilamida (CHAMPRESERT et al., 2021).

3.3.1. Fritura

A fritura é uma das técnicas de processamento mais utilizadas no mundo, esse procedimento normalmente envolve o cozimento dos alimentos em temperaturas elevadas acima do ponto de ebulição da água (entre 150 a 190 °C) por um curto período de tempo, utilizando normalmente óleo vegetal como principal meio de aquecimento, mas também pode ser utilizada técnicas como ar e vácuo, dentre outros (WANG et al., 2021; AĞÇAM, 2022).

Durante o processo de fritura a transferência de calor e massa ocorrem de forma simultânea, isto facilita a rápida desidratação do alimento, contribuindo para a ocorrência de reações como caramelização e Maillard, responsáveis por diversas modificações no produto, proporciona características sensoriais

desejáveis, como, sabor, cor, aroma e crocância (KOU et al., 2018; ZAGHI et al., 2019; WANG et al., 2021).

A fritura em óleo pode ser realizada de duas maneiras principais: fritura superficial ou fritura por imersão. O método de fritura superficial é comumente empregado para refogar alimentos. Por outro lado, o método de imersão é preferido para alimentos que requerem um tempo de cocção mais prolongado e uma maior maciez interna, como é o caso das batatas fritas, dos salgadinhos de festa e dos donuts, por exemplo (AĞÇAM, 2022).

O procedimento de imersão em óleo é um método muito popular, isso se deve a rapidez e facilidade do preparo, ao custo relativamente acessível do processo, e ao fato de que a técnica agrega características sensoriais desejáveis aos alimentos. No entanto, durante essa operação unitária, são gerados compostos resultantes do aquecimento do óleo e da interação das moléculas da matéria-prima, como dímeros e polímeros de ácidos graxos livres, e até mesmos compostos tóxicos e potencialmente carcinogênicos como o hidroximetilfurfural (HMF), o furfural e a acrilamida (ZAGHI et al., 2019; AĞÇAM, 2022).

Dentre os fatores que contribuem para o aumento da produção do hidroximetilfurfural (HMF), do furfural e da acrilamida, estão as altas temperaturas utilizadas, a redução da umidade proporcionada pelo processo, assim como a reutilização do óleo de fritura (ZAGHI et al., 2019; KUEK et al., 2020). Durante a reutilização do óleo também podem ser gerados compostos provenientes da oxidação lipídica como grupos carbonil, cetonas, ácido acrílico e aldeídos saturados altamente reativos como a acroleína. Estas substâncias podem reagir com a asparagina formando acrilamida e ainda mais acroleína por uma via

alternativa, sem necessariamente ter açúcares redutores no meio reacional (KUEK et al., 2020).

Portanto, os alimentos fritos propensos a formação de acrilamida, como é o caso das batatas podem apresentar níveis mais elevados dessa substância comparados com as demais técnicas de processamento, isso se deve a geração da acrilamida por duas vias, a via da reação de Maillard tradicional e a via de oxidação lipídica também conhecida como via da acroleína (KUEK et al., 2020; OU et al., 2020).

3.4. MÉTODOS DE MITIGAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Dentre os procedimentos amplamente empregados para reduzir a presença de acrilamida nos alimentos, destacam-se a seleção de variedades com baixos teores dos precursores dessa substância, bem como a aplicação de pré-tratamentos como o branqueamento, que atua diminuindo os níveis de açúcares redutores e asparagina por meio da lixiviação (KRISHNAKUMAR; VISVANATHAN, 2014). Além disso, estudos recentes indicaram que a acidificação da matriz alimentar antes do processamento desempenha um papel crucial na minimização da formação de acrilamida (BAŞARAN; TURK, 2021; HUANG et al., 2022; NAIK; WANG; SELOMULYA, 2022).

Técnicas emergentes, como a utilização de micro-ondas, ultrassom, irradiação, radiação infravermelha, campo pulsado, fluido supercrítico e até mesmo melhoramento genético também estão sendo pesquisadas nesse contexto. Além disso, a utilização da enzima L-asparaginase tem se destacado como uma abordagem promissora para mitigar a formação de acrilamida em

alimentos (NEMATOLLAHI; MOLLAKHALILI MEYBODI; MOUSAVI KHANEGHAH, 2021).

A L-asparaginase é uma enzima que hidrolisa a asparagina, impedindo sua interação com os açúcares redutores durante a reação de Maillard, prevenindo, assim, a formação da acrilamida. Uma das vantagens significativas do uso dessa enzima é que ela não interfere nas características sensoriais do alimento. Ao contrário de outros métodos de pré-tratamento que podem alterar o sabor, aroma ou textura da matriz alimentar, a aplicação da L-asparaginase oferece uma maneira eficaz de reduzir a acrilamida sem comprometer as qualidades sensoriais do produto final. Isso não apenas atende às expectativas dos consumidores, mas também garante a segurança do alimento (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

3.5. L-ASPARAGINASE E SEU CONTEXTO HISTÓRICO

A L-asparaginase é uma enzima amidohidrolase. Um dos primeiros registros dessa enzima remete ao início do século XIX , quando Delaville em 1802 encontrou uma molécula proteica em aspargos, que tinha a capacidade de realizar clivagem hidrolítica, gerando amônia. No entanto, esse primeiro relato não remetia diretamente à hidrólise da L-asparagina (CLEMENTI, 1922).

Em 1847, Bacon e seus colaboradores fizeram os primeiros ensaios com a molécula, descobrindo que ela tinha a capacidade de quebrar a asparagina em ácido aspártico e amônia (CLEMENTI, 1922), mas foi apenas em 1904 que Lang, um pesquisador alemão, avaliou a correlação da hidrólise da L-asparagina com a ação enzimática, durante seus estudos com constituintes do fígado bovino (PATEL et al., 2022).

Contudo, foi somente na década de 1960 que a L-asparaginase conquistou notoriedade, quando sua relevância terapêutica foi estabelecida. Experimentos anteriores conduzidos por Kill (1953), Neuman e McCoy (1956) demonstraram que a enzima era capaz de induzir a regressão do câncer do sistema linfático em cobaias (CLEMENTI, 1922; PATEL et al., 2022). Nos anos seguintes, esforços foram dedicados para identificar uma L-asparaginase com as mesmas propriedades antitumorais e que fosse viável para a produção em larga escala. Em 1964, Mashburn e Wriston descobriram uma L-asparaginase produzida por *E. coli* que atendia aos critérios de produção e atividade anticarcinogênica (LOCH; JASKOLSKI, 2021).

Em 1978, um marco significativo foi alcançado quando a agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) autorizou a primeira versão comercial da L-asparaginase. Atualmente, as formulações comerciais dessa enzima são amplamente reconhecidas como um dos medicamentos mais eficazes no tratamento das doenças malignas do sistema linfático como, a leucemia linfoblástica aguda, os linfomas, os linfossarcoma de Hodgkin e os melanossarcoma (SHRIVASTAVA et al., 2016; PATEL et al., 2022).

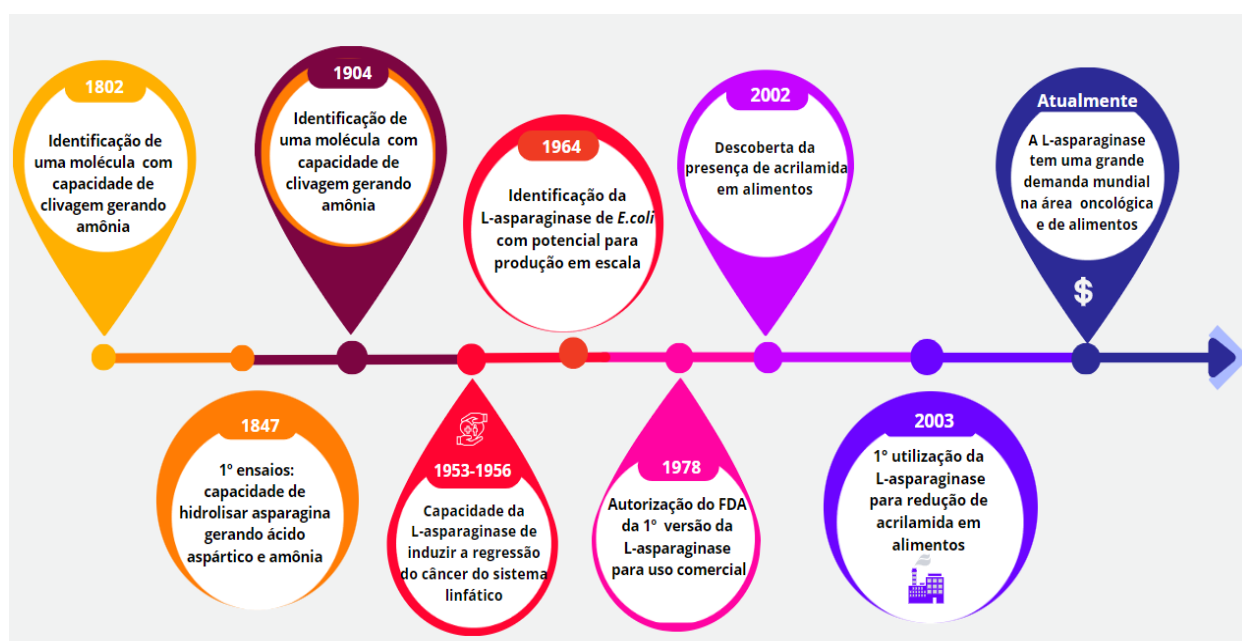
Além de seu impacto na área oncológica, a relevância da L-asparaginase se estende a outros setores, a enzima tem uma importância significativa na indústria alimentícia onde é utilizada na redução de acrilamida (LI et al., 2020).

O uso de uma abordagem enzimática para mitigar a via da formação da acrilamida em alimentos foi proposto inicialmente por Zyzak et al. (2003), que utilizaram a L-asparaginase para hidrolisar a asparagina em batatas fritas. A aplicação da enzima antes do processamento é considerada um dos métodos mais efetivos na redução da acrilamida podendo minimizar a formação dessa

substância em mais de 90%, tendo como vantagem a preservação das características sensoriais do produto alimentício (MOHAN et al., 2014; DARVISHI; FARAJI; SHAMSI, 2019). Esta enzima também vem sendo estudada, como antimicrobiano, assim como para a produção de biossensores capazes de detectar a L-asparagina (CHAND et al., 2020; NUNES et al., 2021; VIMAL; KUMAR, 2022).

Um resumo da linha do tempo do histórico da L-asparaginase pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2. Cronologia histórica da L-asparaginase



Fonte: Próprio autor

3.5.1. Características da L-asparaginase

A enzima L-asparaginase pode ser obtida de diferentes fontes, dentre elas: plantas, bactérias, fungos, algas e plasma de alguns animais. As L-asparaginases mais eficientes em termos de atividade catalítica são aquelas derivadas de microrganismos, como as produzidas por *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*

recentemente renomeada *Dickeya dadantii*, *Penicillium lilacinum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Shigella flexneri*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium culmorum*, dentre outros. Estas apresentam alta especificidade ao substrato e tempo de meia-vida prolongada, quando comparadas às L-asparaginases de outras fontes (SAJITHA et al., 2015; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016; VIMAL; KUMAR, 2017; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017). Além disso essas enzimas podem ser encontradas em diferentes conformações como na forma hexamérica, tetramérica, dimérica e monomérica (BATOOL et al., 2016; IZADPANAH QESHMI et al., 2018), no entanto, é pertinente ressaltar que a maioria das L-asparaginases de origem microbiana, com alta ação sobre a L-asparagina e cujas estruturas cristalinas estão claramente definidas, adota uma configuração tetramérica (LUBKOWSKI; WLODAWER, 2021).

A forma clássica de classificação dos integrantes da família das L-asparaginases é fundamentada em enzimas bem estabelecidas originárias de *E. coli*, sendo categorizadas em dois grupos principais: L-asparaginases do Tipo I e L-asparaginases do tipo II. As L-asparaginases Tipo I, conhecidas também como asparaginase-glutaminase, exibem afinidade tanto pela asparagina quanto pela glutamina, algumas demonstrando até uma preferência maior pela glutamina. Em contrapartida, a L-asparaginase Tipo II demonstra exclusivamente uma alta afinidade pela asparagina (SUN et al., 2016).

Além disso, existe uma relação notável entre o tipo de L-asparaginase e seu local de produção (intracelular ou extracelular). Na *E. coli* e em outros microrganismos, como a *S. cerevisiae*, a L-asparaginase Tipo I é uma enzima citosólica ou seja, intracelularmente produzida e expressa no citoplasma,

apresentando uma afinidade limitada pela L-asparagina. Em contrapartida, a enzima do tipo II apresenta alta especificidade para a L-asparagina e é produzida por esses microrganismos na região periplasmática (extracelular) quando submetidos a condições anaeróbicas (BATOOL et al., 2016; COSTA et al., 2016; LOCH; JASKOLSKI, 2021).

Outra questão importante a ser abordada é que, embora as sequências de aminoácidos das distintas fontes de L-asparaginases possam apresentar diferenças consideráveis, sua estrutura terciária permanece altamente preservada, assim como a arquitetura e a composição dos resíduos de aminoácidos dos seus sítios ativos, quando comparadas com os modelos cristalográficos bem estabelecidos das duas L-asparaginases provenientes de *E. coli* (LUBKOWSKI; WLODAWER, 2021).

3.5.2. Mecanismo de ação da L-asparaginase

A L-asparaginase, tem como função principal, catalisar a desaminação da asparagina em ácido aspártico e amônia (Figura 3). Seu mecanismo reacional mais aceito envolve duas etapas. Onde em um primeiro momento acontece a ativação do resíduo nucleofílico da enzima por uma base forte NH_2 , atuando no carbono da função amida do aminoácido L-asparagina, e produzindo um produto intermediário chamado de β -acil-enzima, dando início a segunda etapa da reação, onde normalmente uma molécula de H_2O (nucleófilo ativado) ataca o intermediário β -acil-enzima quebrando a ligação éster e convertendo a molécula em ácido L-aspártico e liberando amônia (CACHUMBA et al., 2016).

No contexto alimentar, a L-asparaginase desempenha um papel essencial na mitigação da formação de acrilamida. Quando aplicada antes do tratamento

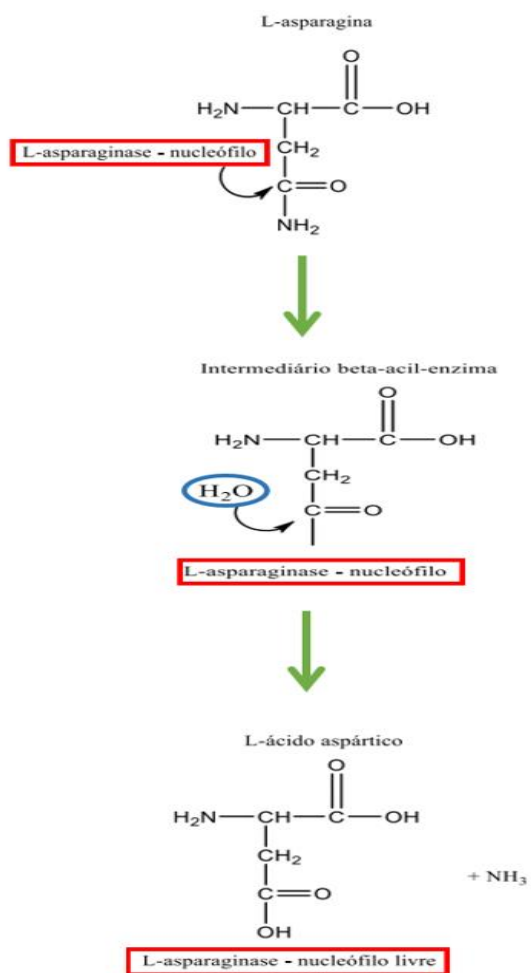
térmico, essa enzima atua sobre a L-asparagina, reduzindo substancialmente sua presença no alimento. Isso evita que a L-asparagina participe da reação de Maillard durante o processamento em altas temperaturas, na qual interage com os açúcares redutores e resulta na formação de acrilamida. A utilização da L-asparaginase não compromete a ocorrência da reação de Maillard nem a geração dos atributos sensoriais positivos no alimento, pois essa reação requer a presença de um aminoácido, não necessariamente a L-asparagina. Na ausência da L-asparagina, a reação ocorrerá por meio da utilização de outros aminoácidos presentes no sistema, sem que ocorra a formação de acrilamida (PARKER et al., 2012; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

No âmbito oncológico essa enzima também tem um papel importantíssimo. Quando administrada para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e de outros tipos de câncer, a L-asparaginase tem a ação de hidrolisar a L-asparagina presente no sangue e em tecidos circundantes, com o objetivo de reduzir drasticamente os níveis desse aminoácido no sistema. Isso resulta em um ambiente no qual as células carcinogênicas são privadas de obter a quantidade necessária de L-asparagina para sustentar seu crescimento e divisão celular, causando sua apoptose (COSTA et al., 2016).

Curiosamente, apenas as células doentes são sensíveis à L-asparaginase, pois a enzima L-asparagina sintetase está silenciada por mecanismos epigenéticos. Sua ausência faz com que as células malignas necessitem da L-asparagina exógena, proveniente do sangue e de tecidos saudáveis. Em contrapartida, as células normais possuem a L-asparagina sintetase ativa, cuja função é catalisar a transferência de um grupo amina para o ácido aspártico, resultando na formação de asparagina. Essa reação, durante o tratamento, age neutralizando os efeitos da L-

asparaginase, contribuindo, portanto, para a proteção das células saudáveis, justificando o sucesso do uso desta enzima como protocolo de tratamento para diferentes cânceres linfáticos (PASTORCZAK et al., 2014).

