

Clonado y caracterización de una novedosa asparaginasa termófila. Estrategia enzimática para la mitigación de acrilamida en alimentos

Glodowsky, Alejandro P; Larrosa, Virginia J; Muchiutti, Gabriela S; Levin, Gustavo J.

Autores: Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER-CONICET) Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. (2820) Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: glevin@conicet.gov.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/wfu8keodz>

Resumen

La acrilamida (AA), una sustancia considerada como posible agente carcinogénico, se forma en alimentos ricos en almidón y conteniendo el aminoácido asparagina, cuando son sometidos a procesos de cocción a temperaturas superiores a 120 °C. Esta problemática ha generado advertencias de salud a nivel mundial. Sin embargo, se ha descubierto que la enzima l-Asparaginasa (l-ASNasa, EC 3.5.1.1) posee una notable eficacia en la inhibición de la acrilamida, ya que hidroliza su precursor, la l-asparagina.

En el contexto de este estudio, se logró identificar una variante de la ASNasa a partir de *Thermus oshimai*, una bacteria termófila aislada de los suelos antárticos. La enzima purificada mostró su máxima actividad a un pH de 10,0 y una temperatura de 80 °C, con una pérdida total de su actividad enzimática a 95 °C. Comparando con las papas fritas no tratadas, aquellas que fueron sometidas a un tratamiento enzimático (a una concentración de 1,49 U/ml, a una temperatura de 80 °C durante 60 minutos) experimentaron una reducción significativa del 60% en su contenido de acrilamida.

Además, se destacó que la ASNasa de *T. oshimai* mantuvo más del 90% de su actividad inicial después de tres meses de almacenamiento a 4 °C, lo que sugiere una notable estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Estos resultados respaldan la idea de que la ASNasa de *T. oshimai* podría ser una excelente opción para controlar la formación de acrilamida en la industria alimentaria, especialmente en procesos de alta temperatura, como el escaldado.

Introducción

El sector agroalimentario argentino cuenta con una valiosa abundancia de recursos naturales y una sólida modernización tecnológica. Sin embargo, para mejorar la producción e industrialización de alimentos, es esencial impulsar la innovación tecnológica y la capacitación de los trabajadores, con el fin de aumentar su competitividad. Dentro de esta mejora de productos, destacan aquellos que ofrecen un valor agregado, como los alimentos con procesos de diferenciación, como productos bajos en azúcar o sin gluten, aquellos adaptados a los patrones de consumo saludables y bajos en sodio, así como los alimentos funcionales, que pueden crear nuevos nichos de demanda. Estas mejoras no solo aumentan los beneficios de la producción, sino que también generan empleo y requieren inversiones tecnológicas por parte de las empresas.

Además, muchas actividades económicas cruciales para el desarrollo sostenible enfrentan desafíos que exigen soluciones sustentables. Por ejemplo, los procesos industriales a menudo requieren innovaciones para reducir el consumo de energía, aumentar la productividad y reducir la contaminación. El desarrollo de tecnologías innovadoras que abordan estas demandas es fundamental para el crecimiento sostenible y la competitividad de las industrias.

Una de las herramientas clave en la industria alimentaria para impulsar la diferenciación de productos, optimizar procesos y mejorar la calidad de los alimentos, así como avanzar hacia prácticas sostenibles, es el uso de enzimas.

En la actualidad, la producción de enzimas es una herramienta con un gran potencial para abordar las necesidades de la industria alimentaria, y su fabricación se ha convertido en una oportunidad estratégica para agregar valor. Se estima que el mercado global de enzimas industriales tuvo un volumen de 4.200 millones de dólares en 2014, con una tasa de crecimiento anual del 7%, alcanzando los 6.200 millones de dólares en 2020. El segmento de alimentos y bebidas domina este mercado, con un valor de 2.300 millones de dólares solo en ese año (Singh et al. 2016). Se espera que este mercado alcance los 8.700 millones de dólares en 2026, con una tasa de crecimiento anual del 6,5% durante el período de pronósticos (Markets y Markets (2020).

La búsqueda y clasificación sistemática de nuevas fuentes de enzimas con valor económico, conocida como bioprospección de enzimas, es esencial en las tecnologías emergentes y las biotecnologías relacionadas con los alimentos. Explorar el potencial biocatalítico de los microorganismos permite encontrar enzimas de interés industrial, como las asparaginastas termoresistentes, que son especialmente valiosas en el desarrollo de alimentos.

La L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) es una enzima producida por diversos microorganismos y algunas plantas, y su uso ha aumentado en la fabricación de alimentos. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la L-asparagina, lo que reduce eficazmente la formación de acrilamida, un contaminante químico que se produce de manera natural durante el procesamiento térmico de alimentos ampliamente consumidos (FAO/WHO, 2007). La acrilamida es neurotóxica y se ha relacionado con el cáncer en estudios con ratas. Organismos reguladores internacionales, como EFSA y FDA, reconocen la importancia de reducir los niveles de acrilamida en los alimentos, mientras que en Argentina aún no existen regulaciones en este sentido (IARC, 1994; EFSA 2015).

