



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



William Fernando Vieira

Produção de L-Asparaginase de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana para diferentes biorreatores

Uberlândia - MG

Fevereiro de 2018



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



William Fernando Vieira

Produção de L-Asparaginase de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana para diferentes biorreatores

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Vicelma Luiz Cardoso
Coorientador: Ubirajara Coutinho Filho

Uberlândia - MG

Fevereiro de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistemas de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

V65p Vieira, William Fernando, 1988
2018 Produção de L-Asparaginase de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana
para diferentes biorreatores/ William Fernando Vieira. – Fevereiro de 2018.
87 p.: il.

Orientador: Vicelma Luiz Cardoso.

Coorientador: Ubirajara Coutinho Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.177>

Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Fermentação - Teses. 3. Enzimas - Teses.
4. Poliuretanas - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz, . II. Coutinho Filho, Ubirajara. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

William Fernando Vieira

Produção de L-Asparaginase de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana para diferentes biorreatores

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia - MG, 05 de Fevereiro de 2018:

Prof. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Orientador (PPGEQ - UFU)

Prof. Dr Ubirajara Coutinho Filho
Coorientador (PPGEQ - UFU)

Prof. Dr Adalberto Pessoa Júnior
Membro da banca (FCF - USP)

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Membro da banca (INGEB- UFU)

Prof. Dra. Verônica dos Santos Lopes
Membro da banca (FECIV - UFU)

Uberlândia - MG
Fevereiro de 2018

Aos meus pais André Honorato e Abadia Aparecida pelo exemplo de dedicação e força durante todo o meu processo de formação, a quem serei eternamente grato. Aos meus irmãos, irmãs, tios e tias, pelo apoio nas mais diversas situações e decisões.

Aos meus avós Osmar e Sebastiana, pelo exemplo de vida e boa conduta. À minha namorada Kellen Cristina, pelo companheirismo incondicional.

Agradecimentos

Meus agradecimentos, primeiramente, ao Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho pela orientação, pelas inúmeras contribuições durante o desenvolvimento do trabalho e por ter-me confiado a grande responsabilidade de desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dra. Vicelma Luiz Cardoso, pelas orientações e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho, considerações realizadas na qualificação do trabalho.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela parceria no projeto de pesquisa associado ao desenvolvimento da presente dissertação.

Aos funcionários, técnicos e professores da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia do curso de Pós-graduação em Engenharia Química.

As instituições de fomento e pesquisa FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais pelo apoio moral e emocional durante o desenvolvimento do trabalho, pelas considerações de conduta realizadas na construção deste trabalho.

Aos meus avós que na qualidade de pais duas vezes, me ajudaram com apoio moral e financeiro durante toda a minha vida acadêmica, em especial minha avó Sebastiana Elias de Moraes por ter me criado e educado nos melhores costumes éticos e morais.

Aos meus irmãos e irmãs pela parceria de sempre, por estarem sempre no lugar certo na hora certa e principalmente na família certa.

A minha namorada Kellen Cristina Rosa da Silva pela cumplicidade nas horas boas e também nas difíceis, por ser compreensiva com o tempo de descanso que foi dedicado ao trabalho de pesquisa.

Aos meus tios, tias que atuaram muitas das vezes na função paterna, me apoiando de todas as formas possíveis.

Aos meus primos e primas, pela troca de experiências durante a nossa busca pelo crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus amigos que com palavras de apoio me motivaram a continuar lutando e acreditando neste projeto de carreira.

Aos colegas de laboratório, por compartilharem comigo as dificuldades e alegrias durante toda a construção deste trabalho.

Em fim, agradeço a todos aqueles que participaram da construção deste trabalho, muito obrigado pela parceria e amizade construída durante este período de aprendizado.

