UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JORGE JAVIER MUSO CACHUMBA

Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Lorena – SP

2017

JORGE JAVIER MUSO CACHUMBA

Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Maio, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Muso Cachumba, Jorge Javier

Produção de L-asparaginase extracelular por
fermentação em estado sólido / Jorge Javier Muso
Cachumba; orientador Silvio Silvério da Silva - ed.
reimp., corr. - Lorena, 2017.
124 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. L-asparaginase. 2. *Aspergillus terreus*. 3.
Fermentação em estado sólido. 4. Desenho de
experimentos. 5. Reator em coluna de leito fixo. I.
Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

*À Deus e minha Lolita
pelas suas bênçãos em cada um dos meus passos.
A meus pais Anita e Jorge
por seu incansável amor e porque sempre confiaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e minha Mãe Lolita, pelo presente da vida, pelas suas bênçãos, porque nunca soltaram minha mão e me cuidaram sempre.

A meus pais, Anita e Jorge, por sua confiança em mim, por seu apoio incondicional, pelo seu sacrifício diário e seu infinito amor.

A meus irmãos Erik e Cami, por ser o motor da minha vida, por ser o motivo e a inspiração que precisei para atingir este objetivo. A Grace por seu apoio emocional o qual foi fundamental, porque sempre me ajudou a continuar e por compartilhar minhas alegrias e tristezas durante todo este caminho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva, primeiramente pela sua confiança em mim desde o primeiro contato, pelo seu apoio e orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho, por todos os conhecimentos que me entregou desinteressadamente e pelas oportunidades que contribuíram enormemente na minha formação e crescimento como profissional e pesquisador. Seu labor como professor e pesquisador é sem dúvidas um grande exemplo para nós, seus alunos.

Ao Prof. Dr. Júlio César dos Santos, por seu tempo e ajuda durante o transcorrer de todo o trabalho, por suas ideias que acrescentaram qualidade a este estudo e sobretudo por sua paciência e disponibilidade que sempre teve para ajudar com os problemas e surgiram.

Ao Felipe, Larissa e Ruly, por sua desinteressada e infinita ajuda desde o primeiro momento que cheguei no Brasil, porque sempre me ofereceram seus amplos conhecimentos quando precisei e sobretudo pela sua amizade. Tenho certeza que sem eles do meu lado este trabalho não teria sido possível.

Aos meus colegas do laboratório, Gilda, Rafael, Sabrina, Adriana, Guilherme, Matheus, Paulo, Lucas, Juliana, Michelle, Sara, Júlia, Vere, Leticia, Vanessa, Maki, Fulvia, Vini, pelos sorrisos, experiencias e bons momentos que tivemos durante estes dois anos, especialmente pela sua amizade, sempre me senti um brasileiro mais entre vocês. De maneira especial a Gabi, pela sua ajuda nos experimentos e por ser a melhor aluna de IC que pude encontrar, sua alegria é única.

A meus irmãos, companheiros de república, Guilherme, Andrés, João, Diego, Matheus, Vinicius e Itzco pela convivência diária e por ser meu lar em Lorena, por todas as experiências boas e nem tanto e porque sempre que precisei estiveram presentes. Obrigado por tudo.

A todos meus amigos debiquianos “moranguetes” do Brasil e “do mundo”, porque fizeram meu dia a dia único, por todas as incríveis e inesquecíveis experiências que levo comigo, por ter a paciência para me suportar estes dois anos e porque definitivamente graças a vocês estar longe da minha família foi muito mais simples. Em mim vocês têm um amigo para a vida toda, tenho certeza que o destino e a vida nos encontrarão de novo.

As famílias jundiaenses, que agora considero minha família no Brasil, por me permitir formar parte de vocês, por sua amabilidade, generosidade e carinho e porque sempre me receberam com os braços abertos. Vocês me mostraram como o povo brasileiro é receptivo e legal. Obrigado por tudo.

À CAPES, CNPq, Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello, pela ajuda financeira e logística no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

MUSO-CACHUMBA, J. J. **Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido**. 2017. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

A L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é a enzima responsável pela hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia, sendo utilizada como agente antitumoral e também para reduzir o conteúdo de acrilamida, composto neurotóxico e carcinogênico, presente em certos alimentos processados a altas temperaturas. Atualmente, o número de trabalhos referentes à produção de L-asparaginase por leveduras e fungos é limitado, principalmente quanto à produção da enzima de forma extracelular em fermentação em estado sólido (FES). Assim, o presente trabalho visou avaliar a produção de L-asparaginase extracelular por FES utilizando fungos e leveduras. Foi avaliado um grupo de 10 cepas de microrganismos como potenciais produtores de L-asparaginase extracelular. Na FES empregou-se o bagaço de cana-de-açúcar (80% de umidade relativa) como suporte suplementado com meio Czapek-Dox modificado e essas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL a 30 °C por 72 horas para leveduras e 96 horas para o fungo *A. terreus*. A atividade enzimática foi determinada pela metodologia do hidroxamato e confirmada por testes de cromatografia em camada delgada. Após a seleção dos microrganismos produtores de L-asparaginase extracelular, foi testada a influência de diferentes fontes de carbono, fontes de nitrogênio, pH, tamanhos de partícula e temperaturas na produção de L-asparaginase extracelular por FES utilizando um arranjo ortogonal Taguchi L'_{16} . Após essa etapa de seleção das variáveis foram realizados ensaios visando a otimização do processo, avaliando o efeito da concentração da fonte de carbono e nitrogênio por planejamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 . Finalmente, e com as melhores condições, avaliou-se a produção de L-asparaginase em reator em coluna de leito fixo com volume de 180 mL. Dos microrganismos testados na etapa de seleção, o fungo filamentoso *Aspergillus terreus* CCT7693 demonstrou resultados positivos de atividade asparaginolítica, sendo este selecionado para os experimentos posteriores. De acordo com o arranjo ortogonal Taguchi L'_{16} , a maior produção de L-asparaginase extracelular ($112,57 \pm 13,65$ U/L) foi obtida quando a maltose foi utilizada como fonte de carbono; a glutamina como fonte de nitrogênio (indutor); pH de 5,5; tamanho de partícula inferior a 0,850 mm e temperatura de 25 °C. No DCCR foram determinadas como condições otimizadas uma concentração de amido de 0,54%; ausência de maltose; concentração de L-asparagina de 0,44% e concentração de L-glutamina de 1,14%, obtendo-se uma atividade L-asparaginase máxima de $120,732 \pm 16,77$ U/L atingindo uma produção 7,39 vezes superior àquela obtida inicialmente ($16,34 \pm 3,28$ U/L). Na etapa de produção da enzima em reator em coluna de leito fixo obteve-se uma atividade enzimática máxima total de 105,3 U/L demonstrando que este novo modo de produção utilizado foi eficaz. Assim, o presente trabalho permitiu avaliar aspectos relacionados com as condições de cultivo e selecionar o fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 como microrganismo produtor de L-asparaginase extracelular por FES, abrindo perspectivas para explorar este sistema visando aumento de escala de produção.

Palavras-chave: L-asparaginase. *Aspergillus terreus*. Fermentação em estado sólido. Otimização. Desenho de experimentos. Reator em coluna de leito fixo.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq, CAPES, Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello.

ABSTRACT

MUSO-CACHUMBA, J. J. **Production of extracellular L-asparaginase by solid-state fermentation.** 2017. 124 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) is the enzyme that hydrolyses L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia. It can be used as a chemotherapeutic agent and also to reduce acrylamide concentration, a neurotoxic and carcinogenic compound, present in certain foods processed at high temperatures. Currently, the amount of works related to L-asparaginase production by yeast and fungi is limited, mainly when it comes to extracellular enzyme production under solid-state fermentation (SSF). Thus, the present work aimed to evaluate the production of extracellular L-asparaginase by SSF using fungi and yeasts. The potential to produce extracellular L-asparaginase was evaluated within a group of 10 strains of microorganisms. In the SSF, sugarcane bagasse (80% relative humidity) was used as support, supplemented with modified Czapek-Dox medium, and the fermentations were done in 50 mL-Erlenmeyer flasks at 30 °C, for 72 hours for yeasts and 96 hours for *A. terreus* fungus. The enzymatic activity was determined by hydroxamate methodology and confirmed by thin-layer chromatography. After the selection of the extracellular L-asparaginase producing microorganisms, the influence of different carbon and nitrogen sources (inductor), pH, particle sizes and temperatures was tested for the extracellular L-asparaginase production by SSF, using a Taguchi L₁₆ orthogonal array. After this initial screening of variables stage, assays aiming at optimizing the process were performed, evaluating the effect of carbon and nitrogen source concentration by central composite design 2⁴ (CCD). With the best conditions, the production of L-asparaginase was assayed in a fixed-bed column reactor with a volume of 180 mL. Among the microorganisms tested in the selection stage, only the filamentous fungus *Aspergillus terreus* CCT7693 showed positive results for asparaginolytic activity, and it was selected for the later experiments. According to orthogonal array Taguchi L₁₆, the highest production of extracellular L-asparaginase (112.57 ± 13.65 U/L) was obtained when maltose was used as carbon source; L-glutamine as nitrogen source (inductor); pH 5.5; particle size less than 0.850 mm and temperature of 25 °C. Through CCD, the optimized conditions were set as: 0.54% starch concentration; absence of maltose; 0.44% L-asparagine concentration and 1.14% L-glutamine concentration. The maximum L-asparaginase activity obtained was 120.723 ± 16.77 U/L, reaching a production 7.39 folds higher than an obtained initially (16.34 ± 3.28 U/L). In the stage of enzyme production in a fixed-bed reactor, a total enzymatic activity of 105.3 U/L was obtained, which indicates that the new production mode was efficient. Thus, the present work allowed to evaluate aspects related to the culture conditions and to select the fungus *Aspergillus terreus* as a microorganism producer of extracellular L-asparaginase by FES, opening perspectives to explore this system, aiming at increasing scale production.

Keywords: L-asparaginase. *Aspergillus terreus*. Solid-state fermentation. Optimization. Design of experiment. Fixed-bed column reactor.

Acknowledgments: FAPESP, CNPq, CAPES, Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG), Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA PROTEICA DAS ENZIMAS.....	22
FIGURA 2 – MECANISMO GERAL DA REAÇÃO CATALISADA PELA L-ASPARAGINASE	27
FIGURA 3 – ESQUEMA DOS DIFERENTES MECANISMOS DE REAÇÃO DA L-ASPARAGINASE	28
FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS AMINOÁCIDOS L-ASPARAGINA E L-GLUTAMINA	29
FIGURA 5 – ESQUEMA DA AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DA L-ASPARAGINASE	31
FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ACRILAMIDA	34
FIGURA 7 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA ACRILAMIDA A PARTIR DA L-ASPARAGINA VIA REAÇÃO DE MAILLARD	37
FIGURA 8 – CLASSIFICAÇÃO GERAL MISTA DOS BIORREATORES	51
FIGURA 9 – ESQUEMA DE UM REATOR EM COLUNA EM ESCALA DE LABORATÓRIO.	52
FIGURA 10 – ESQUEMA DO REATOR ESTÉRIL EM COLUNA EM ESCALA DE LABORATÓRIO	53
FIGURA 11 – ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FIXO EM ESCALA DE LABORATÓRIO	54
FIGURA 12 – ESQUEMA DO BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO EM ESCALA DE LABORATÓRIO	55
FIGURA 13 – ESQUEMA DO BIORREATOR DE TAMBOR PERFURADO EM ESCALA DE LABORATÓRIO	56
FIGURA 14 – ESQUEMA DO BIORREATOR DE TAMBOR MISTURADOR DE PALETA HORIZONTAL EM ESCALA DE LABORATÓRIO	56
FIGURA 15 – ESQUEMA DO BIORREATOR COLUNA-BANDEJA EM ESCALA DE LABORATÓRIO	57
FIGURA 16 – A. ESQUEMA DO BIORREATOR BANDEJA DE KOJI OPERANDO EM ESCALA INDUSTRIAL. B. REATOR EM BANDEJA COM FLUXO DE AR	58
FIGURA 17 – ESQUEMA GERAL DO REATOR DE LEITO EMPACOTADO COM AGITAÇÃO INTERMITENTE E AERAÇÃO FORÇADA.....	59
FIGURA 18 – ESQUEMA DO REATOR DE LEITO FLUIDIZADO A ESCALA INDUSTRIAL	60
FIGURA 19 – ASPECTO MICROSCÓPICO: CONÍDIOS E CONIDIÓFORO DE ASPERGILLUS TERREUS.....	62
FIGURA 20 – FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES EXPERIMENTAIS REALIZADAS PARA ESTUDO DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	77
FIGURA 21 – GRÁFICO DA RELAÇÃO SINAL/RUÍDO (S/R) PARA OS CINCO FATORES (FONTE DE CARBONO; FONTE DE NITROGÊNIO (INDUTOR); pH; TAMANHO DE PARTÍCULA E TEMPERATURA) AVALIADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ARRANJO ORTOGONAL TAGUCHI L ₁₆ NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE A. TERREUS CCT7693 POR FES	84

FIGURA 22 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA EXTRACELULAR DE TRÊS ENSAIOS POSITIVOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL TAGUCHI L'16. FASE MÓVEL UTILIZADA, ISOPROPANOL 70%; REVELAÇÃO COM NINHIDRINA 0,2%.	89
FIGURA 23 – GRÁFICO DE PARETO PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE L-ASPARAGINASE (U/L) REFERENTE AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴ , PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FES	94
FIGURA 24 – COMPILAÇÃO DE GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA INTERAÇÃO CONCENTRAÇÃO (%) DE AMIDO E ASPARAGINA, UTILIZANDO-SE MALTOSE 0% E GLUTAMINA 0% (A); GLUTAMINA 0,5% (B); GLUTAMINA 1,0% (C); GLUTAMINA 1,5% (D) E GLUTAMINA 2,0% (E); PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE L-ASPARAGINASE (U/L), REFERENTE AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴ , PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	97
FIGURA 25 – SISTEMA DE INOCULAÇÃO DE ESPOROS DO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS, EM REATOR EM COLUNA DE LEITO FIXO.....	101
FIGURA 26 – REATOR EM COLUNA COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR ANTES DO TESTE COM SAFRANINA (A) E MISTURADO COM SOLUÇÃO MARCADORA (SAFRANINA) APÓS INJEÇÃO (B)	101
FIGURA 27 – SISTEMA EMPREGADO PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FES EM REATOR EM COLUNA DE LEITO FIXO	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DAS ENZIMAS E SEU USO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS	23
TABELA 2 – PERFIL DE TOXICIDADE DA TERAPIA COM L-ASPARAGINASE	32
TABELA 3 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA ACRILAMIDA	35
TABELA 4 – REDUÇÃO DE ACRILAMIDA EM DIFERENTES PRODUTOS ALIMENTÍCIOS UTILIZANDO NOVOZYMES ACRYLAWAY	40
TABELA 5 – MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	65
TABELA 6 – MEIOS EMPREGADOS PARA MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	66
TABELA 7 – MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	67
TABELA 8 – FATORES CONTROLÁVEIS COM SEUS NÍVEIS CORRESPONDENTES UTILIZADOS NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FES – ARRANJO ORTOGONAL TAGUCHI L'16...73	73
TABELA 9– NÍVEIS E VALORES REAIS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴ PARA VARIÁVEIS CONCENTRAÇÃO (%) DE AMIDO, MALTOSE, ASPARAGINA E GLUTAMINA NO ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	74
TABELA 10 – ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA DO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 UTILIZANDO DUAS DIFERENTES METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO (COM E SEM INIBIDORES DE PROTEASES).	80
TABELA 11 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA ATIVIDADE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR, EM U/G DE SUBSTRATO E U/L, PARA CADA EXPERIMENTO DO ARRANJO ORTOGONAL TAGUCHI L'16, PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FES	82
TABELA 12 – RESULTADOS DE ATIVIDADE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR, EM U/G DE SUBSTRATO E U/L, PARA CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴ , PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	91
TABELA 13 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA ATIVIDADE L-ASPARAGINASE (U/L) REFERENTE AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴ , PRODUZIDA PELO FUNGO ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FES	95
TABELA 14 – RESULTADOS DE ATIVIDADE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE ASPERGILLUS TERREUS CCT7693 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM REATOR EM COLUNA DE LEITO FIXO	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ENZIMAS	21
2.2 GENERALIDADES DA ENZIMA L-ASPARAGINASE	25
2.2.1 Antecedentes históricos	25
2.2.2 Características gerais da enzima L-asparaginase	26
2.3 APLICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	29
2.3.1 Ação antineoplásica da L-asparaginase	30
2.4 APLICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA	34
2.4.1 Generalidades da acrilamida	34
2.4.2 Formação de acrilamida nos alimentos	35
2.4.3 L-asparaginase na redução dos níveis de acrilamida em alimentos	38
2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	40
2.5.1 Considerações gerais da fermentação em estado sólido	40
2.5.2 Fatores que influenciam a fermentação no estado sólido	43
2.5.3 Matrizes sólidas empregadas na fermentação no estado sólido	46
2.5.4 Principais aplicações da fermentação no estado sólido	46
2.5.5 Vantagens e desvantagens da fermentação no estado sólido	47
2.6 BIORREATORES USADOS NA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR FES	49
2.6.1 Biorreatores para FES em escala de laboratório	52
2.6.2 Biorreatores em escala piloto e industrial	58
2.7 UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE	60
2.8 UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE	63
3 OBJETIVOS	64
3.1 GERAL	64
3.2 ESPECÍFICOS	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	65
4.2 MEIOS DE CULTIVO	65
4.2.1 Meios de cultura para manutenção e ativação dos microrganismos	65

4.2.2 Meio de cultura para produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido.....	66
4.3 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR	67
4.3.1 Preparo de inóculo dos microrganismos.....	68
4.3.2 Preparo da suspensão de esporos de <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693	68
4.3.3 Contagem de esporos de <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693.....	68
4.4 CONDIÇÕES PARA A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	69
4.4.1 Suporte (bagaço de cana-de-açúcar)	69
4.4.2 Teste de absorvidade máxima do suporte (bagaço de cana-de-açúcar) ...	69
4.4.3 Meio nutritivo para fermentação no estado sólido.....	70
4.5 CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	70
4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	70
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR PELO MÉTODO DO ÁCIDO L-ASPARTIL-B-HIDROXÂMICO (AHA)	71
4.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA ANÁLISE CONFIRMTORIA DE ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA EXTRACELULAR	72
4.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	73
4.9.1 Planejamento experimental: Arranjo ortogonal Taguchi L'16.....	73
4.10 ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴	74
4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM REATOR DE COLUNA DE LEITO FIXO	75
4.11.1 Preparo do sistema para inoculação do microrganismo no reator em coluna de leito fixo	75
4.11.2. Preparo da FES para produção de L-asparaginase extracelular em reator em coluna de leito fixo	76
4.12. FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS REALIZADAS	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR	78
5.2 TESTE DE ABSORTIVIDADE MÁXIMA DO SUPORTE (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR)	79
5.3 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO.....	80
5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: ARRANJO ORTOGONAL TAGUCHI L'16 PARA SCREENING DE VARIÁVEIS PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE	

EXTRACELULAR DE <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	81
5.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA CONFIRMAÇÃO DE ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA EXTRACELULAR	89
5.6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693 POR FES EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2 ⁴	90
5.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693 POR FES EM REATOR DE COLUNA DE LEITO FIXO.....	100
5.7.1 Testes preliminares do sistema de inoculação de <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693 em reator em coluna de leito fixo	100
5.7.2 Fermentação em estado sólido em reator em coluna de leito fixo para produção de L-asparaginase extracelular de <i>Aspergillus terreus</i> CCT7693	102
6 CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase amino-hidrolase ou simplesmente L-asparaginase (EC 3.5.1.1), tem ganhado especial atenção nos últimos anos em relação a duas importantes aplicações. A primeira na indústria farmacêutica como uma alternativa para tratamento de alguns tipos de câncer em especial a leucemia linfoblástica aguda, doenças malignas do sistema linfoide e linfomas de Hodgkin (APPEL et al., 2007; BROOME, 1961; DUVAL, 2002), e a segunda na indústria alimentícia onde a enzima é usada para prevenir a formação de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas (ANESE et al., 2011; HENDRIKSEN et al., 2009; MOHAN KUMAR et al., 2013). Esta última é importante devido à ação neurotóxica da acrilamida, classificada como potencialmente carcinogênica para humanos (MEDEIROS VINCI; MESTDAGH; DE MEULENAER, 2012).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer em 2017, no Brasil o câncer representa a primeira causa de morte (8% do total) por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos. O câncer infantil corresponde a um grupo de várias doenças que têm em comum a proliferação descontrolada de células anormais e que pode ocorrer em qualquer local do organismo. Os tumores mais frequentes na infância e na adolescência são as leucemias (que afeta os glóbulos brancos), os do sistema nervoso central e linfomas (sistema linfático). Estima-se que para o ano 2017 ocorrerão cerca de 12600 novos casos de câncer em crianças e adolescentes no Brasil sendo 6050 casos na região Sudeste, 2750 casos na região Nordeste, seguidas pelas regiões Sul com 1320, Centro-Oeste, 1270 e Norte com 1210. Nos últimos anos, o progresso no tratamento deste tipo de câncer foi extremamente significativo no Brasil. Hoje, em torno de 80% das crianças e adolescentes podem ser curados após de um tratamento adequado (INCA, 2017).

No Brasil, uma parte importante deste tratamento é a terapia com L-asparaginase, a qual faz parte de diversos protocolos oncológicos do Serviço Único de Saúde (SUS). Porém, atualmente observa-se problemas no abastecimento deste importante fármaco. Até o ano de 2012, o medicamento era fornecido pela empresa Laboratórios Bagó do Brasil a qual tinha os direitos de comercialização do produto registrado pela empresa dinamarquesa Lundbeck. Em agosto de 2012 a

empresa Lundbeck informou a suspensão da produção por motivos técnicos. Para solucionar este impasse, nos anos de 2013 até janeiro do 2017 o medicamento foi adquirido da empresa Medac da Alemanha representada novamente pelo Bagó do Brasil, porém a empresa pediu cancelamento do registro e comunicou a descontinuidade da produção mundialmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Diante do risco de desabastecimento, o Ministério da Saúde iniciou, em 2016, novo processo de compra do medicamento. A representante do produto da empresa chinesa Xatley ofereceu menor preço em relação aos Laboratórios Bagó, convertendo-se na ganhadora da licitação. A diferença entre os valores foi de R\$ 25.288.679,90 para oferta em um ano. Após o processo, o Brasil importou o fármaco, porém, vários especialistas da saúde têm posto em dúvida a eficácia e segurança deste novo medicamento e atualmente estão fazendo estudos para esclarecer essas dúvidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A L-asparaginase é uma enzima produzida por animais, plantas e microrganismos (VAN DEN BERG, 2011), sendo estes últimos considerados a frente mais importante (DESHPANDE; CHOUBEY; AGASHE, 2014; EISELE et al., 2011; HUANG et al., 2014; LEAGUE; SLOT; ROKAS, 2012). A L-asparaginase para uso farmacêutico provem tradicionalmente de bactérias, sendo as enzimas de *Escherichia coli* e *Erwinia carotova* (ou *Erwinia chrysanthemi*), as mais usadas para o tratamento de leucemia e linfomas (KEATING et al., 1993). Porém, o uso das enzimas de origem bacteriana podem levar a sensibilização imunológica (hipersensibilidade) e inativação imunológica para os pacientes que recebem essa enzima (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Em outros casos, a atividade glutaminase apresentada pelas enzimas bacterianas pode ocasionar efeitos secundários, tais como reação alérgica, vômitos, pancreatite, diabetes e anormalidades na coagulação (DUVAL, 2002; VERMA et al., 2007). Outros inconvenientes apresentados pela maioria das L-asparaginases bacterianas são a baixa estabilidade e atividade catalítica e a estreita faixa de pH em que são ativas (ZUO et al., 2014).

Em função dessas limitações, a procura por outras fontes de L-asparaginase, especificamente aquelas provenientes de microrganismos eucarióticos, pode levar a uma enzima com menores efeitos adversos e diferentes características que sejam

mais vantajosas para a sua aplicação (SARQUIS et al., 2004; SREENIVASULU; JAYAVEERA; RAO, 2009). Nos últimos anos, devido ao aumento na demanda de L-asparaginase e o interesse em suas aplicações, fungos eucarióticos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, têm sido investigados como fontes desta enzima (DANGE; PESHWE, 2015; MISHRA, 2006; SARQUIS et al., 2004; SONIYAMBY et al., 2011; VIJAY; JAYA RAJU, 2015; WADE; ROBINSON; PHILLIPS, 1971). Atualmente, por exemplo, L-asparaginases fúngicas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* recombinantes são utilizados na indústria de alimentos para reduzir os níveis de acrilamida formada em alguns alimentos (PEDRESCHI et al., 2011; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008).