Esta investigación tiene como objetivo ampliar la oferta de enzimas termoresistentes aplicables a procesos industriales, especialmente en el tratamiento de papas fritas para prevenir la formación de acrilamida en los productos finales.

Materiales y Métodos

1. Obtención de extractos celulares. Selección cualitativa de los mejores productores de asparaginasa (ASNasa)

Se realizaron cultivos de la colección de cepas termófilas a antárticas en medio líquido R2A (Millipore), overnight (ON) a 80 °C. Se separaron por centrifugación a 8500 rpm por 10 min, los sobrenadantes de cultivo (**Sn**) y los pellet de microorganismos. Estos últimos, se sometieron a ruptura mecánica por sonicación de ultrasonido (Vibracell-Sonics) en condiciones de 80% de potencia, 10 seg de pulso y 5 seg de pausa. Posteriormente, se centrifugaron a 16000 rpm, 4 °C, durante 10 min, conservándose el sobrenadante (extracto celular, **ExCel**) y descartándose el pellet de restos celulares.

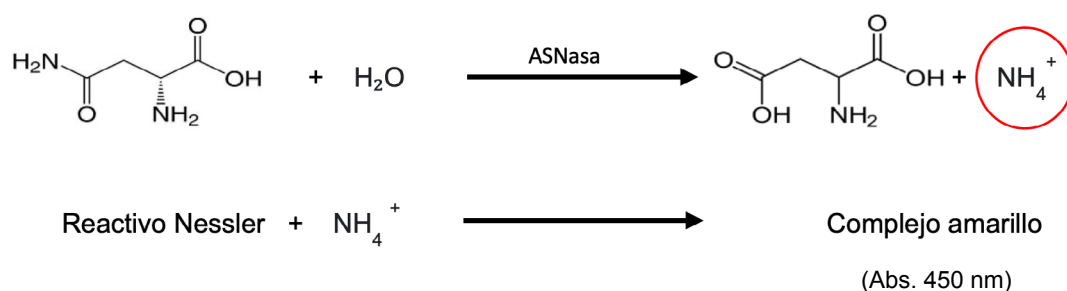
Tanto el Sn como el ExCel se utilizaron para evaluar la presencia de actividad asparaginasa mediante la reacción con el reactivo de Nessler. La actividad asparaginasa se indicó de manera cualitativa, de acuerdo a la cantidad de amonio liberado: incoloro (-), color amarillento tenue (+/-), color amarillo (+) y precipitación del reactivo de Nessler (++)

De las 32 cepas evaluadas, se detectaron 16 ExCel con actividad asparaginasa positiva (de "+" a "++"). No se detectó ningún Sn con actividad enzimática, lo que concluiría que ninguna de las cepas tiene la capacidad de exportar la enzima ASNasa.

La identificación por secuenciación del ARN 16s identificó a TCA 10-20 y TCA 10-21 como cepas de *Thermus oshimai* con un 99,98% de semejanza. Ambas cepas fueron seleccionadas para continuar los trabajos experimentales.

2. Actividad asparaginasa por reacción de Nessler

A partir de la liberación de amonio por hidrólisis enzimática de asparagina utilizando el reactivo de Nessler (K_2HgI_4), se cuantificaron las unidades de actividad enzimática en el extracto.



A 80 μ l de una solución de asparagina 10 mM en buffer fosfato (BP) se le adicionaron 120 μ l de una solución de extracto enzimático para alcanzar un volumen final de 200 μ l. Se incubó la reacción a 80°C por 30 min, y luego se detuvo con el agregado de 0,5 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) 110 mM. Se centrifugó por 5 min a 12000 rpm. A partir de 180 μ l del sobrenadante obtenido y 20 μ l de reactivo de Nessler, se procedió a medir la actividad de la enzima, siguiendo los pasos de la curva de calibración.

-Curva de calibración para reactivo de Nessler.

Utilizando placas de 96 wells se confeccionaron 10 puntos, en el rango de 0 a 1 mM de NH_4Cl , por triplicado. Se adicionó 20 μl de reactivo de Nessler y luego 180 μl de la solución de NH_4Cl correspondiente por wells. Luego de 10 min, se midió la absorbancia del complejo amarillento formado en 450 nm (EZ Read 800 Research-Biochrom).