Figura 3. Mecanismo de ação da L-asparaginase



Fonte adaptada de Ulu; Ates (2017).

3.5.3. Estabilidade L-asparaginase

A estabilidade da L-asparaginase é uma preocupação em ambos os setores onde a enzima é empregada. Sua máxima funcionalidade está correlacionada ao equilíbrio entre as interações intramoleculares dos grupos funcionais e sua relação com o ambiente circundante, essas condições nem sempre são semelhantes às encontradas na sua fonte de origem. Essas modificações do meio podem levar a desnaturação da enzima provocando a perda

de sua atividade, sendo de suma relevância para que o uso da enzima seja bem-sucedido a compreensão das variáveis que interferem na estabilidade operacional da mesma (BEAUFILS et al., 2021).

Quando associados a indústria de alimentos a estabilidade da enzima desempenha um papel muito importante, especialmente quando se trata dos principais fatores como a temperatura, o pH, tempo e condições de armazenamento, íons metálicos, e a presença de compostos no alimento que podem inibir a enzima como a presença de outras enzimas e compostos fenólicos (FENG; KONG, 2022; JIA et al., 2021).

No entanto, vale mencionar que a estabilidade da L-asparaginase é crucial não apenas para a indústria alimentícia, mas também quando se trata da terapia oncológica. Nessa área a baixa estabilidade pode interferir na meia-vida plasmática da enzima, bem como na sua capacidade de resistir a variações de pH do organismo. Além disso, alguns pacientes enfrentam um desafio adicional devido a um mecanismo imunológico adverso que desestabiliza a enzima por meio de sua proteólise, resultando em uma inativação enzimática silenciosa, que pode causar a ineficácia do tratamento, assim como reações alérgicas e anafilaxia (COSTA et al., 2016).

Consequentemente, há um esforço contínuo para encontrar formas de melhorar a estabilidade da L-asparaginase, embora as fontes e conformações dessa enzima na natureza sejam muitas, nem todas têm uma eficiência considerável para a produção comercial, nem a resistentes à proteólise, sendo necessários procedimentos biotecnológicos para atingir as necessidades industriais desejadas (SUN et al., 2016; VIDYA et al., 2017).

Dentre os procedimentos para o melhoramento das enzimas estão as modificações químicas, manipulação genética e a utilização de enzimas de microrganismos eucarióticos e termófilos, além da imobilização enzimática. Esta, última, é uma técnica bastante utilizada para o melhoramento de algumas características do biocatalisador, como estabilidade operacional, faixas pH e temperatura de trabalho mais amplos e possibilidade de reutilização da enzima (RODRIGUES et al., 2013). Além disso, a imobilização também pode ser uma forma de proteger a enzima evitando as reações adversas do sistema imunológico (TALLURI et al., 2023).

3.6. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização é uma técnica amplamente empregada na tecnologia enzimática, e consiste basicamente no confinamento por ligação ou aprisionamento da enzima a uma matriz/suporte. Fundamentalmente, o procedimento de imobilização precisa permitir a interação entre a enzima e o substrato, e ao mesmo tempo possibilitar a reutilização do biocatalisador (CASTRO et al., 2008; MOHAMAD et al., 2015).

A técnica de imobilização é uma ferramenta importante para melhorar as propriedades catalíticas, protegendo a enzima de condições adversas como pH, temperatura e solventes orgânicos (DE ANDRADES et al., 2019). Além disso, a imobilização proporciona um melhor controle operacional, e uma otimização do processo biotecnológico, pois frequentemente permite a recuperação e reutilização da enzima com maior facilidade (CASTRO et al., 2008; MOHAMAD et al., 2015).

Dentre os fatores importantes para a eficiência da imobilização enzimática estão a seleção do suporte e a técnica utilizada para a imobilização, ambos os procedimentos têm forte influência nas propriedades resultantes (MONAJATI et al., 2018).

O suporte ideal deve preferencialmente ser biocompatível e apresentar grupamentos funcionais ativos, que se mantenham estáveis em condições reacionais. Além disso, deve apresentar baixo impedimento estérico, permitindo a interação eficaz entre os aminoácidos da enzima (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; CIESIELCZYK; JESIONOWSKI, 2019).

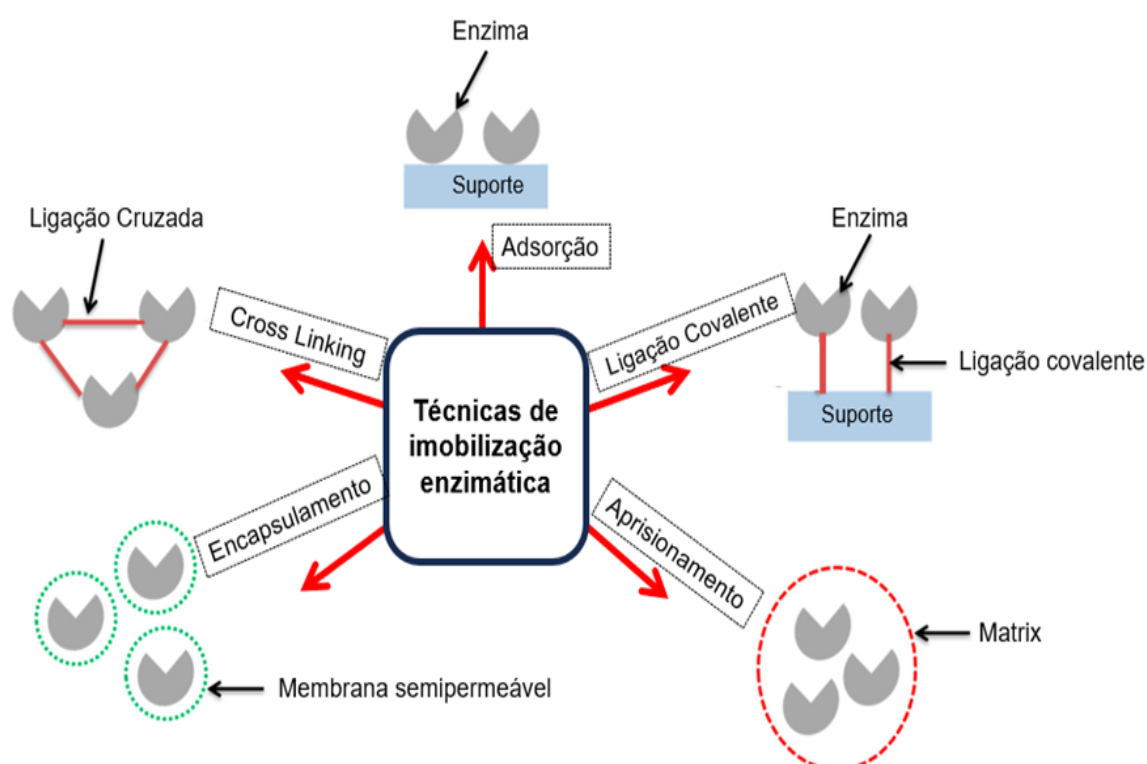
Outros aspectos essenciais a considerar na seleção do suporte incluem seu custo, disponibilidade, estabilidade frente a fatores térmicos, químicos e mecânicos, e reatividade em condições específicas. É fundamental que o suporte seja insolúvel nas condições da reação. Além disso, ele deve possuir características importantes, como ser inerte, contribuir com a capacidade de aumentar a atividade/especificidade da enzima e reduzir a inibição do produto. Essas considerações são importantes e colaboram para garantir o sucesso da imobilização, assim como para otimizar o desempenho da enzima no processo (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; CIESIELCZYK; JESIONOWSKI, 2019).

3.6.1 Técnicas de Imobilização Enzimática

Existem diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e a técnica utilizada. Apesar da grande diversidade de metodologias desenvolvidas, não há um método universal que seja aplicável a todas as enzimas conhecidas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

As principais metodologias de imobilização enzimática podem ser categorizadas em métodos físicos e métodos químicos. Dentre os métodos físicos as técnicas de adsorção e aprisionamento são amplamente utilizadas, já para os métodos químicos destacam-se as técnicas de ligação covalente e ligação cruzada (Figura 4) (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Figura 4. Principais métodos de imobilização enzimática



Fonte: Adaptada de Mokhtar et al. (2020).

3.6.1.1. Adsorção

A imobilização enzimática por adsorção ocorre através de interações fracas como forças de van der Waals, interações iônicas, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o suporte e a enzima o que normalmente não altera a estrutura nativa da proteína, favorecendo que os sítios ativos permaneçam

inalterados. Nessa técnica as enzimas são atraídas pelas forças intermoleculares entre a proteína e o material sólido sendo aderidas à superfície do suporte (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

No entanto, a metodologia de adsorção depende de fatores como tamanho da enzima, área superficial do adsorvente, porosidade, entre outros. Tendo como desvantagem a possibilidade de sofrer dessorção em ambientes desfavoráveis de pH, temperatura, concentração de substrato e força iônica, devido às ligações fracas envolvidas no processo de imobilização (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; LIU; CHEN; SHI, 2018; SINGH et al., 2018).

Em determinadas situações, a adsorção pode servir como uma etapa preliminar antes de outra forma de imobilização, como a ligação covalente. Uma imobilização inicial por adsorção viabiliza condições mais suaves para a imobilização posterior (BARBOSA et al., 2013).

3.6.1.2. Ligações covalentes

Um dos métodos mais eficientes para imobilização enzimática é a ligação covalente. Este procedimento estabelece ligações estáveis entre a enzima e a matriz transportadora, tornando-se uma estratégia adequada para realizar ligações multiponto (SINGH et al., 2018; BRAHAM et al., 2021).

A ligação covalente oferece vantagens como maior estabilidade e prevenção de vazamento de enzimas durante a sua utilização (BALCÃO et al., 2001; DA SILVA et al., 2019).

O método de imobilização por ligação covalente é escolhido normalmente quando se trabalha com enzimas que serão utilizadas em meio aquoso ou em circunstâncias que favorecem sua desnaturação, como temperatura e força iônica

elevada. Durante a imobilização covalente algumas distorções na estrutura da enzima ocorrem dando maior estabilidade ao biocatalisador e até mesmo aumentando sua atividade catalítica (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

No entanto, em determinados casos a ligação covalente pode ser uma desvantagem, dado que essa ligação pode afetar drasticamente a estrutura da enzima ao ponto de ela perder sua atividade (LYU et al., 2019).

Assim, em determinadas situações o tipo de funcionalização do carreador favorece a realização do processo em duas etapas, com objetivo de alcançar uma ligação covalente eficiente, utilizando condições de imobilização mais brandas. Isso envolve uma etapa inicial de adsorção física, seguida pela formação de ligações covalentes (BARBOSA et al., 2013).

3.6.1.3. Aprisionamento

O aprisionamento consiste na oclusão do biocatalisador em uma matriz semipermeável e isso pode ocorrer, por exemplo, através de encapsulamento ou por confinamento em redes poliméricas. No aprisionamento não há o bloqueio do sítio ativo, mantendo, assim, a conformação da enzima, o que garante uma boa atividade catalítica. A desvantagem desta técnica está na formação de barreiras difusionais que podem diminuir a interação entre a enzima e o substrato (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Dentre os suportes mais utilizados para a técnica de aprisionamento estão normalmente as redes poliméricas de baixo custo tendo como matriz a quitosana, alginato de cálcio, colágeno, gelatina, ágar, celulose entre outros (LIU; CHEN; SHI, 2018).

3.6.1.4. Ligação cruzada

A técnica de imobilização por ligação cruzada (*Cross-Linking*) ou copolimerização difere das demais técnicas pois esse método não utiliza nenhum suporte sólido para a imobilização, pois essa técnica consiste no acoplamento das enzimas umas às outras em múltiplos pontos através de reagentes bifuncionais para a formação de agregados reticulados (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; LIU; CHEN; SHI, 2018; SINGH et al., 2018). Desse modo as enzimas são ligadas por ligações covalentes, melhorando a estabilidade e a capacidade de reutilização. Uma das desvantagens dessa técnica é que a enzima pode perder a atividade catalítica durante o processo de reticulação, e por ter uma forma gelatinosa não pode ser aplicável a qualquer tipo de processo (SINGH et al., 2018).

3.5.2. Suportes para a imobilização enzimática

Nos últimos anos, os materiais empregados como carreadores na imobilização enzimática têm sido objeto de muita pesquisa, sendo de extrema importância, pois influenciam diretamente no êxito da imobilização e, por conseguinte, na melhor aplicabilidade das enzimas em diversas áreas, desde processos industriais até aplicações biomédicas e diagnósticas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021).

O carreador ideal para a imobilização enzimática deve ser economicamente viável e ecologicamente correto, minimizando o custo e o impacto ambiental do processo. Deve permitir a adição de grupos reativos, permanecer inerte após a imobilização e possuir resistência térmica e mecânica para operar em diversas condições. Além disso, precisa ser altamente estável e regenerável, também,

deve aumentar a especificidade da enzima, direcionando sua atividade para substrato e proteger a mesma contra os fatores adversos (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Dentre os materiais que apresentam as características desejáveis para a imobilização, estão os compostos inorgânicos e orgânicos como a sílica, o vidro, a celite, e o carvão ativado, as matrizes poliméricas como a quitosana, carragena, alginato, celulose, amido e agarose. Além disso, também há uma crescente tendência no uso de materiais nanoparticulados para essa finalidade (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021).

Uma das matrizes poliméricas que apresentam os atributos para a introdução de grupos reativos e que é facilmente funcionalizável é a agarose, sua biocompatibilidade e não toxicidade a tornam adequada para aplicações na indústria de alimentos e em sistemas biológicos. A estabilidade química e física da agarose em diversas condições de pH, temperatura e solventes garante a robustez da imobilização em diferentes ambientes de processo. Além disso, esse polissacarídeo possui uma estrutura porosa que pode ser controlada, permitindo a entrada adequada do substrato, ao mesmo tempo que mantém a integridade da enzima. Outra vantagem da agarose é sua ampla disponibilidade e custo acessível (DE ANDRADES et al., 2019; FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021).

Entre as infinitas possibilidades de modificação da agarose, a introdução de grupamento epóxi e amino merece destaque por conferir vantagens significativas para a imobilização enzimática (RODRIGUES et al., 2013).

Os grupos epóxi são altamente reativos e versáteis, permitindo a formação de ligações covalentes estáveis com grupos nucleofílicos da enzima, como aminas e tióis. Já os grupamentos amino adicionados interagem com grupos

carboxila, aldeído, epóxi e isocianato da enzima, formando múltiplas ligações covalentes. Essa ligação aumenta a estabilidade da imobilização e mantém os sítios ativos da enzima acessíveis, garantindo sua funcionalidade (MATEO et al., 2000, 2003; TORRES et al., 2003; YANG et al., 2018).

3.6.3. Imobilização de L-asparaginase

A L-asparaginase nativa é frequentemente imobilizada química ou fisicamente, normalmente envolta com vários tipos de polímeros solúveis ou insolúveis. Os suportes orgânicos naturais de fontes renováveis e sintéticos derivados do petróleo estão na vanguarda da imobilização da L-asparaginase. As matrizes naturais são de maior interesse devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de apresentarem uma maior afinidade com a enzima devido aos seus grupamentos amino e hidroxila possibilitando um melhor acoplamento (ULU; ATEs, 2017).

Ulu e Ates (2017) em sua revisão destacaram diversas formas de imobilização para a L-asparaginase utilizando métodos físicos, químicos e diferentes tipos de suporte (orgânicos, inorgânicos e híbridos). É importante ressaltar que a maioria desses estudos de imobilização da L-asparaginase está direcionada para o campo das ciências da saúde, onde essa enzima é utilizada para fins oncológicos (LI et al., 2020).

Quando utilizada para fins terapêuticos a imobilização da L-asparaginase tem a vantagem de estabilizar a enzima, aumentar a meia-vida plasmática, assim como reduzir os efeitos colaterais, minimizar a rejeição do organismo ao medicamento, evitando a perda da eficácia terapêutica durante o tratamento (TALLURI et al., 2023).

Por outro lado, a imobilização dessa enzima com o propósito de reduzir a formação de acrilamida na indústria de alimentos é uma área menos explorada. Isso se deve principalmente às características físicas dos alimentos onde a acrilamida é formada. Geralmente, essas matrizes alimentares são sólidas ou semi-sólidas, o que torna desafiador a aplicação da enzima em sua forma imobilizada. Nessa configuração, a enzima só consegue interagir com a L-asparagina presente nas regiões mais superficiais do alimento, reduzindo a eficácia na redução dos níveis de acrilamida (AGRAWAL et al., 2018).

No entanto, alguns poucos estudos realizados com a enzima imobilizada para aplicação em alimentos já foram realizados em sistema modelo (ALAM et al., 2018; LI et al., 2020), e até mesmo aplicando o imobilizado ao alimento (ALAM et al., 2021), demonstrando resultados interessantes na redução da acrilamida. A hipótese para a eficácia da enzima imobilizada na redução dessa substância está relacionada a dois fatores, o primeiro pode ser atribuído a uma imobilização na parte mais externa do suporte, em nanopartículas por exemplo, e a segunda está correlacionada à reação de Maillard, a qual é mais intensa na região mais externa do alimento. Com a aplicação da enzima imobilizada, ocorre uma redução da L-asparagina nessa região, contribuindo, conseqüentemente, para uma menor formação de acrilamida (ÇELIK; GÖKMEN, 2020; ALAM et al., 2021).