A importância crescente do uso dessa enzima na indústria de alimentos é representada pelo desenvolvimento de uma formulação de L-asparaginase fúngica, pela empresa Novozymes, exclusivamente para alimentos, sob o nome de Acrylaway, (HENDRIKSEN et al., 2009; MICHELOT, 2002), reportando uma redução de até 97% nos níveis de acrilamida em certos alimentos previamente tratados com L-asparaginase fúngica (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013).

Atualmente, em nível mundial, a produção de L-asparaginase é frequentemente realizada por fermentação submersa. No entanto, esta tecnologia apresenta desvantagens como altos custos de produção e baixos rendimentos do produto. Além disso, esse processo gera efluentes em excesso e, conseqüentemente, grandes volumes de águas residuais (EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004).

Uma alternativa a estes problemas é a produção dessa enzima por fermentação em estado sólido (FES), uma proposta relativamente simples e efetiva que pode aumentar o rendimento da produção com um menor investimento de capital e de consumo de energia (COUTO; SANROMÁN, 2006; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Apresenta também outras vantagens, como utilizar meios de fermentação menos complexos, requerer controles operacionais mais simples e um baixo consumo de água. A principal vantagem da fermentação em estado sólido é a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substrato para o processo fermentativo, uma vez que estes representam um material renovável e potencial para uso em processos biotecnológicos,

principalmente devido ao seu baixo custo, acessibilidade e composições nutricionais. Assim, a fermentação em estado sólido é uma tecnologia promissora, sustentável, que permite a utilização de matéria-prima renovável e a geração de menores impactos ambientais (MARTINELLO et al., 2006).

Devido as vantagens e a simplicidade da FES, nos últimos anos esse tipo de fermentação tem ganhado muito interesse e atualmente existem vários processos consolidados industrialmente de produtos na área de alimentos, indústrias farmacêuticas, bioquímicas, bioenergia, entre outros. Por exemplo, a produção de ácido cítrico e da enzima fitase são processos que atualmente operam-se em escala industrial desse modo com uma produção eficiente (PALMA, 2003).

É importante considerar que o processo de produção de L-asparaginase é significativamente influenciado por múltiplos fatores como a composição do meio de fermentação, temperatura, pH, concentração do inóculo, velocidade de agitação, tempo de incubação, entre outros (HYMAVATHI et al., 2009; WEI; LIU, 1998). Entretanto, a literatura consultada ainda reporta poucos estudos descrevendo as condições operacionais para obtenção dessa enzima em processos operados em fermentação em estado sólido (KUMAR; DASU; PAKSHIRAJAN, 2010).

Considerando que no Brasil cerca de 4000 crianças fazem uso da L-asparaginase, os graves problemas de desabastecimento e à necessidade de obtenção de uma enzima com características vantajosas para as aplicações tanto farmacêuticas quanto alimentícias, o presente trabalho propôs contribuir com conhecimentos acerca da produção dessa enzima por fermentação em estado sólido utilizando fungos e leveduras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, sendo, portanto, capazes de aumentar a velocidade das reações químicas que ocorrem nas diferentes células dos organismos vivos (WEIL, 2000). Estes catalizadores biológicos foram descritos pela primeira vez no século XVIII quando foram estudadas as funções das secreções do estômago na digestão da carne e, no início do século XIX, com o estudo da conversão do amido em açúcar pela saliva. Porém, só no ano de 1833 foi descoberta a primeira enzima pelos franceses Anselme Payen e Jean-François Persoz. Nesta investigação, os autores trataram um extrato aquoso do malte com etanol e observaram a precipitação de uma substância sensível ao calor. Essa substância promovia a conversão do amido em maltose. Seus descobridores a denominaram diástase (do grego “separar”) e mais tarde foi renomeada com o nome de amilase (LEHNINGER; NELSON; COX, 2009; WEIL, 2000).

Em 1850 Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar a álcool por leveduras era catalisada por “*fermentos*”, e que essas estruturas eram inseparáveis das células de leveduras vivas. No entanto, em 1897 Eduard Buchner demonstrou que os extratos de levedura podem fermentar o açúcar em álcool e que as moléculas que intervêm no processo continuam funcionando quando são separadas das células vivas de levedura. Finalmente foi Frederick W. Kühne quem denominou estas moléculas com o nome de *enzimas* (LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

Apesar dos avanços alcançados, foi em 1926 que a natureza proteica das enzimas foi descoberta por James Sumner. O pesquisador isolou e cristalizou a enzima urease e comprovou que os cristais eram exclusivamente proteína. Atualmente sabe-se que a grande maioria das enzimas são de natureza proteica, com a exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA ou ribozimas que apresentam atividade catalítica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2009; WEIL, 2000). Esta atividade catalítica depende principalmente da integridade da estrutura proteica nativa, ou seja de suas unidades primária, secundária, terciária e quaternária (Figura 1), e se esta estrutura se desnatura ou se dissocia em

subunidades a enzima perde sua atividade catalítica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

Figura 1 – Estrutura proteica das enzimas

Fonte: adaptado de (LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, o nome sistemático das enzimas apresenta duas partes: a primeira corresponde ao nome do substrato e a segunda ao tipo de reação que catalisam acrescentando-se o sufixo "ase" ao final, por exemplo, glicose desidrogenase. Assim também, conforme a mesma instituição, atualmente, as enzimas são classificadas em seis grupos em relação à reação que catalisam (Tabela 1), e de acordo com a *Enzyme Commission* (E.C.) cada enzima recebe uma numeração única composta de quatro dígitos além de seu nome sistemático (GURUNG et al., 2013; LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

Entre as principais vantagens apresentadas pelas enzimas estão sua capacidade de acelerar a velocidade de uma reação sem se consumir e não alterar o equilíbrio químico característico dessa reação e inclusive podem acelerar uma reação reversível em ambos sentidos (CABRAL; GAMA; AIRES-BARROS, 2003). Porém, sua especificidade é talvez a sua propriedade mais significativa (SAID; PIETRO, 2002).

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas e seu uso em processos industriais

No. Classe	Nome da classe	Tipo de reação que catalisa	Nome da enzima industrial
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos H)	Catalase Glicose oxidase Lacase
2	Transferases	Reações de transferências de grupos	Glicosiltransferase
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (Transferência de grupos funcionais à água)	Amilase Celulase Lipase Mananase Pectinase Fitase Protease Pululanase Xilanase
4	Liases	Clivagem de enlaces C-C, C-O, C-N sem hidrólise nem oxidação	Pectato liase Alfa-aceto lactato descarboxilase
5	Isomerases	Transferência de grupos na mesma molécula para formar isômeros	Glicose isomerase
6	Ligases	Formação de enlaces C-C, C-O, C-S e C-N por reações de condensação	Não usadas na atualidade

Fonte: (KAN; YUEN, 2005; LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

O mecanismo de ação das enzimas depende principalmente da composição química de uma pequena parte da sua estrutura proteica denominada sítio ativo, a qual gera um ambiente específico e favorável para que ocorra uma reação bioquímica de maneira rápida, devido à capacidade da enzima de reduzir a energia de ativação necessária para que a reação bioquímica ocorra, resultando no aumento da velocidade da reação. É no sítio ativo que o substrato se liga durante a reação para ser convertido em produto sem o consumo da enzima, a qual pode então catalisar uma nova reação. Para que a reação aconteça, a enzima tem que se apresentar em sua forma ativa, chamada holoenzima. Para isto, algumas

enzimas requerem componentes químicos adicionais, chamados de cofatores, além dos seus resíduos de aminoácidos. Este composto pode ser um ou mais íons inorgânicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica complexa chamada de coenzima (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2012; LEHNINGER; NELSON; COX, 2009).

Existem vários fatores que podem afetar de maneira importante a atividade enzimática, entre estes estão as condições ambientais e de cultivo (pH e temperatura por exemplo), tempo de reação, concentração dos reagentes (enzima, substrato e cofatores), propriedades do substrato e presença de inibidores. O pH do meio é um fator particularmente importante e cada enzima tem um pH ótimo característico. Como em qualquer processo químico, a temperatura é o fator que condiciona a velocidade da reação. Temperaturas elevadas, provocam a desativação da enzima por efeito da desnaturação da proteína. A natureza do substrato permite que este seja substituído por outros similares fazendo que a velocidade da reação catalisada seja diferente em cada caso. Assim, se uma enzima tem a capacidade de reconhecer um número grande de substratos sua especificidade é pequena e vice-versa (CABRAL; GAMA; AIRES-BARROS, 2003).

Muitos processos químicos utilizados em diversas indústrias têm desvantagens inerentes do ponto de vista comercial e ambiental. Reações inespecíficas resultam em baixos rendimentos em produto. As altas temperaturas e/ou pressões elevadas necessárias para conduzir reações levam a altos custos de energia e exigem grandes volumes de água. Os processos que envolvem altas temperaturas, pressões, acidez, ou alcalinidade necessitam de um elevado investimento de capital. Subprodutos indesejáveis podem ser de difícil ou elevado custo de eliminação. Também, se os mesmos são produtos químicos de alta energia ou nocivos têm um impacto negativo sobre o meio ambiente. Porém, estes inconvenientes podem ser praticamente eliminados com o uso de enzimas, uma vez que as reações enzimáticas ocorrem sob condições amenas, com alta especificidade e envolvendo altas taxas reacionais (KAN; YUEN, 2005).

As enzimas utilizadas nas indústrias são principalmente de origem microbiológico e contribuem para o desenvolvimento sustentável por serem produzidas por microrganismos em processos de fermentação utilizando principalmente recursos renováveis. Além disso, são necessárias apenas

pequenas quantidades de enzimas para as reações químicas, mesmo em escala industrial. Devido requererem condições operatórias amenas, é possível o uso de equipamentos simples que permitam facilmente controlar as reações enzimáticas. As enzimas também reduzem o impacto sobre o meio ambiente, diminuindo o consumo de produtos químicos, água, energia e a geração de resíduos (KAN; YUEN, 2005).

Considerando todos os benefícios da utilização de enzimas constata-se que o número de aplicações comerciais de enzimas tem aumentado significativamente nos últimos anos. A Tabela 1 apresenta uma pequena variedade de tipos de enzimas atualmente utilizadas em processos industriais, listados de acordo com sua classe (KAN; YUEN, 2005).

É importante destacar que as empresas Novozymes e DuPont lideram o mercado mundial de enzimas com 48% e 20% do total de vendas, respectivamente, seguidas pela empresa DSM com 6% (BEDINGFIELD, 2013; FERNANDES, 2010). O mercado global de enzimas tem crescido nos últimos anos. Em 2012 o valor do mercado global foi aproximadamente 4,5 bilhões de dólares, em 2013 aumentou para 4,8 bilhões de dólares e para o ano 2018 estima-se que este valor chegará a 7,1 bilhões de dólares, com uma taxa de crescimento anual de 8,2% de 2013 a 2018. As enzimas com aplicação no setor doméstico ocupam o maior espaço do mercado, com 36%, sendo o segundo lugar para as enzimas aplicadas na indústria de alimentos e bebidas, com 27%, com um valor estimado de 1,3 bilhões de dólares em 2011 e com expectativa de crescimento para 2,1 bilhões de dólares em 2016. O mercado das enzimas utilizadas na indústria farmacêutica, representa somente 7% do total (BEDINGFIELD, 2013; DEWAN, 2014).

2.2 GENERALIDADES DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

2.2.1 Antecedentes históricos

A hidrólise enzimática de L-asparagina em L-aspartato e amônia foi observada pela primeira vez por Lang (1904), que detectou a atividade da L-asparaginase em diversos tecidos de bovinos. Resultados de Lang foram confirmados após alguns anos por Furth e Friedmann (1910), que detectaram hidrólise de L-asparagina em órgãos de cavalo e porco, concluindo que todos os

tecidos animais possuíam o mesmo nível de atividade de L-asparaginase. Clementi (1922) reportou a presença de L-asparaginase no soro de cobaia, porém as propriedades anti-tumorais da enzima só foram reconhecidas anos depois. Mashburn e Wriston (1964) demonstraram que a L-asparaginase de *E. coli* tinha a capacidade de inibir tumores em ratos, comprovando assim, o potencial de aplicação da enzima abrindo horizontes para que a sua produção comercial comece a ser desejável. Porém o grande interesse pela L-asparaginase iniciou quando Broome (1965) descobriu que a regressão de transplantes de linfossarcoma em ratos tratados com soro de cobaia foi resultado da dependência nutricional das células malignas de L-asparagina exógena.

Desde então, várias pesquisas têm sido desenvolvidas visando o isolamento de cepas microbianas produtoras desta importante enzima, tais como *Pseudomonas fluorescens* (DEGROOT; LICHTENSTEIN, 1960), *Serratia marcescens* (ROWLEY; WRISTON, 1967), *Escherichia coli* (KOZAK; JURGA, 2002; MASHBURN; WRISTON, 1964), *Erwinia carotovora* (WADE et al., 1968), *Proteus vulgaris* (TOSA et al., 1972), *Saccharomyces cerevisiae*, *Karnatakensis Streptomyces*, *Streptomyces venezuelae* e várias gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (CURRAN et al., 1985; GALLAGHER; MARSHALL; WILSON, 1989; GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; SARQUIS et al., 2004).

2.2.2 Características gerais da enzima L-asparaginase

A L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é uma enzima que está presente em vários organismos como animais, microrganismos, plantas, e inclusive no soro de certos roedores, mas ausente em seres humanos (EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004). Citando especificamente as L-asparaginases de origem bacteriano, se conhece que são classificadas em dois subtipos (I e II), os quais são definidos pela sua localização, forma oligomérica e afinidade pelo substrato. As L-asparaginases de *Escherichia coli*, são enzimas cujas características são bem conhecidas. Referente a sua especificidade, por exemplo, é conhecido que a EcAII (periplasmática) exibe um perfil de atividade de pH amplo e uma afinidade pelo substrato elevada quando comparada com a EcAI (citossólica) (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006).

Em termos gerais as L-asparaginases apresentam algumas características comuns, seu peso molecular está ao redor de 138,4 g/mol; seu pH ótimo pode ir de 8,0 até 8,6; seu ponto isoelétrico é de 5,67; seu sítio ativo possui resíduos de treonina, aspartato e lisina e possui um K_M aparente de 10 μ M e um tempo de meia-vida de $1,24 \pm 0,17$ dias (MÜLLER; BOOS, 1998; VAN DEN BERG, 2011). Se conhece também que sua atividade pode ser inibida na presença de compostos tais como 5-diazo-4-oxo-L-norvalina, L-asparatato (WRISTON; YELLIN, 1973), dimetilsulfóxido, NH_4^+ (SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971), glutaraldeído e tripsina (ZHANG et al., 2004).

A L-asparaginase, catalisa principalmente a hidrólise da L-asparagina a ácido L-aspártico e amônia. A L-asparagina é um aminoácido proveniente da dieta humana, porém, também pode ser sintetizada a partir de ácido L-aspártico, L-glutamina e ATP pela ação da enzima L-asparagina sintetase (PANOSYAN et al., 2004; VAN DEN BERG, 2011). O mecanismo preciso de ação a L-asparaginase é ainda desconhecido, porém se conhece que o processo de hidrólise ocorre em duas etapas através de um intermediário beta-acil-enzima (Figura 2).

Figura 2 – Mecanismo geral da reação catalisada pela L-asparaginase

Fonte: (MUSO et al., 2016) baseado em (HILL, 1967). Setas tracejadas indicam ataque nucleofílico.

Na primeira etapa do processo, o resíduo nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte e ataca o átomo de carbono amida da L-asparagina (substrato), gerando um produto intermediário beta-acil-enzima. Na segunda etapa da reação

ocorre um ataque no carbono éster, feito por um nucleófilo ativado por uma molécula de água (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; VERMA et al., 2007). Este mecanismo é comparável ao mecanismo clássico das serina-proteases, cujas atividades dependem de um grupo de aminoácidos conhecidos como a tríade catalítica. Essa tríade é composta por um aminoácido nucleofílico, serina (Ser), uma base, histidina (His) e um aminoácido com característica ácida, aspartato (Asp), todos conectados através de pontes de hidrogênio (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; VERMA et al., 2007).

Além da atividade asparaginolítica apresentada pela L-asparaginase, esta enzima tem a capacidade de catalisar outras reações. Foi relatado na literatura que a L-asparaginase de *Serratia marcescens* é capaz de hidrolisar 5% de L-glutamina quando comparada com a hidrólise da L-asparagina. Isto quer dizer que possui apenas 5% de atividade glutaminolítica frente a sua atividade asparaginolítica (Figura 3).

Figura 3 – Esquema dos diferentes mecanismos de reação da L-asparaginase

Fonte: adaptado de (KUMAR, 2013).

O mesmo ocorre para as L-asparaginases bacterianas mais estudadas, pertencentes às bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Outros microrganismos como *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter glutaminasificans* sintetizam a L-asparaginase com a mesma atividade asparaginolítica e glutaminolítica. Sabe-se que em alguns casos a L-asparaginase inicia a hidrólise da L-glutamina somente após a conversão completa da L-asparagina presente em ácido aspártico. Atualmente considera-se que a L-glutamina é um inibidor

competitivo da hidrólise de L-asparagina (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; NOVAK; PHILLIPS, 1974; VAN DEN BERG, 2011).

As hidrólises da L-glutamina e da L-asparagina são muito similares devido à semelhança estrutural entre ambos aminoácidos (Figura 4). Portanto, a maior parte das L-asparaginases microbianas apresentam atividade glutaminolítica cruzada, com algumas exceções como a L-asparaginase da bactéria *Wolinella succinogenes*, que não apresenta atividade de L-glutaminase (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; VAN DEN BERG, 2011).

Figura 4 – Estrutura dos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina

Fonte: (PACETTI, 2008).

A enzima L-asparaginase, também pode catalisar a hidrólise de β -aspartilpeptídeo amidas (Figura 3), mas os rendimentos de reação são consideravelmente baixos, por exemplo, as taxas de hidrólise de L-aspartilalanina amida e L- aspartilglicina amida são de 1/10 e 1/50, respectivamente, comparado à taxa de hidrólise de L-asparagina (NORONKOSKI et al., 1998).

2.3 APLICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

A enzima L-asparaginase é um importante agente quimioterapêutico usado para o tratamento de diversas doenças linfoproliferativas e linfomas, particularmente leucemia linfoblástica aguda (ALL) e linfomas de Hodgkin, e tem

sido um agente importante em protocolos de quimioterapia por quase 30 anos (AMYLON et al., 1999; CLAVELL et al., 1986; HANN et al., 2000; JONES et al., 1977; ORTEGA et al., 1977; SCHRAPPE et al., 2000). A L-asparaginase como medicamento demonstrou eficácia tanto na indução quanto em fases subsequentes de várias estratégias quimioterapêuticas. Porém, a terapia com proteínas exógenas em seres humanos tem uma grande limitação devido à problemas de imunogenicidade. Sabe-se que a utilização de L-asparaginase causa reações de hipersensibilidade, que se desenvolvem em até 78% dos pacientes tratados com formas não modificadas de enzima (nativas) (CLAVELL et al., 1986; ERTEL et al., 1979; NESBIT et al., 1979). Como uma tentativa para reduzir a imunogenicidade e preservar a atividade enzimática, uma forma alternativa de L-asparaginase vem sendo utilizada nos últimos 10 anos, a PEG-L-asparaginase, uma variante da enzima com um acoplamento de uma molécula de polietilenoglicol (PEG) (ASHIHARA et al., 1978; PARK et al., 1981).

O tratamento com a PEG-L-asparaginase foi reconhecido como uma alternativa em que minimizou-se as reações imunogênicas do fármaco sem alterar suas propriedades antineoplásicas (ABUCHOWSKI et al., 1979; YOSHIMOTO et al., 1986). Esta versão modificada da enzima, testada em animais, reduziu a formação de anticorpos em comparação com sua forma nativa e aumentou consideravelmente a duração da sua ação (ASHIHARA et al., 1978). Nos últimos, observou-se uma grande expansão da utilização de L-asparaginase no tratamento de leucemia e outros distúrbios linfoproliferativos. Desta forma, a L-asparaginase se estabeleceu como um agente indispensável em processos modernos de quimioterapia (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

2.3.1 Ação antineoplásica da L-asparaginase

As células cancerígenas, mais especificamente as células linfáticas, requerem uma enorme quantidade de L-asparagina para seu rápido e maligno crescimento. Para satisfazer esta grande demanda, utilizam o aminoácido proveniente tanto da dieta, presente no soro sanguíneo, quanto a L-asparagina sintetizada pela própria célula, que é bastante limitado. Linfoblastos leucêmicos e outras células tumorais não possuem ou apresentam níveis muito baixos de L-asparagina-sintetase, pelo qual não tem a capacidade de sintetizar L-asparagina,

dependendo portanto, da L-asparagina presente no soro para sua proliferação e sobrevivência (KIRIYAMA et al., 1989; PRAGER; BACHYNSKY, 1968). A L-asparaginase hidrolisa a L-asparagina do soro sanguíneo ocasionando a morte das células tumorais por privá-las de um fator essencial para a síntese de suas proteínas (apoptose p53-dependente). Entretanto, as células saudáveis não são afetadas pois possuem a enzima L-asparagina sintetase, sendo assim capazes de sintetizar o aminoácido L-asparagina em quantidades suficientes para sua manutenção (Figura 5). Por tanto, o benefício terapêutico da L-asparaginase no tratamento da leucemia baseia-se no fato de que as células leucêmicas carecem de maior atividade da enzima L-asparagina sintetase em comparação com as células normais (STAMS et al., 2003).

Figura 5 – Esquema da ação antineoplásica da L-asparaginase

Fonte: (MUSO et al., 2016), baseado em (VAN DEN BERG, 2011).

Apesar de o tratamento já ser utilizado há anos em diversos protocolos oncológicos, ainda não estão bem determinadas a formulação ideal e a dosagem para o tratamento utilizando L-asparaginase. O objetivo da terapia é suprimir totalmente os níveis séricos de L-asparagina, mas ainda não foi estabelecida uma concentração mínima adequada para a eficácia completa do tratamento (PIETERS et al., 2011). Neste ponto, é importante citar que a terapia com L-asparaginase tem dois perfis de toxicidade distintos produzidos pela queda dos níveis de asparagina,

a primeira se refere à sensibilização imunológica (hipersensibilidade) pela exposição a proteínas exógenas, e a segunda devida aos efeitos adversos relacionados com a inibição da síntese de proteínas. Porém, ao contrário dos outros agentes quimioterapêuticos, a L-asparaginase afeta muito pouco a medula óssea e, geralmente, não afeta a mucosa gastrointestinal ou oral e nem os folículos do cabelo (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Um resumo das complicações apresentadas em consequência das toxicidades de hipersensibilidade (classificadas pelo grau de acordo com o *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria* - CTC) e inibição da síntese proteica, está apresentado na Tabela 2 (GALLAGHER; MARSHALL; WILSON, 1989).

Tabela 2 – Perfil de toxicidade da terapia com L-asparaginase

Sistema	Complicações
Imunológico	Hipersensibilidade
	Reações
	Grau (CTC)
	Sem reações 0
	Reações leves locais (<10 cm <24 h) 1
	Urticaria 2
	Broncoespasmos, doenças do soro 3
	Reações locais severas (>10 cm >24 h) 4
	Imunossupressão
Fígado	Hipoalbumenia: elevações na transaminase, bilirrubina e fosfatase alcalina; anormalidades em lipoproteínas; diminuição no colesterol sérico.
Pâncreas	Pancreatite hemorrágica aguda; diminuição de insulina sérica; cetose diabética.
Coagulação	Aumento do tempo da protrombina; hipofibrinogenemia; diminuição de plasminogénio, fator V, VII, VIII, IX e outros; tromboembolismo; eventos hemorrágicos.
Sistema nervoso central	Depressão e alterações de personalidade leve; confusão e alucinações.
Outros	Parotidite; letargia; coma; apreensão.

Fonte: Adaptado de (GALLAGHER; MARSHALL; WILSON, 1989). CTC: Critério comum de toxicidade (*Common Toxicity Criteria*).