3. Inducción del medio de cultivo para la sobreexpresión de asparaginasa

Se realizó un ensayo de inducción de actividad asparaginasa mediante el agregado de asparagina (asn) en el medio de cultivo. Para ello se preparó medio de cultivo R2A en concentración 2x y se lo diluyó por agregado de solución asparagina de concentración variable: 0; 0.1; 0.5; 1; 1.5%

Luego se realizaron cultivos de la cepa TCA 10-20 en medio R2A con asn en concentración final: 0; 0.05; 0.25; 0.5; 0.75%. Se midieron los valores de densidad óptica en 600 nm (DO_{600}) a 3,5 y 20 h (Figura 1A).

Luego del crecimiento de biomasa en los medios evaluados, las bacterias fueron cosechadas y lisadas para liberar las enzimas intracelulares. Posteriormente, los extractos resultantes fueron cuantificados en su actividad asparaginasa como se mencionó anteriormente (Figura 1B).

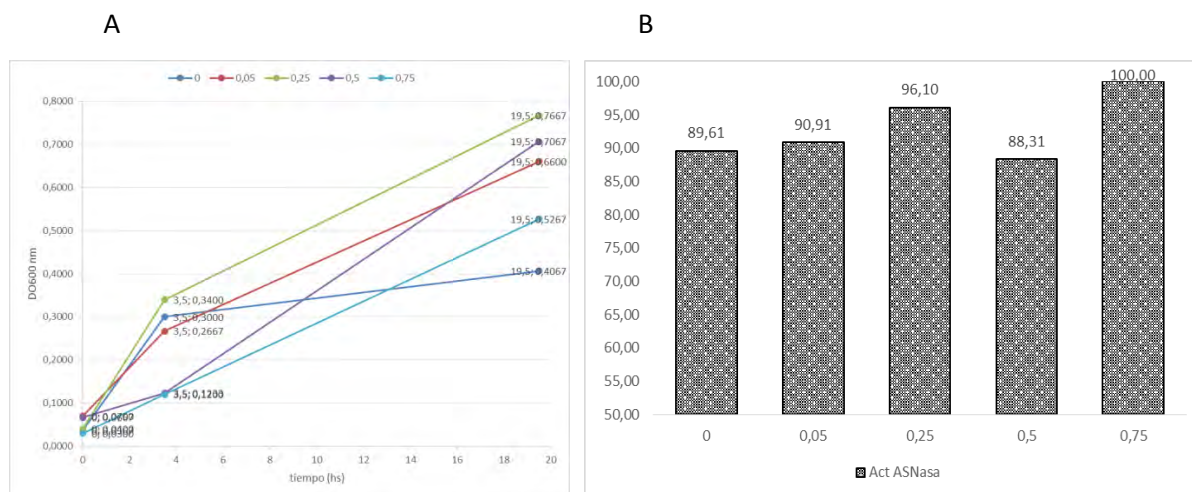


Fig. 1: A. Biomasa a 3,5 y 20 hs de los cultivos con concentraciones variables de asparagina. **B:** Actividad de ASNasa de los cultivos con concentraciones variables de asparagina

Finalmente, se concluyó que no hubo un incremento significativo en la actividad asparaginasa por agregado del aminoácido, pero sí un aumento en la DO, por lo que se estaría estimulando la producción de biomasa. A partir de estos resultados, se incorporó asparagina en las formulaciones del medio de cultivo R2A, en una concentración final de 0,25%.

4. Cinética de crecimiento microbiano

Se realizó una cinética de crecimiento microbiano para determinar la velocidad específica (μ_{max}). El cultivo tipo batch se realizó en 1.0 Lt de R2A a 80 °C, 500 rpm de agitación y 0,4 l/min de aireación (Labfors5-INFORS HT). El mismo se suplemento con

asparagina 0,25% (concentración final) a modo de inductor. Se inoculó con 10 ml de un pre-cultivo de la cepa TCA 10-20. En la Figura 2AI se muestra la curva de crecimiento celular de forma sigmoidea, a partir de la cual se construyó la linearización logarítmica en función del tiempo y se determinó el μ_{max} en 0,444 h⁻¹ (Figura 2AII).

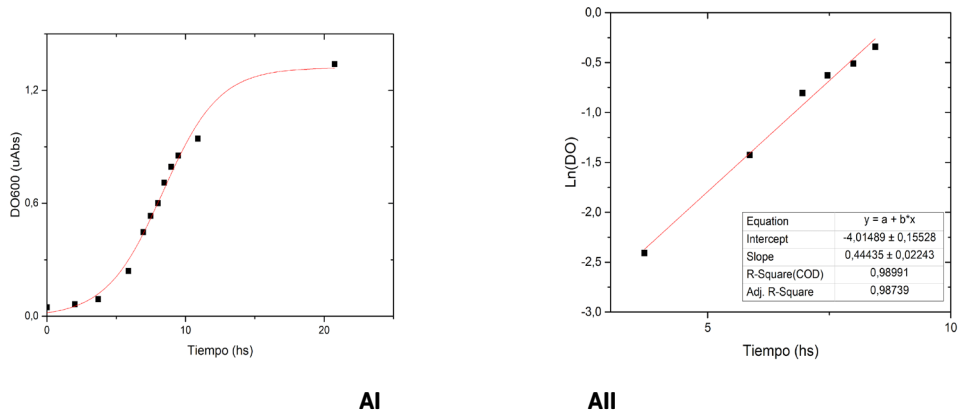


Fig. 2: Cinética de crecimiento TCA 10-20

AI) Cinética de crecimiento microbiano de la cepa TCA 10-20. **AII)** Linearización de la región exponencial para el cálculo de μ_{max}