*“Não vos amoldeis às estruturas deste mundo,
mas transformai-vos pela renovação da mente,
a fim de distinguir qual é a vontade de Deus:
o que é bom, o que Lhe é agradável, o que é perfeito.
(Bíblia Sagrada, Romanos 12, 2)*

Resumo

A L-asparaginase é uma enzima de fundamental importância no tratamento do câncer e também é útil na indústria alimentícia no controle de acrilamida em alimentos processados em altas temperaturas. Devido à importância da L-asparaginase, as pesquisas para novos microrganismos capazes de produzi-la por fermentação em estado sólido têm sido investigadas. Nesta dissertação de mestrado, o *Penicillium sp.* O LAMAI 505 foi utilizado na produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido (FES). A dissertação investigou: a) a influência da temperatura, do pH e das concentrações de glicose e L-asparagina e do tamanho de inóculo na produção de L-asparaginase; b) a produção otimizada de L-asparaginase pelo método de Redes Neurais Artificiais (RNA) e Algoritmo Genético (AG); c) avaliou a produção de L-asparaginase utilizando novos biorreatores, reciclo de meios nutritivo e reutilização de células do fungo e de espuma de poliuretano. Observou-se: a) O modelo de RNA de três camadas contendo 18 neurônios em camada oculta apresentou descrição satisfatória da produção de L-asparaginase ($R^2 = 0,99$ para estágio de treinamento e $R^2 = 0,98$ em fase de validação); b) condições otimizadas (16,96 mL de meio nutriente/g de suporte sólido, 1,0 g/L de L-asparagina, 5,24 g/L de glicose, pH igual a 5,0 e temperatura de 44,3 °C a atividade da L-asparaginase foi de 3411,6 U/kg, que foi 1,61 vezes maior do que o melhor valor obtido sem condições otimizadas; c) a taxa de reciclagem de 2,0 mL/min a 48 h, obtendo a atividade máxima de 3716,7 U/kg de suporte sólido (9,3 % maior que a atividade em biorreator estático); d) a produção de L-asparaginase em cinco ciclos de reutilização de células de *Penicillium sp.* LAMAI 505 e suporte inerte proporcionaram atividade de L-asparaginase de 6050,0 U/kg de suporte sólido no terceiro ciclo e atividade média de 3878,0 U/kg de suporte sólido para cinco ciclos de reutilização, representando um aumento médio dos cinco ciclos de reutilização de 14.1 % em relação ao biorreator estático. Os resultados indicam que a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES com suporte inerte (FES-SI) é satisfatório quando comparado com a produção encontrada na literatura em estudos com outras espécies de fungos em condições otimizadas, o que sugere que a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* O LAMAI 505 é de grande importância para o desenvolvimento deste setor comercial.

Palavras-chave: L-asparaginase, fermentação em estado sólido, espuma de poliuretano.

Abstract

L-asparaginase is an enzyme of fundamental importance in the treatment of cancer and is also useful in the food industry in the control of acrylamide in foods processed at high temperatures. Due to the importance of L-asparaginase, research for new microorganisms capable of producing it and the use of solid-state fermentation have been investigated. In this master's dissertation, the *Penicillium sp.* LAMAI 505 was used in the production of L-asparaginase by solid-state fermentation (SSF). The dissertation investigated: a) influence of temperature, pH and concentrations of glucose and asparagine and inoculum size in asparaginase production; b) optimized L-asparaginase production by Artificial Neural Networks (ANN) method and Genetic Algorithm (GA); c) and evaluated L-asparaginase production using novel bioreactors by recycling media and re-using cells. It was observed: a) three-layer ANN model containing 18 neurons in hidden layer presented satisfactory description of L-asparaginase production ($R^2 = 0.99$ for the training stage and $R^2 = 0.98$ in validation stage); b) under optimized conditions (16.96 mL of nutrient medium/g of solid support, 1.0 g/L of L-asparagine, 5.24 g/L of glucose, pH equal to 5.0 and temperature of 44.3 °C) the activity of L-asparaginase was 3411.6 U/kg, which was 1.61 times higher than the best value obtained with no optimized conditions; c) the recycle rate of 2.0 mL/min at 48 h provided the maximum activity of 3716.7 U/kg of solid support (9.3 % higher than the activity in static bioreactor); d) the L-asparaginase production in five re-use cycles of *Penicillium sp.* LAMAI 505 cells and inert support provided L-asparaginase activity of 6050.0 U/kg of solid support in the third cycle and average activity 3878.0 U/kg of solid support for five reuse cycles, representing a mean increase of the five reuse cycles of 14.1 % in relation to the static bioreactor. Results indicate that the production of L-asparaginase from *Penicillium sp.* by FES with inert support (FES-SI) is satisfactory when compared with production found in the literature in studies with other species of fungi under optimized conditions, which suggests that the production of L-asparaginase from *Penicillium sp.* LAMAI 505 is of great importance for the development of this commercial sector.