Quanto ao primeiro perfil de toxicidade, a hipersensibilidade, a manifestação clínica mais comum é a urticária; no entanto, os tipos de reações alérgicas podem variar desde um eritema localizado até anafilaxia sistêmica. Outras reações de hipersensibilidade incluem, endurecimento, edema, inchaço, frio, febre, sensibilidade, erupções na pele e até alguns casos de anafilaxia fatal que pode ocorrer até 4 h após a injeção. Alguns destes efeitos adversos podem ser tratados com anti-histamínicos, como a urticária. No entanto, outras reações mais graves muitas vezes exigem a descontinuidade do fármaco. Estas reações são observadas em uma frequência de 13-30% dos tratamentos que utilizam L-asparaginase de *E. coli* e muitas vezes são influenciados pela quimioterapia concomitante (AMYLON et al., 1999; CLAVELL et al., 1986; HASKELL et al., 1969; JONES et al., 1977; OHNUMA et al., 1970; ORTEGA et al., 1977).

Fatores de risco que aumentam a hipersensibilidade à L-asparaginase incluem doses acima 6000 IU/m² por dia (JAFFE et al., 1973), administração por via intravenosa mais do que por via intramuscular (i.m.) (NESBIT et al., 1979), tratamentos repetitivos (TRUEWORTHY et al., 1978) e a recorrência a um único agente ao invés de quimioterapia combinada (OETTGEN et al., 1970). A quimioterapia combinada ao invés da monoterapia é considerada útil para evitar reações alérgicas, pois leva à imunossupressão, o que elimina uma resposta imune à L-asparaginase (SOEDIONO, 1989).

Em termos gerais, as reações de hipersensibilidade são causadas pela produção de anticorpos contra a enzima, e ocorrem exclusivamente durante os tratamentos de intensificação ou de reindução, feitos após o tratamento inicial. Devido ao tempo de reação do organismo na produção dos anticorpos contra a enzima, na primeira administração não são observados efeitos adversos, porém conforme o tratamento avança e ocorre a produção dos anticorpos, as reações de hipersensibilidade começam a ocorrer. Finalmente, em alguns casos pode ocorrer a hipersensibilidade silenciosa, que acontece quando os anticorpos produzidos em resposta à L-asparaginase não levam à reações de hipersensibilidade, mas podem causar uma rápida inativação da enzima, reduzindo consideravelmente seu tempo de meia-vida, e consequentemente, prejudicando o tratamento (MÜLLER; BOOS, 1998; NAGARETHINAM et al., 2012; PIETERS et al., 2011; VAN DEN BERG, 2011).

Em alguns pacientes pode ocorrer o fenômeno de resistência à L-asparaginase, devido principalmente à desrepressão espontânea do gene que codifica a enzima L-asparagina sintetase, observada nas células tumorais de diversos pacientes com leucemia linfoblástica aguda resistentes à droga. Nesses casos é necessário que o tratamento com L-asparaginase seja descontinuado e o protocolo de quimioterapia alterado (NAGARETHINAM et al., 2012).

Ainda de acordo com a Tabela 2, o segundo perfil de toxicidade, a redução da síntese proteica no organismo, leva à diminuição dos níveis séricos de albumina, insulina, fatores de coagulação e lipoproteínas. A queda dessas proteínas leva a distúrbios tais como diabetes mellitus, hemorragias e dislipidemias. Outros efeitos que também podem ocorrer são: febre, calafrios, dores de cabeça, depressão, espasmos, tontura e disfunções de órgãos como pâncreas, rins e fígado (MÜLLER; BOOS, 1998; PIETERS et al., 2011; VAN DEN BERG, 2011).

2.4 APLICAÇÃO DA L-ASPARAGINASE NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

2.4.1 Generalidades da acrilamida

A acrilamida é conhecida também como 2-propenamida; amida acrílica; etileno carboxamida; propeneamida; amida do ácido propenóico; *acrylamid*; monômero de acrilamida ou amida do ácido acrílico. É um composto com uma massa molecular de 71,08 g/mol e sua fórmula molecular é C₃H₅NO (FRIEDMAN, 2003). Sua estrutura química está ilustrada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura química da acrilamida

Fonte: (FRIEDMAN, 2003).

Encontra-se disponível como um sólido branco, inodoro e cristalino ou como uma solução aquosa (IPCS, 1985). A acrilamida é uma amida altamente solúvel em água que reage com sítios nucleofílicos em macromoléculas em adições do tipo

Michael, ou seja a adição nucleofílica de um carbânion ou outro nucleófilo (CALLEMAN, 1996; SEGERBÄCK et al., 1995). Algumas de suas propriedades físico-químicas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas da acrilamida

Propriedade	Valor
Ponto de ebulição	192,6 °C
Ponto de fusão	84,5 °C
Inflamabilidade	Não inflamável
Gravidade específica	1,122 g/mL (30 °C)
Solubilidade em água	2,215 g/L (30 °C)
Pressão de vapor	0,007 mm Hg (25 °C)
Densidade do vapor	2,46
Estabilidade	Estável à temperatura ambiente, mas pode polimerizar violentamente em fusão.
Reatividade	Reage com ácidos, bases e agentes oxidantes

Fonte: (VERSCHUEREN, 2008).

2.4.2 Formação de acrilamida nos alimentos

A acrilamida é amplamente empregada há décadas na síntese de polímeros de poliacrilamida, os quais são empregados nas indústrias de papel, têxtil e como floculantes no tratamento de efluentes (FRIEDMAN, 2003). Porém, sua toxicidade é conhecida desde 1964, quando experimentos com animais indicaram irritações na pele e olhos e efeitos neurotóxicos sob exposição prolongada a esse composto (MCCOLLISTER; OYEN; ROWE, 1964). A partir dessas observações, seu potencial carcinogênico foi investigado durante anos, e como resultado dessas pesquisas, em 1994, a *International Agency for Research Cancer*, em parceria com a Organização Mundial da Saúde, acrescentaram a acrilamida à sua lista de compostos potencialmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1994). Desde esse anúncio alarmante, um progresso significativo tem sido feito na compreensão de como e de quais fontes o precursor da acrilamida é formado em vários alimentos (KUMAR, 2013).

Vários estudos demonstraram que o aminoácido L-asparagina é o principal responsável pela formação da acrilamida nos alimentos fritos ou assados após

condensação com açúcares redutores ou uma fonte de carbonila, mas este fenômeno não ocorre em alimentos cozidos (KERAMAT et al., 2010; TAREKE et al., 2000, 2002). Arribas-Lorenzo e colaboradores (2009) relataram que a alta exposição à acrilamida se dá principalmente pelo consumo de alimentos tais como batatas fritas, snacks extrusados, café, biscoitos e pães. O fenômeno de formação da acrilamida em alimentos vem sendo extensamente pesquisado nos últimos tempos. No ano 2003, Zyzak e colaboradores, detectaram que a cadeia amida presente na estrutura da acrilamida provém da L-asparagina e comprovaram que o uso da enzima L-asparaginase antes do processo de assar ou fritar os alimentos, reduzia em mais de 99% os níveis de acrilamida no produto final processado. Isso ocorre porque a ação da enzima leva a uma redução de 88% de L-asparagina na matéria prima inicial.

Durante o processamento de alimentos fritos e assados, que requerem uma coloração e sabores específicos, é indispensável que ocorra a reação de Maillard, uma reação entre açúcares redutores e aminoácidos livres, que resulta em uma série de eventos que conduzem ao escurecimento dos alimentos. Este processo é utilizado para gerar compostos monocarbonilo e dicarbonilo mais reativos, que são os responsáveis pelas reações de escurecimento dos alimentos (TAEYMANS et al., 2004).

O principal mecanismo de formação de acrilamida ocorre sob condições de baixa umidade e envolve a formação de uma base de Schiff a partir da reação do aminoácido L-asparagina e o grupo carbonila reativo de um açúcar redutor, o mesmo pode reagir através de vários mecanismos e formar acrilamida (STADLER et al., 2004; YAYLAYAN; WNOROWSKI; PEREZ LOCAS, 2003; ZYKAK et al., 2003). O passo chave é a reação do tipo Strecker, na qual acontece a descarboxilação da base de Schiff, o que leva à formação dos conhecidos “produtos intermediários de Maillard”; iminas instáveis, que podem liberar acrilamida diretamente ou indiretamente através de um precursor 3-aminopropionamida quando este perde uma molécula de amônio (Figura 7) (ZYKAK et al., 2003).

Existem vários precursores importantes na produção de acrilamida, sendo um deles o aduto de açúcar-asparagina, N-glicosilasparagina, o qual gera grandes quantidades de acrilamida, sugerindo que os primeiros passos da reação de Maillard são vitais neste processo (STADLER et al., 2002). Outro precursor

importante é a L-asparagina descarboxilada ou 3-aminopropanamida, a mesma que quando aquecida pode gerar acrilamida inclusive em ausência de açúcares redutores (ZYZAK et al., 2003).

Figura 7 – Mecanismo de formação da acrilamida a partir da L-asparagina via reação de Maillard

Fonte: adaptado de (GRANVOGL; SCHIEBERLE, 2006; MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002; STADLER et al., 2004).

Finalmente, é importante citar que há rotas secundárias para formar acrilamida em alimentos, como a reação de Strecker de L-asparagina, com o aldeído de Strecker como o intermediário direto (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002), ou o mecanismo através do ácido acrílico (BECALSKI et al., 2003; GERTZ; KLOSTERMANN, 2002; LIGNERT et al., 2002; STADLER et al., 2003). Porém, a principal rota secundária para a formação de acrilamida é a oxidação de lipídeos. Os óleos podem servir como a fonte de carbonilo para a reação de Maillard. Um estudo mostrou a formação de acrilamida pela via acroleína, formada a partir da degradação de lipídeos (ácidos graxos oxidados ou glicerol) (YASUHARA et al., 2003). A acroleína pode-se transformar em uma molécula de ácido acrílico ou em um radical acrílico intermediário, as quais podem, na presença de uma fonte de nitrogênio e sob condições de reação favoráveis, formar a acrilamida. Trata-se de uma rota secundária, mas com destacada importância em alimentos gordurosos e/ou fritos (YASUHARA et al., 2003).

2.4.3 L-asparaginase na redução dos níveis de acrilamida em alimentos

Desde a descoberta da presença da acrilamida em alimentos e seu potencial tóxico, as indústrias buscaram estratégias alternativas para sua mitigação. Porém, a redução dos níveis de acrilamida, mantendo as características (sabor, cor, textura, segurança, etc.) e qualidade do produto em alimentos comerciais fritos, é o principal desafio (KUMAR, 2013).

A remoção ou redução da concentração dos reagentes (L-asparagina ou glicose) é uma das diferentes estratégias avaliadas para a redução dos níveis de acrilamida nos alimentos. Obviamente, quando um dos reagentes apresenta uma concentração mais baixa, a formação de acrilamida se reduz significativamente. Especificamente, para diminuir a concentração de L-asparagina tem-se avaliado várias opções, sendo as principais: seleção de espécies vegetais com baixos níveis de L-asparagina; eliminação das enzimas que controlam a biossíntese de L-asparagina suprimindo os genes que as codificam; hidrólise da L-asparagina a ácido aspártico e amônia por ácido; ou modificando a L-asparagina a N-acetil L-asparagina por acetilação, impedindo a formação de acrilamida a partir de intermediários N-glicósídeos (FRIEDMAN, 2003). Muitas alternativas têm sido desenvolvidas visando sempre a eliminação da acrilamida nos alimentos. Não só

foram avaliadas estratégias químicas ou biológicas, como também do processo de elaboração dos alimentos, variando fatores como temperatura e tempo de cozimento e incluindo o uso de aditivos como a glicina. Porém a maioria destes esforços não obtiveram bons resultados uma vez que estas variações afetam diretamente as características do alimento (STADLER et al., 2002).

No entanto, observou-se que entre as várias estratégias de mitigação propostas, o método enzimático é considerado o mais promissor para conseguir uma redução eficiente de acrilamida através da utilização da enzima L-asparaginase (CIESAROVA; KISS; BOEGL, 2006; HENDRIKSEN et al., 2005; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008). A introdução de L-asparaginase como um auxiliar no processamento de alimentos, converte a L-asparagina em L-aspartato e amônia, reduzindo assim a quantidade de acrilamida formada durante a produção de batatas fritas, snacks ou produtos à base de massa de trigo tais como biscoitos e pães. Ciesarova; Kiss e Boegl (2006) relataram uma redução de 90-97% dos níveis de acrilamida em produtos preparados a partir de batata quando tratados com L-asparaginase, enquanto que Pedreschi; Kaack e Granby (2008) relataram uma diminuição de acrilamida de 60% nos mesmos produtos. Outro estudo realizado por Hendriksen et al. (2009), relatou uma redução no conteúdo final de acrilamida de 34%-92% em massas quando tratadas com a enzima. É importante ressaltar que a utilização de L-asparaginase não teve efeitos prejudiciais sobre as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (HENDRIKSEN et al., 2009).

Finalmente, foi desenvolvida uma formulação de L-asparaginase fúngica extracelular pertencente ao fungo *Aspergillus oryzae*, específica para aplicação em alimentos por um grupo de pesquisadores na Novozymes da Suíça (HENDRIKSEN et al., 2009). A enzima foi testada em diversos alimentos, sendo capaz de reduzir os níveis de acrilamida em todos os produtos testados (Tabela 4). A formulação desenvolvida pelo grupo é comercializada, atualmente, sob o nome de Acrylaway (MICHELOT, 2002).

Desta forma observa-se a importante e promissora aplicação da enzima L-asparaginase na indústria de alimentos visando a melhoria da qualidade dos produtos sem afetar seus aspectos sensoriais.

Tabela 4 – Redução de acrilamida em diferentes produtos alimentícios utilizando Novozymes Acrylaway

Produto alimentício	Redução de acrilamida
Biscoitos	50-90%
Bolachas	75-85%
Pães crocantes e pães torrados	50-90%
Massas para snacks	75-90%
Snacks peletizados	Mais de 95%

Fonte: (MICHELOT, 2002).

2.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

2.5.1 Considerações gerais da fermentação em estado sólido

A fermentação em meio sólido vem sendo utilizada desde a antiguidade, principalmente na fabricação e uso do molho de soja na China desde 3000 a. C e no Japão e sudoeste da Ásia desde 1000 a. C (ARAUJO, 2004). Impulsionado pelo sucesso na produção de penicilina, após a segunda Guerra Mundial, os processos de fermentação líquida ou submersa se tornaram modelos tecnológicos muito importantes e conhecidos, convertendo-se no processo mais utilizado para a produção de qualquer composto por fermentação. Assim, o desenvolvimento tecnológico da FES foi levado a um segundo plano nos países ocidentais. Porém, o enriquecimento proteico de rações animais, a partir de 1940, motivou a utilização da FES nos países ocidentais, pois permitia a utilização de resíduos agroindustriais, gerando um grande impacto econômico e ambiental (PANDEY, 2003). A partir dos anos 80 ocorreram avanços relacionados principalmente ao emprego de novos microrganismos na FES, melhorias do desempenho dos biorreatores, utilização de novos subprodutos e a descoberta de novos produtos (ZHENG; SHETTY, 1998).

O termo “fermentação em estado sólido”, tradução do inglês “solid state fermentation” ou “solid state culture”, possui várias definições conforme propõem os seguintes autores.

Hesseltine (1972) utilizou este termo para se referir a todas as fermentações em que o substrato não é líquido, e onde o crescimento do microrganismo ocorre em materiais sólidos não submersos em uma fase líquida (HESSELTINE, 1977a,

1977b). Por sua parte, Kondo (1996) e Isikhuemhen, Zadrazil e Fasidi (1996), definiram a FES como um processo natural pelo qual ocorrem importantes ciclos vitais como a decomposição de matéria orgânica lignocelulósica por fungos e leveduras. Segundo Moo-Young e Cannel (1980); Moo-Young, Moreira e Tengerdy (1983), é um processo onde a umidade presente se encontra retida complexamente no interior da matriz sólida e Demain e Solomon (1986); Lonsane et al. (1985); Maheva et al. (1984); Mitchell et al. (1999); Oriol (1987); Raimbault e Alazard (1980); Tengerdy (1985) definiram a FES como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos ocorre em substratos sólidos insolúveis em água e na ausência de todo líquido na forma livre. Para que a fermentação possa se chamar em estado sólido, o líquido retido nas partículas sólidas deve estar em uma quantidade que garanta a atividade de água necessária para o crescimento e metabolismo de microrganismos, mas sem exceder a capacidade máxima de retenção de água da matriz sólida.

Viniegra-González (1997) afirma que é um processo microbiológico que ocorre sobre a superfície de materiais sólidos os quais têm a propriedade de absorver e reter a água, com ou sem nutrientes solúveis. Esta definição inclui processos em que o suporte sólido é inerte e os nutrientes requeridos pelo microrganismo se encontram solúveis em uma fase aquosa.

Segundo Gutierrez Rojas et al. (1998), os processos de fermentação em estado sólido constam das seguintes etapas: seleção cuidadosa da matriz sólida, escolha de um microrganismo específico, controle dos parâmetros da fermentação e finalmente separação e purificação dos produtos.

Outro ponto importante é relacionado com os microrganismos empregados na FES e a matriz utilizada. Esta é constituída pelo suporte de crescimento e fase aquosa que fornece os nutrientes para o crescimento do microrganismo, e além disso deve, obrigatoriamente, ser porosa (SOCCOL, 1992). Geralmente, a fonte de carbono é formada por polímeros vegetais de alto peso molecular, cuja degradação depende da síntese de enzimas (amilases, celulasas, xilanasas, proteases, etc.) que permitam sua assimilação. Os fungos filamentosos são os principais microrganismos cultivados em meio sólido, uma vez que as matrizes sólidas utilizadas se assemelham aos meios naturais nos quais se desenvolvem e suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas

ramificadas, sendo propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOLE, 1987). Os fungos filamentosos também podem suportar pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), e se desenvolvem em uma faixa de umidade relativa muito ampla, de 12% até 80%, considerando que a umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água do material utilizado (LONSANE et al., 1985). Tais características não são encontradas em leveduras e bactérias.

Segundo Dufour (1990), a fermentação em meio sólido apresenta um sistema trifásico (sólido - líquido - gasoso), onde a fase sólida está inteiramente ligada com a líquida. Assim, a água que forma parte do sistema pode se encontrar em três diferentes formas e proporções: como água de constituição ou água ligada ao sólido; água de solvatação, aquela fracamente ligada ao sólido e água adsorvida por capilaridade ao sólido ou água livre.

Finalmente, as fermentações em estado sólido, podem ser classificadas segundo a tecnologia empregada em fermentação estática; com agitação ocasional ou com agitação contínua (HESSELTINE, 1977a) e em função da natureza do suporte, se distinguindo dois tipos:

- Fermentação em substrato sólido ou cultura sólida em uma fase substrato-suporte: a fase sólida é constituída por um material que possui função de suporte e fonte de nutrientes.

- Cultura sólida em uma fase suporte impregnada de um meio líquido: a matriz sólida é utilizada como um suporte inerte, a qual serve de reservatório para uma solução nutritiva que estará absorvida na matriz sólida. As matrizes sólidas possuem uma alta capacidade de retenção de água e podem ser muito diversos como bagaço de cana-de-açúcar, fibras de celulose, vermiculita, poliuretano, cinzas vulcânicas, esponjas, cascas de árvore (SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992).

Pandey, Soccol e Mitchell (2000), indicaram que frequentemente pode-se confundir os termos fermentação em estado sólido e fermentação em substrato sólido, porém o termo fermentação em estado sólido abrange os processos fermentativos que podem utilizar a matriz sólida como fonte de nutrientes ou como suporte inerte, ambos na ausência ou quase ausência de água livre no sistema e só quando se trata do primeiro caso o processo pode ser chamado de fermentação em substrato sólido.

2.5.2 Fatores que influenciam a fermentação no estado sólido

Devido à homogeneidade da fermentação submersa, o controle das condições ambientais no processo é relativamente simples. Isto não acontece na FES uma vez que apresenta uma alta heterogeneidade, sendo afetada por múltiplos fatores (DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992). Assim, o controle de determinadas variáveis é indispensável para obter produtos específicos e de qualidade (DEL BIANCHI; MORALES; CAPALBO, 2001; PANDEY, 2002). Entre os principais fatores que afetam diretamente o processo de fermentação em estado sólido é possível citar a umidade, atividade de água, temperatura e transferência de calor, pH, concentração do inóculo, aeração e agitação, as quais serão discutidas nos subitens a seguir.

2.5.2.1 Umidade

Um dos fatores principais que influenciam significativamente no processo é o teor de umidade do substrato, o qual varia dependendo da capacidade de retenção do substrato, as necessidades do microrganismo e o produto desejado. Uma matriz com um nível de umidade adequado deverá permitir uma fácil transferência de nutrientes, oxigênio e calor, favorecendo o metabolismo do microrganismo. Assim, um baixo teor de umidade resultará em baixo rendimento do produto desejado já que impedirá um adequado crescimento do microrganismo. Por outro lado, um alto nível de umidade diminui a porosidade da matriz o que resulta em uma baixa difusão de oxigênio, aumento da temperatura interna do meio e aumento no risco de contaminação (LONSANE et al., 1985). A umidade neste tipo de processos fermentativos, pode variar de 18 a 85%, em função da capacidade de retenção de água da matriz sólida utilizada (DEL BIANCHI; MORALES; CAPALBO, 2001). Em muitos processos de FES, o valor ótimo de umidade do substrato para o correto crescimento do microrganismo não coincide com o melhor valor para a obtenção do produto desejado, este fenômeno é muito frequente na produção de enzimas (NARAHARA et al., 1982).

2.5.2.2 Atividade de água (A_w)

O requerimento de água pelo microrganismo não pode ser avaliado de acordo a umidade da matriz, e sim em termos de atividade de água (A_w) do meio (DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992). A atividade de água determina a quantidade de água livre presente no meio e que pode ser utilizada pelo microrganismo imediatamente, influenciando diretamente nas suas atividades fisiológicas (CORREIA, 2004). Antes de começar um processo de FES é importante considerar que cada microrganismo possui um limite de água para que suas atividades metabólicas e seu crescimento seja adequado e, com base neste parâmetro, faz-se a seleção da matriz. Assim, a atividade de água ótima para fungos é aproximadamente 0,7; para leveduras 0,8 e para bactérias 0,9; uma pequena variação nestes valores pode ocasionar mudanças no metabolismo do microrganismo influenciando diretamente na obtenção do produto final (ANDRADE, 1999).

2.5.2.3 Temperatura e transferência de calor

Devido aos processos fermentativos serem exotérmicos, uma quantidade de calor diretamente proporcional à atividade metabólica do microrganismo é liberada durante o processo. A baixa condutividade térmica das matrizes sólidas provoca um acúmulo de calor metabólico, tornando difícil dissipar o mesmo e formando gradientes de temperatura. Sendo assim, a temperatura é um fator crítico do processo (PINTO, 2003). O grande desafio constitui na remoção desse calor acumulado. A este respeito, a injeção de ar parcialmente saturado (resfriamento evaporativo) é um dos métodos mais promissores, removendo até um 80% do calor gerado (PALMA, 2003), considerando que o uso da refrigeração é inadequado (HASAN, 2002).

2.5.2.4 pH

Mesmo que o pH seja um parâmetro determinante em qualquer processo biológico, seu controle na FES não é de fácil realização devido às características próprias da matriz sólida como a heterogeneidade e sua consistência (PANDEY, 2003). O mais comum para seu monitoramento é a medida do pH na suspensão

aquosa ou no extrato obtido a partir da amostra sólida. Porém, devido aos microambientes formados e à impossibilidade de realizar uma medição de pH, as medidas feitas durante o processo não são representativas, sendo que, segundo Palma (2003), a determinação exata do pH em substratos sólidos só pode ser considerada precisa no início e no final da FES. Neste processo é importante considerar que, em termos gerais, para os fungos é preferível pH baixos, de 4,5 a 5,0, e para as bactérias pH próximos à neutralidade. O controle do pH do meio é indispensável por alterar o conjunto enzimático dos microrganismos (PERAZZO NETO, 1999). Atualmente, o uso de soluções ou substratos com alta capacidade tamponante, é o método mais eficaz para o controle de variações grande de pH durante o processo de FES (SCHMIDELL et al., 2001).

2.5.2.5 Concentração inicial do inóculo

De forma semelhante à fermentação submersa, a padronização da quantidade e concentração do inóculo que será utilizado na FES é de fundamental importância. Um inóculo com uma alta concentração favorece a formação de uma grande quantidade de biomassa e afeta diretamente à formação de metabólitos ou produtos desejados. Pelo contrário, uma concentração muito baixa no inóculo beneficia a proliferação de contaminantes (ARAUJO, 2004). Segundo Sandhya et al. (2005), a quantidade e concentração do inóculo sempre têm que estar relacionadas com a quantidade de substrato, só assim pode-se garantir que os nutrientes necessários não se esgotem no meio do processo.