A partir de estos datos, se realizaron dos ajustes según Zwietering y col, para el cálculo de la μ_{max} en estas condiciones obteniendo un valor de $0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ (Figura 2B). Así mismo, se determinó la fase lag (λ) en $3,59 \pm 0,21 \text{ h}$.

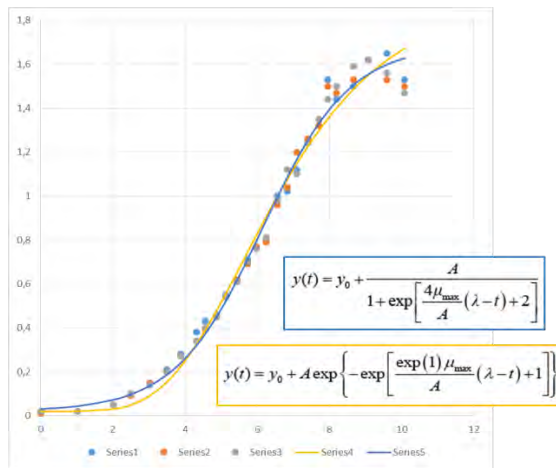


Fig. 2B: Cinética de crecimiento TCA 10-21

Cinética de crecimiento microbiano de la cepa TCA 10-21 con ajuste a dos modelos de curvas sigmoideas

5. Producción y purificación de ASNasa

Se obtuvo el pellet de un cultivo de 200 ml del microorganismo crecido a 80 °C y posteriormente se lisó mediante ultrasonido en un volumen final de 10 mL. Se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C, recuperándose el sobrenadante. Se comprobó la actividad asparaginasa del extracto, por el método de Nessler, con un valor de 1,49 U/ml y su contenido proteico en 11,53 mg/ml, según el método de Bradford (Bradford,1976).

- Precipitación con sulfato de amonio.

Para recuperar la enzima por *salting-out*, el extracto enzimático fue sometido a fraccionamiento en cinco etapas, a saber, 20, 35, 45, 65 y 80% p/v saturación de sulfato de amonio. Al extracto crudo de ASNasa se agregó sulfato de amonio hasta una concentración 20% p/v. Después se incubó la mezcla a 4 °C por 30 min. El precipitado se recuperó por centrifugación a 12000 rpm durante 15 min a 4°C.

Posteriormente, se adicionó el sulfato de amonio para llevar la concentración hasta 35 % p/v, repitiendo los pasos de separación del precipitado. Consecutivamente, se completó el protocolo hasta una concentración de 80% p/v de sulfato de amonio. Estas precipitaciones escalonadas fueron referidas como los “cortes” de sulfato de amonio. Las cantidades de sulfato de amonio sólido fueron añadidos lentamente a un volumen conocido para obtener el porcentaje de saturación deseado. El precipitado de cada concentración se disolvió en buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0 y se utilizaron concentradores de membrana (Centricon 10 kDa MWCO-GE-Healthcare) para eliminar el exceso de sulfato de amonio por centrifugación a 8500 rpm. Se comprobó que la mayor de actividad ASNasa se encuentra en las fracciones de 45 y 65% (Figura 3).

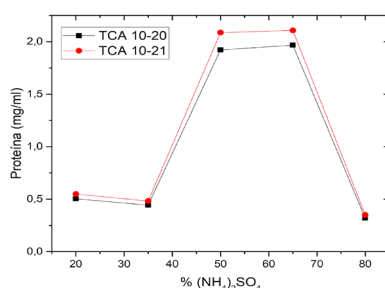


Fig. 3: Salting-out extracto crudo con ASNasa. Actividad ASNasa de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

- Purificación de asparaginasa por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

El precipitado obtenido con sulfato de amonio al 65% se resuspendió en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 conteniendo sulfato de amonio 1.0 M. Se dejó en agitación a 4 °C durante 30 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min, para descartar proteínas precipitadas. El sobrenadante se recuperó, se filtró con filtros de 0,45 µm y se desarrolló la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

Se cargó una alícuota de 2 ml de sobrenadante en una columna HiTrap Fenil FF (GE-Healthcare, Suecia), previamente equilibrada con buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, sulfato de amonio 1.0 M.

