

TÍTULO: PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE L-ASPARAGINASE DE *Aliivibrio fischeri* COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ENZIMÁTICAS

AUTORES: BENTO, H. B. S.¹, PAIVA, G. B.¹, PEDROLI, D. B.¹, TAVARES, A. P. M.², SANTOS-EBINUMA, V. C.¹

INSTITUIÇÕES: ¹DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA, FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – UNESP, ARARAQUARA, SP (RODOVIA ARARAQUARA-JAÚ/KM01, (14801-902, ARARAQUARA– SP, BRAZIL); ²CICECO-AVEIRO INSTITUTE OF MATERIALS, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF AVEIRO, (3810-193 AVEIRO, PORTUGAL)

RESUMO:

A produção da enzima L-asparaginase (L-ASNase, E.C.3.5.1.1) apresenta próspero interesse industrial e comercial devido às suas aplicações nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Na área de alimentos, a crescente demanda por produtos isentos de acrilamida estimula a busca por novas rotas de produção de L-ASNase com elevada atividade e rendimento, uma vez que esta enzima atua na hidrólise da asparagina evitando sua conversão em acrilamida durante o processamento industrial. Os avanços da tecnologia de DNA recombinante permitem o uso da engenharia genética para possibilitar a síntese de novas proteínas com características de interesse industrial. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção heteróloga de L-ASNase de *Aliivibrio fischeri*. A enzima foi produzida de forma intracelular por *Bacillus subtilis* $\Delta 6$ (microrganismo classificado como GRAS, ideal para aplicação na indústria de alimentos) por cultivo submerso em shaker orbital a 30 °C, 200 rpm, 24 h. Após a clarificação do meio fermentado, realizou-se o rompimento celular por ultrassonicação. Posteriormente, o extrato enzimático foi caracterizado em função do pH de atuação e cinética em relação a concentração de substrato considerando a hidrólise de L-Asparagina como metodologia de quantificação de atividade enzimática. A amônia liberada na reação enzimática foi quantificada pelo método colorimétrico de Nessler. A atividade de glutaminase também foi determinada, obtendo-se uma atividade de 2,73 U.mL⁻¹. Os resultados indicaram que o extrato obtido apresentou atividade enzimática na hidrólise de asparagina em uma ampla faixa de pH (3,0-9,5) atingindo valores entre 3,32-3,46 U.mL⁻¹ na faixa ótima de atuação (pH 7,5-8,5). O estudo cinético em função da concentração do substrato indicou alta afinidade por L-Asparagina na faixa ótima de pH, apresentando $K_m = 6,1884 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $V_{m\acute{a}x} = 5,3969 \text{ } \mu\text{mol.min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ em pH 7,5. A atividade da L-ASNase foi estável a estocagem à 4 °C, -20 °C e -80 °C por 100 dias, retendo, aproximadamente, 62%, 95% e 98% da atividade inicial, respectivamente. Estes resultados indicam que a L-Asparaginase produzida possui potencial de aplicação na indústria de alimentos para mitigação da formação de acrilamida por meio da hidrólise da L-Asparagina presente, apresentando atividade enzimática em uma ampla faixa de pH, elevada afinidade pelo substrato Asparagina e satisfatória estabilidade de estocagem.

Palavras-chave: L-Asparaginase, cinética enzimática, *Aliivibrio fischeri*, *Bacillus subtilis*.

Agências de Fomento: FAPESP (2018/06908-8 e 2020/15513-7), CNPq (130614/2019-0). CICECO-Aveiro Institute of Materials, UIDB/50011/2020 & UIDP/50011/2020, Portuguese Foundation for Science and Technology/MCTES and by POCI-01-0145-FEDER-031268-funded by FEDER, through COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI), and by national funds (OE), through FCT/MCTES.