2.5.2.6 Aeração e transferência de oxigênio

Devido à heterogeneidade e a ausência de água livre nos sistemas de FES a transferência de oxigênio é limitada pelo filme líquido na superfície do substrato, sendo que o tamanho da área interfacial e o valor da pressão parcial de oxigênio se convertem em fatores cruciais. A taxa de aeração na FES depende de fatores tais como: a natureza do microrganismo e o requerimento de oxigênio para seu crescimento; o produto final desejado; a quantidade de calor metabólico e CO₂ gerados; o tamanho de partícula e a densidade aparente da matriz e a umidade (CORREIA, 2004; DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992).

2.5.2.7 Agitação

Em termos gerais, o uso de agitação na FES apresenta vantagens, uma vez que na troca de gasosa, homogeneiza a biomassa e a temperatura, facilita a remoção de calor e a aeração e, dependendo do substrato, previne ou facilita a aglomeração dos sólidos, facilitando a distribuição uniforme de qualquer aditivo que pode ser adicionado durante o processo, sejam estes nutrientes, água para o controle de umidade ou soluções reguladoras de pH (tampões, ácidos ou bases). Porém, as desvantagens da agitação também devem ser consideradas, entre elas estão: efeito adverso na porosidade do substrato; perda da fixação do microrganismo ao substrato, danos ao micélio do fungo, particularmente nos fungos filamentosos e danos nas hifas aéreas, resultando em inibição da esporulação (CORREIA, 2004).

2.5.3 Matrizes sólidas empregadas na fermentação no estado sólido

Para que seja considerada uma matriz sólida com potencial uso na FES, o material tem que ser de natureza granular ou fibrosa e permitir a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A capacidade de retenção vai depender exclusivamente do material utilizado. Assim, dentro do grupo de matrizes sólidas utilizadas na FES, podem se distinguir dois grandes grupos, as matrizes sintéticas e as matrizes naturais e dentro deste último grupo podem se distinguir dos subgrupos. O primeiro é o conjunto dos materiais amiláceos provenientes do arroz, trigo, centeio, cevada, milho ou mandioca, os quais geralmente permitem fermentações com uma umidade inicial de 25 a 60%. No segundo grupo se destacam os substratos celulósicos como as palhas, cascas, bagaço, farelos e outros os quais permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados que podem ir desde 60 a 80% sem o aparecimento de água livre no sistema (SOCCOL, 1992).

2.5.4 Principais aplicações da fermentação no estado sólido

Nos últimos anos, as aplicações e o uso da FES tem ganhado muito interesse e, apesar da FES ser uma técnica desenvolvida principalmente para a manufatura de alimentos e bebidas fermentadas, atualmente têm-se aplicado em

indústrias farmacêuticas e bioquímicas, na produção de enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de biorremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, entre outros (PALMA, 2003).

Estas múltiplas aplicações podem ser classificadas em dois grupos: a) Aplicações sócio-econômicas, tais como aproveitamento de resíduos agroindústrias, ensilagem e compostagem de resíduos e b) aplicações economicamente lucrativas como produção de alimentos fermentados, ácidos orgânicos e enzimas (PALMA, 2003).

Alguns desses processos já são operados em escala industrial, e sua produção é bem estabelecida. Dentro deste grupo é possível citar alguns exemplos como a produção de ácido cítrico, feita na Tailândia e na Indonésia e recentemente no México, o Alltech's European Bioscience Center iniciou a produção industrial da enzima fitase por FES (PALMA, 2003).

2.5.5 Vantagens e desvantagens da fermentação no estado sólido

Vários autores apresentaram em seus trabalhos comparações entre as fermentações submersa e em estado sólido. A escolha do tipo de fermentação que será utilizada em um determinado processo depende significativamente do tipo de microrganismo e do produto final desejado (DEMAIN; SOLOMON, 1986; HESSELTINE, 1977a; LONSANE et al., 1985). A FES apresenta algumas vantagens e desvantagens, as quais serão discutidas a seguir (BRAMORSKI, 1997; LU; MADDOX; BROOKS, 1998).

Dentro das vantagens do uso da FES principalmente se destacam:

- Alta produtividade

- Simplicidade do meio de cultura, geralmente formado de resíduos agrícolas os quais contêm os nutrientes necessários para o microrganismo. Outro fator que ajuda à simplicidade do meio é que geralmente, o único componente necessário a ser adicionado é água, a qual só em algumas ocasiões pode levar nutrientes adicionais como fonte de nitrogênio ou minerais.

- Redução do volume e complexidade dos efluentes líquidos a tratar, considerando-se que geralmente todo o extrato obtido é utilizado como produto final. Além disso os efluentes não apresentam condições para o desenvolvimento de patógenos.

- Redução da contaminação bacteriana como resultado da baixa umidade do meio fermentativo.

- As condições ambientais e nutricionais nas quais o microrganismo se desenvolve na FES são muito semelhantes aquelas dos meios naturais, o que favorece seu metabolismo.

- Para as fermentações tradicionais, a microbiota do suporte pode servir como inóculo.

- Fácil aeração devido à porosidade do material.

- Devido à alta concentração de produtos (altos rendimentos), os processos de separação, extração e purificação (*downstream*) são mais simples.

- O baixo conteúdo de umidade na FES possibilita um pequeno volume de reator por massa de substrato usado quando comparado com a fermentação submersa.

- Nas fermentações feitas com fungos filamentosos, é possível a colheita de esporos.

- O custo de equipamentos e energia é muito menor quando comparado com a fermentação submersa.

Porém, algumas desvantagens no processo de FES também são observadas:

- Risco de elevação excessiva de temperatura devidos a problemas de transferência de calor e de perda de umidade sobretudo nas fermentações mais longas. A remoção do calor metabólico gerado, em processos a grande escala, é bem mais complexa que na fermentação submersa.

- Difícil regulação e controle dos parâmetros de cultura especialmente do pH, concentração de O₂, CO₂ e umidade.

- A necessidade de pré-tratamentos como umidificação, homogeneização, dispersão, tratamento térmico e enzimático, moagem, entre outros para uso dos suportes.
- Necessidade de uma alta taxa de inoculação e os processos de cálculos precisos de biomassa são muito complexos, em alguns casos inviáveis.
- Limitado número de microrganismos com tolerância a baixas concentrações de água livre que podem ser usados no processo.
- Quando se utiliza substratos com uma granulometria muito elevada dificulta-se a transferência de oxigênio.

2.6 BIORREADORES USADOS NA PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS POR FES

O termo biorreator, reator bioquímico, reator biológico ou fermentador, é utilizado para descrever o recipiente desenhado para tentar simular as condições ambientais naturais e proporcionar os parâmetros de operação adequadas sob as quais um determinado microrganismo transforma os substratos em um produto de interesse industrial. Dependendo das características do processo, sua aplicação e o produto desejado, os biorreatores variam em forma e tamanho (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003; SCHMIDELL et al., 2001)

Em termos gerais, para garantir que o processo de fermentação ocorra com sucesso, o biorreator deve ter as seguintes características: o material com o qual é construído não pode ser tóxico, deve suportar altas pressões (principalmente vapor pressurizado para esterilização) e não ser afetado pela corrosão química; o sistema deve garantir condições assépticas durante todo o processo, mesmo sendo bioprocessos de longa duração; a agitação e aeração devem satisfazer as necessidades do microrganismo; o controle de temperatura deve garantir a estabilidade da mesma durante todo o processo, permitindo, sobretudo, liberar a energia produzida pelo metabolismo eficientemente; o consumo de energia deve ser mínimo; ter um sistema eficiente para controle de pH e adição de nutrientes e, finalmente, permitir a coleta de amostras de maneira que não comprometa o processo, principalmente a esterilidade do mesmo (MITCHELL et al., 1993; PANDEY et al., 2001).

Tem-se proposto vários tipos de classificações dos biorreatores baseados em diversos critérios, por exemplo, o tipo de biocatalisadores (enzimas ou células); a configuração do biocatalisador (livre ou imobilizado) ou a forma de agitação do líquido. Porém outras classificações mistas também foram propostas, como a descrita por Kleinstreuer, (1987), baseada no tipo e a configuração do biocatalisador. Neste trabalho propõe-se uma outra classificação mista baseada no sistema de agitação e o tipo de fermentação, baseada na classificação proposta por Schmidell et al., (2001). Pretende-se ser mais abrangente que as classificações anteriormente citadas, a mesma é descrita na Figura 8.

Devido às particularidades próprias do processo de fermentação em estado sólido, tais como problemas operacionais, fenômenos de transporte e difícil controle das condições de cultivo, o desenho de biorreatores para este tipo de processo avançou pouco nas últimas décadas quando comparado com os reatores para processos de fermentação líquida (PANDEY et al., 2001; RUÍZ-LEZA et al., 2007).

A dificuldade do desenho de biorreatores para fermentação sólida deve-se ao fato que, além de considerar os aspectos operacionais gerais do desenho de qualquer biorreator, tem que se levar em conta também as peculiaridades inerentes da FES, tais como os problemas de transferência de calor, a morfologia do microrganismo e a necessidade ou não de esterilidade no processo. No caso dos inconvenientes na transferência de calor, tem que se considerar fatores como a composição, tamanho de partícula, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água (atividade de água) do suporte ou substrato utilizado, para garantir uma troca de calor e oxigênio adequada. A morfologia do microrganismo é também um fator a ser levado em conta no processo de FES em biorreator, por exemplo, no caso de fungos filamentosos a presença de hifas septadas está relacionada com a resistência mecânica, o que vai influir diretamente na agitação do meio, se esta for necessária (DURAND, 2003).

Assim, para solucionar estes inconvenientes, deve-se desenhar reatores que apresentem um bom desempenho, sendo indispensável que o biorreator possua as seguintes características: um sistema de controle de temperatura, vazão de ar e umidade adequado; condições de esterilidade necessárias para este tipo de processos; gerar um sistema homogêneo quanto a condições de temperatura, umidade, atividade de água e substrato o qual garante um crescimento uniforme do

microrganismo e finalmente permitir uma rápida e efetiva remoção de compostos nocivos como o CO₂ (CEN; XIA, 1999).

Figura 8 – Classificação geral mista dos biorreatores

Fonte: adaptado de (KLEINSTREUR, 1987; SCHMIDELL et al., 2001).

2.6.1 Biorreatores para FES em escala de laboratório

2.6.1.1 Biorreator em coluna

Entre os anos de 1975 e 1980, a equipe do *Institut de Recherche Pour le Développement* (IRD) na França, antigamente ORSTOM, desenvolveu um sistema composto por pequenas colunas de 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, contendo um substrato previamente inoculado e regulado termicamente por um banho termostático. A demanda de O_2 do microrganismo é suprida por aeração forçada, saturada de água, que atravessa todo o leito, utilizando compressores com válvulas para regulação da pressão evitando assim a compressão excessiva do leito (Figura 9) (DURAND, 2003).

Figura 9 – Esquema de um reator em coluna em escala de laboratório.

Fonte: adaptado de (DURAND, 2003). A parte direita da figura apresenta o detalhe de cada coluna.

Este tipo de reator é útil nas etapas preliminares da pesquisa por permitir uma avaliação e estudo das melhores condições de fatores como composição do meio, tipo e quantidade de substrato, vazão de ar, transferência de oxigênio e outros parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento do microrganismo, como a produção de CO_2 , uma vez que as colunas podem ser conectadas a um cromatógrafo de gases (DURAND, 2003; RUÍZ-LEZA et al., 2007).

Uma das vantagens deste tipo de sistema é sua simplicidade geométrica que, junto com as propriedades do material utilizado para sua fabricação, geralmente vidro, faz que a relação custo/benefício seja favorável. O vidro permite uma fácil troca e remoção do calor gerado na fermentação, o qual pode ser dissipado eficientemente. Porém, este sistema também apresenta algumas desvantagens, como a falta de um sistema para retirada de amostras durante a fermentação, necessárias para cálculos de parâmetros cinéticos, o qual obriga o sacrifício de uma coluna inteira cada vez que for necessária uma análise (DURAND, 2003; DURAND et al., 1993; ILIUTA; ILIUTA; LARACHI, 2005).

2.6.1.2 Biorreator em coluna estéril

No ano 2000, o *Instituto Nacional de la Investigación Agronómica* (INRA) na França, melhorou o desenho prévio (Figura 10)

Figura 10 – Esquema do reator estéril em coluna em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (DURAND, 2003). (1) Tampa aquecedora, (2) sonda da temperatura do meio, (3) tela de aço inoxidável, (4) medidor de temperatura do ar de entrada, (5) sonda de umidade relativa, (6) resistência de aquecimento, (7) sonda de temperatura da água, (8) medidor do fluxo mássico, (9) medidor de nível, (10) isolamento térmico.

O novo desenho apresentava um reator com um volume de 1 litro e que possuía um sensor de controle de umidade relativa, temperatura e taxa de fluxo de ar que atravessava o substrato. Além disso incluía uma tampa aquecedora, um sistema de resfriamento em torno da resistência de aquecimento e permitia a retirada de amostras pela abertura da tampa na presença de chama, evitando assim o risco de contaminação. Este tipo reator, com todas suas novas características, permite um melhor controle do conteúdo de água no processo, e é muito útil na coleta de informação necessária nos estudos de ampliação de escala (DURAND, 2003).

2.6.1.3 Reator de leito fixo

O biorreator de leito fixo é um sistema simples, de baixo custo e fácil manuseio, constituído por um tubo com uma entrada, uma seção térmica e uma saída, podendo a entrada e saída ser, de material constituinte e diâmetro, diferentes da seção térmica (Figura 11).

Figura 11 – Esquema do reator de leito fixo em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (ZANELATO, 2011).

A entrada serve para a homogeneização do fluido antes de ingressar à seção térmica, a qual é revestida por uma camisa de resfriamento para controle da temperatura no leito. Já a seção de saída possui, geralmente, um sistema que evita que os esporos ou metabólitos possam ser dispersos no ambiente (SCHMIDELL et al., 2001).

Sua principal vantagem é que devido a sua característica de leito estático é ideal para processos fermentativos que utilizam fungos filamentosos ou microrganismos sensíveis a cisalhamento, os quais crescem na superfície do material sólido e se aprofundam no leito (PANDEY, 2003). Sua desvantagem consiste em que não permite uma homogeneidade térmica durante o processo, podendo levar a problemas na troca de calor, o que pode comprometer o crescimento do microrganismo (MITCHELL et al., 2000).

2.6.1.4 Tambor horizontal

Este tipo de reator é um dos mais utilizados em processos de FES devido à versatilidade do seu desenho o qual apresenta-se em três formas: tambor giratório (Figura 12), tambor perfurado (Figura 13) e tambor misturador de paleta horizontal (Figura 14). Cada desenho foi desenvolvido visando obter agitação contínua do substrato sólido durante o processo, incrementar o contato dele com as paredes do biorreator e fornecer maiores quantidades de O_2 ao microrganismo (DURAND, 2003; RUÍZ-LEZA et al., 2007).

Figura 12 – Esquema do biorreator de tambor rotativo em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (DOMÍNGUEZ et al., 2001).

Figura 13 – Esquema do biorreator de tambor perfurado em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (DURAND, 2003). Orifício A: Orifício para entrada de nutrientes e retirada de amostra.

Figura 14 – Esquema do biorreator de tambor misturador de paleta horizontal em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (DURAND, 2003).

O tambor giratório é um cilindro, com ou sem jaqueta para controle de temperatura, que possui aeração forçada em um extremo e movimento em torno do seu eixo o qual permite a mistura e aeração do substrato. Porém essa mesma rotação pode causar rupturas dos micélios provocando aglomerações celulares e de substrato que dificultam o controle de temperatura e umidade. Além disso a transferência de O_2 dentro destes pellets pode ser muito baixa ou até nula

(DURAND, 2003; ROUSSOS et al., 1997). Esses problemas foram resolvidos no desenho do tambor com paletas, o qual permite uma adequada transferência de oxigênio, troca de calor e diminui a aglomeração celular, porém este dispositivo é ineficiente para volumes industriais (DURAND, 2003).

Embora ser um tipo de reator muito utilizado pela sua vantagem de fornecer elevadas taxas de trocas térmicas, os tambores apresentam também algumas desvantagens causadas pela agitação contínua, tais como modificações na estrutura do substrato sólido e danos no micélio, principalmente se a hifa não for septada, pois a agitação pode ser abrasiva, e por isso sua aplicabilidade depende se o microrganismo resiste a tensões de cisalhamento. Além disso, a ampliação de escala é dificultada pelo fato de seu desenho ser mais complexo quando comparado com o reator de leito fixo, elevando os custos de manutenção (DOMÍNGUEZ et al., 2001; DURAND, 2003; RUÍZ-LEZA et al., 2007).

2.6.1.5 Biorreator coluna-bandeja

O desenho foi desenvolvido pelo Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila (México) (Figura 15).

Figura 15 – Esquema do biorreator coluna-bandeja em escala de laboratório

Fonte: adaptado de (RUÍZ-LEZA et al., 2007).

Consistiu numa coluna de 33 cm de comprimento e 25 cm de diâmetro contendo 8 bandejas perfuradas com capacidade de 140 mL cada uma. Possui uma jaqueta para controle de temperatura e um distribuidor de ar no fundo da coluna, com um fluxo de 194 mL/min o qual permite uma melhor distribuição do O₂ até as bandejas (RUÍZ-LEZA et al., 2007).

2.6.2 Biorreatores em escala piloto e industrial

2.6.2.1 Biorreator em bandeja (sem mistura)

Os reatores em bandeja são mecanismos muito simples que vem sendo utilizados em processos bastante conhecidos de escala industrial, como, por exemplo, a fermentação do koji. Porém, são também usados em processos a escala laboratorial e piloto (PANDEY et al., 2001). É formado por várias bandejas perfuradas, para permitir areação, localizadas uma sobre a outra (Figura 16).

Figura 16 – A. Esquema do biorreator bandeja de koji operando em escala industrial. B. Reator em bandeja com fluxo de ar

Fonte: A. adaptado de (DURAND, 2003). (1) Válvula de água; (2) Tubo UV; (3), (7), (12) Sopradores de ar; (4), (10) Filtros de ar; (5) Saída de ar; (6) Umidificador; (8) Aquecedor; (9) Recirculação de ar; (11) Entrada de ar; (13) Bandejas. B. Adaptado de (ZANELATO, 2011).

O desenho do biorreator permite construí-lo de vários materiais, dependendo o bioproduto desejado, como madeira, metal (aço inoxidável ou alumínio) ou plástico. A fermentação é desenvolvida numa câmara com temperatura e umidade controlada e o ar é percolado paralelamente à superfície do leito. Suas desvantagens são a necessidade de uma área extensa de trabalho, a esterilização separada do substrato e que não permite a manipulação mecânica, requerendo maior quantidade de mão de obra (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2001).

2.6.2.2 Biorreator de leito empacotado com agitação intermitente com circulação de ar forçado

Este tipo de reator pode ser chamado também como de leito empacotado. Geralmente é de formato retangular e o substrato é separado com malhas de arame, através do qual o ar pode passar. Possui um agitador, para misturar o leito periodicamente, e um regulador de temperatura, umidade relativa e fluxo de ar (Figura 17). Para um melhor controle da troca de calor e umidade pode ser necessário borrifar uma determinada quantidade de água durante o processo, a qual é calculada considerando a massa do substrato e a concentração de CO_2 liberado da respiração celular (DURAND, 2003).

Figura 17 – Esquema geral do reator de leito empacotado com agitação intermitente e aeração forçada

Fonte: adaptado de (DURAND, 2003).

2.6.2.3 Leito fluidizado

O sistema de leito fluidizado é formado por um cilindro vertical que possui uma bomba externa que fornece aeração e agitação ao substrato por fluxo forçado de ar (Figura 18). A característica principal deste desenho é que a velocidade do fluxo de ar é suficiente para suspender as partículas de substrato. Esta propriedade garante a transferência de O_2 , a taxa de troca de calor e a heterogeneidade da umidade de forma mais efetivas pelo alto fluxo de ar. Porém, este sistema também pode causar danos ao microrganismo devido à tensão do cisalhamento e gradientes de temperatura ao longo da coluna (MITCHELL et al., 2000).

Figura 18 – Esquema do reator de leito fluidizado a escala industrial

Fonte: adaptado de (MITCHELL et al., 2000).

2.7 UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *ASPERGILLUS* NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Segundo Pandey (1992), a seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios para que a FES possa ser desenvolvida com sucesso. Dentro do grupo de microrganismos empregados na FES, os fungos filamentosos são os microrganismos mais frequentemente utilizados devido a sua capacidade

de crescer em ambientes com baixa atividade de água, além de produzir vários metabólitos de interesse e ser de fácil manipulação (COSTA, 1996).

Em termos gerais, os fungos são organismos eucarióticos não fotossintéticos que possuem parede celular, obtêm seu alimento por absorção, podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares e macroscópicos e formam esporos para sua reprodução. A maioria deles produzem um micélio bem desenvolvido constituído por hifas septadas ou cenocíticas. Podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente. Na reprodução sexuada pode apresentar produção de zigósporos, ascósporos ou basidiósporos, enquanto a reprodução assexuada ocorre por brotamento, fragmentação e produção de esporangiósporos ou conídios (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1998).

A espécie *Aspergillus* spp., pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. As quase 200 espécies de *Aspergillus* existentes são isoladas de solos, plantas em decomposição e do ar (WAINWRIGHT, 1995). Pertencem ao grupo dos hyalhyphomyces devido a sua capacidade de formar esporos. Suas colônias apresentam colorações que podem variar desde a branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada até verde. Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ustus* e *Aspergillus versicolor*. Com a exceção de *A. nidulans* e *A. glaucus*, estes fungos apresentam uma taxa de crescimento rápida formando colônias de 1 a 9 cm de diâmetro (PRADO, 2002). O interesse biotecnológico nas espécies de *Aspergillus* ocorre principalmente pela sua capacidade de produzir um grande número de enzimas de natureza extracelular (WAINWRIGHT, 1995).

O fungo *Aspergillus terreus*, foi identificado por Charles Thom em 1918. São fungos que formam colônias com um aspeto de camurça de cor canela. Seu período de incubação vai entre 7 e 14 dias. Os conidióforos são hialinos com parede lisa e de tonalidade amarelada, igual a seus conídios. As estruturas conidiais são compactas, colunares e bisseriadas (Figura 19) (MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005). O *Aspergillus terreus* é um saprófito do solo, produtor de vários metabólitos secundários e é causador de infecções como aspergilose bronco-

pulmonar invasiva ou alérgica, cutânea, oftálmica, onicomicose e de micoses disseminadas (LASS-FLÖRL, 2012).

Figura 19 – Aspecto microscópico: Conídios e conidióforo de *Aspergillus terreus*

Fonte: arquivo pessoal.

Como relatado numa revisão realizada por Muso et al., (2016), vários estudos comprovaram que o género *Aspergillus* tem a capacidade de produzir quantidades significativas de L-asparaginase. Sarquis et al., (2004), determinou que os fungos filamentosos, *Aspergillus tamarii* e *Aspergillus terreus* produziram 38 U/L e 58,8 U/L de L-asparaginase, respectivamente, em processo de fermentação submersa, e concluiu que a produção da enzima é regulada pela fonte de nitrogênio utilizada. Em um estudo de *screening* de fungos produtores de L-asparaginase, encontrou-se uma cepa de *Aspergillus terreus* foi capaz de produzir 9,3 U/mL (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012). Baskar; Renganathan, (2012) otimizaram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* sob fermentação submersa, no qual o fungo produziu 44,38 U/mL. Em outro estudo de otimização com *Aspergillus niger*, registrou-se uma produção de 2,83 U/mL, igualmente em fermentação submersa, onde concentrações de glicose acima de 1% inibiu a produção da enzima (ANJUM ZIA et al., 2013).

Finalmente, é importante considerar que a produção de L-asparaginase pelo género *Aspergillus* sob FES ainda não é um assunto amplamente estudado, porém

vem ganhando importância nos últimos anos (MUSO et al., 2016). Mishra, (2006) utilizou casca de feijão-guandu como substrato e demonstrou a produção de 40,9 U/g de substrato seco pelo fungo *Aspergillus niger* sob FES. Em uma pesquisa recente realizada por Dias et al. (2015), utilizando vários resíduos agroindustriais, foi avaliada a produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger*. A máxima produção da enzima (94,21 U/g) foi registrada após 96 horas de fermentação utilizando uma mistura de 1/3 de farelo de trigo, 1/3 de farelo de soja e 1/3 de farelo de algodão.