Las proteínas que no interactuaron con la fase estacionaria fueron lavadas con el mismo buffer. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente de agua, en un flujo de 1.0 ml/min. Se midió la absorbancia en 280 nm en todo el proceso.

Se recuperaron dos fracciones: la primera, que no interactúa con la matriz y otra de menor tamaño, que es retenida. Ambas fracciones fueron colectadas, dializadas ON a 4 °C con membranas de celulosa (MWCO 12.000) (Sigma, St. Louis, EEUU) en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, para su posterior determinación de actividad ASNasa (Figura 4).

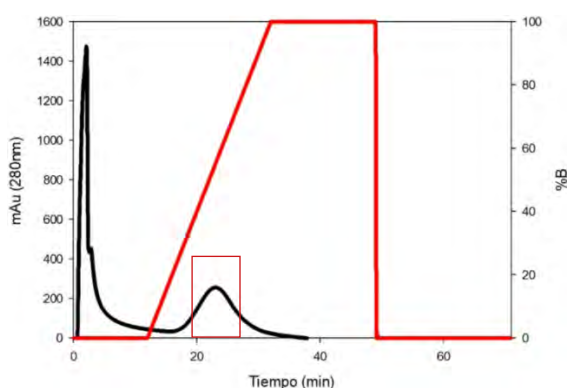


Fig. 4: Cromatografía HIC de extracto enzimático. Fracción con actividad ASNasa (recuadro rojo) .

El factor de purificación de la HIC respecto de la muestra inicial (Mo) proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio fue de 7,43 (Tabla 1).

Tabla 1: cuadro de purificación de asparaginasa termófila de TCA 10-21

Paso	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Mo	350,35	0,26	1,00	1,00
HIC	171,61	1,91	0,49	7,43

6. Caracterización de asparaginasa de *T. oshimai*

- Efecto de la temperatura

La temperatura óptima de reacción de ASNasa fue estudiada a 4, 20, 37, 60, 80 95°C. La actividad enzimática se determinó por reacción de Nessler como se describió anteriormente. La actividad ASNasa relativa (%) se calculó utilizando la actividad más alta obtenida como del 100%.

Como se muestra en la Figura 5, en las cepas de *T. oshimai* se alcanzó el máximo de actividad a 80 °C, con una pérdida total de la misma a los 95 °C. Por su parte, la enzima procedente de un microorganismo mesófilo como *E. coli*, mostró el valor máximo de actividad en torno a los 50 °C.

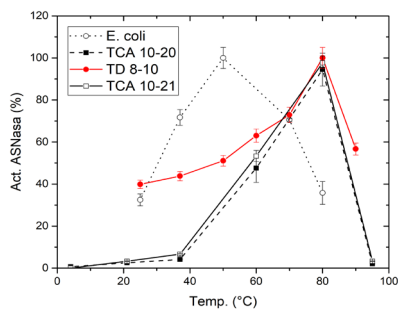


Fig. 5: Temperatura óptima de reacción de ASNasa. Cepas TD 8-10, TCA 10-20 y TCA 10-21 termófilas y ASNasa de *E. coli*.

- Efecto del pH

El pH óptimo de reacción de la enzima se determinó desarrollando la reacción en valores de pH que varían de 4,0 a 11,0. Para ello se utilizaron buffer acetato de sodio 100 mM para pH 4,0 y 5,0, fosfato de sodio 100 mM para pH 6,0 y 7,0, buffer Tris-HCl 100 mM para pH 8,0 y 9,0 y carbonato de sodio 100 mM para pH 10,0 y 11,0.

La cinética de la reacción en cada pH fue evaluada por actividad de ASNasa durante 1 h a 80 °C, según el protocolo antes descripto.

Como resultado se observó una máxima actividad ASNasa a valores de pH cercanos a 10 (Figura 6). Sin embargo, se evidenció un incremento/meseta de actividad próximo a pH 8. Este comportamiento podría indicar la presencia de dos isoformas de la enzima, siendo la curva total una superposición de actividades de cada una de ellas.

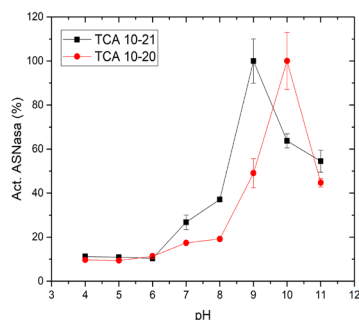


Fig. 6: pH óptimo de reacción para ASNasa de cepas TCA 10-20 y TCA 10-21.

Según el análisis filogenético, el microorganismo más relacionado a *Thermus oshimai*, cuya enzima ASNasa se encuentra reportada, es quizás *Thermus thermophilus* (Pritsa, y Kyriakidis, 2001). La caracterización enzimática de acuerdo a Prista y col; determinó que la condición óptima de reacción es pH 9,2 y 77 °C, condiciones similares a las determinadas en este trabajo (pH 9 y 80 °C). Por otra parte, los autores del trabajo referenciado no hacen mención a la presencia de isoformas, estimando el peso molecular de la enzima, mediante SDS-PAGE, en 33 kDa.