Keywords: L-asparaginase, solid state fermentation, polyurethane foam.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Conversão de L-asparagina em L-aspartico e amônia	25
Figura 2 – Imagem de microscopia eletrônica da poliuretana com <i>Penicillium sp.</i> LA-MAI 505.	27
Figura 3 – Esquema ilustrativo da classificação básica dos fungos.	29
Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do <i>Penicillium sp.</i> utilizado na FES.	30
Figura 5 – A estrutura tetramétrica da L-asparaginase de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 6 – Representação esquemática da LLA no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes.	35
Figura 7 – Espuma de poliuretana utilizada na FES com suporte inerte.	40
Figura 8 – Biorreator leito estático do tipo bandeja.	41
Figura 9 – Biorreator estático do tipo leito empacotado.	42
Figura 10 – Biorreator do tipo tambor rotativo.	42
Figura 11 – Biorreator do tipo leito fluidizado.	43
Figura 12 – Cultivo do <i>Pencillium sp.</i> em Czapek.	47
Figura 13 – Procedimento de contagem de células de fungo na solução utilizada na FES.	48
Figura 14 – Imagem dos suportes sólidos de farelo de arroz, bagaço de malte e espuma de poliuretana, respectivamente da esquerda para direita.	49
Figura 15 – Representação esquemática do biorreator estático isotérmico.	50
Figura 16 – Representação esquemática do biorreator batelada alimentada.	51
Figura 17 – Representação esquemática do biorreator leito gotejante.	52
Figura 18 – Reações para a quantificação de L-asparaginase.	54
Figura 19 – Procedimento de análise da L-asparaginase.	55
Figura 20 – Produção de L-asparaginase em FES-SI (espuma de poliuretana) e FES (biomassas farelo de arroz e bagaço de malte), em diferentes teores de unidades.	57
Figura 21 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido de farelo de arroz antes e depois da fermentação.	59
Figura 22 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido de bagaço de malte antes e depois da fermentação.	60
Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido inerte de poliuretana antes e depois da fermentação.	60
Figura 24 – Gráfico dos ajustes das etapas de treinamento e validação dos dados experimentais utilizado RMA-AG.	61
Figura 25 – Curva de ajusta da RNA-AG com restrição de adição de L-asparagina.	63
Figura 26 – Curva de ajusta da RNA-AG sem restrição de adição de L-asparagina.	64

Figura 27 – Análise do meio líquido e concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.	65
Figura 28 – Análise da superfície de resposta das fontes de carbono (glicose e asparagina) utilizadas na FES-SI.	66
Figura 29 – Análise da superfície de resposta do pH e da concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.	66
Figura 30 – Análise da superfície de resposta da temperatura e da concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.	67
Figura 31 – Análise do meio líquido e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.	67
Figura 32 – Análise da temperatura e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.	68
Figura 33 – Análise do pH e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.	68
Figura 34 – Análise do pH e da temperatura na produção de L-asparaginase.	69
Figura 35 – Análise do meio líquido e da temperatura na produção de L-asparaginase.	69
Figura 36 – Análise do meio líquido e do pH na produção de L-asparaginase.	70
Figura 37 – Efeitos no tempo de FES-SI na produção de L-asparaginase.	71
Figura 38 – Gráfico de produção de L-asparaginase no reator batelada com reciclo de meio nutritivo otimizado em biorreator estático.	72
Figura 39 – Gráfico de reúso poliuretano na produção de L-asparaginase utilizando biorreator com alimentação e retirada de produto.	73

Lista de tabelas

Tabela 1	– Principais classificações das classes de enzimas.	31
Tabela 2	– Espécies de fungos utilizados na produção de L-asparaginase ao longo do tempo.	33
Tabela 3	– Enzimas utilizadas no tratamento terapêutico.	34
Tabela 4	– Análise dos suportes sólidos na FES.	49
Tabela 5	– Avaliação da vazão e do tempo no biorreator leito gotejante.	51
Tabela 6	– Planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase de <i>Penicillium sp.</i>	53
Tabela 7	– Comparação da FES com a literatura.	58
Tabela 8	– Ajustes nas etapas de treinamento e validação de modelo de RNA.	61
Tabela 9	– Resultados da otimização da produção de L-asparaginase de <i>Penicillium sp.</i>	62
Tabela 10	– Resultados otimizados obtidos com o modelo de RNA-AG no tempo de fermentação de 72 h.	64