2.8 UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Mesmo que os trabalhos, reportados na literatura, de produção de L-asparaginase utilizando leveduras até agora sejam muito escassos, as leveduras podem ser uma interessante alternativa uma vez que são microrganismos eucarióticos.

As primeiras leveduras reportadas como produtoras de L-asparaginase foram *Pichia polymorpha* e *Candida utilis*. Foda; Zedan; Hashem, (1980), apresentaram dados da L-asparaginase de *P. polymorpha*, a qual apresentou um K_M de 13,7 mM e um pH ótimo de 6,7. Por outro lado, segundo um estudo realizado por Sakamoto et al., (1977), determinou-se que a enzima produzida por *C. utilis* possui um K_M de 77 μ M. Num estudo recente no qual foram testadas 43 cepas de leveduras, apenas as leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis* apresentaram atividade de L-asparaginase periplasmática quando cultivadas em CD-m líquido (SOLER, 2015). Finalmente, numa pesquisa igualmente recente, foi expresso o gene *ansB* de *E. coli*, que codifica à enzima L-asparaginase, na levedura *Pichia pastoris*. Os resultados apresentaram uma enzima extracelular com uma atividade de 2,5 U/mL a uma temperatura ótima de 37 °C, podendo ser uma alternativa eficaz na produção da enzima humanizada.

Assim, com estes antecedentes, o trabalho aqui apresentado é de grande relevância e contribuirá com dados importantes visando a obtenção de conhecimento que ajudarão definir as melhores condições para a otimização da produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a produção da enzima L-asparaginase de natureza extracelular por fermentação em estado sólido (FES) com a utilização de fungos e leveduras.

3.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar fungos e leveduras, de um grupo de 10 cepas, capazes de produzir L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido (FES)
- Determinar as melhores condições de cultivo, dos fungos e leveduras selecionadas, visando obter apreciáveis atividades enzimáticas da L-asparaginase.
- Avaliar duas metodologias de extração enzimática com o microrganismo selecionado.
- Avaliar a influência da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH, tamanho de partícula e temperatura na produção de L-asparaginase extracelular, empregando um arranjo ortogonal Taguchi L'_{16} .
- Otimizar a produção da enzima L-asparaginase extracelular utilizando um planejamento experimental composto central rotacional, com os fatores com maior influência no processo obtidos do arranjo ortogonal Taguchi L'_{16} prévio.
- Avaliar a produção da enzima L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido em reator em coluna de leito fixo empregando as condições otimizadas baseadas nos resultados preliminares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para a etapa de seleção de microrganismos produtores de L-asparaginase extracelular (item 4.3), foi utilizado um grupo de 10 cepas pertencentes ao acervo de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBIOS), coordenado pelo Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, localizado nas instalações do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade São Paulo (EEL-USP), as quais são descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Microrganismos utilizados na seleção de cepas produtoras de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Nome da levedura	Origem
<i>Issatchenkia orientalis</i> CCTCCM 206098	China Center for Type Culture Collection - resíduos industriais contendo compostos fenólicos
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Informação não disponível
<i>Issatchenkia occidentalis</i> Y1'a	UNESP-Rio Claro
<i>Issatchenkia occidentalis</i> M1	UNESP-Rio Claro
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Informação não disponível
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 405	UNESP-Rio Claro
<i>Candida utilis</i>	UFMG - água de rio coletada no Rio das Velhas, município de Sabará, MG
<i>Pichia kudriavzevii</i> SBD 1-2	UNESP-Rio Claro
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello - Folha de caqui
<i>Aspergillus terreus</i> CCT7693	Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello

Fonte: arquivo pessoal

4.2 MEIOS DE CULTIVO

4.2.1 Meios de cultura para manutenção e ativação dos microrganismos

O meio líquido Caldo YM (YM – *Yeast, malt*) foi utilizado para a ativação e crescimento de todos os microrganismos utilizados neste trabalho e o meio sólido

Ágar YM (YMA – *Yeast, malt, agar*) para sua manutenção celular (com exceção do fungo *Aspergillus terreus* CCT7693, no qual utilizou-se meio Ágar Batata Dextrose (PDA – *Potato, dextrose, agar*) sólido para sua manutenção celular). As composições dos dois meios estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Meios empregados para manutenção e ativação dos microrganismos utilizados no trabalho

Componente (g/L)	Caldo YM	Ágar YM	PDA
Glicose	10	10	20
Peptona	5	5	-
Extrato de levedura	3	3	-
Extrato de malte	3	3	-
Extrato de batata	-	-	200
Agar	-	20	15
pH final	5,0	5,0	5,6

Fonte: arquivo pessoal

4.2.2 Meio de cultura para produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Foi utilizado o meio de cultura Czapek Dox Rico (CDR) para a produção de L-asparaginase extracelular por FES. A Tabela 7 apresenta seus componentes e concentrações (SARQUIS et al., 2004; SAXENA; SINHA, 1981).

A esterilização de todos os meios de cultivo (itens 4.2.1 e 4.2.2) foi realizada a 121 °C por 15 minutos, sendo separada a fração contendo a fonte de carbono das demais para evitar reações de degradação dos componentes do meio ou formação de outros. É importante citar que as concentrações da fonte de carbono (glicose) e fonte de nitrogênio (Asparagina) presentes no meio CDR, acima apresentado, correspondem somente à composição base do mesmo, sendo que no transcorrer do trabalho foram modificadas dependendo o objetivo do experimento.

Essas modificações serão mencionadas conforme correspondam, na descrição do trabalho.

Tabela 7 – Meio de cultura para produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	20
Asparagina	10
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	4
Cloreto de potássio (KCl)	0,5
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,5
Fosfato diácido de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,5
Nitrato de cobre I (CuNO ₃)	0,01
Sulfato de zinco (ZnSO ₄)	0,01
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0,01

Fonte: adaptado de (SARQUIS et al., 2004; SAXENA; SINHA, 1981)

4.3 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR

Em uma primeira etapa deste trabalho foi realizada a seleção de cepas de microrganismos eucarióticos capazes de produzir quantidades significativas de L-asparaginase extracelular por FES. Assim, foram testadas dez cepas de microrganismos provenientes do banco de leveduras do laboratório do Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva (LBIOS) (Tabela 5). Os microrganismos foram conservados a 4 °C em meio sólido YMA, com a exceção do fungo *Aspergillus terreus* CCT7693, que foi mantido em meio PDA. As placas contendo os microrganismos, foram repicadas a cada seis meses para manter sua viabilidade.

4.3.1 Preparo de inóculo dos microrganismos

Para o preparo do inóculo, as leveduras foram ativadas previamente em meio líquido YMA, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, a 250 rpm, 30 °C durante 48h a 72h. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 15 min, e as células precipitadas foram resuspensas em solução salina (NaCl 0,9%), e quantificadas por meio de relação concentração celular x absorbância, previamente estabelecida, em espectrofotômetro (Jenway 7305) com um comprimento de onda de 600 nm (SOLER, 2015). Devido a sua natureza esporulante, somente o inóculo do fungo *A. terreus* CCT7693 foi realizado mediante preparação de suspensão de esporos.

4.3.2 Preparo da suspensão de esporos de *Aspergillus terreus* CCT7693

Os esporos do fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 foram produzidos em tubos falcon de 15 mL contendo meio YMA inclinado. O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. O inóculo foi realizado em placa de petri, utilizando um disco de agar obtido a partir de uma cepa repicada. A placa inoculada foi incubada a 30°C até completa esporulação (COSTA, 1996; PRADO, 2002; SOCCOL, 1992). Os tubos foram cultivados a 30°C por 7 dias, e após esse período, os esporos foram recuperados da superfície do meio sólido utilizando solução contendo 0,9% de NaCl e 0,1 % de Tween 80 (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; VANDENBERGHE et al., 2000). A suspensão de esporos foi coletada em um tubo falcon de 50 mL para posterior contagem e padronização do inóculo.

4.3.3 Contagem de esporos de *Aspergillus terreus* CCT7693

A padronização da suspensão de esporos foi estimada pela contagem em microscópio, usando câmara Agasse Lafont-R, a qual conta com retículos com uma área de 0,0025 mm² e uma profundidade de 0,100 mm. A concentração final do inóculo foi calculada empregando a equação (1). Foi utilizada, para todos os experimentos, a relação proposta por Mohan Kumar; Ramasamy; Manonmani, (2013) de 10⁷-10⁸ esporos/mL como concentração do inóculo final.

$$N = \frac{ne.F}{V_r} \quad (1)$$

Onde:

N = número de esporos por mL de suspensão (esporos/mL);

ne = número total de esporos contados;

F = fator de diluição;

V_r = volume do retículo: 6,25x10⁻⁶ mL.

4.4 CONDIÇÕES PARA A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.4.1 Suporte (bagaço de cana-de-açúcar)

O suporte utilizado neste trabalho foi bagaço de cana-de-açúcar, o qual foi gentilmente fornecido pela empresa EDENIQ Brasil (Ribeirão Preto/SP) previamente seco para uso. Objetivando-se trabalhar com um suporte inerte na fermentação em estado sólido (FES) o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a sucessivas lavagens em água corrente. Posteriormente, o mesmo foi submerso em água morna para remoção de possíveis açúcares remanescentes e finalmente foi realizada uma outra lavagem com água corrente. Em seguida, o bagaço de cana-de-açúcar lavado foi seco a temperatura ambiente até uma umidade próxima a 8%. O bagaço de cana foi moído em moinho elétrico (Marconi – MA 680) e posteriormente classificado em peneira de acordo a sua granulometria em três frações: fração (1), maior que 1,000 mm; fração (2), com um tamanho de partícula aproximado entre 0,850 mm e 1,000 mm e fração (3), menor que 0,850 mm (SPIER, 2005).

4.4.2 Teste de absortividade máxima do suporte (bagaço de cana-de-açúcar)

Visando testar o volume máximo de meio que o bagaço de cana-de-açúcar pode reter como matriz sólida, foi realizado o teste de absortividade. Em um béquer de 50 mL, foram pesados 2 g de bagaço de cana-de-açúcar com um tamanho de partícula entre 0,85 mm e 1,00 mm (fração 2). Posteriormente, foram acrescentados por vez 2 mL de meio Czapek Dox Rico (CDR) até aparecer meio livre no sistema.

O volume total antes do aparecimento de meio livre no sistema foi considerado como o volume máximo de meio que essa quantidade de suporte (2g de bagaço de cana-de-açúcar) é capaz de absorver e reter. O suporte, contendo o máximo volume de meio que é capaz de absorver, foi submetido a um teste de umidade em balança de infravermelho.

4.4.3 Meio nutritivo para fermentação no estado sólido

Do total de volume da solução que a matriz sólida foi capaz de reter na sua estrutura (item 4.4.2), 10% correspondeu ao inóculo ou suspensão de esporos e 90% restante ao meio CDR contendo os sais, a fonte de nitrogênio e fonte de carbono correspondentes às necessidades de cada teste.

4.5 CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Para o preparo da FES, foram esterilizados individualmente 2 g de bagaço de cana-de-açúcar (suporte) em frascos Erlenmeyer de 50 mL a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, foi adicionado o meio nutritivo contendo o inóculo conforme o item 4.4.3. A solução, contendo o meio CDR e o inóculo, foi criteriosamente homogeneizada com o suporte até não se perceber água livre no sistema. O processo de fermentação foi realizado à temperatura de 30 °C durante 72 horas para as leveduras e 96 horas para o fungo *A. terreus* CCT7693. Em todos os testes fermentativos, foram realizados controles de esterilidade (DIAS et al., 2015; SOLER, 2015; SPIER, 2005).

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Após o período de fermentação, foi adicionado ao substrato uma solução de Tween 80 (0,5%) em Tris-HCl (50 mM) com pH 8,6, em uma proporção peso/volume (p/v) de 1/10. A mistura resultante foi homogeneizada a uma velocidade de agitação de 180 rpm e incubada a 30 °C durante 2 horas. Posteriormente a biomassa foi separada por filtração utilizando um filtro de gaze. O sobrenadante foi filtrado por meio de papel filtro qualitativo utilizando uma seringa e recolhido para determinação

da atividade enzimática extracelular (item 4.7) (HOSSEINPOUR et al., 2012; SOLER, 2015).

Nesta etapa de extração, foram avaliadas duas metodologias: uma sem inibidores de proteases (como descrito acima) e outra acrescentando fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), como inibidores, em uma concentração de 2%.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR PELO MÉTODO DO ÁCIDO L-ASPARTIL-β-HIDROXÂMICO (AHA)

O ensaio para a determinação da atividade da L-Asparaginase foi realizado pela quantificação da formação de ácido L-aspartil-β-hidroxâmico. Para isto, foi preparado um meio reacional com um volume total de 2,0 mL em tubos de ensaio, dos quais 0,2 mL foram de L-asparagina 100 mM; 0,2 mL de hidroxilamina 1 M (pH 7,0); 0,6 mL de tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,6) e 1,0 mL de amostra. Cada teste foi realizado em duplicata e com seu respectivo branco que foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro. O tubo branco conteve a mesma composição dos tubos teste sem o volume de amostra. Todos os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 min (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; SOLER, 2015).

Posteriormente, foi acrescentado aos tubos, incluindo os brancos, 0,5 mL de uma solução composta por 5% de FeCl₃ e 2,5% de ácido tricloroacético (TCA/HCl) para interromper a reação, e posteriormente, só nos tubos brancos se acrescentou 1,0 mL da amostra correspondente. Os tubos foram submetidos a centrifugação a 1000 x g durante 15 min, e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância em espectrofotômetro (Jenway 7305), em comprimento de onda de 500 nm, sendo que antes de cada teste o espectrofotômetro foi zerado com a leitura do tubo branco (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; SOLER, 2015).

A curva de calibração correspondente, foi realizada com uma solução padrão de ácido β-hidroxil aspártico (AHA) 5 mM (pH 8,6), com a qual determinou-se a equação para o cálculo da atividade enzimática de L-asparaginase (Equação (2)). O cálculo obtido pela equação (2) determina a atividade enzimática em U/mL, sendo que uma unidade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de

enzima necessária para formar um μmol de AHA por minuto (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977).

$$\text{Atividade } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = (\text{Absorbância} - 0,05) \times 0,265 \quad (2)$$

Os resultados foram expressos em U/L e U/g de substrato. No caso dos valores em U/L, o volume utilizado no cálculo foi o correspondente ao volume total utilizado na extração enzimática (item 4.6). Já para os resultados em U/g de substrato, o cálculo foi feito com o valor em gramas da fonte de carbono correspondente a cada experimento.

4.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA ANÁLISE CONFIRMTORIA DE ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA EXTRACELULAR

As placas utilizadas neste ensaio de CCD (Macherey-Nagel, Düren – Alemanha), foram fabricadas em alumínio, com dimensões de 5x20 cm e com uma espessura de 0,20 mm de sílica gel.

A análise confirmatória iniciou-se colocando todas as placas em estufa a 100°C por 1 hora, para sua ativação. Simultaneamente, foram colocados em um tubo de ensaio 0,9 mL de tampão fosfato (pH 7,0); 0,2 mL de solução de L-asparagina 100 mM e 100 μL do extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e o meio resultante da reação enzimática foi utilizado para a análise cromatográfica.

Previamente ao término da ativação da placa, as cubas cromatográficas foram saturadas com 10 mL de solução de isopropanol 70%, fase móvel utilizada na corrida. Após a ativação das placas, foram aplicados 2 μL das soluções teste correspondentes e dos padrões de L-asparagina 100 mM e ácido L-aspartico 100 mM como controle. A aplicação foi feita 2 cm acima da base da placa e objetivando-se melhor resolução foram inseridos apenas três testes por cada placa. A análise foi feita a temperatura ambiente durante 6 horas, tempo no qual a fase móvel se locomoveu aproximadamente 12 cm.

Ao término da análise, as placas foram retiradas das cubas e secas a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para sua revelação, foram aspergidas solução de ninhidrina 0,2% e mantidas em incubadora térmica (Ethik Technology – 400-3ND) a 100 °C por 5 minutos (HENDRIKSEN et al., 2009).

4.9 CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Da seleção de microrganismos produtores de L-asparaginase extracelular (item 4.3), definiu-se para condução de estudos posteriores, a cepa a qual apresentou maior produção da presente enzima.

4.9.1 Planejamento experimental: Arranjo ortogonal Taguchi L'16

Utilizou-se o planejamento experimental Taguchi L'16 como ferramenta para *screening* de variáveis, visando avaliar a influência de diferentes condições de cultivo. Esta ferramenta permitiu avaliar a influência de 5 fatores diferentes com 4 níveis cada um: fonte de carbono (concentração de 1%); fonte de nitrogênio (indutor) (concentração de 2%), pH, tamanho de partícula e temperatura, conforme apresentado na (Tabela 8) (BASKAR; RENGANATHAN, 2009a, 2009b; HYMAVATHI; SATHISH, 2010; SARQUIS et al., 2004).

Tabela 8 – Fatores controláveis com seus níveis correspondentes utilizados no estudo da influência das condições de cultivo na produção de L-asparaginase extracelular por FES – Arranjo ortogonal Taguchi L'16

Fator	Descrição	Níveis			
		1	2	3	4
A	Fonte de Carbono (1%)	Amido	Xilose	Glicose	Maltose
B	Fonte de nitrogênio (indutor) (2%)	Asparagina	Prolina	Glutamina	Ureia
C	pH	4,5	5,5	6,5	7,5
D	Tamanho de partícula	Sem moagem (SM)	Fração 1 (F1)	Fração 2 (F2)	Fração 3 (F3)
E	T (°C)	25	30	35	40

Fonte: arquivo pessoal. F1: >1,000 mm; F2: 0,850 mm-1,000 mm; F3: <0,850 mm

Cada experimento foi realizado em duplicata em frascos Erlenmeyer de 50 mL. A análise da variável resposta, atividade L-asparaginase (U/L), foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 8.0 e os resultados foram expressos empregando gráficos de efeitos.

4.10 ESTUDO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2⁴

Posteriormente a análise estatística do arranjo ortogonal Taguchi L'16, foram escolhidos os níveis que apresentaram significância na produção da enzima. Um novo planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2⁴ foi realizado visando avaliar a influência da concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção de L-asparaginase por FES. Os níveis e valores reais do planejamento experimental composto central rotacional 2⁴ para variáveis concentração (%) de amido, maltose, asparagina e glutamina se apresenta na Tabela 9. Os demais fatores (pH, tamanho de partícula e temperatura) foram fixados nos níveis determinados como as melhores condições para produção da enzima.

Tabela 9 – Níveis e valores reais do planejamento experimental composto central rotacional 2⁴ para variáveis concentração (%) de amido, maltose, asparagina e glutamina no estudo da otimização da produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Fator	Descrição	Níveis				
		-α	-1	0	+1	+α
A	Amido (%)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
B	Maltose (%)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
C	Asparagina (%)	0	0,5	1,0	1,5	2,0
D	Glutamina (%)	0	0,5	1,0	1,5	2,0

Fonte: arquivo pessoal.

Na execução do DCCR foram realizados um total de 27 experimentos, com três pontos centrais. A análise da variável resposta, atividade L-asparaginase (U/L), foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 8.0 e os resultados foram expressos empregando gráficos de Pareto, contorno e superfície de resposta e tabelas de análise de variância (ANOVA).

Após análise estatística, o modelo matemático proposto foi validado por meio de replicatas. As condições estabelecidas foram definidas como as condições otimizadas para produção de L-asparaginase extracelular por FES e foram utilizadas para experimentos posteriores, os quais avaliaram a produção da enzima em um sistema de FES em reator de coluna de leito fixo (item 4.11).

4.11 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM REATOR DE COLUNA DE LEITO FIXO

Experimentos em reator foram realizadas com uma coluna de vidro, com encamisamento para recirculação de fluido para controle de temperatura, de capacidade de 180 mL, apresentando as seguintes dimensões, diâmetro interno: 2,5 cm, diâmetro externo: 4,0 cm, comprimento interno 49,5 cm e bocal de 7,0 cm, fabricada pela empresa DiogoLab Comercio de artigos para laboratório LTDA de São Paulo.

Neste ensaio, foram utilizados 15 g de bagaço de cana-de-açúcar (umidade 8%), os quais foram homogeneizados com um volume 75 mL, dos quais 60 mL corresponderam ao meio Czapek Dox Rico (CDR), 7 mL à fonte de carbono e os 8 mL restantes ao inóculo do microrganismo.

4.11.1 Preparo do sistema para inoculação do microrganismo no reator em coluna de leito fixo

A inoculação foi realizada por meio de um sistema composto por uma tubulação fina de borracha de diâmetro interno de 3,0 mm e externo de 4,0 mm com orifícios, a qual foi inserida no meio da coluna percolando-a completamente. Preliminarmente aos testes fermentativos, realizou-se o teste de traçador, com

injeção de solução de safranina. Para o qual, após da montagem do sistema de inoculação, a coluna foi preenchida completamente de bagaço de cana-de-açúcar e empregado uma seringa de 20 mL foi injetada a solução de safranina. O objetivo foi visualizar se o corante se distribuiu completamente em toda a biomassa dentro da coluna o qual garante que na etapa de inoculação o inóculo será distribuído de maneira homogênea.

4.11.2 Preparo da FES para produção de L-asparaginase extracelular em reator em coluna de leito fixo

Após o preparo do sistema para inoculação, a coluna foi preenchida, em sua totalidade, com o bagaço de cana-de-açúcar homogeneizado com 60 mL de meio CDR. O sistema foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, utilizando-se uma seringa de 20 mL, em condições estéreis, foram introduzidos a fonte de carbono (7mL) e o inóculo (8mL) no reator.

Objetivando-se atender as necessidades de O₂ do microrganismo, foi inserido ar ao sistema. O ar seco foi inicialmente saturado com água para manutenção da umidade do substrato, em cerca 80%, no interior da coluna durante todo o processo, sendo conseqüente inserido em um filtro estéril e foi introduzido na coluna a temperatura de 25 °C em vazão de 0,7 vvm e umidade relativa de 70%. Filtro de ar também foi acoplado a saída do sistema.

A manutenção da temperatura foi realizada por recirculação de água pelo encamisamento da coluna utilizando-se um banho termostático (Spencer 281) ao longo de todo o processo.

4.12 FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS REALIZADAS

A Figura 20 apresenta os processos realizados no presente trabalho em diagrama esquemático.

Figura 20 – Fluxograma das atividades experimentais realizadas para estudo de produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido

Fonte: arquivo pessoal.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR

As leveduras escolhidas neste trabalho foram previamente testadas no laboratório do Prof. Dr. Sílvio Silvério em estudos anteriores como possíveis microrganismos produtores de L-asparaginase apresentando resultados positivos para o ensaio em meio sólido com azul de bromotimol (SOLER, 2015). Porém, quando utilizadas, neste estudo, nos ensaios de fermentação em estado sólido para produção de L-asparaginase extracelular nenhuma delas apresentaram resultados positivos para atividade enzimática. Esta diferença entre os resultados possivelmente ocorreu devido a falsos positivos nos ensaios em placa com azul de bromotimol. Estes ensaios se baseiam na mudança de coloração relacionada a aumento de pH. Entretanto, a complexidade do metabolismo de microrganismos faz com que estes possam excretar sub-produtos que alterem o pH, ocasionando dificuldades e imprecisão na avaliação da causa da variação de cor, a qual deve ser ocasionada prioritariamente pela presença de amônia como produto da hidrólise de L-asparagina pela enzima L-asparaginase.

Entre os microrganismos testados para produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido (FES) (item 4.1), somente os ensaios realizados utilizando o fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 apresentaram resultados positivos quanto à atividade enzimática. Todos os testes foram feitos em replicatas e utilizando a metodologia de extração sem inibidores de proteases (item 4.6). Neste teste, o fungo *A. terreus* CCT7693 produziu L-asparaginase extracelular apresentando uma atividade enzimática de $1,64 \pm 0,33$ U/ g de substrato ($16,34 \pm 3,28$ U/L), sendo assim o escolhido como o único microrganismo com potencial produtor de L-asparaginase extracelular por FES, sendo utilizado nos experimentos subsequentes.