7. Identificación y cuantificación de acrilamida por HPLC

- Detección de acrilamida por HPLC.

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta performance acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA Waters Inc.) para la detección de acrilamida. Como fase estacionaria se utilizó una columna C18 y como fase móvil agua con H₂SO₄ 10 mM. La longitud de onda utilizada fue 196 nm. Las muestras fueron analizadas en HPLC durante un período de 8 minutos.

- Extracción de acrilamida con soluciones de Carrez.

Se añadió 10 mL de hexano a 1 g de papa frita molida y se colocó en agitación durante 10 min. Se descartó la fase orgánica y el triturado se secó durante 10 min a 40 °C. Posteriormente, se adicionó 10 mL de agua destilada, y de manera secuencial, 500 µL de las soluciones Carrez I y Carrez II (hexacianoferrato de potasio y sulfato de zinc, respectivamente). Se incubó a 30 °C durante 30 min con agitación suave y se centrifugó durante 20 min a 10000 rpm a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante de la fase acuosa y se filtró con filtro de 0,45 µm. El filtrado se guardó en refrigeración hasta su posterior análisis.

8. Tratamiento enzimático de los alimentos. Aplicación de asparaginasa para disminuir la formación de acrilamida

Para evaluar la capacidad mitigadora en la formación de acrilamida por parte del extracto enriquecido en actividad ASNasa, fue necesario estandarizar un protocolo de cocción de papas que asegure la formación del contaminante. A su vez, se necesitó adecuar un método de extracción y detección. Luego de la puesta a punto de estos tres factores, se procedió a los ensayos de mitigación.

Se utilizó el extracto enriquecido como aditivo previo a la cocción de una muestra de papas. Se realizaron extracciones de acrilamida y se cuantificaron por HPLC a fin de evaluar la eficiencia del tratamiento.

- Evaluación de la liberación de amonio.

Se cortaron papas crudas en cubos de 1 cm³ y 1 g aproximadamente. Se colocaron en un recipiente de vidrio, 5 ml de solución buffer carbonato de sodio 100 mM, pH 10,0, al cual se agregaron 20 µl de extracto enzimático enriquecido cada 60 mg de papa. Se incubaron durante 1 h a 80 °C. Se realizó un control de papa sin extracto y otro de extracto sin papa. Luego de la incubación se tomó una alícuota de sobrenadante y se evaluó la cantidad de amonio liberado al medio por el método de Nessler.

De acuerdo a la Figura 7, se observó un aumento del 60% en la concentración de amonio liberado mediante hidrólisis enzimática de la asparagina cuando las papas fueron expuestas a los extractos con asparaginasa. Los resultados se compararon con la cantidad de amonio liberado por las papas que no recibieron tratamiento alguno. Por su parte, los extractos enzimáticos no revelaron cantidades significativas de amonio en las condiciones evaluadas mediante el método de Nessler.

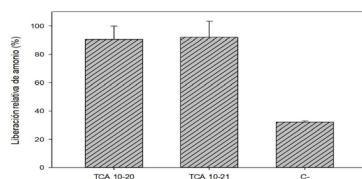


Fig. 7: Actividad ASNasa sobre papas previo a la cocción.

El análisis de los cromatogramas obtenidos por HPLC, determinó que la metodología extractiva de acrilamida utilizando las soluciones de Carrez fue eficaz y reproducible, mostrando señales definidas y con bajas concentraciones de compuestos co-extraíbles. Para validar la presencia de acrilamida, se realizó una prueba adicional utilizando una muestra de papas fritas tratadas con las soluciones de Carrez (M5), a la cual se le añadieron 20 ppm de patrón de acrilamida en una relación 50:50. Este experimento reveló una disminución en la intensidad de los otros picos del cromatograma, debido a la dilución de la muestra, como se ilustra en las Figuras 8 A-D.