Dentre as matrizes já estudadas para a imobilização da L-asparaginase, Ulu e Ales (2017) relataram em sua revisão os seguintes suportes: albumina, alginato de cálcio e gelatina utilizando ligação cruzada; peptídeos de poli(dL-alanina), dextrana, ácido colomínico, gliceril agarose, agarose-glutaraldeído, levana de frutose, fibra da seda, sericina da seda, ácidos graxos, nylon, resina epóxi, carvão ativado, utilizando a técnica de ligação covalente; gel de sílica,

celite, fosfato tricálcico, quitosana, fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) por adsorção, poliacrilamida, nanopartículas magnéticas de hidrogel, poliimida de eritrócitos de polietilenoglicol (PEG) pelo método de aprisionamento, glóbulos vermelhos e poli(dextrana) L-arginina CaCO_3 por encapsulamento, além dos métodos de modificação química utilizando como carboximetilquitosana, sulfato de dextrona, albumina-PEG.

El-Refai et al. (2016) também estudaram diferentes técnicas e suportes para a imobilização de L-asparaginase de *Penicillium cyclopium*, os suportes e as técnicas utilizadas foram: ligação iônica empregando Amberlite IR-120, uma resina de troca catiônica, a segunda técnica que eles utilizaram foi adsorção física empregando alumina, álcool polivinílico e sílica gel, e a terceira técnica foi por ligação covalente utilizando quitosana e glutaraldeído. Dentre essas técnicas a que apresentou melhor eficiência foi a de ligação iônica utilizada Amberlite IR-120, já a menor eficiência foi detectada para o método de ligação covalente.

A L-asparaginase imobilizada em nanofolhas de óxido de grafeno funcionalizado com ácido aspártico por conjugação covalente demonstrou que esse material apresenta melhora na estabilidade térmica e ao pH da enzima comparada à enzima livre e imobilizada por adsorção física, demonstrando, assim, que esse procedimento de imobilização é promissor para a imobilização da L-asparaginase para uso industrial (MONAJATI et al., 2018).

Portanto, a imobilização apresenta uma importância significativa para manter as melhores condições industriais da enzima, como armazenamento, temperaturas críticas e resistência aos ambientes muito ácidos ou alcalinos. Esse aprimoramento na estabilidade é fundamental para uma aplicação industrial bem-sucedida (EL-REFAI et al., 2016; MONAJATI et al., 2018).

A imobilização da L-asparaginase, não apenas melhora os parâmetros de temperatura, pH e armazenamento, mas também aumenta consideravelmente a resistência à proteólise em comparação com a enzima nativa. Ademais, na área da oncologia, a imobilização desempenha um papel crucial ao prolongar o tempo de meia-vida plasmática da enzima, além de colaborar para a redução da alergenicidade (EL-REFAI et al., 2016; VARSHOSAZ; ANVARI, 2018).

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A L-asparaginase (Acrylaway® L e G) de *Aspergillus oryzae* foram gentilmente cedidas pela Novozyme (Bagsværd, Dinamarca); a L-asparagina, epicloridrina e etilenodiamina, Acrilamida-D3, PSA (Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing), albumina de soro bovino, bem como n-hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, CAS No. 110-54-3) e acetonitrila (CH_3CN , grau HPLC, $\geq 99,9\%$) foram adquiridas da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), as esferas Sepharose CL-4 eram da GE

Healthcare. A acrilamida (CAS No. 79-06-1 $\geq 99\%$) foi adquirida da Merck KGaA (Alemanha). Sulfato de magnésio seco P.A ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 98%), cristal de cloreto de sódio P.A. ACS (NaCl , 99%) e reagente de Nessler foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil). Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico.

4.2. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.2.1. Atividade enzimática

A atividade enzimática da L-asparaginase foi determinada pelo método colorimétrico de Nessler usando uma curva padrão de sulfato de amônio. Como descrito por Wang et al. (2008), o método consiste na reação da amônia (liberada durante a conversão da L-asparagina em ácido L-aspártico) com o reagente de Nessler (tetraiodomercurato de potássio (II)) produzindo uma cor amarela característica, que é determinada espectrofotometricamente em $\lambda 436 \text{ nm}$.

Para iniciar o procedimento, uma solução foi preparada combinando 1000 μL de água destilada, 900 μL de Tris-HCl 50 mM (pH 8,6), 100 μL de 189 mM L-asparagina e 100 μL de solução enzimática. Essa mistura foi mantida a 37°C com agitação por até 30 minutos. Em seguida, 100 μL de ácido tricloroacético 1,5 M foram adicionados para encerrar a reação. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi retirada e misturada com 4,3 mL de água destilada e 500 μL de reagente de Nessler. A quantidade de amônia liberada foi então medida a 436 nm em espectrofotômetro, e as amostras foram quantificadas usando uma curva padrão com diferentes concentrações de sulfato de amônio. A unidade de atividade enzimática (U) para L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto nas condições de reação.

4.2.2. Determinação da concentração de proteínas

A concentração proteica da enzima foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão para a construção da curva de calibração (0,125 mg. mL⁻¹ a 1,5 mg. mL⁻¹).

4.2.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_M e V_{max} , da L-asparaginase foram determinados medindo a atividade enzimática em diferentes concentrações do substrato L-asparagina (variando de 0,02 M a 0,5 M).

Os parâmetros foram calculados por regressão não linear da equação de Michaelis-Menten utilizando a *ferramenta solver Microsoft Excel 2019*.

4.2.4. pH e temperatura ótima da enzima L-asparaginase

A influência do pH na atividade enzimática da L-asparaginase foi avaliada em diferentes tecidos utilizando os seguintes tampões: pH acetato de sódio 0,1 M (4 e 5); 0,1 M de fosfato de sódio pH (7 e 8); Tris 0,1 M pH 8,6; e 0,1 M de pH carbonato de sódio (9 e 10). Para analisar a influência da temperatura na atividade enzimática, a enzima foi avaliada em relação à sua atividade catalítica, variando a temperatura de 25 a 65°C.

4.2.5. Estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da enzima, a L-asparaginase foi incubada por 1 h em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7) em diferentes temperaturas (de 25 a 65°C). Em seguida, a amostra contendo a enzima foi

imediatamente transferida para um banho de gelo para interromper a inativação. A atividade enzimática foi determinada como descrito acima e a atividade no tempo zero foi considerada a 100 %.

4.2.6. Estabilidade do pH

A estabilidade do pH foi obtida incubando-se a enzima por 1 h em diferentes soluções tampão 0,1M (tampão acetato de sódio pH 4 e 5; tampão fosfato de sódio pH 7 e 8; Tampão Tris pH 8,6 e tampão carbonato de sódio pH 9 e 10). Em seguida, uma alíquota foi utilizada para realizar a atividade enzimática. A atividade inicial antes da incubação foi considerada como 100 %.

4.3. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

4.3.1. Atividade enzimática

A atividade enzimática da L-asparaginase foi determinada pelo método colorimétrico de Nessler usando uma curva padrão de sulfato de amônio. Como descrito por Wang et al. (2008) , o método consiste na reação da amônia (liberada durante a conversão da L-asparagina em ácido L-aspártico) com o reagente de Nessler (tetraiodomercurato de potássio (II)) produzindo uma cor amarela característica, que é determinada espectrofotometricamente em $\lambda 436$ nm.

Para iniciar o procedimento, uma solução foi preparada combinando 1000 μ L de água destilada, 900 μ L de Tris-HCl 50 mM (pH 8,6), 100 μ L de 189 mM L-asparagina e 100 μ L de solução enzimática. Essa mistura foi mantida a 37°C com agitação por até 30 minutos. Em seguida, 100 μ L de ácido tricloroacético 1,5 M foram adicionados para encerrar a reação. Uma alíquota de 200 μ L do sobrenadante foi retirada e misturada com 4,3 mL de água destilada e 500 μ L de

reagente de Nessler. A quantidade de amônia liberada foi então medida a 436 nm em espectrofotômetro, e as amostras foram quantificadas usando uma curva padrão com diferentes concentrações de sulfato de amônio. A unidade de atividade enzimática (U) para L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de amônia por minuto nas condições de reação.

4.3.2. Determinação da concentração de proteínas

A concentração proteica do composto enzimático foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão para a construção da curva de calibração (0,125 mg. mL⁻¹ a 1,5 mg. mL⁻¹). (BRADFORD, 1976)

4.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, K_M e V_{max} , da L-asparaginase foram determinados medindo-se a atividade enzimática em diferentes concentrações do substrato L-asparagina (variando de 0,02 M a 0,5 M).

Os parâmetros foram calculados por regressão não linear da equação de Michaelis-Menten utilizando a *ferramenta solver Microsoft Excel* em 2019.

4.3.4. pH e temperatura óptima da enzima L-asparaginase

A influência do pH na atividade enzimática da L-asparaginase foi avaliada em diferentes tecidos utilizando os seguintes tampões: pH acetato de sódio 0,1 M (4 e 5); 0,1 M de fosfato de sódio pH (7 e 8); Tris 0,1 M pH 8,6; e 0,1 M de pH carbonato de sódio (9 e 10). Para analisar a influência da temperatura na atividade

enzimática, a enzima foi avaliada em relação à sua atividade catalítica, variando a temperatura de 25 a 65°C.

4.3.5. Estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da enzima, a L-asparaginase foi incubada por 1 h em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7) em diferentes temperaturas (de 25 a 65°C). Em seguida, a amostra contendo a enzima foi imediatamente transferida para um banho de gelo para interromper a inativação. A atividade enzimática foi determinada como descrito acima e a atividade no tempo zero foi considerada a 100 %.

4.3.6. Estabilidade do pH

A estabilidade do pH foi obtida incubando-se a enzima por 1 h em diferentes soluções tampão 0,1M (tampão acetato de sódio pH 4 e 5; tampão fosfato de sódio pH 7 e 8; Tampão Tris pH 8,6 e tampão carbonato de sódio pH 9 e 10). Em seguida, uma alíquota foi utilizada para realizar a atividade enzimática. A atividade inicial antes da incubação foi considerada como 100 %.

4.4. AMOSTRAS

As batatas-doces (*Ipomoea batatas* L.) cultivares Cuia, Rubissol e Beauregard, bem como a batata tradicional (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Ágata, foram adquiridas de um único produtor e do mesmo lote, na feira agroecológica de produtos orgânicos de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

As batatas foram selecionadas, higienizadas, descascadas, cortadas em formato de palitos (6 cm de comprimento x 0,8 cm de largura x 0,8 cm de espessura), com auxílio de um cortador de legumes. Posteriormente, foram

divididas em porções de 70 g e armazenados em freezer doméstico a -18 ± 2 °C. Antes de cada análise, as amostras foram aclimatadas por 15 min.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS BATATAS

4.5.1. Determinação da umidade

O teor de umidade (método 925.20) foi determinado de acordo com metodologias propostas pela *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2005).

4.5.2. Determinação da atividade de água (aw)

A atividade de água foi realizada utilizando o equipamento LabMASTER-aw© (Novasina AG, Suíça) a 25 °C.

4.5.3. Determinação dos açúcares redutores

O método espectrofotométrico baseado na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959), foi utilizado para determinar o teor de açúcares redutores de batata-doce e batata tradicional. A curva padrão foi feita com glicose e a absorbância foi lida em 540 nm.

4.5.4. Determinação da L-asparagina

O conteúdo de asparagina das amostras foi analisado usando um kit enzimático de determinação de L-asparagina da Megazyme® (L-asparagina/ L-glutamina/ amônia - rápida).

Para o preparo da amostra, 2 g de batatas trituradas e homogeneizadas foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, foram

adicionados 60 mL de água destilada e a amostra foi incubada a 60 °C por 8 min. Após a incubação, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e o volume do frasco foi completado com água ultrapura. A solução foi filtrada, descartando-se os primeiros 5 mL de filtrado, e o restante foi utilizado para o ensaio.

Resumidamente, 0,10 mL dos filtrados foram combinados com 0,20 mL de tampão azida sódica (0,02% p/v, pH 4,9) e 0,02 mL de glutaminase. Após incubação por 5 min à temperatura ambiente, foram adicionados 1,5 mL de água ultrapura, 0,3 mL de tampão azida de sódio 2-oxoglutarato (0,02% p/v, pH 8) e 0,2 mL de NADPH. As preparações foram homogeneizadas, e a absorbância foi medida a 340 nm após 5 min. Em seguida, 0,02 mL de glutamato desidrogenase foi adicionado, uma segunda leitura foi realizada após 5 min. Finalmente, 0,02 mL de asparaginase foi adicionado às amostras e, após 5 min, as preparações foram lidas novamente no mesmo comprimento de onda. O experimento foi conduzido em triplicata para cada amostra de batata.

4.5.5. Análise de cores

A determinação dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foi avaliada para diferentes cultivares de batata-doce e batata-doce tradicional com e sem tratamento enzimático antes e após o processamento térmico. Os parâmetros de cor foram medidos usando um colorímetro (Delta color®, Brasil).

Onde:

L^* = Luminosidade ($L^* = 0$ preto; $L^* = 100$ brancos).

a^* = coordenada vermelho/verde ($+a^*$ indica vermelho e $-a^*$ indica verde)

b^* = coordenada amarelo/azul ($+b^*$ indica amarelo e $-b^*$ indica azul).

ΔE = Diferença de cor entre os tratamentos

$$\Delta E = \sqrt{((L_2^* - L_1^*)^2 + (a_2^* - a_1^*)^2 + (b_2^* - b_1^*)^2)}$$

4.6. TRATAMENTO ENZIMÁTICO

O tratamento enzimático das batatas foi realizado incubando-se 70 g de batata de cada tipo de batata em 200 mL de solução tampão (Tris 0,1 M; pH 8,6) contendo L-asparaginase. Cinco diferentes concentrações enzimáticas foram previamente testadas (50 U. mL⁻¹, 250 U. mL⁻¹, 500 U. mL⁻¹, 1000 U. mL⁻¹, 1500 U. mL⁻¹) por 1 h a 45 °C. A concentração de L-asparaginase que apresentou menor área absoluta foi selecionada para a realização das análises subsequentes visando à redução da acrilamida nas diferentes cultivares de batata.

4.7. TRATAMENTO TÉRMICO

O método de fritura por imersão em óleo de soja comercial foi realizado em uma fritadeira elétrica doméstica com bandeja gotejante (Philco® modelo *Deep Fry*, Brasil), a 180 °C por 5 min. Para cada nova fritura, o nível de óleo foi corrigido para o nível máximo da fritadeira (1,8 L).

4.8. ÍNDICE DO PERÓXIDO DO ÓLEO

O índice de peróxido do óleo foi avaliado por 8 ciclos de fritura consecutivos e determinado por titulação de iodo com tiosulfato (AOAC, 2005). Para isso, 5 g de amostra de óleo foram coletados em triplicata após cada ciclo de fritura. As amostras foram completamente dissolvidas com uma mistura de 25 mL de clorofórmio e ácido acético glacial (2:3) e 1 mL de KI saturado foi adicionado à

solução. O frasco foi levemente agitado e armazenado no escuro por 5 min. Após esse período, 75 mL de água deionizada foi adicionada à solução. A titulação foi realizada com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, com agitação constante, até que a cor amarela quase desaparecesse. Em seguida, 0,5 mL de solução indicadora de amido foi adicionada, e a titulação continuou até que a coloração azul desaparecesse completamente.

4.9. QUANTIFICAÇÃO DA ACRILAMIDA

4.9.1. Método de extração

A extração da acrilamida gerada durante o processamento térmico das amostras estudadas (batata-doce e batata tradicional) foi realizada pelo método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*). Este método foi originalmente desenvolvido para extração de pesticidas e posteriormente adaptado por Mastovska e Lehotay (2006) e por Al-TaHER (2012) para extração de acrilamida.

Para a extrair a acrilamida das amostras após a fritura as batatas foram liofilizadas e, em seguida, trituradas e homogeneizadas. Alíquotas de 1g foram transferidas para tubos centrífugos de 50 mL para curva padrão e determinação da acrilamida.

Na primeira etapa da extração, foram adicionados 350 μ L do padrão D3 de acrilamida interna (1 ng. mL^{-1}), seguido da adição de diferentes concentrações do padrão de acrilamida ($0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$), para gerar a curva de calibração, abrangendo concentrações de acrilamida variando de 50 a $750 \mu\text{g. Kg}^{-1}$. Após essa etapa, 5 mL de hexano, 10 mL de água ultrapura (MilliQ), 10 mL de acetonitrila, 4,6 g de $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de NaCl foram adicionados aos tubos. Em seguida, os tubos

foram agitados vigorosamente em um vórtex por 1 min e, posteriormente, centrifugados por 5 minutos a uma força de 2422 g.

Em seguida, a fase contendo hexano foi removida e 1 mL de alíquota da fase acetonitrila foi transferido para um microtubo de 2 mL contendo 50 mg de PSA e 172 mg de $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$. O extrato foi homogeneizado por 30 s e centrifugado a 2,422 g por 1 min. Uma alíquota de 500 μL do sobrenadante foi transferida para um frasco para análise de UPLC-MS/MS.

4.9.2. Análise UPLC/MS-MS

A análise da acrilamida foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu® ionização por electrospray (ESI) (UPLC-MS/MS) (LCMS 8045). O equipamento utilizado é um modelo híbrido com analisadores quadrupolo e TOF (*time of flight*).