Alguns trabalhos apresentados na literatura realizados por fermentação submersa reportaram resultados positivos na produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*. Em um estudo em que se avaliou a influência de diferentes fontes de nitrogênio no processo de produção da enzima, Sarquis et al., (2004)

reportou uma atividade enzimática de 58,8 U/L quando utilizado o fungo *A. terreus*. Em outro estudo encontrou-se que uma cepa de *Aspergillus terreus* atingiu uma atividade enzimática de 9,3 U/mL (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012) e em outro trabalho de otimização da produção desta enzima pelo mesmo fungo, foi reportada uma atividade L-asparaginolítica de 44,38 U/mL (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). Atualmente não têm sido reportados, na literatura, trabalhos de produção de L-asparaginase de *A. terreus* por FES, porém os resultados acima apresentados permitem confirmar que este fungo filamentoso tem potencial produtor da enzima.

Por outro lado, de acordo com Soler (2015), as leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis* têm a capacidade de produzir a enzima L-asparaginase de natureza periplasmática por fermentação submersa, sendo que esta característica particular da enzima faz que sua extração e purificação seja mais difícil quando comparada com uma enzima de natureza extracelular. Neste contexto, no presente trabalho foi avaliada a viabilidade de que a FES pudesse propiciar condições adequadas para que essas leveduras fossem capazes de produzir a enzima extracelular. Entretanto, verificou-se que os resultados foram negativos. Estes resultados sugerem que as condições geradas pela FES não foram propícias para que estas leveduras pudessem excretar a enzima. Desta maneira, o estudo de outros tipos de processos que estimulem a liberação da enzima deve ser investigado em maiores detalhes, como por exemplo mudanças na quantidade e tipo de comprimento de onda da luz durante a fermentação ou fatores de estresse como déficit de nutrientes, entre outros.

A importância de que o fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 possua capacidade de produzir a enzima de natureza extracelular por fermentação em estado sólido, foi fundamental para a continuidade deste estudo.

5.2 TESTE DE ABSORTIVIDADE MÁXIMA DO SUPORTE (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR)

De acordo com os resultados do teste descrito no item 4.4.2, foi possível determinar o volume máximo de meio nutritivo CDR que a matriz sólida (2 g de

bagaço de cana-de-açúcar) é capaz de reter sem deixar água livre no sistema (10 mL) deixando o suporte com umidade inicial de aproximadamente 80%.

A umidade em processos de FES, pode variar de 18 a 85%, em função da capacidade de retenção de água da matriz sólida utilizada (DEL BIANCHI; MORALES; CAPALBO, 2001). Quando esta matriz é de natureza celulósica é possível trabalhar com teores de umidade que podem ir desde 60 a 80% sem a verificação de água livre no sistema (SOCCOL, 1992). Os fungos filamentosos podem suportar pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), e se desenvolver em uma faixa de umidade relativa muito ampla, de 12% até 80%, considerando que a umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água do material que serve de suporte para o microrganismo (LONSANE et al., 1985). Estas considerações estão de acordo com a umidade determinada ao final do teste de absorvidade realizado neste trabalho (80%).

5.3 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

De acordo com o item 4.6, foram testadas duas metodologias (com e sem inibidores de proteases) para obtenção do extrato enzimático. Os testes para cada uma das metodologias foram feitos em replicatas utilizando o meio CDR base como fonte de nutrientes. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade asparaginolítica do fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 utilizando duas diferentes metodologias de extração (com e sem inibidores de proteases).

Testes	Extração enzimática sem inibidores	Extração enzimática com inibidores (PMSF e EDTA 2%)
1	1,84 U/ g substrato (18,39 U/L)	n.d
2	1,81 U/ g substrato (18,12 U/L)	n.d
3	1,26 U/ g substrato (12,57 U/L)	n.d

Fonte: arquivo pessoal. n.d: não determinado.

Conforme apresentado na Tabela 10, foi possível determinar a atividade da enzima L-asparaginase apenas quando o extrato foi obtido com a solução sem inibidores. Nos extratos obtidos com a solução com 2% de inibidores os testes de hidroxamato para determinação da atividade asparaginolítica apresentaram uma coloração positiva, porém não foi possível determinar o valor correto de absorbância em espectrofotômetro devido à presença de partículas suspensas. Estas interferências observadas foram ocasionadas provavelmente pela presença dos inibidores, que podem ter reagido com compostos do meio de cultivo, formando precipitados os quais interferem na precisão da técnica de análise espectrofotométrica. Devido a esta dificuldade técnica, escolheu-se a metodologia de extração utilizando solução de Tween 80 (0,5%) em Tris-HCl (50 mM) com pH 8,6, em uma proporção de 1/10 (p/v) para a obtenção de todos os extratos nos experimentos posteriores (HOSSEINPOUR et al., 2012; SOLER, 2015).

5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: ARRANJO ORTOGONAL TAGUCHI L'₁₆ PARA SCREENING DE VARIÁVEIS PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus terreus* CCT7693 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O planejamento arranjo ortogonal Taguchi L'₁₆ foi realizado visando avaliar diferentes condições de cultivo do fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 para produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido, possibilitando a seleção de variáveis que influenciam no processo para estudos posteriores. Os resultados da atividade asparaginolítica, em U/g de substrato e U/L, para cada um dos experimentos estão apresentados na Tabela 11.

De acordo com a Tabela 11, o melhor ensaio para produção de L-asparaginase extracelular foi o número 15, produzindo uma média de $22,51 \pm 2,73$ U/g de maltose ($112,57 \pm 13,65$ U/L), quando utilizado como fonte de carbono a maltose; como fonte de nitrogênio (indutor) a glutamina; pH de 5,5; tamanho de partícula menor do que 0,85 mm (fração 3) e a uma temperatura de 25 °C. Ressalta-se também o valor produzido no ensaio número 1, no qual verifica-se atividade de L-asparaginase de $13,77 \pm 1,40$ U/g de amido ($68,85 \pm 7,01$ U/L), sendo assim o segundo maior valor encontrado nos ensaios.

Tabela 11 – Média e desvio padrão da atividade L-asparaginase extracelular, em U/g de substrato e U/L, para cada experimento do arranjo ortogonal Taguchi L'16, produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES

Ex p	Fatores					Atividade L-asparaginase	
	Fonte de Carbono	Fonte de nitrogênio	pH	Tamanho de partícula	T (°C)	U/g de substrato	U/L
1	Amido	Asparagina	4,5	SM	25	13,77 ± 1,40	68,85 ± 7,01
2	Amido	Prolina	5,5	F1	30	n.d	n.d
3	Amido	Glutamina	6,5	F2	35	8,41 ± 1,01	42,06 ± 5,05
4	Amido	Ureia	7,5	F3	40	n.d	n.d
5	Xilose	Asparagina	5,5	F2	40	n.d	n.d
6	Xilose	Prolina	4,5	F3	35	n.d	n.d
7	Xilose	Glutamina	7,5	SM	30	n.d	n.d
8	Xilose	Ureia	6,5	F1	25	n.d	n.d
9	Glicose	Asparagina	6,5	F3	30	0,89 ± 0,21	4,43 ± 1,03
10	Glicose	Prolina	7,5	F2	25	n.d	n.d
11	Glicose	Glutamina	4,5	F1	40	n.d	n.d
12	Glicose	Ureia	5,5	SM	35	n.d	n.d
13	Maltose	Asparagina	7,5	F1	35	3,37 ± 1,21	16,87 ± 6,08
14	Maltose	Prolina	6,5	SM	40	n.d	n.d
15	Maltose	Glutamina	5,5	F3	25	22,51 ± 2,73	112,57 ± 13,65
16	Maltose	Ureia	4,5	F2	30	n.d	n.d

Fonte: arquivo pessoal. n.d: não determinado. Tamanho de partícula, SM: sem moagem; F1: >1,000 mm; F2: 0,850 mm-1,000 mm; F3: <0,850 mm.

Em ambos casos, verificou-se que a combinação dos nutrientes (fonte de carbono e nitrogênio) e dos valores propostos de pH, temperatura e tamanho de partícula, geraram condições propícias para que o fungo possa utilizar o indutor e produzir a enzima L-asparaginase. Além disso, sugere-se que estas mesmas condições estimularam a liberação da enzima, devido a que a FES permitiu simular as condições semelhantes ao ambiente no qual se desenvolve naturalmente o fungo.

Encontra-se na literatura pertinente, outros trabalhos reportando produção de L-asparaginase, entretanto, utilizando processos, condições e microrganismos diferentes o presente trabalho. Por exemplo, em trabalho realizado por Mishra (2006), o qual relata a produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* em

fermentação em estado sólido, o autor utilizou resíduos agroindustriais de três leguminosas (farelo de guandu, feijão preto e soja) para produção de L-asparaginase. Foi descrito que quando usado como substrato o farelo de soja, se obteve a máxima produção da enzima ($40,9 \pm 3,35$ U/g de substrato seco), seguido do farelo de feijão preto e de guandu, com um tempo de fermentação de 96 horas, umidade de 70%, pH 6,5 e temperatura de 30 ± 2 °C.

Em outro trabalho, realizado por Sreenivasulu; Jayaveera; Rao (2009) foram testados 14 diferentes substratos como farelo de arroz, farelo de grama verde, sêmola de trigo, farelo de trigo, farelo de grama preta, cevada, farinha de sorgo, farinha de arroz, óleo de rícino sólido, óleo de amendoim sólido, óleo de coco sólido e óleo de sésamo sólido visando obter altas atividades enzimáticas. Os resultados demonstraram que o óleo de amendoim sólido foi o melhor substrato conseguindo a máxima produtividade de L-asparaginase (60 U/g de substrato) com umidade inicial de substrato sólido de 90%, temperatura de incubação a 30 °C, pH inicial de 6,5 e um período de incubação de 5 dias.

Em outro estudo, foi avaliada a capacidade de várias espécies de fungos para produzir a enzima L-asparaginase e o uso de vários substratos como sementes de algodão, polpa de madeira, farelo de trigo, óleo de gengibre sólido e farelo de arroz. Entre os substratos testados, o fungo *A. niger* conseguiu produzir atividades enzimáticas de 88 U/g substrato seco, quando utilizado o óleo de gengibre sólido (VIVEKANANDHA; SANKARESWARAN; PRABHAVATHI, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Dias et al. (2015), no qual foi comparada a produção da enzima L-asparaginase por *Aspergillus niger* LBA 02 utilizando uma combinação de resíduos agroindustriais com o uso de apenas um substrato. Nesse estudo pôde-se comprovar que a combinação de três substratos foi o melhor meio para alcançar altas atividades enzimáticas. A maior atividade L-asparaginase foi obtida quando se utilizou uma mistura de farelo de trigo (1/3), farelo de soja (1/3) e farelo de algodão (1/3) após 96 horas de incubação, conseguindo-se $89,22 \pm 8,23$ U/g de substrato.

Mesmo que na literatura não tenham sido reportados trabalhos da produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* por FES, os estudos acima apresentados permitem sugerir que os microrganismos pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem potencial produtor desta enzima. Outro fator a se evidenciar é a

exequibilidade das condições estabelecidas pela FES para a produção da enzima de natureza extracelular.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 8.0 com o qual se obteve o gráfico da relação sinal/ruído (S/R) (Figura 21) o qual permitiu distinguir qual dos quatro níveis empregados é o melhor para cada um dos cinco fatores avaliados na produção de L-asparaginase extracelular por *A. terreus* CCT7693.

Figura 21 – Gráfico da relação sinal/ruído (S/R) para os cinco fatores (fonte de carbono; fonte de nitrogênio (indutor); pH; tamanho de partícula e temperatura) avaliados no planejamento experimental arranjo ortogonal Taguchi L₁₆ na produção de L-asparaginase extracelular de *A. terreus* CCT7693 por FES

Fonte: arquivo pessoal

Quanto ao pH, o melhor nível foi o segundo, o qual correspondeu a um valor de 5,5 e para a temperatura o primeiro nível que correspondeu a 25 °C, condições que foram selecionadas para os experimentos posteriores.

De acordo com a literatura verificada, quanto à produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*, em processos de fermentação submersa, usualmente o pH utilizado é de 6,5. Porém todos estes estudos foram realizados por fermentação submersa, assim, as condições e ambiente no qual se desenvolve o fungo são diferentes das encontradas na fermentação em estado sólido (BASKAR; RENGANATHAN, 2009a, 2009b, 2012; SARQUIS et al., 2004).

Em um trabalho de otimização da produção de L-asparaginase por células livres e imobilizadas de *Aspergillus terreus* realizado por Farag et al. (2015), foi testada a influência do pH no processo, determinando-se que a maior atividade asparaginolítica ocorreu quando utilizado um pH de 6,0 e que a produção da enzima diminuiu com o aumento do pH, sendo a que a faixa de pH ótima para o processo é de 4,0 a 7,0. Em outro estudo realizado por Vivekanandha; Sankareswaran; Prabhavathi (2013) foram encontrados resultados semelhantes na produção de L-asparaginase por fermentação submersa, mas utilizando *A. niger*, verificando-se a melhor faixa de pH visando altas concentrações da enzima, foi de 5,0 a 7,0.

De acordo com os estudos descritos acima e os resultados deste trabalho, verificou-se que o fungo *Aspergillus terreus* apresentou natureza acidófila, características de microrganismos os quais se adequam melhor em pH baixos para seu crescimento. De fato, é possível corroborar com a literatura pertinente, que a produção da enzima L-asparaginase extracelular de fungos filamentosos por FES ocorre, com poucas exceções, preferencialmente em cultivos com um pH inicial inferior a 7,0, o que faz que meios ácidos estimulem o crescimento e a sínteses da enzima por estes microrganismos (CHANDRASEKHAR, 2012; HOSAMANI; KALIWAL, 2011; MONICA et al., 2014).

Quanto à variável temperatura, nos trabalhos citados acima, foram utilizadas temperaturas de 30 ou 32 °C no processo fermentativo. Farag et al. (2015), avaliou também a influência da temperatura, conseguindo determinar que a faixa ótima para obter significantes rendimentos na produção de L-asparaginase foi de 25 °C a 35 °C, sendo esta última a temperatura que determinou a maior atividade enzimática. De forma semelhante, em outro trabalho de otimização das condições de cultivo em fermentação submersa para produção de L-asparaginase de *A. terreus* MTCC 1782, foi determinado que a melhor temperatura para o processo foi 35 °C (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). A diferença nos resultados

apresentados por Farag et al. (2015) e Baskar e Renganathan (2012), em comparação àqueles obtidos neste trabalho, podem-se justificar devido que as mesmas foram conduzidas por fermentação submersa, diferente, à FES utilizada neste trabalho.

É importante mencionar que os resultados da literatura acima citados e os deste trabalho permitem evidenciar a natureza mesófila do fungo *A. terreus*. Em todos os casos a temperatura ótima de crescimento foi registrada entre 25 e 35 °C. Por outro lado, quando analisadas as faixas ótimas de pH (4,0 a 7,0) e temperatura (25 e 35 °C), sugeridas pela literatura, pode observar-se diversidades de valores. Este fato explica-se devido a que os fungos filamentosos são microrganismos sumamente tolerantes, inclusive a condições extremas, crescendo e se desenvolvendo satisfatoriamente sem maior dificuldade.

Segundo o planejamento de Taguchi, o nível com partículas menores de 0,85 mm (Nível 4), foi o melhor tamanho de partícula para produção de L-asparaginase extracelular, (Figura 21). Ainda que as análises estatísticas indiquem o uso desta fração para maximização de atividade enzimática, operacionalmente verificou-se melhor exequibilidade em conduzir o processo utilizando a fração 2 (entre 0,85 mm e 1,00 mm). De fato, a ausência de água livre e a heterogeneidade dos sistemas de FES fazem com que a transferência de oxigênio seja limitada e dependa do filme líquido na superfície do substrato, sendo o tamanho da área interfacial um fator determinante. O tamanho de partícula da matriz sólida tem um papel fundamental, sendo que um tamanho de partícula muito pequeno poderia facilitar o empacotamento do suporte impedindo uma transferência de oxigênio adequada e uniforme (CORREIA, 2004; DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992). Além disso, a manipulação de um suporte com partículas muito pequenas pode dificultar processos desenvolvidos em reatores (SPIER, 2005). Desta maneira, por verificações práticas, visando obter-se adequada transferência de oxigênio no sistema de FES, conduziu-se os demais experimentos utilizando a fração 2.

Para as variáveis fonte de carbono e nitrogênio, não foi possível determinar um só nível como a melhor condição de cultivo, sendo que para cada uma dessas variáveis foi determinado, segundo o planejamento de Taguchi, dois níveis diferentes responsáveis pelos altos rendimentos na produção da L-asparaginase (Figura 21). No caso da fonte de carbono, foram escolhidos o amido e a maltose

como os melhores substratos e como fontes de nitrogênio (indutores) a L-asparagina e L-glutamina, considerando que destes quatro níveis a combinação maltose-glutamina foi a melhor permitindo atingir o máximo rendimento na produção da enzima (Tabela 11).

Em alguns estudos nos quais foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio visando a otimização da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos, foi verificado que a L-prolina foi o melhor agente indutor dessa enzima, quando utilizada a concentração de 2% (BASKAR; RENGANATHAN, 2009a, 2009b; SARQUIS et al., 2004; TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012). Este indutor, com igual concentração, também foi testado no presente trabalho nos ensaios número 2, 6, 10 e 14 apresentando atividade L-asparaginase nula (Tabela 11). Entretanto, ressalta-se que esses trabalhos foram realizados por fermentação submersa, pelo qual uma vez mais comprova-se que o ambiente gerado pela fermentação sólida é significativamente diferente ao gerado pela fermentação submersa, influenciando diretamente no metabolismo do microrganismo. Em outro estudo, foi demonstrado que o uso de L-asparagina em concentração de 0,3% foi a melhor fonte de nitrogênio em relação a outros indutores como a glutamina, prolina, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de sódio e potássio; resultado que coincide parcialmente com àquele obtido neste trabalho, uma vez que a melhor fonte de nitrogênio aqui encontrada foi a L-glutamina seguida da L-asparagina (FARAG et al., 2015). Resultados semelhantes também foram encontrados em um estudo de produção de otimização de L-asparaginase por *Actiobacterium* isolada de um ecossistema de mangue em Nizampatnam (Índia), no qual foram escolhidos a L-asparagina e a L-glutamina como os melhores indutores com uma média de atividade asparaginolítica de 7,42 U/mL (KIRANMAYI; PODA; VIJAYALAKSHMI, 2014).

Segundo a literatura consultada e os resultados obtidos neste estudo, verificou-se que os melhores indutores da produção da enzima, majoritariamente, são L-asparagina e L-glutamina, compostos os quais a enzima L-asparaginase tem afinidade, apresentando atividade asparaginolítica e glutaminolítica. Este fato é comumente verificado pela maioria das enzimas L-asparaginase, uma vez que estas geralmente apresentam atividade L-glutaminase cruzada devido à similaridade estrutural de ambos aminoácidos.

Em relação à fonte de carbono (substrato), em trabalho realizado por Akilandeswari, Kavitha e Vijayalakshmi (2012), foi avaliada a influência de várias fontes de carbono (glicose, sucrose e amido) na produção de L-asparaginase, obtendo a maior atividade enzimática (3,60 U/mL) quando utilizado o amido como substrato na fermentação submersa com *Aspergillus niger*, resultado que corrobora àquele obtido no presente trabalho, no qual o amido foi o segundo melhor substrato.

Por outro lado, Farag et al. (2015), também testou sete diferentes fontes de carbono, entre elas amido, maltose e glicose, encontrando que a melhor fonte de carbono para produzir L-asparaginase por fermentação submersa utilizando *A. terreus* foi a maltose, resultado coincidente com o maior rendimento da produção da enzima observado neste trabalho. Em outro trabalho de otimização das condições de cultivo foram testadas diferentes fontes de carbono (glicose, maltose, sacarose, frutose, lactose) e foi observado que a glicose seguida da maltose foram os melhores compostos para produção da enzima. Este resultado indica novamente à maltose como uma adequada fonte de carbono para ser empregada na produção de L-asparaginase (KALYANASUNDARAM et al., 2015). Em um outro trabalho de otimização de L-asparaginase de *Aspergillus terreus* MTCC1782 utilizando farinha de semente de baira (*Pennisetum glaucum*) como matriz da FES, também determinou-se a maltose como uma substrato importante no processo fermentativo (VARALAKSHMI; RAJU, 2013).

O fato de que as fontes de carbono complexas (amido e maltose) estimularam uma produção maior da enzima L-asparaginase do que as fontes simples como a glicose e xilose, sugere que o fungo precisaria um gasto energético muito alto para poder degradar e consumir a maltose ou amido. Este fato, obrigaria ao microrganismo a consumir preferencialmente outros compostos, com mais fácil metabolização, disponíveis no meio para manutenção celular como a fonte de nitrogênio (L-asparagina ou L-glutamina), fazendo necessária uma elevada síntese da enzima L-asparaginase para poder aproveitar os aminoácidos. Assim, evitaria um gasto energético elevado e desnecessário na degradação das moléculas de amido ou maltose.

Neste contexto, foram selecionados a maltose e amido como os melhores substratos e a L-asparagina e L-glutamina como os melhores indutores, variáveis cujo efeito de sua concentração no processo foi melhor avaliado (item 5.6) visando

otimizar a produção da L-asparaginase extracelular por FES. Ressalta-se que nesses experimentos adicionais, foram fixados os valores de pH em 5,5; temperatura em 25 °C e tamanho de partícula em fração média, níveis obtidos do arranjo ortogonal Taguchi L'16 e discutidos anteriormente.

5.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) PARA CONFIRMAÇÃO DE ATIVIDADE ASPARAGINOLÍTICA EXTRACELULAR

Como uma análise confirmatória da produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES, foi realizada metodologia de cromatografia em camada delgada (CCD), baseada nos picos dos aminoácidos envolvidos na reação produzida pela enzima, ou seja, a L-asparagina e o ácido L-aspártico. Foram utilizadas as amostras dos ensaios do planejamento de Taguchi L'16 que apresentaram elevadas concentrações da enzima, sendo estes o ensaio número 1, 3 e 15 apresentados na Tabela 11. Os resultados obtidos no teste de cromatografia em camada delgada para confirmação da atividade asparaginolítica são apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação da atividade asparaginolítica extracelular de três ensaios positivos do planejamento experimental Taguchi L'16. Fase móvel utilizada, isopropanol 70%; revelação com ninhidrina 0,2%.

Fonte: arquivo pessoal. Picos da esquerda para direita: padrão de L-asparagina, padrão de ácido L-aspártico, amostra teste 1, amostra teste 3 e amostra teste 15.

Este teste apresentou um resultado qualitativo referente à produção de L-asparaginase extracelular. Um resultado positivo é indicado pela presença de picos de ácido L-aspártico (cor roxa) nas corridas teste, indicando que a enzima foi capaz de transformar a L-asparagina, presente no meio reacional, em ácido L-aspártico. A presença de pico de L-asparagina (cor amarela) indica que esta não foi convertida em ácido L-aspártico e por tanto não houve produção da enzima (SOLER, 2015).

Na Figura 22 é possível observar que para os três ensaios, a produção de L-asparaginase apresentou resultado positivo, devido à presença de pico de ácido L-aspártico para cada um deles. Porém também foi possível distinguir em todos os três casos a presença de picos de L-asparagina, determinando-se assim que não foi possível sua completa transformação em ácido L-aspártico e amônia.

Mesmo não sendo possível a conversão completa da L-asparagina presente no meio reacional, os resultados mostrados na CCD são importantes para confirmar a produção da enzima, uma vez que este teste é um método confiável e robusto, que não requer de equipamentos ou reagentes de alto custo. Sua confiabilidade e robustez é justificada pelo fato de que a ninhidrina empregada como solução reveladora dos picos da corrida cromatográfica reage especificamente com compostos que contêm aminas primárias em sua estrutura neste caso os aminoácidos L-asparagina e ácido L-aspártico, fazendo que os possíveis interferentes não afetem a definição dos picos da CCD (SOLER, 2015).