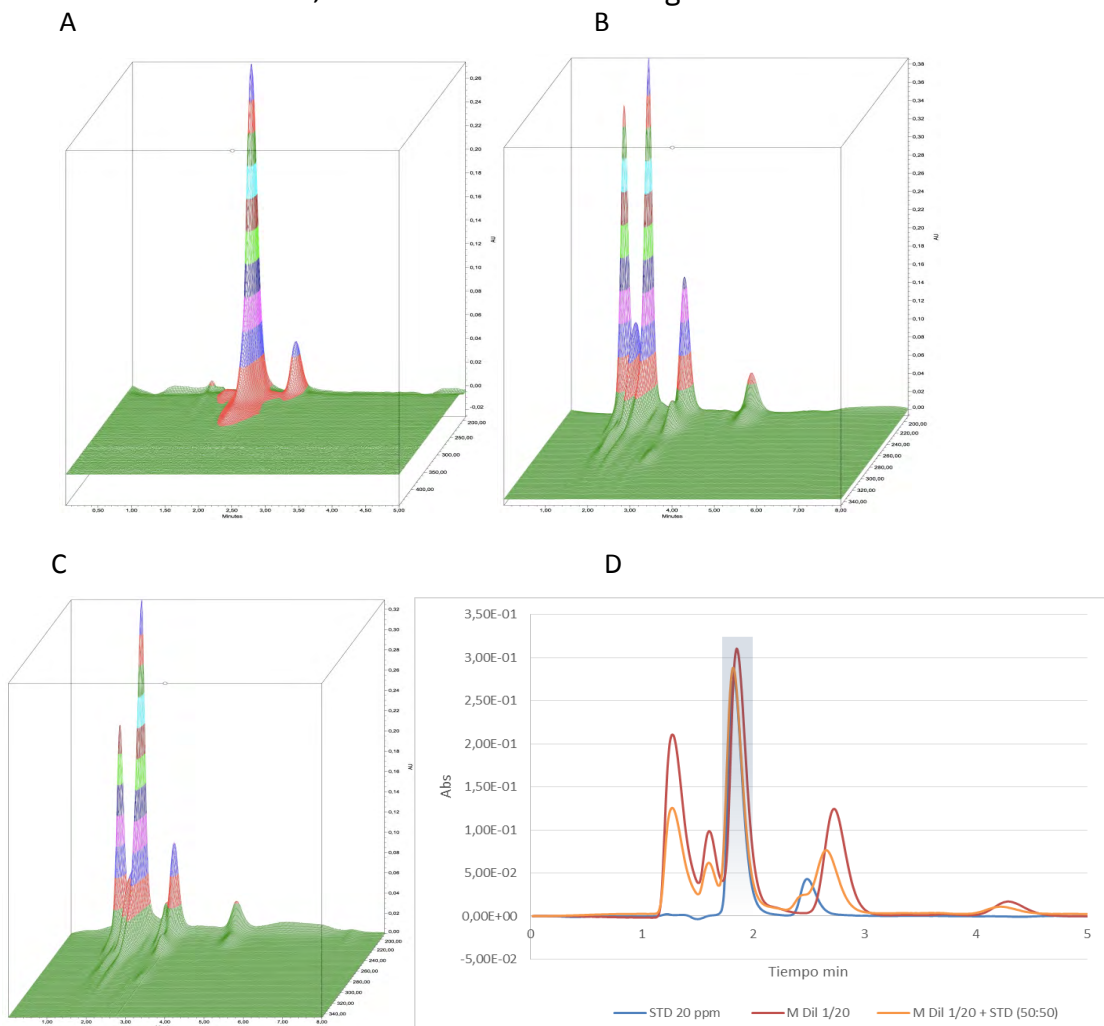


Fig. 8: Cromatogramas 3D. **A)** Estándar acrilamida 20 ppm. **B)** Muestra papas con extracción Carrez (M2). **C)** Muestra papas con extracción Carrez (M2) + acrilamida 20 ppm (50:50). **D)** Solapamiento bidimensional de los 3 cromatogramas.

- Evaluación de la acrilamida por HPLC

Se tomaron papas adquiridas en una verdulería de la ciudad de Gualeguaychú y se cortaron en cubos de 1 cm³ y 1 g aproximadamente. Estos cubos fueron lavados meticulosamente con agua destilada antes de someterse a diversos tratamientos pre-cocción a 80 °C. Para estudiar la influencia del proceso previo a la fritura en la formación de acrilamida se realizó una pre-incubación con y sin un extracto enzimático de asparaginasa termófila, durante una hora. A temperatura ambiente y a 80 °C. En el caso de las muestras incubadas con el extracto enzimático fue con una concentración de 1,49 U/mL. La temperatura de pre-cocción corresponde a la temperatura de mayor actividad de la enzima. Posteriormente, los cubos de papas fueron sometidos a un proceso de fritura a una temperatura de 160 °C y dos tiempos (2 y 5 min), con la excepción de una muestra control que se mantuvo sin cocinar. Una vez finalizada la fritura, las muestras se secaron minuciosamente utilizando papel absorbente, se molieron finamente, utilizando un molinillo de cuchillas y se aplicó el protocolo de extracción de acrilamida utilizando las soluciones de Carrez (M5).

Los tratamientos estudiados en las papas fueron:

- **M1**, papa cruda sin ASNasa;
- **M2**, papa incubada por 1 h a 80 °C sin ASNasa; luego freída durante 2 min - 160 °C.
- **M3**, papa incubada por 1 h a T amb. sin ASNasa; luego freída durante 2 min - 160 °C.
- **M4**, papa incubada por 1 h a T amb. sin ASNasa; luego freída durante 5 min - 160 °C.
- **M5**, papa incubada por 1 h a 80 °C con 1,0265 U de ASNasa; luego freída durante 2 min - 160 °C.