A separação analítica da acrilamida foi realizada utilizando uma coluna de dimensões GISS C18 Shim-pack (2,1 mm x 100 mm; 1,9 μm). A temperatura do forno foi mantida em 40 °C, com limite máximo de temperatura de 85 °C. Para a fase móvel, foram utilizadas duas soluções. A solução (A) consistiu de água ultrapura (miliQ) acidificada com 0,1% de ácido fórmico. A solução (B), por sua vez, foi composta de metanol a 1% com ácido fórmico a 0,1%. O método de eluição utilizado foi o gradiente, com variação da proporção da solução B de acordo com o tempo de análise, onde o gradiente foi aplicado da seguinte forma: no início, liberava-se 1% da solução B (0 a 2 min), seguido de aumento para 80% (4 a 4,5 min) e, por fim, redução para 1% (5 a 15 min). Com fluxo de 0,2 mL. min⁻¹.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software TIBCO Statistica® (versão 13.5) onde foram realizados a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (5% de significância).

6. CAPÍTULO IV - ENHANCING BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF L-ASPARAGINASE: IMMOBILIZATION ON AMINOEPOXY- AGAROSE FOR IMPROVED CATALYTIC EFFICIENCY AND STABILITY

Neste capítulo, a imobilização da enzima L-asparaginase em suportes de epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose foi investigada avaliando as melhores condições de imobilização, com o objetivo de alcançar a máxima eficiência e estabilidade da enzima imobilizada. Foram conduzidas análises detalhadas das propriedades catalíticas da enzima imobilizada, abrangendo sua estabilidade térmica, resistência a variações de pH e capacidade de armazenamento, entre outros aspectos. Os resultados completos deste estudo estão apresentados no manuscrito a seguir, publicado no periódico *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.52, p.1-11.

Enhancing Biotechnological Applications of L-Asparaginase: Immobilization on Amino-Epoxy-Agarose for Improved Catalytic Efficiency and Stability

Denise W. de Melo¹, Roberto Fernandez-Lafuente², Rafael C. Rodrigues^{1,*}

¹Biocatalysis and Enzyme Technology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Ave, P. O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

²Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC Madrid, Spain.

*Corresponding author: Rafael Costa Rodrigues

E-mail address: rafaelcrodrigues@ufrgs.br

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102821>

Enhancing Biotechnological Applications of L-Asparaginase: Immobilization on Amino-Epoxy-Agarose for Improved Catalytic Efficiency and Stability

ABSTRACT

L-asparaginase has been shown to be effective in reducing acrylamide formation in food and in treating certain cancers, such as acute lymphoblastic leukemia. This study aimed to improve the application of L-asparaginase in these areas, through its immobilization in two distinct supports: epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose. Different immobilization conditions were investigated, including immobilization pH and buffer concentration. The best activity results were obtained employing amino-epoxy-agarose, being the 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10 the conditions that offered the highest immobilization yield (76%), immobilization efficiency (89.8%) and relative activity (68.2%). Immobilization of L-asparaginase in amino-epoxy-agarose improved its catalytic efficiency and stability, including at pH 4 and 60 °C. All immobilized biocatalysts preserved more than 70% of their activity after 7 cycles of reuse, and maintained about 82% of their activity after 60 days of storage at 4°C. These results show the efficacy of immobilized biocatalysts in the preservation of enzymatic activity and highlight their potential for biotechnological applications.

Keywords: L-asparaginase, enzyme immobilization, epoxy-agarose, amino-epoxy-agarose, acrylamide reduction

1. Introduction

L-asparaginase is the enzyme utilized for reducing acrylamide levels in foods. This compound is a carcinogenic, genotoxic and neurotoxic substance that can be found in foods that are rich in reducing sugars and the amino acid asparagine, when they are subjected to thermal processing above 120 °C (due to the produced Maillard reaction). When applied to the food matrix before thermal processing, the L-asparaginase acts by hydrolyzing asparagine into aspartic acid and ammonia, decreasing the asparagine amount in the system and consequently mitigating the formation of acrylamide. It also offers the advantage of preserving the nutritional and sensory characteristics of the treated products (Corrêa et al., 2021; Xu et al., 2016). In addition to its use for acrylamide mitigation, the enzyme has been used in asparagine biosensors (KUMAR; KATARIA; VERMA, 2013; NUNES et al., 2021).

L-asparaginase finds applications not only in the food industry but also in medicine, where its antitumor capacity is utilized to treat certain types of cancers including acute lymphoblastic leukemia and lymphosarcoma. Tumor cells exhibit a high dependency on the amino acid asparagine for their rapid proliferation. By employing the enzyme, asparagine is enzymatically degraded, resulting in a reduction of this crucial amino acid in the system. This depletion of asparagine leads to apoptosis of the cancer cells and disrupts their growth cycle (CECCONELLO et al., 2020; NUNES et al., 2021).

Despite its therapeutic effect, the use of L-asparaginase in medicine has some disadvantages, such as: increased hypersensitivity, allergic reactions, silent inactivation due to the formation of anti-asparaginase antibodies, and a short serum half-life. This is partly due to its microbiological origin and its high immune

responsiveness (CECCONELLO et al., 2020; FEENSTRA et al., 2022). Aiming to minimize the adverse effects caused by the use of this biocatalyst, several alternatives have been adopted in recent years, among them, the use of L-asparaginase from other sources, the genetic improvement by protein engineering, and the enzyme immobilization (CECCONELLO et al., 2020; FONSECA et al., 2021).

Enzyme immobilization is a technique that has been widely used to improve the catalytic properties and stability of proteins. In addition, it enables the reuse of enzymes in several cycles, making it highly advantageous for industrial applications (GARCIA-GALAN et al., 2011). It consists essentially in the confinement or entrapment of the enzyme into a matrix/support, protecting the biocatalyst from denaturing agents, thus maintaining its operational stability and allowing its separation and reuse (MOHAMAD et al., 2015). Also, the immobilization can offer several benefits, including the reduction of allergic reactions, enhancement of enzyme stability by different causes (RODRIGUES et al., 2021), and protection against proteases and other external agents (MATEO et al., 2007; NOMA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021). Additionally, immobilization expands range of conditions where the enzyme can be utilized because it can increase the enzyme rigidity or just by preventing its aggregation (MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2021). Enzyme immobilization can also alter enzyme selectivity or specificity (GARCIA-GALAN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013b), reduce inhibitions (MATEO et al., 2007), or be coupled to the enzyme purification (BARBOSA et al., 2015). To reach these benefits, the immobilization must be correctly performed, including the support and active group and the immobilization protocol (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE,

2022). Furthermore, the advantages of immobilized L-asparaginase application extends to biosensors and contributes to the improvement of catalytic properties in the food and pharmaceutical sectors (NUNES et al., 2021; XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022).

In the food industry, the application of immobilized L-asparaginase encounters certain difficulties, particularly when dealing with solid or semi-solid food products in which acrylamide formation occurs. Examples of such products include potatoes, coffee, bakery and confectionery products. The nature of these foods makes it challenging for the immobilized enzyme to effectively interact with the substrate within the internal regions of the food matrix and the final biocatalysts recovery (ANDLER; GODDARD, 2018; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016c).

Although the immobilized L-asparaginases presents some obstacles, studies have already been conducted in a model system (ALAM et al., 2018; LI et al., 2020), and even applying the immobilized enzyme to food (ALAM et al., 2021), showing positive results. This is probably because acrylamide is formed in larger amounts in the outside layer of the food where the Maillard reaction is more intense, due to the rapid drying and temperature increase during cooking (ÇELİK; GÖKMEN, 2020).

Therefore, L-asparaginase in its immobilized form may be a promising alternative for application in food. To date, L-asparaginase has been immobilized, primarily for application in the health area using various protocols and supports from chitosan and alginate, to nanoflowers and multi-walled carbon nanotubes (ATES et al., 2018; BAHRAMAN; ALEMZADEH, 2017; BALCÃO et al., 2001; BALCAO et al., 2001; ULU; ATES, 2017).

The selection of an appropriate carrier matrix and the methods employed in the immobilization process are crucial factors for the successful immobilization of enzymes (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022). These procedures have a significant impact on the resulting properties of the immobilized enzyme. In the case of multimeric enzymes like L-asparaginase from *A. oryzae*, the challenge is even greater, as the immobilization process must be carefully designed to preserve the complex structure of the enzyme, preventing its dissociation during operation (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009), and ensure proper interaction between its subunits. It is essential to avoid any structural alterations that could potentially impact enzyme activity (CESPUGLI et al., 2018; MONAJATI et al., 2018b).

One of the most efficient methods for enzyme immobilization is covalent bonding. This procedure establishes strong bonds between the enzyme and the carrier matrix, making it a suitable strategy for immobilizing L-asparaginase. Covalent bonding offers advantages such as improved stability and prevention of enzyme leakage during use (BALCAO et al., 2001; DA SILVA et al., 2019). In some cases, a two-stage process is required for efficient covalent bonding, where initial physical adsorption is followed by the formation of covalent bonds, as occurred with some heterofunctional supports (BARBOSA et al., 2013).

Additionally, the presence of reactive groups on the support is crucial for interaction with nucleophilic groups on the surface of the enzyme, such as amino acids and carboxylic acids (DA SILVA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2021; YANG et al., 2018).

In this sense, polysaccharides such as agarose (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016), alginate (ZHANG et al., 2022a), and chitosan (QIU

et al., 2021) are commonly employed for immobilization purposes. Also, these materials are easy to crosslink and functionalize. Moreover, they are readily available in nature (BILAL; IQBAL, 2019). Agarose presents itself as an intriguing choice for the immobilization of L-asparaginase due to its excellent resistance to microbiological degradation, high porosity, inertness, safety, and strong hydrophilicity (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

However, despite these favorable characteristics, it is often necessary to crosslink agarose to enhance its resistance to chemical, physical, and mechanical disruption. Crosslinking serves as an effective means to increase the rigidity of agarose without compromising its porosity. Some functional agents such as epichlorohydrin, divinylsulfone, and bis-oxiranes are recognized as reliable chemical crosslinkers for agarose (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Among them, epichlorohydrin contains a highly reactive halogen end, and when added to agarose allows the insertion of epoxy groups into it through interaction with hydroxyls, resulting in stable bonds (SMITH et al., 2020). The introduction of epoxy groups enables multipoint immobilization. However, the effectiveness of immobilization is constrained by the inherent properties of the enzyme, as there is low intermolecular reactivity between the epoxy groups and the primary amino groups on the protein surface (MATEO et al., 2000; YANG et al., 2018).

Therefore, in certain instances, the modification of the epoxy-agarose support is necessary to enhance the enzyme immobilization. A promising approach for this modification involves the incorporation of amino groups onto the support using ethylenediamine. These additional groups provide the support with

an ion exchange capacity that permits the first enzyme immobilization (MATEO et al., 2003; TORRES et al., 2003; YANG et al., 2018). So far, several studies have been conducted on the immobilization of enzymes using epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose supports. For example, Da Silva et al. (2019) co-immobilized dextransucrase and dextranase on epoxy-agarose, achieving a recovered activity of 59.54%. De Andrades et al. (2019b) immobilized β -glucosidases on the same support but obtained a low immobilization yield of only 4%. Zhang et al. (2020) and Yang et al. (2018) utilized amino-epoxy-agarose supports and achieved high immobilization efficiencies of 88% and 90%, respectively, for recombinant protein A.

In the context of L-asparaginase, the immobilization on epoxy agarose and amino-epoxy-agarose supports remains relatively unexplored. This indicates that the use of these supports for L-asparaginase immobilization represents an emerging research area with the potential for significant advancements in leukemia treatment, acrylamide reduction, and biosensor development. Based on these considerations, our study aimed to immobilize L-asparaginase on both epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose supports. We investigated the optimization of immobilization conditions and analyzed the catalytic properties of the immobilized enzyme, including thermal stability, pH stability, and storage stability. Additionally, we evaluated the pH and optimal temperature for enzymatic activity.

2. Material and Methods

2.1. Material

The L-asparaginase (Acrylaway® L) of *Aspergillus oryzae* was kindly provided by Novozyme (Bagsværd, Denmark); L-asparagine, epichlorohydrin, and

ethylenediamine were acquired from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA), Sepharose CL-4 beads were from GE Healthcare. All other reagents used were of analytical grade.

All experiments were conducted in triplicate, and the data are presented as mean values and standard deviation.

2.2. Enzyme activity

The enzyme activity of L-asparaginase was determined by Nessler's colorimetric method, as described by Wang et al. (2008). It consists of the reaction of ammonia (released during the conversion of L-asparagine to L-aspartic acid) with Nessler reagent (potassium tetraiodomercurate (II)).

Initially, 1000 μL of distilled water; 900 μL of 50 mM Tris (pH 8.6); 100 μL of 189 mM L-asparagine, and 100 μL of enzyme solution or approximately 20 mg of immobilized enzyme were mixed and placed at 37°C under stirring for up to 30 min. At the end, 100 μL of 1.5 M trichloroacetic acid was used to stop the reaction. After that, 200 μL of the supernatant was sampled and added to 4.3 mL of distilled water and 500 μL of Nessler's reagent. The ammonia released was then measured in a spectrophotometer at 436 nm. A standard curve with different concentrations of ammonium sulfate was used to quantify the samples. One unit of enzyme activity (U) of L-asparaginase was considered as the amount of enzyme required to release 1 μmol of ammonia per minute under the assay conditions.

2.3 Protein concentration

The protein analysis was performed by the Bradford method (BRADFORD, 1976). A calibration curve with different concentrations of BSA (bovine serum

albumin) ranging from 0.125 mg. mL⁻¹ to 1.5 mg. mL⁻¹ was used to determine the protein concentration.

2.4. Preparation of the epoxy-agarose and modified epoxy-agarose supports.

The epoxy-agarose support was prepared as described by Da Silva et al. (2019) and De Andrades (2019b) with some modifications. In this method, the primary hydroxyl groups present in agarose react with epichlorohydrin to form the epoxy-agarose support. Briefly, 10 g of agarose, previously washed with water and vacuum dried, was added to 100 mL of 2 M NaOH under stirring in an ice bath, followed by the addition of 0.6 g of NaBH₄. Subsequently, 5 mL of epichlorohydrin was added dropwise to avoid increasing the temperature of the system. The suspension was stirred gently in an open container for 16 h at room temperature to allow the formed H₂ to be released. After this period, the support was washed thoroughly with distilled water until neutral pH and filtered.

For the epoxy-agarose support modification with amino groups, the 10 g of epoxy-agarose, prepared as described above, was mixed to 40 mL of 2% ethylenediamine. The suspension was maintained in agitation for up to 2 h, washed with distilled water again thoroughly and vacuum filtered (MATEO et al., 2000).

2.5. Enzyme immobilization

The L-asparaginase enzyme was immobilized using the prepared supports in a relation of 1:10 m: v to the enzyme solution (6.7 mg protein. mL⁻¹) diluted in the immobilization buffer. Different conditions for L-asparaginase immobilization on epoxy agarose and amino-epoxy-agarose supports were investigated, including

varying molarities and pH values. These conditions included 0.1 M, 0.5 M, and 1.0 M sodium phosphate buffer at pH 7.0, as well as 0.1 M sodium carbonate buffer at pH 10. The enzyme/support suspensions were gently shaken at room temperature for up to 72 h. Following this, the supernatant was removed, and the support containing the enzyme was washed with the corresponding immobilization buffer to eliminate any potential residues of non-immobilized enzyme until no activity was detected in the washed fractions. Samples containing free enzyme and the corresponding buffer were used as control and submitted to the same immobilization conditions. The immobilization parameters recovered activity (RA), immobilization yield (IY), and immobilization efficiency (EI) were calculated according to equations (1, 2, and 3) described by Sheldon and Pelt (2013).

$$RA (\%) = \frac{\text{Biocatalytic activity (U)}}{\text{Initial activity (U)}} \times 100 \quad (1)$$

$$IY (\%) = \frac{\text{Biocatalytic activity (U)}}{\text{Immobilized activity (U)}} \times 100 \quad (2)$$

$$IE (\%) = \frac{\text{Immobilized activity (U)}}{\text{Initial activity (U)}} \times 100 \quad (3)$$

2.6 Effect of pH and temperature on the enzyme activity

The influence of pH on the enzymatic activity of free and immobilized L-asparaginase was evaluated by replacing the assay buffer in the protocol described before. The following buffers were used: 0.1 M sodium acetate pH (4 and 5); 0.1 M sodium phosphate pH (7 and 8); 0.1 M Tris pH 8.6; and 0.1 M sodium carbonate pH (9 and 10).

To analyze the influence of temperature on enzymatic activity of free and immobilized L-asparaginase the enzyme activity was measured at the following temperatures: 30 °C; 35 °C; 40 °C; 45 °C; 50 °C; 55 °C and 60 °C.

2.7 Effect of pH on the enzyme stability

The pH stability was performed by incubating the enzymes (free and immobilized) for 1 h in different 0.1M buffer solutions (sodium acetate buffer pH 4 and 5; sodium phosphate buffer pH 7 and 8; Tris-HCl buffer pH 8.6 and sodium carbonate buffer pH 9 and 10). Afterward, a sample was collected, and the enzyme activity was measured. The initial activity prior to incubation was considered as 100%.