5.6 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus terreus* CCT7693 POR FES EMPREGANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2⁴

Após o estudo de seleção de variáveis mediante arranjo ortogonal Taguchi L'16, foram escolhidas as fontes de carbono amido e maltose e as fontes de nitrogênio: glutamina e asparagina como novos fatores a serem avaliados em um planejamento experimental composto central rotacional 2⁴, para avaliar o efeito de sua concentração na produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES visando à otimização do processo. Os resultados da variável resposta atividade asparaginolítica em U/g de substrato e U/L se apresentam na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados de atividade L-asparaginase extracelular, em U/g de substrato e U/L, para cada experimento do planejamento experimental composto central rotacional 2^4 , produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por fermentação em estado sólido

No. Exp	Fatores				Atividade L-asparaginase	
	Amido (%)	Maltose (%)	Asparagina (%)	Glutamina (%)	U/g de substrato	U/L
1	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	17,96	89,81
2	1,5%	0,5%	0,5%	0,5%	2,75	27,51
3	0,5%	1,5%	0,5%	0,5%	3,99	39,95
4	1,5%	1,5%	0,5%	0,5%	0,00	0,00
5	0,5%	0,5%	1,5%	0,5%	3,25	16,27
6	1,5%	0,5%	1,5%	0,5%	0,00	0,00
7	0,5%	1,5%	1,5%	0,5%	0,00	0,00
8	1,5%	1,5%	1,5%	0,5%	0,00	0,00
9	0,5%	0,5%	0,5%	1,5%	18,57	92,86
10	1,5%	0,5%	0,5%	1,5%	5,56	55,56
11	0,5%	1,5%	0,5%	1,5%	5,21	52,12
12	1,5%	1,5%	0,5%	1,5%	0,00	0,00
13	0,5%	0,5%	1,5%	1,5%	6,83	34,13
14	1,5%	0,5%	1,5%	1,5%	2,90	28,97
15	0,5%	1,5%	1,5%	1,5%	0,00	0,00
16	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%	0,00	0,00
17	0,0%	1,0%	1,0%	1,0%	6,46	32,28
18	2,0%	1,0%	1,0%	1,0%	0,00	0,00
19	1,0%	0,0%	1,0%	1,0%	21,67	108,33
20	1,0%	2,0%	1,0%	1,0%	0,00	0,00
21	1,0%	1,0%	0,0%	1,0%	2,28	22,75
22	1,0%	1,0%	2,0%	1,0%	0,00	0,00
23	1,0%	1,0%	1,0%	0,0%	4,11	41,14
24	1,0%	1,0%	1,0%	2,0%	0,44	4,37
25	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	7,59	75,93
26	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	7,82	78,17
27	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	7,05	70,50

Fonte: arquivo pessoal.

Os intervalos definidos de 0% a 2%, para todas as variáveis, foram baseados em testes iniciais. Nestes, quanto a fonte de carbono, foi observado que a produção da enzima foi inibida em ensaios com uma concentração superior a 3%. Portanto, os intervalos foram definidos visando que nenhum dos ensaios apresentasse uma concentração total superior a 3%.

Em testes iniciais, também, foi observado que um dos indutores utilizados no planejamento experimental, a L-asparagina, apresentou limitações físicas referentes a sua solubilidade quando utilizada em concentrações superiores a 6%. Assim, não foi possível usar a concentração final limite de 6% pois para atingir essa concentração precisava-se preparar uma solução mãe a uma concentração ainda maior. Desse modo, verificou-se a inviabilidade de trabalhar com altas concentrações finais deste indutor, optando-se assim pelo intervalo de 0% a 2%.

Nos resultados da Tabela 12, observou-se que o maior valor de atividade enzimática (21,67 U/g de substrato) foi atingido no experimento 19, quando a concentração (%) de amido foi de 1%, maltose 0% e asparagina e glutamina 1%. O segundo melhor valor de atividade L-asparaginase (18,57 U/g de substrato) foi obtido no experimento 9, o qual teve 0,5% de amido, 0,5% de maltose, 0,5% de asparagina e 1,5 % de glutamina. Ressalta-se que, como observado nos ensaios prévios do laboratório, todos os ensaios do DCCR (Tabela 12) com uma concentração total de fonte de carbono (amido e maltose) de 3% (ensaios 4, 8, 12, 16, 18 e 20) apresentaram atividade L-asparaginase nula.

Esta diferença de valores explica-se considerando que a produção da enzima pode ser inibida por altas concentrações de substrato, sendo possível atingir altas atividades de L-asparaginase quando a concentração da fonte de carbono é baixa devido ao metabolismo próprio do microrganismo. Este déficit na fonte de carbono direciona o metabolismo do microrganismo a utilizar outras vias de obtenção de nutrientes para manutenção celular e consequentemente à síntese da L-asparaginase para o consumo dos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina (indutores) presentes no meio.

Por outro lado, uma outra explicação pode ser referida quanto a inibição na presença de altas concentrações de substrato. De tal modo, é possível considerar que a produção da enzima L-asparaginase é favorecida quando a relação carbono/nitrogênio (C/N) é baixa, sendo que a inibição não dependa somente do

valor da concentração da fonte de carbono, e sim do valor da relação C/N. Assim, para obter altos valores de atividade asparaginolítica, seria necessário conduzir o bioprocessamento com baixos níveis de fonte de carbono e maiores valores de concentração da fonte de nitrogênio. Esta tendência nos resultados pode ser verificada na Tabela 12 sendo que todos os ensaios os quais tinham relação C/N total maior que 1 apresentaram resultados de atividade enzimática negativos ou muito baixos. Pelo contrário, os valores mais altos registrados de atividade L-asparaginase foram conseguidos quando a relação C/N foi igual ou menor que 1.

Os dados foram analisados estatisticamente com o software STATISTICA 8.0 quanto a variável resposta atividade L-asparaginase em U/L. Verificou-se previamente, em análise estatística de planejamento fatorial completo 2^4 com 3 pontos centrais (experimentos 25, 26 e 27) (não apresentada) a significância de curvatura no modelo, indicando que um modelo de segunda ordem poderia ajustar melhor a equação. Neste contexto, realizou-se experimentos adicionais (experimentos 17 ao 24), referentes ao planejamento experimental composto central rotacional, visando obter-se análise sob um modelo quadrático. Ressalta-se também, como descrito anteriormente, o desenvolver do trabalho com as variáveis concentração de L-asparagina e concentração total de fonte de carbono, em níveis operacionais máximos quanto a exequibilidade da técnica experimental, sendo que sua extrapolação poderia inviabilizar a metodologia.

Após a verificação de curvatura, foram determinados os efeitos e interações entre as variáveis no DCCR, os quais podem ser observados no gráfico de Pareto (Figura 23) e na tabela de análise de variância (ANOVA) (Tabela 13). De acordo com a análise estatística, a 95% de confiança, observou-se que os efeitos das variáveis concentração de amido (%), maltose (%) e asparagina (%) foram significativos para o processo de produção de L-asparaginase extracelular pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES, assim como a interação de segunda ordem entre amido (%) e asparagina (%) (1L x 3L) (Tabela 13).

Figura 23 – Gráfico de Pareto para a variável resposta atividade L-asparaginase (U/L) referente ao planejamento experimental composto central rotacional 2⁴, produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES

Fonte: arquivo pessoal.

Pode observar-se que todas as variáveis apresentaram efeito negativo (Figura 23) para a variável resposta, atividade L-asparaginase, e somente a interação de segunda ordem (amido e asparagina) apresentou um efeito positivo. Estes resultados permitem corroborar novamente que a produção da enzima L-asparaginase é favorecida quando utilizadas concentrações de nutrientes (fonte de carbono e nitrogênio) baixas, o que sugere que a enzima é produzida preferencialmente quando o fungo *Aspergillus terreus* encontra-se em condições de estresse.

Tabela 13 – Análise de variância para a variável resposta atividade L-asparaginase (U/L) referente ao planejamento experimental composto central rotacional 2⁴, produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Valor p
(1)Amido (L)	3211.96	1	3211.959	12.77980	0.003818*
Amido (Q)	4472.96	1	4472.964	17.79711	0.001192*
(2)Maltose (L)	9192.77	1	9192.772	36.57637	0.000058*
Maltose (Q)	527.53	1	527.529	2.09894	0.173024
(3)Asparagina(L)	4372.43	1	4372.429	17.39710	0.001297*
Asparagina(Q)	5238.69	1	5238.690	20.84380	0.000649*
(4)Glutamina(L)	11.39	1	11.391	0.04532	0.834985
Glutamina(Q)	3509.77	1	3509.771	13.96474	0.002838*
1L x 2L	52.45	1	52.447	0.20868	0.655963
1L x 3L	1811.31	1	1811.313	7.20689	0.019869*
1L x 4L	35.83	1	35.826	0.14254	0.712358
2L x 3L	555.92	1	555.924	2.21192	0.162746
2L x 4L	270.12	1	270.115	1.07474	0.320317
3L x 4L	0.80	1	0.797	0.00317	0.956014
Error	3015.97	12	251.331		
Total SS	30892.10	26			
R ² =0.90237					

Fonte: arquivo pessoal. * fatores significativos ao nível de confiança de 95%

Assim também, foi determinada, por análise estatística a 95% de confiança, a expressão matemática de segunda ordem que permite modelar o processo de produção da enzima L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES. O modelo matemático ($R^2=0,90237$) é apresentado na Equação (3), na qual A: Concentração (%) de Amido; B: Concentração (%) de Maltose; C: Concentração (%) de Asparagina e D: Concentração (%) de Glutamina.

Atividade enzimática $\left(\frac{U}{L}\right)$

$$\begin{aligned}
 &= 34,788 + 36,916 * A - 13,746 * B + 31,338 * C + 113,547 * D - 57,919 \\
 &* A^2 - 19,891 * B^2 - 62,682 * C^2 - 51,306 * D^2 + 7,242 * A * B + 42,559 * A \\
 &* C + 5,985 * A * D + 23,578 * B * C - 16,435 * B * D + 0,893 * C * D
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

Para analisar a interação significativa (95% de confiança) de segunda ordem entre a concentração (%) de amido e asparagina, foram feitos gráficos de contorno, os quais são apresentados na Figura 24. De acordo com os resultados dos efeitos apresentados pelo gráfico de Pareto (Figura 23), para todos os gráficos de contorno, foi fixada a concentração de maltose (%) no nível baixo (0%). Ainda neste caso, considerando que o efeito quadrático da concentração (%) de glutamina foi significativo, foi importante analisar a faixa de valores desta variável que maximiza a produção da enzima. Para isso, variou-se a porcentagem de glutamina entre 0% (A); 0,5% (B); 1,0% (C); 1,5% (D) e 2,0% (E). Todos os gráficos foram compilados na Figura 24.

Na Figura 24 pode-se observar, em todos os casos, que a concentração de L-asparaginase se eleva quando as concentrações de amido e asparagina são baixas (próximas a 0%), o que corrobora que a produção da enzima é favorecida sob condições de estresse ou baixas concentrações de nutrientes. Neste contexto, vários estudos têm demonstrado que altas concentrações de fonte de carbono podem inibir a produção desta enzima.

Por exemplo, no estudo realizado por Anjum Zia et al., (2013), os autores demonstraram que concentrações superiores a 1% de glicose suprimem a atividade L-asparaginase. Do mesmo modo, em um trabalho de otimização de L-asparaginase de *Aspergillus terreus* por células livres e imobilizadas, demonstrou que a maior produção da enzima ocorreu quando utilizadas concentrações baixas de nutrientes, 0,2% de fonte de carbono (dextrose) e 0,3% de indutor (L-asparagina), resultado similar ao obtido neste trabalho e que ajuda confirmar ser a produção de L-asparaginase aumentada quando diminui-se as concentrações de nutrientes (FARAG et al., 2015). Outro estudo também obteve alta atividade enzimática quando utilizada concentração de glicose de 0,6% combinada com

farinha de soja em cultivo submerso de *Aspergillus terreus* MTCC 1782 (BASKAR; RENGANATHAN, 2011b).

Figura 24 – Compilação de gráficos de superfície de resposta da interação concentração (%) de amido e asparagina, utilizando-se maltose 0% e glutamina 0% (A); glutamina 0,5% (B); glutamina 1,0% (C); glutamina 1,5% (D) e glutamina 2,0% (E); para a variável resposta atividade L-asparaginase (U/L), referente ao planejamento experimental composto central rotacional 2^4 , produzida pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por fermentação em estado sólido

Fonte: arquivo pessoal.

Outro trabalho de otimização de condições de cultivo para produção de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* CCT 3940, os autores verificaram a máxima atividade enzimática quando utilizada glicose 0,5% e 0,2% de L-asparagina (DIAS; SATO, 2016). Similarmente, um trabalho realizado por Badoei-Dalfard, (2015) reportou alta atividade L-asparaginase (785 U/mL) quando utilizadas concentrações de 0,5% de L-asparagina e 0,2% de glicose, em um cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*. De fato, podem ser citados vários outros estudos nos quais os autores utilizam concentrações baixas, de no máximo 1%, tanto de fonte de carbono quanto de fonte de nitrogênio (indutor), como as melhores condições as quais favorecem a produção de L-asparaginase (APARNA; JAYA RAJU, 2015; BASKAR; RENGANATHAN, 2011a, 2012; DESHPANDE; CHOUBEY; AGASHE, 2014; KALYANASUNDARAM et al., 2015).

Por outro lado, pode-se observar, segundo análise da Figura 24, que a faixa com maiores valores para a variável concentração de glutamina foi entre 0,5% (>80 U/L) e 1,5% (>60 U/L), sendo que a melhor resultado (>100 U/L) foi atingido quando se utilizou glutamina no nível de 1,0%. Ressalta-se que concentrações de glutamina muito baixas (próximas de 0%) ou altas (>1,5%) reduzem a produção da enzima L-asparaginase. Por este resultado, verifica-se que concentrações de glutamina muito baixas podem ter afetado diretamente à relação C/N, anteriormente citada, incrementando a mesma e diminuindo a produção da enzima. Por outro lado, sugere-se que concentrações muito altas desse indutor podem ocasionar inibição por excesso de substrato como o que ocorreu com a fonte de carbono previamente citada.

Alguns trabalhos, apresentados na literatura, também reportam a influência da L-glutamina no processo de produção de L-asparaginase. Por exemplo, autores testaram várias fontes de nitrogênio (lisina, arginina, fenilalanina, glicina, L-glutamina, L-asparagina, tirosina, extrato de malte, peptona, oxalato de amônia e sulfato de amônia) com uma concentração de 0,5%, visando otimizar a produção da enzima. Nesse estudo, a L-glutamina foi a segunda melhor fonte de nitrogênio, depois da L-asparagina, demonstrando assim que uma concentração de 0,5% deste indutor favoreceu a produção da enzima (KIRANMAYI; PODA; VIJAYALAKSHMI, 2014), valor pertencente à faixa ótima de L-glutamina determinada neste presente estudo.

Em outro estudo, Sarquis et al., (2004) avaliaram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus tamarii* e *Aspergillus terreus*, testando diferentes concentrações e fontes de nitrogênio (L-asparagina 1%, prolina 0,2% e 2%, ureia 0,2% e L-glutamina 0,1%, 0,2% e 1%). Naquele trabalho, observou-se que, mesmo não sendo a melhor fonte de nitrogênio para produção da enzima, quando comparadas as diferentes concentrações de glutamina (0,1%, 0,2% e 1%) a concentração que atingiu maiores valores de atividade L-asparaginase de *A. terreus* foi 1%, resultado que corrobora, novamente, aquele obtido neste trabalho. Ressalta-se que em ambos trabalhos a L-glutamina não foi o melhor indutor (fonte de nitrogênio) considerando ter altas atividades enzimáticas, resultados coincidentes com aquele determinado neste estudo.

A confirmação do modelo matemático acima apresentado, foi realizada em triplicata empregando os valores ótimos das variáveis independentes, concentração (%) de amido, maltose, asparagina e glutamina, indicadas pelo modelo, visando obter a maior atividade L-asparaginase como resultado da otimização do processo. Estes valores foram obtidos utilizando a função desejabilidade (*desirability*) do software DESIGN-EXPERT 6.0.8, o qual determinou para concentração de amido 0,54%; maltose 0,0%; asparagina 0,44% e glutamina 1,14%.

De acordo com o modelo matemático o valor teórico esperado da variável dependente, atividade L-asparaginase, quando utilizadas as condições otimizadas foi de 116,5 U/L. Por outro lado, depois da realização dos experimentos confirmatórios se obteve uma média de atividade L-asparaginase de 120,723 U/L $\pm$ 16,77 (44,71 $\pm$ 6,21 U/g de substrato), o qual quando comparado com o valor teórico, pode determinar-se uma porcentagem de variação de 3,5%. Esta porcentagem de variação pode ser considerada baixa, uma vez que os processos fermentativos e de produção metabólitos, como as enzimas, são processos biológicos, os quais são susceptíveis a vários fatores que podem afetar seu desenvolvimento, como por exemplo fatores ambientais e externos. Em vários trabalhos que estudam processos biológicos foram observadas porcentagens muito mais elevadas de variação entre os valores preditos e os reais. Em um estudo recente sobre sacarificação e fermentação simultâneas para obtenção de bioetanol a partir de resíduos industriais de batata empregando *Aspergillus niger* e

Saccharomyces cerevisiae, foi observado uma diferença de 14% entre os valores reais e preditos de atividade enzimática de glucoamilases (IZMIRLIOGLU; DEMIRCI, 2016). Em outro estudo da produção de celulasas por *Streptomyces* DSK59, observa-se também porcentagens de variação entre 9% e 14% para alguns dos seus experimentos (BUDIHAL; AGSAR; PATIL, 2016). Outra porcentagem semelhante (9%) foi encontrada em um trabalho de produção de xilanases de *Aspergillus fischeri* Fxn 1 por FES quando comparados seus valores de atividade enzimática reais e preditos na validação do modelo matemático (SENTHILKUMAR et al., 2005).

Com base nestes ensaios e considerando o R^2 de 0,90237 e a porcentagem de erro do modelo, pode-se verificar a exequibilidade do uso da equação (3) como a expressão matemática que modela a produção da enzima L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES. Ressalta-se que no final do processo de otimização, a produção foi 7,39 vezes maior do que a obtida inicialmente ($16,34 \text{ U/L} \pm 3,28$) na seleção do microrganismo produtor da enzima (item 5.1).

5.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus terreus* CCT7693 POR FES EM REATOR DE COLUNA DE LEITO FIXO

Após o processo de obtenção das melhores condições de cultivo de *Aspergillus terreus* CCT7693 para produção de L-asparaginase por FES (amido 0,54%; maltose 0,0%; asparagina 0,44% e glutamina 1,14%), foi avaliada a produção da enzima em reator em coluna de leito fixo visando à avaliação de um sistema susceptível de aumento de escala.

5.7.1 Testes preliminares do sistema de inoculação de *Aspergillus terreus* CCT7693 em reator em coluna de leito fixo

Com o objetivo de inocular de forma homogênea os esporos do microrganismo *Aspergillus terreus* no biorreator em coluna de leito fixo para produção de L-asparaginase extracelular, foi desenvolvido o sistema como apresentado no item 4.11.1, o qual se apresenta esquematicamente na Figura 25.

Figura 25 – Sistema de inoculação de esporos do fungo *Aspergillus terreus*, em reator em coluna de leito fixo

Fonte: arquivo pessoal.

Após a montagem do sistema de inoculação (Figura 25), foi realizado o teste de traçador cujos resultados se apresentam na Figura 26.

Figura 26 – Reator em coluna com bagaço de cana-de-açúcar antes do teste com safranina (A) e misturado com solução marcadora (safranina) após injeção (B)

Fonte: arquivo pessoal.

Como descrito no item 4.11.1, após a injeção da solução de safranina na coluna preenchida previamente com bagaço de cana-de-açúcar, pelo teste de

traçador, foi possível observar que a solução marcadora (vermelha) distribuiu-se de maneira uniforme ao longo de todo o suporte (Figura 26 B). A diferença de cor apresentada na Figura 26 permite confirmar a efetividade do sistema de inoculação e assim executar o estudo de fermentação em estado sólido em reator em coluna de leito fixo para produção de L-asparaginase.

5.7.2 Fermentação em estado sólido em reator em coluna de leito fixo para produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693

Como descrito previamente, após determinadas as condições otimizadas de processo para produção de L-asparaginase, foi importante avaliar também o processo em reator. Para tal objetivo foi selecionado um biorreator em coluna de leito fixo, com o qual foi montado um sistema de acordo com o item 4.11.2, apresentado esquematicamente na Figura 27.

Figura 27 – Sistema empregado para produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES em reator em coluna de leito fixo

Fonte: arquivo pessoal.

A FES foi realizada no biorreator em coluna de leito fixo, e após o tempo de fermentação, o biorreator foi dividido em três seções iguais, e de cada uma, foram obtidos resultados de atividade L-asparaginase pelo método do Hidroxamato (item 4.7). Também foi determinado resultado de atividade total considerando toda a biomassa utilizada no biorreator. Os testes em coluna de leito fixo foram realizados em replicatas. Todos os resultados de atividade L-asparaginase se apresentam na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados de atividade L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por fermentação em estado sólido em reator em coluna de leito fixo

Atividade L-asparaginase						
SEÇÃO	Teste 1		Teste 2		Média	
	(U/L)	(U/g substrato)	(U/L)	(U/g substrato)	(U/L)	(U/g substrato)
INICAL	86,9	32,2	79.37	29.4	83.1	30.8
MEIA	131,9	48,8	111.1	41.1	121.5	45.0
FINAL	98,0	36,3	124.3	46.1	111.2	41.2
TOTAL	105,6	39,1	104.9	38.9	105.3	38.9

Fonte: arquivo pessoal.

De acordo com a Tabela 14, verificou-se média de atividade L-asparaginase de 105,3 U/L (38,9 U/g de substrato), após a FES em reator em coluna de leito fixo. Quando comparado este resultado com o apresentado na confirmação do modelo, realizado em escala pequena (frasco Erlenmeyer de 50 mL), o qual foi $120,723 \pm 16,77$ U/L ($44,71$ U/g de substrato $\pm 6,21$), pode-se observar valores semelhantes, indicando que o reator em coluna de leito fixo é um sistema eficiente para uso neste processo e possível aumento de escala. Este resultado e sua significativa similaridade entre os dados dos diferentes sistemas, permitiu determinar a eficácia do reator em coluna de leito fixo, apresentado na Figura 27, para o processo de produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte.

Atualmente não existe reportado na literatura nenhum trabalho de produção de L-asparaginase utilizando bagaço de cana-de-açúcar, bem como são poucos os trabalhos que apresentam a produção desta importante enzima de natureza extracelular. Essa limitada quantidade de estudos a partir desta biomassa ressalta a importância e mérito científico do presente estudo. De fato, nos últimos anos o interesse na procura de uma enzima com menos efeitos adversos e de novos microrganismos, especialmente eucarióticos, como novas fontes da enzima, tem-se elevado significativamente. Neste contexto, evidencia-se a abordagem deste trabalho na procura de uma L-asparaginase com características nobres que possa ser utilizada na área alimentícia e farmacêutica.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu avaliar diferentes aspectos relacionados com as condições de cultivo e seleção de microrganismos na produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido.

Na seleção de microrganismos produtores de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido, das dez cepas testadas, somente o fungo filamentoso *Aspergillus terreus* CCT7693 foi capaz de produzir a enzima de natureza extracelular (1,83 U/g de glicose), sendo positivo no ensaio de atividade asparaginolítica realizado pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA).

Das duas metodologias de extração testadas (com e sem inibidores de proteasas), determinou-se que a solução extrativa contendo como inibidores de proteasas o fluoreto de fenil-metil-sulfonila (PMSF) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), não foi adequada, devido à formação de partículas suspensas que interferiram na leitura de absorbância.

Na seleção de variáveis, realizado pelo planejamento experimental Taguchi L'16, a maior atividade asparaginolítica encontrada ($22,51 \pm 2,73$ U/g de maltose) foi no ensaio 15, no qual a fonte de carbono utilizada foi maltose; como fonte de nitrogênio L-glutamina; tamanho de partícula entre 0,850 mm e 1,000 mm; em um pH 5,5 e temperatura de 25 °C

De acordo com os resultados obtidos no arranjo ortogonal Taguchi L'16, determinou-se as melhores condições de cultivo de *Aspergillus terreus* CCT7693 para produção de L-asparaginase extracelular por FES, sendo fixados os valores de pH e temperatura em 5,5 e 25 °C, respectivamente, e o tamanho de partícula em sua fração média (0,850 mm e 1,000 mm), para os experimentos posteriores.

Foram determinadas como melhores fontes de carbono a maltose seguida do amido e como fontes de nitrogênio (indutores) a L-glutamina seguida da L-asparagina, as quais foram determinadas como novas variáveis cujas concentrações foram avaliadas em um planejamento experimental composto central rotacional 2⁴.

A produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES foi confirmada por meio do ensaio de cromatografia em camada delgada (CCD).

No processo de otimização empregando desenho composto central rotacional (DCCR) 2⁴, foi registrado 21,67 U/g de substrato como o maior valor de atividade enzimática no experimento 19, quando a concentração (%) de amido foi de 1%, maltose 0% e asparagina e glutamina 1%.