Lista de abreviaturas e siglas

AG	Algoritmo Genético
CRM	Centro de Recurso Microbianos
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FES	Fermentação Estado Sólido
FES-SI	Fermentação Estado Sólido com Suporte Inerte
FS	Fermentação Submersa
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
IARC	International Agency for Research Cancer
IC	Imobilização de Células
LAMAI	Código de armazenamento no CRM
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MI	Microrganismo imobilizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDP	Parcerias para o Desenvolvimento Público
RMSE	Root Mean Square Error
RNA	Rede Neural Artificial
RNA-AG	Rede Neural Artificial com Algoritmo Genético
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UNESP	Universidade Estadual Paulista

Lista de símbolos

μ	Micro ou 10^{-6} unidade de medida
Λ	Atividade de L-asparaginase
δ	Leitura de Absorbância
θ	tempo de incubação (minuto)
Vol_{Ext}	Volume da solução de extração (mL)
$Vol_{Amostra}$	Volume da amostra de análise (mL)
$F_{Diluição}$	Fator de diluição da amostra
X^{cod}	Valor da variável codificada
X^{real}	Valor da variável real
x^{max}	Valor máximo do conjunto da mesma variável
x^{min}	Valor mínimo do conjunto da mesma variável
Y_i^{calc}	Valor calculado para cada ponto do planejamento
Y_i^{Exp}	Valor experimental para cada ponto do planejamento
Y_m	Valor médio calculado entre valor calculado e experimental

Sumário

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Introdução	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	Fungos	29
2.2	Enzimas	30
2.3	L-asparaginase	32
2.3.1	Uso farmacêutico	33
2.3.2	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	35
2.3.3	Toxicidade e Hipersensibilidade	36
2.4	Uso na indústria de alimentos	36
2.5	Produção de L-asparaginase	37
2.5.1	Fermentação submersa (FS)	37
2.5.2	Fermentação estado sólido (FES)	38
2.5.3	Suporte inerte de poliuretana	39
2.5.4	Imobilização de células (IC)	40
2.6	Biorreatores	40
2.6.1	Biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Fungo utilizado na produção de enzimas	47
4.2	Suportes sólidos utilizados inicialmente na FES	48
4.3	Fermentação em estado sólido com suporte inerte (FES-SI)	50
4.3.1	Otimização da FES-SI	52
4.4	Análise da L-asparaginase	54
4.5	Modelagem da produção de L-asparaginase	55
4.5.1	Rede neural artificial	55
4.5.2	Algoritmo genético aplicado na RNA (RNA-AG)	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1	Comparação dos suportes sólidos na produção de L-asparaginase	57
5.2	Modelagem e otimização da produção de L-asparaginase	61

5.3	Aplicação das condições ótimas no tempo	70
5.4	Análise dos reatores utilizados nas FES-SI	71
5.4.1	Reator de reciclo de meio (leito gotejante)	71
5.4.2	Reator com alimentação e retirada de produto intermitentes	72
6	CONCLUSÃO	75
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
	REFERÊNCIAS	79