2.8 Thermal stability

For the thermal stability procedure, L-asparaginase (free and immobilized) was incubated for 1 h in sodium phosphate buffer solution (0.1 M pH 8) at 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, and 60 °C. Afterward, a sample was collected, and the enzyme activity was measured. The initial activity prior to incubation was considered as 100%.

For the temperature of 60 °C, the inactivation curve was followed by collecting aliquots every 5 min from the sample incubated in sodium phosphate buffer (0.1 M pH 8).

2.9 Storage stability

The storage stability at 4 °C of biocatalysts immobilized were evaluated for 2 months, the analyses were performed every 10 days. The activity of the immobilized enzymes on the first day was considered 100%.

2.10 Kinetic parameters

The kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation were determined by measuring the enzyme activity for free and immobilized enzymes at different concentrations of the substrate L-asparagine (ranging from 0.02 M to 0.5 M).

The parameters were calculated by nonlinear regression of the Michaelis-Menten equation using the Solver tool in Microsoft Excel 2019 software.

2.11 Operational stability

The operational stability of biocatalysts immobilized in amino-epoxy-agarose was evaluated through activity assays. After each cycle, the samples were centrifuged at 5000 g for 2 minutes, and the reaction was interrupted by the removal of the substrate. The biocatalysts were then resuspended in a fresh substrate solution to start the next cycle. 7 cycles of operational stability were performed, with triplicates in each test. The residual activity was calculated taking the enzymatic activity of the first cycle as a reference, corresponding to 100%.

3. Results and Discussion

3.1 Enzyme immobilization

Initially, L-asparaginase immobilization on epoxy-agarose support was attempted under various conditions, and the results are presented in Table 1. However, effective immobilization of L-asparaginase on epoxy-agarose was not achieved. These results can be attributed to the low intermolecular reactivity between the epoxy groups present in the matrix and the amino groups on the enzyme surface. The epoxy-agarose support is highly hydrophilic, and inert, making complex the first enzyme adsorption. This very low hydrophobic interaction

may result in reduced immobilization efficiency and yield (BOLIVAR et al., 2009; DE ANDRADES et al., 2019b; ZHANG et al., 2020).

In order to improve the immobilization of L-asparaginase in the support, the epoxy-agarose support was modified with ethylenediamine, producing an heterofunctional support, amino-epoxy-agarose. This procedure resulted in the increase of amino groups in the matrix, which favored the fixation of the enzyme in milder conditions. This improvement is due to the rapid initial interaction by adsorption of the amino groups, followed by the subsequent formation of multipoint covalent bonds of the epoxy groups (MATEO et al., 2003).

Immobilization of L-asparaginase in epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose beads was investigated under four different immobilization conditions, varying molarity and pH. Sodium phosphate buffer pH 7 in different molarities (0.1, 0.5 and 1.0 M) and sodium carbonate buffer 0.1 M pH 10 were used. The results obtained showed that the immobilization on amino-epoxy-agarose support resulted in significantly higher immobilization yields compared to epoxy-agarose, enabling the use of milder conditions such as 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 7 and shorter immobilization times. It is worth noting that immobilization on the epoxy-agarose support using this buffer was unsuccessful, indicating the importance of the modified support for efficient immobilization. Furthermore, the increase in ionic strength to 1.0 M had a negative impact on the immobilization process. As the buffer molarity increased, there was a gradual decrease in the immobilization yield for the L-asparaginase on amino-epoxy-agarose. This observation suggests that the decrease in immobilization yield may be attributed not only to the enzyme/support interaction but also to the potential inhibition or

denaturation of the enzyme during the process (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

It is important to highlight that the highest immobilization performance was observed when using 0.1 M sodium carbonate buffer at pH 10 and the amino-epoxy-agarose. Under this condition, the biocatalyst presented a yield, efficiency, and recovered activity of 76%, 89.8%, and 68.2%, respectively. This result demonstrates the positive influence of an alkaline pH on the immobilization process. The improvement in immobilization can be attributed to the fact that epoxy carriers tend to form bonds more effectively at alkaline pH. In this condition, there is increased reactivity of the epoxy groups, which facilitates the formation of multipoint covalent bonds with the enzyme molecules. However, it should be noted that these bonds require prolonged incubation of the enzyme, ranging from several hours to days, for optimal efficiency (MATTE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2013b).

Considering the enzyme immobilization on heterofunctional amino-epoxy agarose supports, it is important to highlight that a high concentration of amino groups in the carrier can potentially hinder immobilization. This is because these molecules tend to primarily form physical bonds, which obstruct the formation of subsequent covalent bonds. Therefore, it is crucial to create supports with an intermediate charge of amino groups, with a recommended proportion of approximately 20% (ZHANG et al., 2020).

Table 1. Enzymatic activity of L-asparaginase immobilized in epoxy-agarose using different immobilization buffers.

Immobilization conditions	Observed activity (U.g ⁻¹)	IY (%)	IE (%)	RA (%)
Epoxy agarose support				
0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7	1.74 ± 0.07	2.25	0.80	0.72
0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 10	1.67 ± 0.06	2.35	0.78	0.70
1.0 M sodium phosphate buffer, pH 7	2.73 ± 0.10	2.95	1.21	1.17
Amino-epoxy agarose support				
0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7	127.11 ± 0.91	68.4	72.9	49.8
0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7	124.85 ± 0.82	61.1	81.4	49.7
0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 10	161.14 ± 1.65	76.0	89.8	68.2
1.0 M sodium phosphate buffer, pH 7	105.43 ± 0.11	52.4	79.3	41.6

*(n.d.) not detected

Considering the promising results of biocatalysts immobilized in amino-epoxy-agarose supports, it was decided to employ these immobilized in the conduct of subsequent experiments.

3.2 Effect of pH and temperature on the enzyme activity

The effect of pH (4 to 10) on the catalytic activity of the free and immobilized enzyme was investigated by modifying the pH of the enzyme assay. The results were presented in Figure 1. All immobilized enzymes maintained their best activity

in a range between pH 7 to 9, with a mean value of $98.14 \% \pm 2.14$. The free enzyme, in turn, presented 100% of its activity at pH 8.6 (Figure 1).

Both the free and immobilized biocatalysts exhibited reduced activity at acidic pH (4 and 5) and alkaline pH (10). However, the enzyme immobilized at pH 10 demonstrated the highest activity, reaching 76.95% at pH 4. It was followed by the immobilized enzymes at pH 7 in 1 and 0.5 M, which displayed relative activities of 74.23% and 74.67%, respectively. Comparatively, the activity of enzyme immobilized at pH 10 was 20 % higher than that of the free enzyme. This improvement can be attributed to conformational changes suffered by the enzyme during immobilization, resulting in enhanced protection against more extreme pH conditions (NOMA et al., 2021).

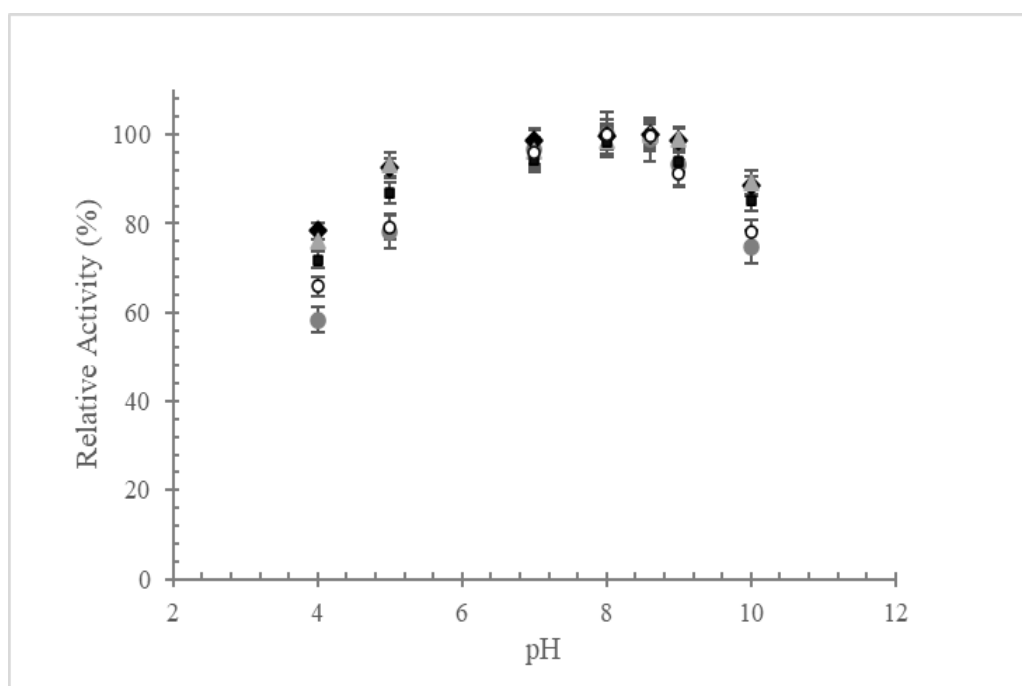


Figure 1. Effect of pH on the activity of free and immobilized L-asparaginase on different amino-epoxy agarose supports (●) Free enzyme; (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■) Immobilized amino-

epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

As well as pH, the temperature of the reaction is also an important critical factor that influences the catalytic activity of the enzyme. From 30 to 45 °C, both free and immobilized L-asparaginase presented activities close to their maximum (Figure 2). Singh et al. (2013) and Noma et al.(2020a) reported similar values for the optimum temperature. As the temperature increased, both enzyme forms exhibited a decrease in activity. However, this decrease was relatively smaller for the L-asparaginase immobilized at pH 10 and pH 7 in 1.0 M buffer, with 84.72% and 83.69% of their activity retained at 60°C, as shown in Figure 2. On the other hand, the immobilized at pH 7 in 0.1 M buffer and the free enzyme were more susceptible, experiencing a loss of over 22% of their activity at the same temperature.

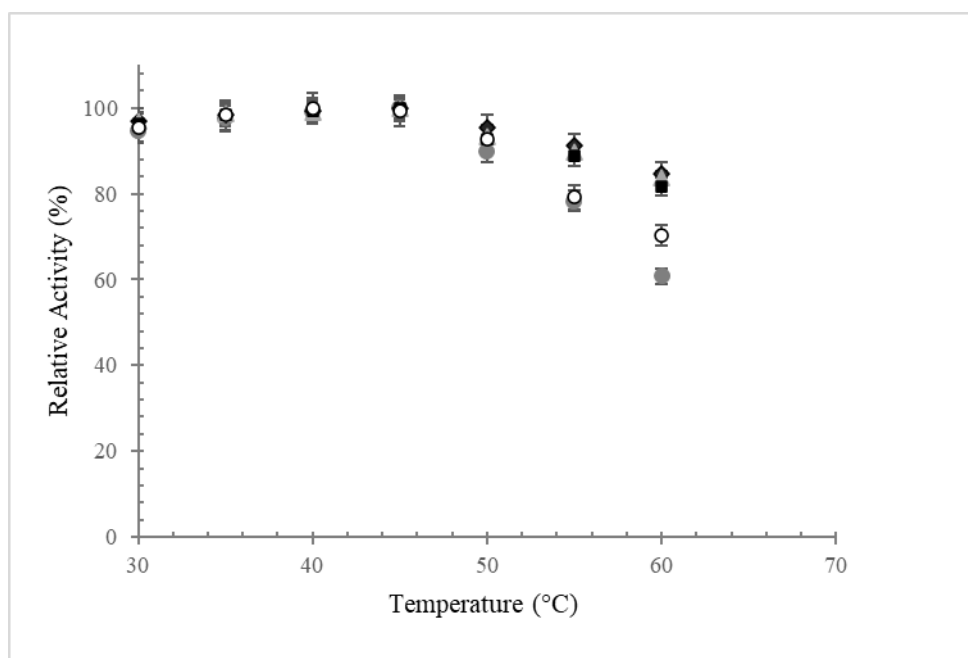


Figure 2. Effect of temperature on the activity of free and immobilized L-asparaginase on different amino-epoxy agarose supports (●) Free enzyme; (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲

) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■)
Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○)
Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

3.3 Enzyme stability at different pH

The enzymes were incubated in various buffers for 1 h to assess their stability at different pH levels. The residual activities are depicted in Figure 3. Both the free enzyme and the immobilized L-asparaginase exhibited the highest stability at pH 8.6. However, it is evident that the immobilized enzymes displayed significantly greater stability compared to the soluble enzyme, as evidenced by their higher activities at pH 4, 5, and 10. Previous studies, such as the research conducted by Bahreini et al. (2014) and Varshosaz and Anvari (2018), have indicated that most L-asparaginases demonstrate enhanced stability between pH 7 and 8.6.

The highest stability found for immobilized enzymes at acidic medium is an interesting result. One possible explanation for this effect is that the active site of the free enzyme is more susceptible to the influence of H⁺ ions compared to the immobilized biocatalyst. This phenomenon suggests that immobilization may offer additional protection against pH fluctuations, resulting in enhanced stability and activity of the enzyme under extreme pH conditions. Therefore, the immobilization of L-asparaginase on amino-epoxy-agarose enables a delay in protein denaturation, allowing the enzyme to remain active for a longer period. This is attributed to the limitation on conformational flexibility, which serves as a protective mechanism for the immobilized biocatalyst against thermal and pH inactivation (ULU, 2020).

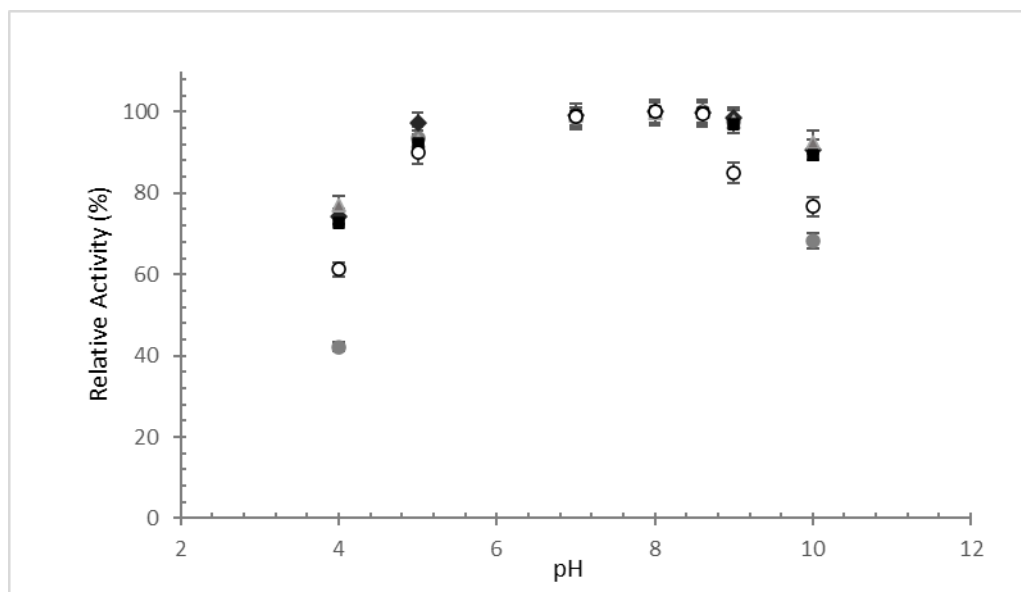


Figure 3. Effect of different pH on the stability of free and immobilized L-asparaginase on different amino-epoxy agarose supports. (●) Free enzyme; (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

3.4. Thermal stability

Free and immobilized L-asparaginase were incubated in different temperatures for 1 h and the residual activity was measured. The results are shown in Figure 4. From 30 to 45 °C there is no activity loss for free and immobilized preparations. The free enzyme showed a rapid decline in catalytic activity at 55 °C, which was attributed to denaturation and subsequent structural modification. This decline was so significant that the free enzyme completely lost its activity at 60 °C.

The immobilization of the enzyme on amino-epoxy-agarose supports resulted in an enhanced thermal stability, particularly at higher temperatures, such

as 50 °C and 60 °C. Notably, the enzyme immobilized at pH 10 and pH 7 in 1.0 M buffer exhibited the highest thermal stability among the immobilized enzymes, retaining approximately 20% of their activity at 60 °C.

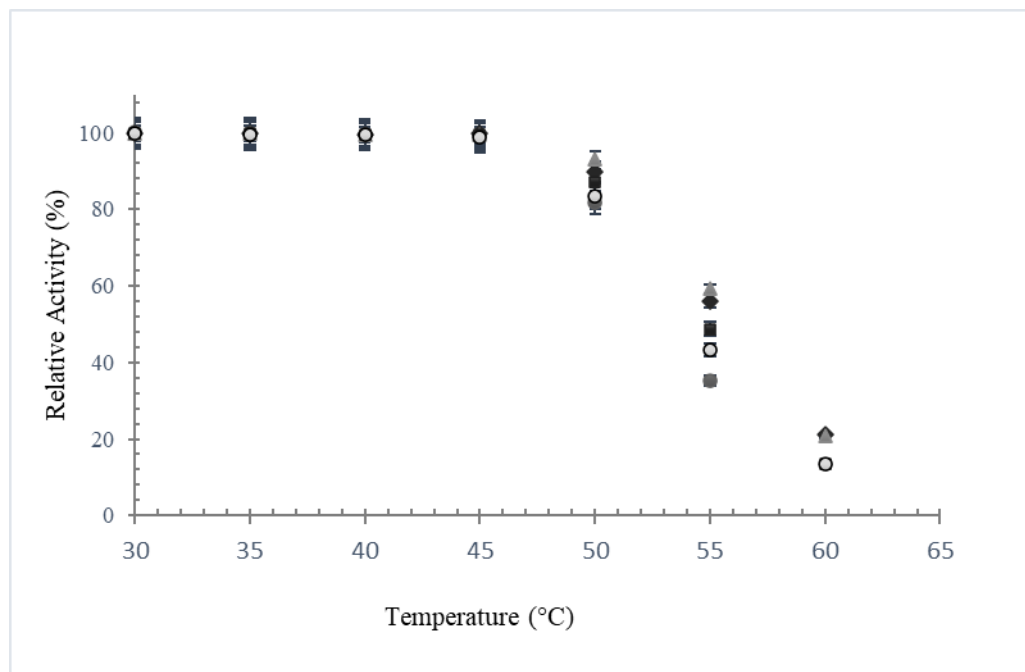


Figure 4. Effect of temperature on the thermal stability of free and immobilized L-asparaginase on different amino-epoxy agarose supports (●) Free enzyme; (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

In order to better understand the thermal stability, we followed the enzyme inactivation at 60 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer solution pH 8 collecting samples at each 5 min. The inactivation curves for free and immobilized enzymes are presented in Figure 5. Free L-asparaginase showed a different inactivation behavior, which can be divided into two stages. In the first 30 min the enzyme presented similar inactivation characteristics as the immobilized enzyme.