Todos os ensaios do DCCR com uma concentração total de fonte de carbono (amido e maltose) de 3% apresentaram atividade L-asparaginase nula, sendo que a produção de L-asparaginase de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES reduz-se quando utilizadas concentrações de fonte de carbono superiores ou iguais a 3%.

A 95% de confiança, os efeitos das variáveis concentração de amido (%), maltose (%), asparagina (%) e a interação de segunda ordem entre amido (%) e asparagina (%) foram significativos para o processo de produção de L-asparaginase extracelular pelo fungo *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES.

Os efeitos significativos das variáveis concentração de amido (%), maltose (%) e asparagina (%) foram negativos para a variável de resposta, atividade L-asparaginase, e somente a interação de segunda ordem (amido e L-asparagina) apresentou efeito positivo, sendo que a produção da enzima L-asparaginase é favorecida quando utilizadas concentrações da fonte de carbono e nitrogênio baixas.

Considerando a interação de segunda ordem entre a concentração (%) de amido e asparagina, a concentração de L-asparaginase aumenta quando as concentrações de amido e asparagina são baixas (cerca de 0%).

A variável concentração (%) de L-glutamina não foi significativa, e a melhor faixa para a processo de produção de L-asparaginase de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES foi entre 0,5% e 1,5%, sendo que a melhor atividade enzimática foi atingida quando utilizada uma concentração de L-glutamina a 1,0%.

Após determinação do modelo matemático, os valores ótimos das variáveis independentes, que maximizam a produção de L-asparaginase extracelular por FES foram: concentração de amido: 0,54%; concentração de maltose: 0,0%; concentração de asparagina: 0,44% e concentração glutamina: 1,14%.

Quando utilizadas as condições otimizadas fornecidas pelo modelo matemático, a atividade L-asparaginase atingida foi de $120,723 \pm 16,77$ U/L ($44,71 \pm 6,27$ U/g de substrato), com porcentagem de variação de 3,5% quando

comparado com o valor teórico, o que confirmou o modelo matemático como uma expressão adequada que modela corretamente o processo.

Após o processo de otimização, a produção de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES aumentou 7,39 vezes mais do que o obtido na parte inicial deste trabalho.

Foi possível obter atividade L-asparaginase de 105,3 U/L (38,9 U/g de substrato) após a FES em reator em coluna de leito fixo, com resultados similares aos realizados em frasco Erlenmeyer ($120,723 \pm 16,77$ U/L), o que permitiu determinar que o biorreator em coluna de leito fixo é um sistema eficiente neste processo.

Os resultados similares entre os diferentes sistemas permitiram corroborar a eficácia do sistema proposto neste trabalho, utilizando reator em coluna de leito fixo, no processo de produção a grande escala de L-asparaginase extracelular de *Aspergillus terreus* CCT7693 por FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar como suporte.

REFERÊNCIAS

ABUCHOWSKI, A. et al. Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase. **Cancer treatment reports**, v. 63, n. 6, p. 1127–32, jun. 1979.

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5655–64, 15 maio 2001.

AKILANDESWARI, K.; KAVITHA, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Production of bioactive enzyme L-asparaginase from fungal isolates of water sample through submerged fermentation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. SUPPL. 4, p. 363–366, 2012.

AMYLON, M. et al. Intensive high-dose asparaginase consolidation improves survival for pediatric patients with T cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study. **Leukemia**, v. 13, n. 3, p. 335–342, 1 mar. 1999.

ANDRADE, A. T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase fúngica utilizando resíduos do beneficiamento de arroz**. 1999. 62 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos) - Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1999.

ANESE, M. et al. Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2837–2842, nov. 2011.

ANJUM ZIA, M. A. Z. et al. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. **Jurnal Teknologi**, v. 62, n. 2, 15 jul. 2013.

APARNA, C.; JAYA RAJU, K. Optimization of process parameters for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 under solid state fermentation using mixed substrate. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 4, n. 5, p. 354–360, 2015.

APPEL, I. M. et al. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 21, n. 11, p. 2377–80, 2007.

ARAUJO, L. DE F. **Enriquecimento proteico do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru* P. DC) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) por fermentação semi-sólida**. 2004. 195 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2004.

ARRIBAS-LORENZO, G.; FOGLIANO, V.; MORALES, F. J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 63–72, 17 fev. 2009.

ASHIHARA, Y. et al. Modification of E. coli L-asparaginase with polyethylene glycol: Disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 83, n. 2, p. 385–391, jul. 1978.

BADDOEI-DALFARD, A. Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 388–397, 2015.

BALASUBRAMANIAN, K.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Production, Isolation and Purification of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* using Submerged Fermentation. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 778–783, 2012.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Evaluation and Screening of Nitrogen Source for L-asparaginase Production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using Latin Square Design. **Journal of Mathematics and Statistics**, v. 1, n. 2, p. 55–58, 2009a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Production of L-Asparaginase from Natural Substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of Substrate, Supplementary Nitrogen Source and L-Asparagine. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 7, 2009b.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal L-asparaginase. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, n. 2, p. 270–279, 2011a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Production of L-asparaginase from Natural Substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Optimization of Carbon Source and Operating Conditions. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 9, n. 1, 23 jan. 2011b.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923–929, 2012.

BECALSKI, A. et al. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 3, p. 802–8, 29 jan. 2003.

BEDINGFIELD, J. The Novozymes Report 2013. 2013. p. 136. Disponível em: <<http://report2013.novozymes.com/>>. Acesso em: 28/01/2016.

BEUCHAT, L. R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. **Journal of Food Protection (USA)**, 1983.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos**

voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais. 1997. 112 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114–1115, 1961.

BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 35, n. 6, p. 967–974, 1965.

BUDIHAL, S. R.; AGSAR, D.; PATIL, S. R. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 706–712, 2016.

CABRAL, J. M. S.; GAMA, M.; AIRES-BARROS, M. R. **Engenharia Enzimática**. 1. ed. Lisboa: Lidel – edições técnicas, 2003.

CALLEMAN, C. J. The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. **Drug metabolism reviews**, v. 28, n. 4, p. 527–90, nov. 1996.

CEN, P.; XIA, L. Production of cellulases by solid state fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 69–92, 1999.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora SA, 2012.

CHANDRASEKHAR, A. P. Isolation, purification and characterization of asparaginase from aspergillus species. **Int. J. Res. Chem. Environ.**, v. 2, p. 38–43, 2012.

CIESAROVA, Z.; KISS, E.; BOEGL, P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato product. **Journal of Food and Nutrition Research (Slovak Republic)**, 2006.

CLAVELL, L. A. et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 315, n. 11, p. 657–63, 11 set. 1986.

CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de l'asparagine chez les differentes especes animals et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme. **Arch Intern Physiol**, v. 19, p. 369–398, 1922.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido de *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus* em resíduo de abacaxi.** 2004. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

COSTA, J. A. V. **Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus Niger* NRRL 3122 em fermentação semi sólida de farelo de arroz.** 1996. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, out. 2006.

CURRAN, M. P. et al. L-asparaginase from *Thermus aquaticus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 241, p. 571–576, 1985.

DANGE, V.; PESHWE, S. Purification and biochemical characterization of L-asparaginase from *Aspergillus niger* and evaluation of its antineoplastic activity. **Int. J. Sci. Res.**, v. 4, n. 2, p. 564–569, 2015.

DEGROOT, N.; LICHTENSTEIN, N. The action of *Pseudomonas fluorescens* extracts on asparagine and asparagine derivatives. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 40, p. 99–110, 1960.

DEL BIANCHI, V. L.; MORALES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Blucher, 2001. v. 2. p. 260-265.

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology.** Washington: American Society for Microbiology, 1986. p. 66–84.

DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 895167, jan. 2014.

DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications, Report Code-BIO030H. **BCC Research**, v. 7215, 2014.

DIAS, F. F. G. et al. Simplex centroid mixture design to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528–534, 2015.

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

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation.** 1. ed. London & New York: Elsevier Science Publishers LTD, 1992.

DOMÍNGUEZ, A. et al. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 549–554, 2001.

DOMÍNGUEZ, A. et al. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic

enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 549–554, 2001.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977.

DUFOUR, D. **Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques cultivés en milieu solide en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases**. 1990. 262 f. Tese (Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie) - Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 1990.

DURAND, A. et al. Solid state fermentation reactors: From lab scale to pilot plant. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 3, p. 591–597, 1993.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113–125, 2003.

DUVAL, M. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer---Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734–2739, 15 abr. 2002.

EISELE, N. et al. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3316–21, fev. 2011.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 387–393, 2004.

ERTEL, I. J. et al. Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Childrens Cancer Study Group. **Cancer research**, v. 39, n. 10, p. 3893–6, out. 1979.

FARAG, A. M. et al. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295–302, 2015.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme research**, v. 2010, p. 862537, jan. 2010.

FODA, M. S.; ZEDAN, H. H.; HASHEM, S. A. Formation and properties of L-glutaminase and L-asparaginase activities in *Pichia polymorpha*. **Acta microbiologica Polonica**, v. 29, n. 4, p. 343–52, 1980.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review.

Journal of agricultural and food chemistry, v. 51, n. 16, p. 4504–26, 30 jul. 2003.

FURTH, O.; FRIEDMANN, M. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. **Biochemistry**, v. 26, p. 435–440, 1910.

GALLAGHER, M. P.; MARSHALL, R. D.; WILSON, R. Asparaginase as a drug for treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Essays in Biochemistry**, v. 24, p. 1–40, 1989.

GERTZ, C.; KLOSTERMANN, S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 11, p. 762–771, nov. 2002.

GRANVOGL, M.; SCHIEBERLE, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5933–8, 9 ago. 2006.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–26, jan. 1997.

GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed research international**, v. 2013, p. 329121, jan. 2013.

HANN, I. et al. Benefit of intensified treatment for all children with acute lymphoblastic leukaemia: results from MRC UKALL XI and MRC ALL97 randomised trials. UK Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. **Leukemia**, v. 14, n. 3, p. 356–63, mar. 2000.

HASAN, S. D. M. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de Drechslera (Helminthosporium) monoceras obtida por fermentação em estado sólido**. 2002. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

HASKELL, C. M. et al. L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. **The New England journal of medicine**, v. 281, n. 19, p. 1028–34, 6 nov. 1969.

HENDRIKSEN, H. et al. Asparaginase mediate reduction of acrylamide formation in baked, fried and roasted products. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 1–135, 2005.

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. 4168–76, 27 maio 2009.

HESELTINE, C. W. Solid State Fermentation. **Biotechnol. and Bioeng**, v. 14, p.

517–532, 1972.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentation-Part 1. **Process Biochemistry**, v. 12, p. 24–27, 1977a.

HESELTIME, C. W. Solid State Fermentation-Part 2. **Process Biochemistry**, p. 29–32, 1977b.

HILL, J. M. L-Asparaginase Therapy for Leukemia and Other Malignant Neoplasms. **JAMA**, v. 202, n. 9, p. 882, 27 nov. 1967.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. . Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. **Inter. J. Microbiol. Rese.**, v. 3, p. 108–119, 2011.

HOSSEINPOUR, M. N. et al. Lipase production in solid state fermentation using *aspergillus niger*: Response surface methodology. **International Journal of Engineering, Transactions B: Applications**, v. 25, n. 3, p. 151–159, 2012.

HUANG, L. et al. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561–9, 1 mar. 2014.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191–8, out. 2009.

HYMAVATHI, M.; SATHISH, T. Impact of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574): Application of saturated Plackett-Burman design. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 473–480, 2010.

ILIUTA, I.; ILIUTA, M. C.; LARACHI, F. Hydrodynamics modeling of bioclogging in waste gas treating trickle-bed bioreactors. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 14, p. 5044–5052, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer infantil. 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em: 10/05/2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation for carcinogenic risk of chemicals to humans. **Lyon**, v. 60, p. 435–453, 1994.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Acrylamide. Geneva, World Health Organization. **Environmental Health Criteria**, v. 49, n. 36, 1985.

ISIKHUEMHEN, O. S.; ZADRAZIL, F.; FASIDI, I. O. Cultivation of white rot fungi in solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55,

n. 5, p. 388–393, 1 maio 1996.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. **Fuel**, v. 185, p. 684–691, 2016.

JAFFE, N. et al. Favorable Remission Induction Rate with Twice Weekly Doses of L-Asparaginase. **Cancer Res.**, v. 33, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 1973.

JONES, B. et al. Optimal use of L-asparaginase (NSC-109229) in acute lymphocytic leukemia. **Medical and pediatric oncology**, v. 3, n. 4, p. 387–400, jan. 1977.

KALYANASUNDARAM, I. et al. Production, Purification and Characterisation of Extracellular L-Asparaginase From Salt Marsh Fungal Endophytes. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 663–677, 2015.

KAN, C. W.; YUEN, C. W. M. Enzymes at work. **Textile Asia**, v. 36, n. 12, p. 46–49, 2005.

KEATING, M. J. et al. L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. **Leukemia & lymphoma**, v. 10 Suppl, p. 153–7, 1 jan. 1993.

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 530–543, 31 dez. 2010.

KIRANMAYI, M. U.; PODA, S.; VIJAYALAKSHMI, M. Production and optimization of L-asparaginase by an actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, p. 799–805, 2014.

KIRIYAMA, Y. et al. Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase. **Leukemia**, v. 3, n. 4, p. 294–7, abr. 1989.

KLEINSTREUR, C. Analysis of biological reactors. In: BUNGAY, H. R.; BELFORT, G. (Eds.). . **Advanced Biochemical Engineering**. New York: John Wiley & Sons, Inc.I, 1987. p. 33–78.

KONDO, R. Investigation on Mechanism of Biological Delignification by Solid State Fermentation. **J. of Scientific & Ind. Research**, v. 55, p. 394–399, 1996.

KOZAK, M.; JURGA, S. A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II. **Acta biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p. 509–13, jan. 2002.

KUMAR, M. N. S. **Production, purification and characterisation of fungal L-asparaginase**. 2013. 278 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Central Food Technological Research Institute, University of Mysore, Mysore, 2013.

KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Localization and production of novel

L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 223–229, fev. 2010.

LANG, S. Über desamidierung im Tierkörper. **Beitr chem Physiol Pathol**, v. 5, p. 321–345, 1904.

LASS-FLÖRL, C. *Aspergillus terreus*: how inoculum size and host characteristics affect its virulence. **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 8, p. 1192–4, 15 abr. 2012.

LEAGUE, G. P.; SLOT, J. C.; ROKAS, A. The ASP3 locus in *Saccharomyces cerevisiae* originated by horizontal gene transfer from *Wickerhamomyces*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 7, p. 859–63, 1 nov. 2012.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica**. 5. ed. Barcelona: Omega, 2009.

LIGNERT, H. et al. Acrylamide in food: mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods. **Food & Nutrition Research**, v. 46, n. 4, p. 159–172, 1 dez. 2002.

LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 6, p. 258–265, jun. 1985.

LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. Application of a multi-layer packed bed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 117–123, 1998.

MAHEVA, E. et al. Sporulation of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 2, p. 97–102, fev. 1984.

MARTINELLO, T. et al. Optimization of poorly compactable drug tablets manufactured by direct compression using the mixture experimental design. **International journal of pharmaceutics**, v. 322, n. 1–2, p. 87–95, 28 set. 2006.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Médica**. Barueri: Manole, 2005.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, p. 450–452, 1964.

MCCOLLISTER, D. D.; OYEN, F.; ROWE, V. K. Toxicology of acrylamide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 172–181, mar. 1964.

MEDEIROS VINCI, R.; MESTDAGH, F.; DE MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1138–1154, ago. 2012.

MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their

friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–640, 2006.

MICHELOT, E. A low-acrylamide future beckons. 2016, **Health & nutrition information sheet**. Disponível em: <http://www.acrylaway.novozymes.com/en/information-center/News-andupdates/Documents/Acrylaway_Information.pdf>. Acesso em: 05/06/2016.

MINISTERIO DE SAÚDE. Ministério da Saúde enviou medicamento para teste de qualidade. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28021-ministerio-da-saude-enviou-medicamento-para-teste-de-qualidade>>. Acesso em: 05/06/2017.

MISHRA, A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 33–42, 2006.

MITCHELL, D. A. et al. General principles of reactor design and operation for solid substrate cultivation. In: DOELLE, H. W. et al. (Eds.). . **International Organization of Biotechnology Bioengineering, Brisbane (GTM), Solid Substrate Cultivation**. Amsterdam: Elsevier Ltd, 1993. p. 115–139.

MITCHELL, D. A. et al. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1–2, p. 167–178, 1 out. 1999.

MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1211–1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 137–147, 2003.

MOHAN KUMAR, 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, 19 abr. 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150–158, maio 2013.

MONICA, T. et al. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Proteomics & Enzymology**, v. 2, p. 2, 2014.

MOO-YOUNG, M.; CANNEL, E. Solid State Fermentation Systems. **Process Biochemistry**, p. 24–28, 1980.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENGGERDY, R. P. Principles of the Solid

Substrate Fermentation, In Filamentous Fungi. **Fungal Biotechnology**, v. 4, p. 117–144, 1983.

MOTTRAM, D. S.; WEDZICHA, B. L.; DODSON, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 448–9, 3 out. 2002.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 28, n. 2, p. 97–113, ago. 1998.

MUSO, J. J. C. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **BJM Braz J Microbiol**, v. 167, p. 1–9, 2016.

NAGARETHINAM, S. et al. **Microbial L-Asparaginase and its future prospects** *Asian Journal of Medical Research*, 1 out. 2012. Disponível em: <http://eprints.manipal.edu/79344/1/10%2CAJMR_review_asparaginase.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2016

NARAHARA, H. et al. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, v. 60, n. 4, p. 311–319, 1982.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208–21, 1 mar. 2007.

NESBIT, M. et al. Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. **The American journal of pediatric hematology/oncology**, v. 1, n. 1, p. 9–13, jan. 1979.

NORONKOSKI, T. et al. Glycosylasparaginase-catalyzed Synthesis and Hydrolysis of -Aspartyl Peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26295–26297, 9 out. 1998.

NOVAK, E. K.; PHILLIPS, A. W. L-glutamine as a substrate for L-asparaginase from *Serratia marcescens*. **Journal of bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 593–600, fev. 1974.

OETTGEN, H. F. et al. Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. **Cancer**, v. 25, n. 2, p. 253–278, fev. 1970.

OHNUMA, T. et al. Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man. **Cancer Res.**, v. 30, n. 9, p. 2297–2305, 1 set. 1970.

ORIOL, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau**. 1987. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, 1987.

ORTEGA, J. A. et al. L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **Cancer research**, v. 37, n. 2, p. 535–40, fev. 1977.

PACETTI, S.; ABBOTT, L. **Amino acid mimetic copolymers and medical devices coated with the copolymers**, 2008. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US8071705>>. Acesso: 05/06/2016.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 109–117, mar. 1992.

PANDEY, A. et al. **Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications**. 1st ed ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3636, p. 1–4, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, mar. 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, jul. 2000.

PANOSYAN, E. H. et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–26, abr. 2004.

PARK, Y. K. et al. Pharmacology of Escherichia coli-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. **Anticancer research**, v. 1, n. 6, p. 373–6, jan. 1981.

PEDRESCHI, F. et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1473–1476, jul. 2011.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food chemistry**, v. 109, n. 2, p. 386–92, 15 jul. 2008.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998.

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia fícus* - indica Mill) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–49, 15 jan. 2011.

PINTO, G. A. S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 180f. Tese (Doutorado em ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PRAGER, M. D.; BACHYNSKY, N. Asparagine synthetase in asparaginase resistant and susceptible mouse lymphomas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 43–47, abr. 1968.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 199–209, 1980.

ROUSSOS, S. et al. **Advances in solid state fermentation**. Montpellier: Springer Science+Business Media, 1997.

ROWLEY, B.; WRISTON, J. C. J. Partial purification and antilymphoma activity of *Serratia marcescens* L-asparaginase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 2, p. 160–165, 1967.

RUÍZ-LEZA, H. A. et al. Bio-reactors desing for solid state fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 6, n. 1, p. 33–40, 2007.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos Ed, 2002.

SAKAMOTO, T. et al. Partial purification and some properties of extracellular asparaginase from *Candida utilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1359–1364, 1977.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, jul. 2005.

SARQUIS, M. I. DE M. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 97–107, mar. 1992.

SAXENA, R. K.; SINHA, U. L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current science**, 1981.

SCHEETZ, R. W.; WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of

an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 1, p. 184–189, jan. 1971.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1º ed. São Paulo: Blucher, 2001.

SCHRAPPE, M. et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3310–22, 1 jun. 2000.

SEGERBÄCK, D. et al. Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 5, p. 1161–5, maio 1995.

SENTHILKUMAR, S. R. et al. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 12, p. 1380–1386, 2005.

SOCCOL, C. R. **Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique**. 1992. 218 f. Tese (Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie) - Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, 1992.

SOEDIONO, B. Oncaspar. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 160, 1989.

SOLER, M. F. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SONIYAMBY, A. R. et al. Isolation, Production and Anti-Tumor Activity of L-asparaginase of *Penicillium* sp. **Indian Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 2, p. 38–42, 2011.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SREENIVASULU, V; JAYAVEERA, KN; RAO, P MALLIKARJUNA. Solid-State Fermentation for the Production of L-Asparaginase by *Aspergillus* Sp. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 1, p. 21–25, 2009.

STADLER, R. H. et al. Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 449–50, 3 out. 2002.

STADLER, R. H. et al. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. **Chemical research in toxicology**, v. 16, n. 10, p. 1242–50, out. 2003.

STADLER, R. H. et al. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the maillard reaction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5550–8, 25 ago. 2004.

STAMS, W. A. G. et al. Sensitivity to L-asparaginase is not associated with expression levels of asparagine synthetase in t(12;21)+ pediatric ALL. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2743–7, 1 abr. 2003.

TAEYMANS, D. et al. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 5, p. 323–47, jan. 2004.

TANGERDY, R. . Solid State Fermentation. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 96–99, 1985.

TAREKE, E. et al. Acrylamide: a cooking carcinogen? **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 6, p. 517–22, jun. 2000.

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, 14 ago. 2002.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, dez. 2013.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the Fusarium sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3692–3696, 2012.

TOSA, T. et al. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 387–392, 1972.

TRUEWORTHY, R. C. et al. Repeated use of L-asparaginase in multi-drug therapy of childhood leukemia. **Medical and pediatric oncology**, v. 4, n. 2, p. 91–7, jan. 1978.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168–178, 2011.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175–178, 2000.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* mtcc 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, n. 9, p. 121–129, 2013.

VERMA, N. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

VIJAY, B.; JAYA RAJU, K. Production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 under solid state fermentation using pearl millet and finger millet as mixed substrate. **J. Chem. Biol. Phys. Sci. B**, v. 5, n. 1, p. 366–377, 2015.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Solid state fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. Chapter 2.

VIVEKANANDHA, S.; SANKARESWARAN, M.; PRABHAVATHI, P. A novel role of L-Asparaginase enzyme production from fungal species. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars**, v. 3, n. 6, p. 7–14, 2013.

WADE, H. E. et al. A new L-asparaginase with antitumour activity? **The Lancet**, v. 2, n. 7571, p. 776–777, 1968.

WADE, H. E.; ROBINSON, H. K.; PHILLIPS, B. W. Asparaginase and glutaminase activities of bacteria. **Journal of general microbiology**, v. 69, n. 3, p. 299–312, 1 dez. 1971.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la Biotecnología de los Hongos**. Zaragoza: Acibia Editorial, 1995.

WEI, D. ZH.; LIU, H. Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 2, p. 129–131, fev. 1998.

WEIL, J. **Bioquímica Geral**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.

WRISTON, J. C.; YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 39, p. 185–248, 1973.

YASUHARA, A. et al. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 14, p. 3999–4003, 2 jul. 2003.

YAYLAYAN, V. A.; WNOROWSKI, A.; PEREZ LOCAS, C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1753–7, 12 mar. 2003.

YOSHIMOTO, T. et al. Characterization of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of leukemia. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 77, n. 12, p. 1264–70, dez. 1986.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo**. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências

Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

ZHANG, Y.-Q. et al. Immobilization of l-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3751–3759, 2004.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Cranberry processing waste for solid state fungal inoculant production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 323–329, mar. 1998.

ZUO, S. et al. Recent research progress on microbial l-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069–1079, 2014.

ZYZAK, D. V et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4782–7, 30 jul. 2003.