Los resultados revelaron hallazgos interesantes. En primer lugar, se evidenció que el tiempo de fritura tuvo un impacto significativo en la formación de acrilamida. Cuando las papas se frieron durante 5 minutos (M4) en comparación con solo 2 minutos (M2, M3), se registró un aumento notable superior al 100% en los niveles de acrilamida. Este hallazgo destacó la importancia del control preciso del tiempo de fritura para limitar la exposición a este compuesto potencialmente dañino.

En cuanto a pre-incubación de los cubos de papas sin el extracto enzimático de asparaginasa termófila, M2 y M3, se evidenció una disminución cercana al 25% en la formación de acrilamida. Se sugiere que esto podría estar relacionado con la hidrólisis espontánea de asparagina, un aminoácido presente en las papas que es un precursor clave de la acrilamida, bajo estas condiciones de temperatura elevada.

Por otro lado, se investigó el impacto de la enzima ASNasa termófila en la reducción de la formación de acrilamida. Los resultados mostraron una impresionante reducción, siendo superior al 50% en los niveles de acrilamida en las papas tratadas con esta enzima (M5). Esto sugiere que la ASNasa termófila desempeña un papel crucial en la mitigación de los riesgos asociados con la acrilamida en alimentos procesados, ofreciendo una posible solución para la industria de la alimentación (Figura 9).

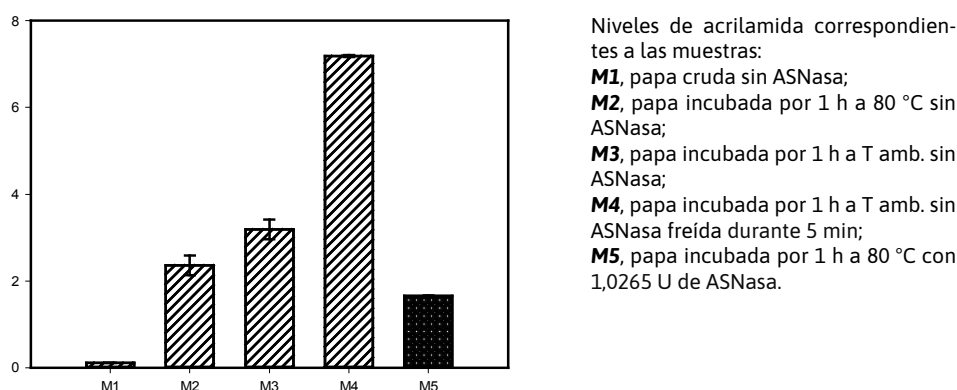


Fig. 9: Niveles de acrilamida en distintos tratamientos de papas.

Los resultados representados en la Figura 9, ofrecen una comprensión más profunda acerca de cómo las variables del tiempo de cocción y la pre-incubación pueden ejercer una influencia considerable en la generación de acrilamida, y al mismo tiempo, destacando cómo la intervención de las enzimas pueden contribuir a disminuir su formación. Estos conocimientos resultan fundamentales para la formulación de estrategias eficaces destinadas al control de la acrilamida y para la mejora de la seguridad alimentaria en beneficio de los consumidores.

7. Referencias:

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1994). Some industrial chemicals. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 60: 389–91.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, & World Health Organization. (2007). *Compendium of food additive specifications (Vol. 4)*. Food & Agriculture Org.
- Markets and Markets (2020) *Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other Types), Source, Application (Food & Beverages, Feed, Bioethanol, Detergents, Pulp & Paper, Textiles & Leather, Wastewater Treatment, Other Applications), Form, and Region - Global Forecast to 2026*.
- Pritsa, A. A., & Kyriakidis, D. A. (2001). L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Molecular and cellular Biochemistry*, 216, 93-101.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., and Mehta, P. K. (2016). *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century*. 3 *Biotech*, 6: 174.
- Zwietering, M. H; Jongenburger, I; Rombouts, F. M; Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*; 56(6): 1875-81.

PID 9114 Denominación del Proyecto

Clonado y caracterización de una novedosa asparaginasa termófila. Estrategia enzimática para la mitigación de acrilamida en alimentos

Director

Levin, Gustavo Javier

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Bromatología

Contacto

glevin@conicet.gov.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Biología Alimentaria

Integrantes del proyecto

Docentes: Larrosa, Virginia Judit. Glodowsky, Alejandro Pablo. Muchiutti, Gabriela Silvana. Piaggio, Mercedes Carolina. Procura, Francisco

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

02/03/2020 y 22/01/2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 207/24 (26-04-2024)