However, after this initial period, the free enzyme exhibited a more pronounced decline in activity compared to the immobilized forms. This thermal inactivation behavior observed in the free enzyme, characterized by two distinct steps, can be attributed to the fact that L-asparaginases are isoenzymes. The conformation of the amino acids gives the isoenzymes their own thermostable and thermolabile fractions, attributing to the enzyme extract this particular biphasic inactivation behavior (Batool et al., 2016; Díaz-Cruz et al., 2016). On the other hand, immobilization has proven to be an effective for stabilizing both fractions of L-asparaginase, thereby enhancing the thermal stability of the enzyme.

When comparing the different immobilized enzymes and the soluble form, it was observed that the biocatalyst prepared at pH 7 and 1.0 M presented the highest residual activity, maintaining 9.7% of its activity after 75 min of incubation. In contrast, the free enzyme was completely inactivated in 50 min. The inactivation of the free L-asparaginase fractions is attributed to the thermal denaturation process, which typically involves significant modifications and conformational rearrangements requiring ample space and flexibility. Consequently, free enzymes are more susceptible to thermal inactivation. Conversely, immobilization compromises flexibility, thereby contributing to the preservation of the enzyme in its active form (BARUCH-SHPIGLER; AVNIR, 2020).

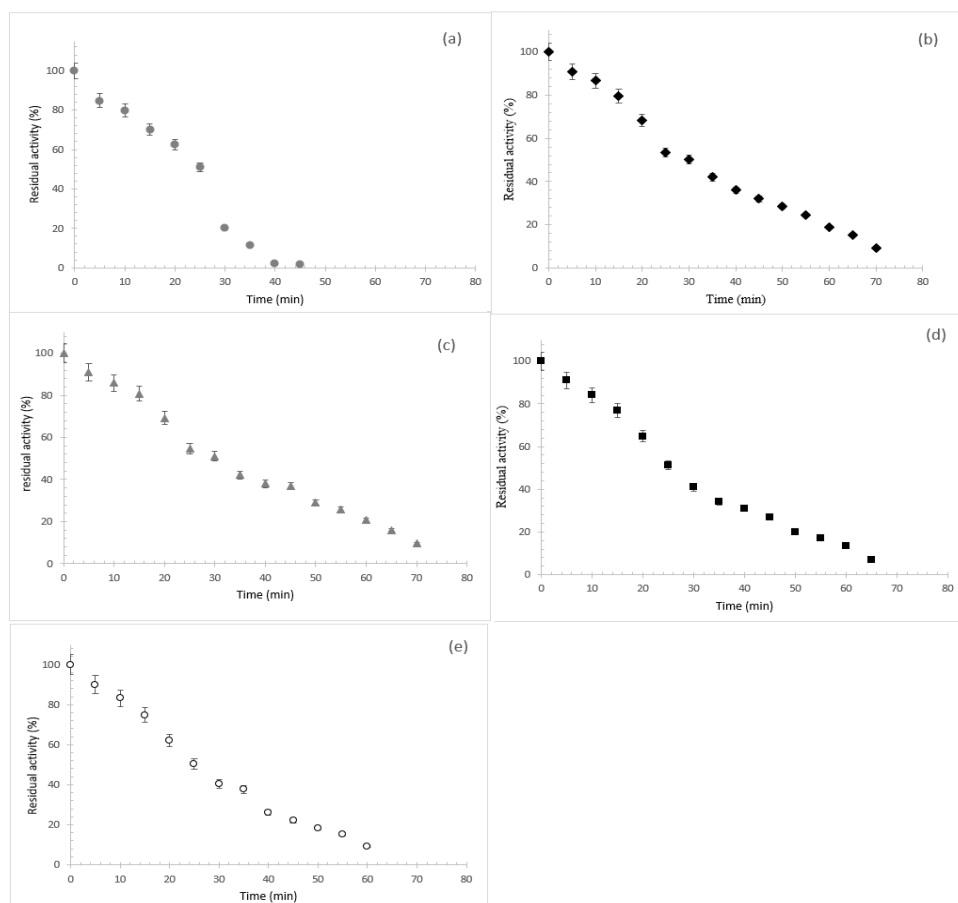


Figure 5. Thermal inactivation at 60 °C. **(a)** free enzyme; **(b)** Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; **(c)** Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; **(d)** Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; **(e)** Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

3.5 Storage stability

The stability of immobilized enzymes during the storage is crucial for ensuring the commercial viability of these biocatalysts, as it determines their ability to maintain enzymatic activity over time (ULU, 2020).

Our results demonstrated that the biocatalysts immobilized at pH 7 and 1.0 M and the immobilized at pH 10 were able to retain more than 82% of their initial

activity during storage at 4°C for a period of 60 days (Figure 6). These findings demonstrate the stability of these immobilized biocatalysts, suggesting that they can be stored for extended periods without experiencing significant changes in their enzymatic activity.

Consequently, these biocatalysts exhibit promising stability during storage, making them a viable choice for commercial applications. These results underscore the significance of enzymatic immobilization as a strategy for developing more stable and long-lasting biocatalysts.

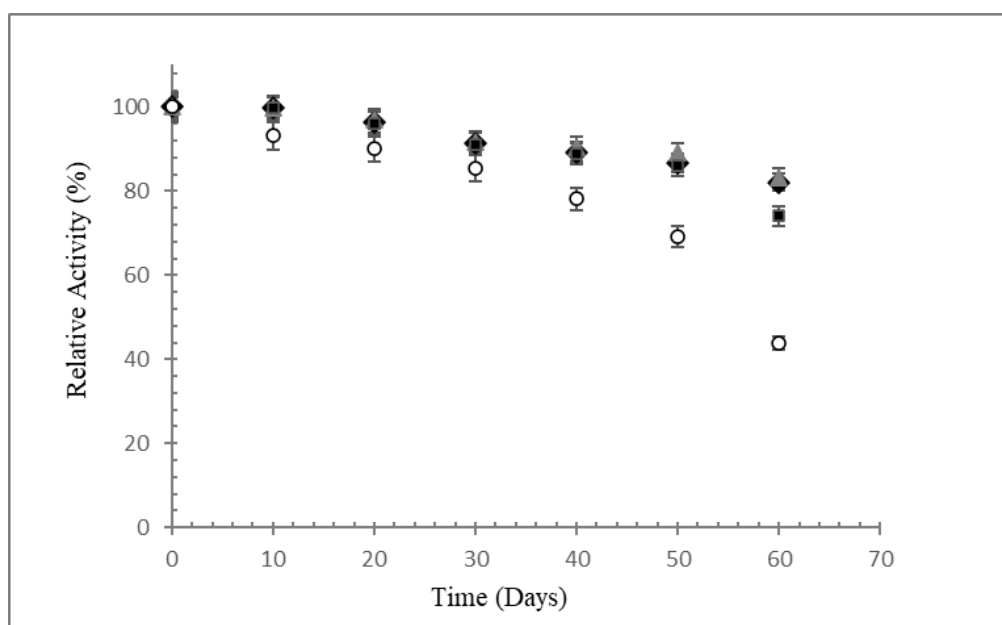


Figure 6. Storage stability of L-asparaginase enzyme immobilized on different amino-epoxy agarose supports. (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

3.6 Kinetic Parameters

The kinetic parameters (K_M and V_{max}) of soluble and immobilized L-asparaginase were determined by measuring the initial reaction rates, varying the substrate concentration (0.02 M to 0.5 M). The results for the different biocatalysts are shown in Table 2.

Table 2. Kinetic K_M parameters and V_{max} values for free and immobilized L-asparaginase on different amino-epoxy agarose supports.

	K_M (M)	V_{max} (U.mg ⁻¹)
Free Enzyme	0.125	310.54
Immobilized amino-epoxy agarose supports		
0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 10	0.078	270.91
1.0 M sodium phosphate buffer, pH 7	0.104	337.90
0.5 M sodium phosphate buffer, pH 7	0.107	302.76
0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7	0.112	293.70

Compared to the free enzyme (K_M 0.125 and V_{max} 310.54 U.mg⁻¹) all immobilized biocatalysts presented lower K_M values, indicating a higher affinity of the enzyme immobilized by the substrate. This decrease in K_M can be attributed to improvements in structural properties resulting from immobilization, which confer protection to the enzyme against deactivation and denaturation. These positive effects of immobilization contribute to the maintenance of adequate three-dimensional conformation of the enzyme, favoring its interaction with the substrate (ROBINSON, 2015). In addition, the increase in the V_{max} value observed for L-asparaginase immobilized in 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7 may indicate an increase in the ability of this biocatalyst to convert the substrate into a product, indicating a higher overall catalytic efficiency for this immobilized.

3.7 Operational stability

The assessment of operational stability plays an important role in the context of immobilized biocatalysts. This is due to the fact that the overall viability of the process is intrinsically linked to the ability of these biocatalysts to preserve their enzymatic activity over multiple reuse cycles. Immobilization not only facilitates the subsequent recovery of the enzyme, but also provides a protective effect, significantly reducing the chances of direct exposure to adverse conditions. These elements collaborate synergistically to sustain the operational stability of the enzyme, allowing the maintenance of its functionality over time (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022).

As illustrated in Figure 7, more than 70% of the initial activity of the immobilized biocatalysts was maintained after seven cycles of reuse, indicating that L-asparaginase immobilized in amino-epoxy-agarose has sufficient stability and robustness for application in the food and pharmaceutical industry.

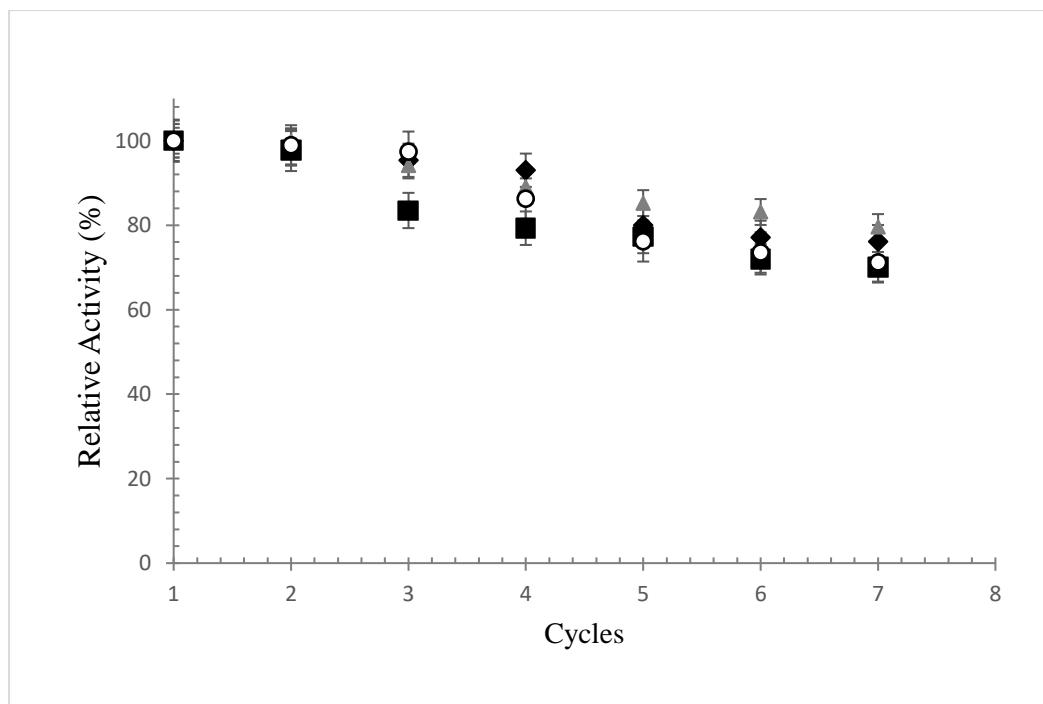


Figure 7. Operational stability of L-asparaginase enzyme immobilized on different amino-epoxy agarose supports. (◆) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium carbonate buffer pH 10; (▲) Immobilized amino-epoxy-agarose 1.0 M sodium phosphate buffer pH 7; (■) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.5 M sodium phosphate buffer pH 7; (○) Immobilized amino-epoxy-agarose 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.

The gradual reduction of enzymatic activity after each cycle can be attributed mainly to the leaching of the immobilized during the recovery process and the changes in the stereochemical structure of L-asparaginase, and it is relevant to emphasize that the continuous interaction between the substrate and the immobilized enzyme can cause structural distortions in its active site, leading to loss of activity (Al-Najada et al., 2019).

4. Conclusions

L-asparaginase was immobilized on epoxy-agarose and amino-epoxy-agarose supports. The modification of epoxy-agarose with ethylenediamine was essential to enable enzyme immobilization. The immobilized biocatalysts exhibited greater stability under acidic pH conditions (pH 4) and elevated temperatures (60 °C for 1 h) compared to the free enzyme. This suggests that immobilization offered additional protection against thermal denaturation and extreme pH fluctuations, thereby expanding the potential applications of these enzymes in biotechnological processes. Another noteworthy aspect is the ability of the biocatalysts to maintain high enzymatic activity even after 60 days of storage at 4 °C and preserve more than 70% of their activity after 7 cycles of reuse. Based on the results obtained in this study, it can be concluded that the immobilization of L-asparaginase on amino-epoxy agarose supports has proven to be a promising approach for stabilizing and enhancing enzymatic properties. Consequently, these findings will contribute to the advancement of enzymatic biotechnology, providing crucial information for improving the efficient use of L-asparaginase in medical applications and the food industry.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process 405418/2021-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – processes 21/2551-0002270-1 and 22/2551-0000397-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) from Brazilian Government. The authors declare no conflict of interest.

References

- Alam, S., Ahmad, R., Pranaw, K., Mishra, P., Khare, S.K., 2018. Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system. *Bioresour Technol* 269, 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.095>
- Alam, S., Nagpal, T., Singhal, R., Kumar Khare, S., 2021. Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications. *Bioresour Technol* 339, 125599. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125599>
- Al-Najada, A.R., Almulaiky, Y.Q., Aldhahri, M., El-Shishtawy, R.M., Mohamed, S.A., Baeshen, M., AL-Farga, A., Abdulaal, W.H., Al-Harbi, S.A., 2019. Immobilisation of α -amylase on activated amidrazone acrylic fabric: a new approach for the enhancement of enzyme stability and reusability. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49206-w>
- Andler, S.M., Goddard, J.M., 2018. Transforming food waste: how immobilized enzymes can valorize waste streams into revenue streams. *NPJ Sci Food* 2, 19. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0028-2>
- Ates, B., Ulu, A., Köytepe, S., Ali Noma, S.A., Kolat, V.S., Izgi, T., 2018. Magnetic-propelled Fe_3O_4 -chitosan carriers enhance α -asparaginase catalytic activity: a promising strategy for enzyme immobilization. *RSC Adv* 8, 36063–36075. <https://doi.org/10.1039/C8RA06346J>
- Bahraman, F., Alemzadeh, I., 2017. Optimization of L-Asparaginase Immobilization onto Calcium Alginate Beads. *Chem Eng Commun* 204, 216–220. <https://doi.org/10.1080/00986445.2015.1065821>

- Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Mokarram, A.R., Goodarzi, M.T., Saidijam, M., 2014. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. *Nanoscale Res Lett* 9, 340. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340>
- Balcão, V.M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F.X., Guisán, J.M., 2001. Coimmobilization of L-asparaginase and glutamate dehydrogenase onto highly activated supports. *Enzyme Microb Technol* 28, 696–704. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00307-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00307-6)
- Balcao, V.M., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Malcata, F.X., Guisan, J.M., 2001. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. *Biotechnol Prog* 17, 537–542. <https://doi.org/10.1021/bp000163r>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2015. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv* 33, 435–456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2013. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. *Biomacromolecules* 14, 2433–2462. <https://doi.org/10.1021/bm400762h>
- Baruch-Shpigler, Y., Avnir, D., 2020. Enzymes in a golden cage. *Chem Sci* 11, 3965–3977. <https://doi.org/10.1039/C9SC05419G>
- Batool, T., Makky, E.A., Jalal, M., Yusoff, M.M., 2016. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. *Appl Biochem Biotechnol* 178, 900–923. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1917-3>

- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., 2019. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Research International* 123, 226–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.066>
- Bolivar, J.M., Mateo, C., Godoy, C., Pessela, B.C.C., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009. The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports. *Process Biochemistry* 44, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.03.012>
- Bolivar, J.M., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2022. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chem Soc Rev* 51, 6251–6290. <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>
- Boudrant, J., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2020. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry* 90, 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cecconello, D.K., Magalhães, M.R. de, Werlang, I.C.R., Lee, M.L. de M., Michalowski, M.B., Daudt, L.E., 2020. Asparaginase: an old drug with new questions. *Hematol Transfus Cell Ther* 42, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>
- Çelik, E.E., Gökmen, V., 2020. Formation of Maillard reaction products in bread crust-like model system made of different whole cereal flours. *European Food Research and Technology* 246, 1207–1218. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03481-4>

- Cespugli, M., Lotteria, S., Navarini, L., Lonzarich, V., Del Terra, L., Vita, F., Zweyer, M., Baldini, G., Ferrario, V., Ebert, C., Gardossi, L., 2018. Rice Husk as an Inexpensive Renewable Immobilization Carrier for Biocatalysts Employed in the Food, Cosmetic and Polymer Sectors. *Catalysts* 8, 471. <https://doi.org/10.3390/catal8100471>
- Corrêa, C.L.O., das Mercedes Penha, E., dos Anjos, M.R., Pacheco, S., Freitas-Silva, O., Luna, A.S., Gottschalk, L.M.F., 2021. Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid. *Food Chem* 338, 128045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128045>
- da Silva, R.M., Paiva Souza, P.M., Fernandes, F.A.N., Gonçalves, L.R.B., Rodrigues, S., 2019. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in epoxy-agarose-tailoring oligosaccharides synthesis. *Process Biochemistry* 78, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.009>
- de Andrades, D., Graebin, N.G., Ayub, M.A.Z., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., 2019. Preparation of immobilized/stabilized biocatalysts of β -glucosidases from different sources: Importance of the support active groups and the immobilization protocol. *Biotechnol Prog* 35. <https://doi.org/10.1002/btpr.2890>
- DÍAZ-CRUZ, C.A., REGALADO-GONZÁLEZ, C., MORALES-SÁNCHEZ, E., VELAZQUEZ, G., GONZÁLEZ-JASSO, E., AMAYA-LLANO, S.L., 2016. Thermal inactivation kinetics of partially purified mango pectin methylesterase. *Food Science and Technology* 36, 282–285. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.02815>
- Feenstra, L.R., Gehring, R., van Geijlswijk, I.M., König, T., Prinsen, H.C.M.T., Vandemeulebroecke, K., Lammens, T., Krupa, A., Teske, E., 2022. Evaluation of PEG-L-asparaginase in asparagine suppression and anti-drug antibody

development in healthy Beagle dogs: A multi-phase preclinical study. *The Veterinary Journal* 286, 105854. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105854>

Fernandez-Lafuente, R., 2009. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol* 45, 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.009>

Fonseca, M.H.G., Fiúza, T. da S., Morais, S.B. de, Souza, T. de A.C.B. de, Trevizani, R., 2021. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 139, 111616. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.111616>

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., Rodrigues, R.C., 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv Synth Catal* 353, 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

Kumar, K., Kataria, M., Verma, N., 2013. Plant asparaginase-based asparagine biosensor for leukemia. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 41, 184–188. <https://doi.org/10.3109/10731199.2012.716062>

Li, R., Zhang, Z., Pei, X., Xia, X., 2020. Covalent Immobilization of L-Asparaginase and Optimization of Its Enzyme Reactor for Reducing Acrylamide Formation in a Heated Food Model System. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.584758>

Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2000. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules* 1, 739–745. <https://doi.org/10.1021/bm000071q>

- Mateo, C., Grazú, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2007. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochem Soc Trans* 35, 1593–1601. <https://doi.org/10.1042/BST0351593>
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J.M., Betancor, L., Pessela, B.C.C., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R., 2003. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. *Biomacromolecules* 4, 772–777. <https://doi.org/10.1021/bm0257661>
- Matte, C.R., Bordinhão, C., Poppe, J.K., Benvenuto, E. V., Costa, T.M.H., Rodrigues, R.C., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z., 2017. Physical-chemical properties of the support immobead 150 before and after the immobilization process of lipase. *J Braz Chem Soc* 28, 1430–1439. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160319>
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29, 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Monajati, M., Borandeh, S., Hesami, A., Mansouri, D., Tamaddon, A.M., 2018. Immobilization of -asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies. *Chemical Engineering Journal* 354, 1153–1163. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.058>
- Noma, S.A.A., Ulu, A., Acet, Ö., Sanz, R., Sanz-Pérez, E.S., Odabaşı, M., Ateş, B., 2020. Comparative study of ASNase immobilization on tannic acid-modified magnetic Fe₃O₄/SBA-15 nanoparticles to enhance stability and reusability. *New Journal of Chemistry* 44, 4440–4451. <https://doi.org/10.1039/D0NJ00127A>

- Noma, S.A.A., Yılmaz, B.S., Ulu, A., Özdemir, N., Ateş, B., 2021. Development of L-asparaginase@hybrid Nanoflowers (ASNase@HNFs) Reactor System with Enhanced Enzymatic Reusability and Stability. *Catal Letters* 151, 1191–1201. <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03362-1>
- Nunes, J.C.F., Cristóvão, R.O., Santos-Ebinuma, V.C., Faria, J.L., Silva, C.G., Neves, M.C., Freire, M.G., Tavares, A.P.M., 2021. L-Asparaginase-Based Biosensors. *Encyclopedia* 1, 848–858. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1030065>
- Qiu, X., Wang, S., Miao, S., Suo, H., Xu, H., Hu, Y., 2021. Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal. *J Hazard Mater* 401, 123353. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123353>
- Robinson, P.K., 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Rodrigues, R.C., Berenguer-Murcia, Á., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Fernandez-Lafuente, R., 2021. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnol Adv* 52, 107821. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Fernández-Lafuente, R., 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>
- Sheldon, R.A., van Pelt, S., 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>
- Singh, Y., Gundampati, R.K., Jagannadham, M. V., Srivastava, S.K., 2013. Extracellular L-Asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of

Antineoplastic Activity In Vitro. *Appl Biochem Biotechnol* 171, 1759–1774.
<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0455-0>

Smith, S., Goodge, K., Delaney, M., Struzyk, A., Tansey, N., Frey, M., 2020. A Comprehensive Review of the Covalent Immobilization of Biomolecules onto Electrospun Nanofibers. *Nanomaterials* 10, 2142.
<https://doi.org/10.3390/nano10112142>

Torres, R., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Palomo, J.M., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2003. A Novel Heterofunctional Epoxy-Amino Sepabeads for a New Enzyme Immobilization Protocol: Immobilization-Stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Prog* 19, 1056–1060. <https://doi.org/10.1021/bp025771g>

Ulu, A., 2020. Metal–organic frameworks (MOFs): a novel support platform for ASNase immobilization. *J Mater Sci* 55, 6130–6144. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04452-6>

Ulu, A., Ates, B., 2017. Immobilization of α -Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. *Bioconjug Chem* 28, 1598–1610. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00217>

Varshosaz, J., Anvari, N., 2018. Enhanced stability of L-asparaginase by its bioconjugation to poly(styrene-co-maleic acid) and Ecoflex nanoparticles. *IET Nanobiotechnol* 12, 466–472. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0156>

Wang, R., Xia, B., Li, B.-J., Peng, S.-L., Ding, L.-S., Zhang, S., 2008. Semi-permeable nanocapsules of konjac glucomannan–chitosan for enzyme immobilization. *Int J Pharm* 364, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.026>

- Xie, J., Zhang, Y., Simpson, B., 2022. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Curr Opin Food Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.004>
- Xu, F., Oruna-Concha, M.-J., Elmore, J.S., 2016. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chem* 210, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.105>
- Yang, J., Sun, L., Guo, R., Yang, H., Feng, X., Zhang, X., 2018. A Facile Route for Oriented Covalent Immobilization of Recombinant Protein A on Epoxy Agarose Gels: In Situ Generation of Heterofunctional Amino-Epoxy Supports. *ChemistrySelect* 3, 10320–10324. <https://doi.org/10.1002/slct.201802256>
- Zhang, F., Lian, M., Alhadhrami, A., Huang, M., Li, B., Mersal, G.A.M., Ibrahim, M.M., Xu, M., 2022. Laccase immobilized on functionalized cellulose nanofiber/alginate composite hydrogel for efficient bisphenol A degradation from polluted water. *Adv Compos Hybrid Mater* 5, 1852–1864. <https://doi.org/10.1007/s42114-022-00476-5>
- Zhang, X., Wang, Y., Zhong, T., Feng, X., 2020. Optimal spacer arm microenvironment for the immobilization of recombinant Protein A on heterofunctional amino-epoxy agarose supports. *Process Biochemistry* 91, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.037>
- Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R., Sanjust, E., 2016. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules* 21, 1577. <https://doi.org/10.3390/molecules21111577>

7. CAPÍTULO V - DISCUSSÃO GERAL

Nesta tese de doutorado, o objetivo foi analisar o efeito da L-asparaginase livre na redução da acrilamida em batatas-doces e tradicionais. Além disso, foi explorada a imobilização dessa enzima em dois suportes de agarose modificados: epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose. Durante esse processo, foram investigados a influência da variação do pH e da concentração molar dos tampões na eficiência, rendimento e atividade relativa dos imobilizados. Ademais, a L-asparaginase imobilizada em diferentes condições no suporte em amino-epoxi-agarose foram submetidos a ensaios de estabilidade, onde foram avaliados parâmetros atividade ótima e estabilidade frente aos fatores como pH, temperatura, armazenamento e reutilização.

Primeiramente, uma revisão aprofundada foi realizada englobando a L-asparaginase e os possíveis suportes para a sua imobilização, também foram estudados a formação da acrilamida em alimentos, lançando luz para a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre a formação da acrilamida em batatas-doces fritas. Este tema, ainda pouco explorado, é especialmente relevante devido ao aumento significativo no seu consumo, e às características bioquímicas das batatas-doces e tradicionais que as tornam propensas à formação da acrilamida.

Com o propósito de aprofundar a compreensão da formação da acrilamida e avaliar a mitigação dessa substância pelo uso da L-asparaginase livre, três cultivares de batata-doce (Cuia, Beauregard e Rubissol) ainda não investigadas foram selecionadas para o estudo. Adicionalmente, uma batata tradicional cultivar Ágata foi incluída como referência devido ao conhecimento substancial existente sobre a formação de acrilamida nesse tipo de batatas. Essa diversidade de

variedades possibilitou uma análise minuciosa e comparativa não apenas da composição físico-química das batatas, mas também no processo de formação e redução da acrilamida nessas matrizes. Essa fase do projeto foi realizada em colaboração com a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Os resultados obtidos nessa etapa, demonstraram que dentre as batatas-doces a cultivar Beauregard foi a que apresentou maior predisposição para a formação da acrilamida devido aos seus fatores bioquímicos de L-asparagina e açúcares redutores elevados, esse efeito foi comprovado após analisar os teores de acrilamida depois do processamento térmico. No entanto, posteriormente a utilização da L-asparaginase essa cultivar também foi a que mais apresentou redução entre as batatas-doces avaliadas com uma redução de cerca de 85%. Quando comparadas as cultivares de batatas-doces com a batata tradicional Ágata essa última apresentou os teores de acrilamida mais elevados, assim como a presença de L-asparagina, atividade de água (a_w) e umidade, contudo, a concentração de açúcares redutores é menor nesse tipo de batata. Por consequência da sua composição os níveis de acrilamida foram maiores na batata tradicional, mas sua redução pelo uso da L-asparagina foi de aproximadamente 96%. Demonstrando de que a L-asparaginase livre é uma excelente alternativa para a mitigação da acrilamida em alimentos.

A segunda etapa do estudo onde foram avaliados a imobilização da L-asparaginase em dois suportes distintos: epóxi-agarose e amino-epóxi-agarose em diferentes condições de pH e molaridade do tampão, demonstrou que a imobilização em suporte amino-epóxi-agarose resultou em rendimentos significativamente maiores em comparação com epóxi-agarose, além de

possibilitar o uso de condições mais suaves como tampão fosfato de sódio 0,1 M em pH 7 e tempos de imobilização mais curtos. O maior desempenho de imobilização foi observado no imobilizado em amino-epóxi-agarose quando se utilizou o tampão carbonato de sódio 0,1 M em pH 10. Nessa condição, o biocatalisador apresentou rendimento, eficiência e atividade recuperada de 76%, 89,8% e 68,2%, respectivamente. Os imobilizados em amino-epóxi-agarose demonstraram maior estabilidade sob condições ácidas (pH 4) e temperaturas elevadas (60 °C por 1h) quando comparados com a enzima livre, indicando uma proteção adicional contra desnaturação térmica e flutuações de pH. Além disso, os biocatalisadores imobilizados nesse suporte mostraram excelente retenção de atividade mesmo após longos períodos de armazenamento e múltiplos ciclos de reutilização, revelando-se uma abordagem promissora para estabilizar e melhorar as propriedades da enzima.

Entretanto, é fundamental observar que, apesar da funcionalização bem-sucedida do suporte e da excelente interação com a enzima, ainda são necessários refinamentos para tornar o imobilizado adequado para aplicação em alimentos. As características estruturais, especialmente a porosidade da agarose, levam a uma imobilização mais interna da enzima, dificultando a interação eficaz com alimentos sólidos e semi-sólidos propensos à formação de acrilamida. Para uma interação mais eficiente, são necessários suportes que imobilizem a L-asparaginase na parte mais externa do carreador, como no caso das nanopartículas.

No entanto, o suporte amino-epoxy-agarose pode se mostrar mais eficaz no cenário oncológico, onde o carreador protege a enzima, contribuindo para a redução dos mecanismos associados à alergenicidade no organismo. Ainda

assim, tanto para aplicações alimentícias quanto médicas, a busca por métodos que aprimorem a estabilidade da L-asparaginase permanece essencial para garantir a eficácia dessas aplicações.

Essas descobertas não apenas contribuem para a indústria, proporcionando processos otimizados e produtos mais seguros, mas também têm implicações valiosas para a biotecnologia enzimática como ciência. A imobilização bem-sucedida da L-asparaginase marca um avanço importante na busca por aplicações médicas e industriais mais eficientes.

8. CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo atingiu os objetivos estabelecidos, conseguindo reduzir os níveis de acrilamida de forma eficaz ao aplicar a L-asparaginase livre nas diferentes cultivares de batatas-doces e batata tradicional, além disso a imobilização da L-asparaginase foi melhorada com a utilização da etilenodiamina para a funcionalização do suporte epóxi-agarose, adicionando grupamentos amino ao suporte e contribuindo para a melhor interação com a enzima e melhor eficácia de imobilização.

Ademais, por meio deste trabalho, foi possível chegar a várias conclusões:

- A composição bioquímica das batatas tem forte correlação na formação da acrilamida e mitigação da acrilamida;
- A utilização da L-asparaginase não modifica a cor das batatas após o tratamento enzimático o que pode contribuir para a aceitabilidade do consumidor;
- Todas as condições de imobilização no suporte amino-epóxi-agarose proporcionaram maior estabilidade ao biocatalizador imobilizado quando comparado com a enzima livre;
- Apesar da imobilização em suporte amino-epóxi-agarose necessitar de adaptações para aplicação em alimentos, esse imobilizado pode ser utilizado na área oncológica com a finalidade de proteger o organismo contra a rejeição do medicamento por parte dos anticorpos, além disso a funcionalização do suporte pode ser utilizada como modelo para outros enzimas ou materiais que não seja a agarose.

Portanto, essa tese contribuiu para o entendimento da formação e redução de acrilamida em batatas, bem como para o avanço no campo da biotecnologia enzimática, fornecendo conhecimentos essenciais que servem de base para futuras aplicação e melhorias desse suporte. Além disso, a metodologia utilizada para a funcionalização pode ser extrapolada para outras matrizes transportadoras ou mesmo para diferentes enzimas, ampliando consideravelmente as possibilidades de utilização dessa técnica promissora.

REFERÊNCIAS

- AĞÇAM, E. Modeling of the changes in some physical and chemical quality attributes of potato chips during frying process. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 100064, 1 jun. 2022.
- AGRAWAL, S. et al. Catalytic characteristics and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 504–511, jul. 2018.
- AHMED, M.; AKTER, MST. S.; EUN, J.-B. Peeling, drying temperatures, and sulphite-treatment affect physicochemical properties and nutritional quality of sweet potato flour. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 112–118, 1 jul. 2010.
- ALAM, S. et al. Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 121–126, 1 dez. 2018.
- ALAM, S. et al. Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125599, 1 nov. 2021.
- AL-TAHER, F. Analysis of Acrylamide in French Fries using Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC kit and LC / MS / MS. **Agilent Technologies**, n. 2, p. 1–6, 2012.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. [s.l.] Oxford University PressNew York, 2005.
- ARAS, D. et al. In Vivo acrylamide exposure may cause severe toxicity to mouse oocytes through its metabolite glycidamide. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172026, 9 fev. 2017.

BACHIR, N. et al. Study the interaction of amino acids, sugars, thermal treatment and cooking technique on the formation of acrylamide in potato models. **Food Chemistry**, v. 408, p. 135235, 15 maio 2023.

BAHREINI, E. et al. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 340, 9 dez. 2014.

BALAGIANNIS, D. P. et al. Kinetic modelling of acrylamide formation during the finish-frying of french fries with variable maltose content. **Food Chemistry**, v. 284, p. 236–244, 30 jun. 2019.

BALCÃO, V. M. et al. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 537–542, 5 jan. 2001.

BARBOSA, O. et al. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013.

BAŞARAN, B.; AYDIN, F.; KABAN, G. The determination of acrylamide content in brewed coffee samples marketed in Turkey. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 37, n. 2, p. 280–287, 1 fev. 2020.

BAŞARAN, B.; TURK, H. The influence of consecutive use of different oil types and frying oil in French fries on the acrylamide level. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 104, n. September, p. 104177, dez. 2021.

BATOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 7 mar. 2016.

BEAUFILS, C. et al. From Enzyme Stability to Enzymatic Bioelectrode Stabilization Processes. **Catalysts**, v. 11, n. 4, p. 497, 14 abr. 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAHAM, S. A. et al. Effect of Tris Buffer in the Intensity of the Multipoint Covalent Immobilization of Enzymes in Glyoxyl-Agarose Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 9, p. 2843–2857, 21 set. 2021.

CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, 1 dez. 2016.

CASTRO, H. F. et al. Imobilização de enzimas e sua estabilidade. Em: **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ, 2008. p. 123–152.

ÇELİK, E. E.; GÖKMEN, V. Formation of Maillard reaction products in bread crust-like model system made of different whole cereal flours. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 6, p. 1207–1218, 24 jun. 2020.

CHAMPRASERT, O. et al. Inhibitory effect of polysaccharides on acrylamide formation in chemical and food model systems. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130213, 30 nov. 2021.

CHAMPRASERT, O.; ORFILA, C.; SUWANNAPORN, P. Acrylamide mitigation using zein–polysaccharide complex particles. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107317, 1 mar. 2022.

CHAND, S. et al. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 619–647, 18 jul. 2020.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018.

CLEMENTI, A. La Désamidation Enzymatique De L'asparagine Chez Les Différentes Espèces Animales Et La Signification Physio Logique De Sa Presence Dans L'organisme. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, n. 4, p. 369–398, 25 jan. 1922.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimatica**. Rio de Janeiro: EPUB; FAPERJ, 2008.

CORRÊA, C. L. O. et al. Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128045, 15 fev. 2021.

COSTA, I. M. et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36239, 8 nov. 2016.

DA SILVA, R. M. et al. Co-immobilization of dextransucrase and dextransase in epoxy-agarose- tailoring oligosaccharides synthesis. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 71–81, 1 mar. 2019.

DARVISHI, F.; FARAJI, N.; SHAMSI, F. Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 955–961, mar. 2019.

DATIR, S. S.; REGAN, S. Role of alkaline/neutral invertases in postharvest storage of potato. **Postharvest Biology and Technology**, v. 184, n. November 2021, p. 111779, fev. 2022.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 6 fev. 2013.

DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; SAMPAIO, K. B.; DE SOUZA, E. L. Sweet potato roots: Unrevealing an old food as a source of health promoting bioactive compounds – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 277–286, 1 mar. 2019.

DE ANDRADES, D. et al. Preparation of immobilized/stabilized biocatalysts of β -glucosidases from different sources: Importance of the support active groups and the immobilization protocol. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 6, p. 1–11, 19 nov. 2019.

DIAS, F. F. G.; SANTOS AGUILAR, J. G. DOS; SATO, H. H. L-Asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 289, 27 jul. 2019.

EFSA. Scientific Opinion on acrylamide in food. **EFSA Journal**, v. 13, n. 6, p. 1–321, jun. 2015.

EL-REFAI, H. et al. Comparison of Free and Immobilized L-asparaginase Synthesized by Gamma-Irradiated *Penicillium cyclopium*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 43–50, 15 mar. 2016.

EMRAGI, E.; KALITA, D.; JAYANTY, S. S. Effect of edible coating on physical and chemical properties of potato tubers under different storage conditions. **LWT**, v. 153, n. April 2021, p. 112580, jan. 2022.

FAO. **OECD-FAO Agricultura Outlook 2021-2030**. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb5332en/Other.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

FDA. **Contains Nonbinding Recommendations Guidance for Industry Acrylamide in Foods**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/87150/download>>. Acesso em: 24 jun. 2019.

FEDERSEL, H.-J.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. J. C. Recent Trends in Enzyme Immobilization- Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2822, 10 maio 2021.

FENG, J.; KONG, F. Enzyme inhibitory activities of phenolic compounds in pecan and the effect on starch digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 117–123, 1 nov. 2022.

GABILONDO, J. et al. Bioactive compounds of two orange-fleshed sweet potato cultivars (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) in fresh, stored and processed roots. **Applied Food Research**, v. 2, n. 1, p. 100061, 1 jun. 2022.

GRAS, C. C. et al. Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and their color modulation by the addition of phenolic acids and food-grade phenolic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 235, p. 265–274, 15 nov. 2017.

HABINSHUTI, I.; MU, T.-H.; ZHANG, M. Structural, antioxidant, aroma, and sensory characteristics of Maillard reaction products from sweet potato protein hydrolysates as influenced by different ultrasound-assisted enzymatic treatments. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130090, 1 nov. 2021.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 26 jan. 2009.

HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus*

oryzae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 27 maio 2009.

HSU, H.-T. et al. Kinetics for the distribution of acrylamide in French fries, fried oil and vapour during frying of potatoes. **Food Chemistry**, v. 211, p. 669–678, nov. 2016.

HUANG, M. et al. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 656–666, 1 mar. 2018.

HUANG, Y. et al. Effect of acidity regulators on acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in French fries: The dual role of pH and acid radical ion. **Food Chemistry**, v. 371, p. 131154, 1 mar. 2022.

IARC. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans – IARC**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-61/>>. Acesso em: 24 jun. 2019.

IZADPANA QESHMI, F. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, n. December 2017, p. 99–112, mar. 2018.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 27 ago. 2014.

JIA, R. et al. Microbial L-asparaginase for Application in Acrylamide Mitigation from Food: Current Research Status and Future Perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1659, 3 ago. 2021.

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 3, p. 340–363, 25 abr. 2011.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; CIESIELCZYK, F.; JESIONOWSKI, T. A novel biocatalytic system obtained via immobilization of aminoacylase onto sol-gel derived ZrO₂·SiO₂ binary oxide material: physicochemical characteristic and catalytic activity study. **Adsorption**, v. 25, n. 4, p. 855–864, 20 maio 2019.

KOU, Y. et al. Efficient Detection of Edible Oils Adulterated with Used Frying Oils through PE-film-based FTIR Spectroscopy Combined with DA and PLS. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 9, p. 1083–1089, 2018.

KRISHNAKUMAR, T.; VISVANATHAN, R. Acrylamide in Food Products: A Review. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 05, n. 07, 2014.

KUEK, S. L. et al. Contribution of lipid towards acrylamide formation during intermittent frying of French fries. **Food Control**, v. 118, n. January, p. 107430, dez. 2020.

KUMARI, A. et al. Method development and validation for acrylamide in potato cutlet by UHPLC-MS/MS. **Food Control**, v. 151, p. 109817, 1 set. 2023.

LI, R. et al. Covalent Immobilization of L-Asparaginase and Optimization of Its Enzyme Reactor for Reducing Acrylamide Formation in a Heated Food Model System. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. October, p. 1–11, 15 out. 2020.

LIM, P. K. et al. The influence of deep frying using various vegetable oils on acrylamide formation in sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) chips. **Journal of food science**, v. 79, n. 1, p. T115-21, jan. 2014.

LIU, C. et al. Effect of Preliminary Treatment by Pulsed Electric Fields and Blanching on the Quality of Fried Sweet Potato Chips. **Foods**, v. 12, n. 11, 1 jun. 2023.

LIU, D.-M.; CHEN, J.; SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 1 maio 2018.

LIYANAGE, D. W. K. et al. Processing strategies to decrease acrylamide formation, reducing sugars and free asparagine content in potato chips from three commercial cultivars. **Food Control**, v. 119, p. 107452, 1 jan. 2021.

LOCH, J. I.; JASKOLSKI, M. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity. **IUCrJ**, v. 8, n. 4, p. 514–531, 1 jul. 2021.

LÖFSTEDT, R. E. Science Communication and the Swedish Acrylamide “Alarm”. **Journal of Health Communication**, v. 8, n. 5, p. 407–432, set. 2003.

LUBKOWSKI, J.; WLODAWER, A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 14, p. 4183–4209, 19 jul. 2021.

LYU, J. et al. Covalent immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A on Fe₃O₄ nanoparticles by aldehyde tag: An ideal immobilization with minimal chemical modification. **Process Biochemistry**, v. 81, n. April 2018, p. 63–69, jun. 2019.

MATEO, C. et al. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 1 dez. 2000.

MATEO, C. et al. Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772–777, 1 maio 2003.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum*

(ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. April, p. 124–130, jul. 2017.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. **LWT**, v. 89, p. 32–37, 1 mar. 2018.

MESIAS, M. et al. Effect of consumer's decisions on acrylamide exposure during the preparation of French fries. Part 2: Color analysis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 154, p. 112321, ago. 2021.

MICHALAK, J. et al. Effect of Microwave Heating on the Acrylamide Formation in Foods. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4140, 10 set. 2020.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MOGOL, B. A.; HAMZALIOĞLU, A.; GÖKMEN, V. Mitigation of Acrylamide in Thermally Processed Foods. Em: **Comprehensive Foodomics**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 32–43.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015.

MOHAN, K. N. S. et al. Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-asparaginase Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 741–748, mar. 2014.

MOKHTAR, N. F. et al. The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. **Catalysts**, v. 10, n. 7, p. 744, 4 jul. 2020.

MONAJATI, M. et al. Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 354, p. 1153–1163, 15 dez. 2018.

MORI, Y. et al. Mechanism of reactive oxygen species generation and oxidative DNA damage induced by acryloylhydroxamic acid, a putative metabolite of acrylamide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 873, p. 503420, 1 jan. 2022.

MUSITA, C. N.; OKOTH, M. W.; ABONG', G. O. Postharvest Handling Practices and Perception of Potato Safety among Potato Traders in Nairobi, Kenya. **International Journal of Food Science**, v. 2019, p. 1–8, 28 abr. 2019.

MUTTUCUMARU, N. 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**, v. 220, p. 76–86, abr. 2017.

NAIK, R. R.; WANG, Y.; SELOMULYA, C. Improvements of plant protein functionalities by Maillard conjugation and Maillard reaction products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 25, p. 7036–7061, 1 set. 2022.

NEMATOLLAHI, A.; MOLLAKHALILI MEYBODI, N.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. An overview of the combination of emerging technologies with conventional methods to reduce acrylamide in different food products: Perspectives and future challenges. **Food Control**, v. 127, n. September 2020, p. 108144, set. 2021.

NGUYEN, K. H. et al. Formation and mitigation of acrylamide in oven baked vegetable fries. **Food Chemistry**, v. 386, p. 132764, 30 ago. 2022.

NOMA, S. A. A. et al. Preparation and characterization of amino and carboxyl functionalized core-shell Fe₃O₄/SiO₂ for L-asparaginase immobilization: A

comparison study. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 5, p. 392–404, 2 set. 2020.

NUNES, J. C. F. et al. L-Asparaginase-Based Biosensors. **Encyclopedia**, v. 1, n. 3, p. 848–858, 20 ago. 2021.

ONISHI, Y. et al. Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 783–789, 4 out. 2015.

OU, J. et al. Interaction of Acrylamide, Acrolein, and 5-Hydroxymethylfurfural with Amino Acids and DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 5039–5048, 6 maio 2020.

PARKER, J. K. et al. Kinetic Model for the Formation of Acrylamide during the Finish-Frying of Commercial French Fries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9321–9331, 12 set. 2012.

PASTORCZAK, A. et al. Asparagine synthetase (ASNS) gene polymorphism is associated with the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia by affecting early response to treatment. **Leukemia Research**, v. 38, n. 2, p. 180–183, fev. 2014.

PATEL, P. G. et al. Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 121, p. 529–541, 1 out. 2022.

PEKSA, A. et al. The Free-Amino-Acid Content in Six Potatoes Cultivars through Storage. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1322, 2 mar. 2021.

PSZCZÓŁKOWSKI, P. et al. The Impact of Effective Microorganisms on Flesh Color and Chemical Composition of Raw Potato Tubers. **Applied Sciences**, v. 11, n. 19, p. 8959, 26 set. 2021.

PUNDIR, C. S.; YADAV, N.; CHHILLAR, A. K. Occurrence, synthesis, toxicity and detection methods for acrylamide determination in processed foods with special reference to biosensors: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 211–225, 1 mar. 2019.

QIN, Y. et al. Nutrition-related health outcomes of sweet potato (*Ipomoea batatas*) consumption: A systematic review. **Food Bioscience**, v. 50, p. 102208, 1 dez. 2022.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RUFIÁN-HENARES, J. A.; PASTORIZA, S. Maillard Reaction. Em: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 593–600.

SADEGHI, R. et al. Eliminating protein interference when quantifying potato reducing sugars with the miniaturized Somogyi-Nelson assay. **Food Chemistry**, v. 373, n. PB, p. 131473, mar. 2022.

SAJITHA, S. et al. Cloning and expression of L-asparaginase from *E. coli* in eukaryotic expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 14–17, out. 2015.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R. E.; DHEWA, T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. **Food Production, Processing and Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 6, 6 dez. 2020.

SANSANO, M. et al. Effect of Pretreatments and Air-Frying, a Novel Technology, on Acrylamide Generation in Fried Potatoes. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. T1120–T1128, 13 maio 2015.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1–10, 1 abr. 2016.

SILVA, G. O. DA et al. Desempenho de cultivares nacionais de batata para produtividade de tubérculos. **Revista Ceres**, v. 61, n. 5, p. 752–752, out. 2014.

SINGH, A. et al. Methods of Enzyme Immobilization and Its Applications in Food Industry. Em: **Enzymes in Food Technology**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 103–124.

SINGH, Y. et al. Extracellular L-Asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of Antineoplastic Activity In Vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1759–1774, 1 dez. 2013.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2016. v. 79p. 179–211.

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

TALLURI, V. P. et al. L-Asparaginase delivery systems targeted to minimize its side-effects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 316, p. 102915, 1 jun. 2023.

TAREKE, E. et al. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4998–5006, 1 ago. 2002.

TORRES, R. et al. A Novel Heterofunctional Epoxy-Amino Sepabeads for a New Enzyme Immobilization Protocol: Immobilization-Stabilization of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 3, p. 1056–1060, 6 jun. 2003.

TUNDISI, L. L. et al. Two-Step Purification of L-Asparaginase from Acrylaway® L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 2022.

ULU, A.; ATES, B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1598–1610, 21 jun. 2017.

VARSHOSAZ, J.; ANVARI, N. Enhanced stability of L-asparaginase by its bioconjugation to poly(styrene-co-maleic acid) and Ecoflex nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 4, p. 466–472, 14 jun. 2018.

VIDYA, J. et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: An overview. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1775–1781, dez. 2017.

VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9–17, mar. 2017.

VIMAL, A.; KUMAR, A. L-asparaginase: Need for an Expedition from an Enzymatic Molecule to Antimicrobial Drug. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 9, 1 jan. 2022.

WANG, A. et al. A comparative metabolomics study of flavonoids in sweet potato with different flesh colors (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Food Chemistry**, v. 260, n. March, p. 124–134, set. 2018.

WANG, R. et al. Semi-permeable nanocapsules of konjac glucomannan–chitosan for enzyme immobilization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 102–107, 19 nov. 2008.

WANG, Y. et al. Effect of New Frying Technology on Starchy Food Quality. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1852, 11 ago. 2021.

WATZEK, N. et al. Profiling of mercapturic acids of acrolein and acrylamide in human urine after consumption of potato crisps*. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 12, p. 1825–1837, 27 dez. 2012.

WOLMANN, F. DA S. et al. Productivity of three sweet potato cultivars: BRS Amélia, BRS Cuia and BRS Rubissol. **Acta Agronómica**, v. 70, n. 3, 7 maio 2022.

XU, A. et al. Effects of Different Isolation Media on Structural and Functional Properties of Starches from Root Tubers of Purple, Yellow and White Sweet Potatoes. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2135, 24 ago. 2018.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M.-J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food chemistry**, v. 210, p. 163–71, 1 nov. 2016.

XU, Y. et al. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 1–12, jul. 2014.

YANG, J. et al. A Facile Route for Oriented Covalent Immobilization of Recombinant Protein A on Epoxy Agarose Gels: In Situ Generation of Heterofunctional Amino-Epoxy Supports. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 37, p. 10320–10324, 9 out. 2018.

YIN, G. et al. Association of acrylamide and glycidamide haemoglobin adduct levels with diabetes mellitus in the general population. **Environmental Pollution**, v. 277, p. 116816, 15 maio 2021.

ZAGHI, A. N. et al. Frying Process: From Conventional to Air Frying Technology. **Food Reviews International**, v. 35, n. 8, p. 763–777, 17 nov. 2019.

ZHANG, X. et al. Optimal spacer arm microenvironment for the immobilization of recombinant Protein A on heterofunctional amino-epoxy agarose supports. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 90–98, 1 abr. 2020.

ZHAO, M.; ZHANG, B.; DENG, L. The Mechanism of Acrylamide-Induced Neurotoxicity: Current Status and Future Perspectives. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 25 mar. 2022.

ZYZAK, D. V. et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4782–4787, 1 jul. 2003.