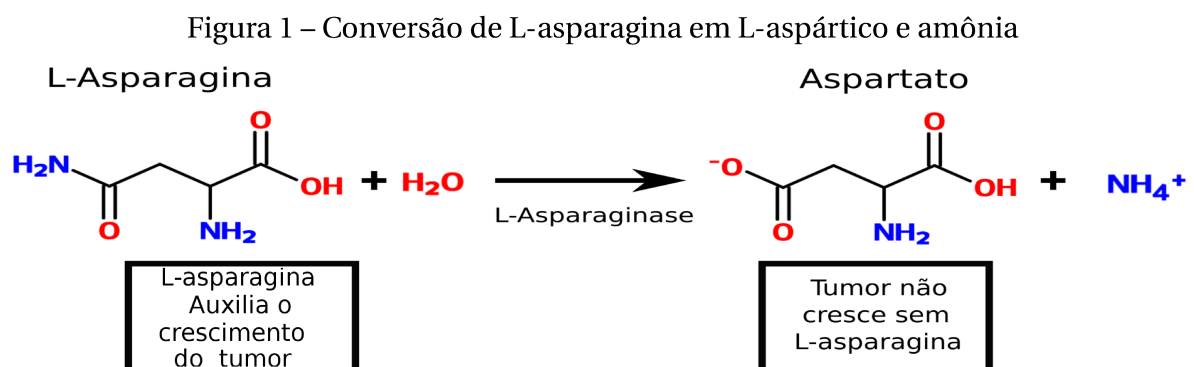
1 Introdução

1.1 Introdução

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) é uma enzima encontrada em diferentes tipos de organismos vivos, tais como, plantas, animais e microrganismos (KORNBRUST et al., 2010). Em meados dos anos 1960 foi descoberto a potencialidade clínica anti-tumoral da enzima L-asparaginase, que se destaca como agente terapêutico padrão ouro no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e pelo potencial de uso clínico em inflamações e outros tipos de câncer (SOLER, 2015; CACHUMBA et al., 2016; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2017; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017).

O Brasil atualmente investe cerca de R\$ 4 bilhões de reais por ano de recursos do Ministério da Saúde em medicamentos biológicos, buscando atender várias doenças, como por exemplo hemofilias, esclerose múltipla, artrite reumatoide e diabetes. As parcerias para o desenvolvimento público (PDPs) são os principais mecanismos para o aumento dos fármacos biológicos no país. A L-asparaginase é um exemplo na modalidade de medicamentos produzido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) com parceria com empresas privadas (ANVISA, 2017).

A L-asparaginase atua na hidrólise do aminoácido L-asparagina em L-aspartato e amônia, como mostra a Figura 1, cortando parte do suprimento das células tumorais impedindo assim que essas cresçam e ganhem força, diminuindo o desenvolvimento do câncer usando o aminoácido L-asparagina (BERG, 2011). A L-asparaginase tem mostrado ser um agente terapêutico eficaz em diferentes tumores, mas principalmente no LLA (WU et al., 2014). Desta forma a L-asparaginase assume um papel de destaque no tratamento de câncer no Brasil e no mundo, sendo produto de interesse em pesquisas acadêmicas e em empresas produtoras de fármacos.



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

Outra forma de aplicação da enzima L-asparaginase é na indústria alimentícia na contenção de acrilamida, substância tóxica que é produzida em alimentos processados a altas temperaturas (PEDRESCHI et al., 2011). A acrilamida é formada por meio da reação de Maillard em alimentos ricos em açúcares redutores na presença de L-asparagina, durante o processamento térmico (DIAS et al., 2017). Um exemplo da potencialidade da L-asparaginase e a aplicação da enzima em processamento de batata chips reduzindo em 90 % a formação de acrilamida neste alimento (VINCI et al., 2011; CÂNDIDO, 2015).

A Organização Mundial da Saúde e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura recomendaram a redução da concentração de acrilamida em alimentos. Em 2015, o EFSA (European Food Safety Authority), a Autoridade Europeia em Segurança Alimentar, publicou uma avaliação do risco de acrilamida nos alimentos, no qual concluíram que a ingestão de acrilamida aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de câncer para os consumidores em todos os grupos etários (EFSA, 2015).

Atualmente a produção de L-asparaginase em larga escala é realizada utilizando a fermentação submersa (FS) com as bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; SAEED et al., 2017). O processo de FS é utilizado por causa da disponibilidade dos nutrientes, difusão microbiana eficiente e boa transferência de massa e calor no processo fermentativo, no entanto, a FS necessita de grandes demandas de energia, além disso apresenta uma baixa produção com alta liberação de efluentes quando comparada com a FES (DORIYA et al., 2016; IRFAN et al., 2016).

A FES pode ser definida pelo crescimento de microrganismos em substratos sólidos umedecidos na ausência de água livre adsorvida no interior da matriz sólida. A FES possui ótima produção volumétrica e estabilidade enzimática nas variações tanto de pH, de temperatura e de tempo de fermentação. Além disso a FES tem sido usada para diversos microrganismos, mas os fungos filamentosos são os mais explorados para esse tipo de fermentação, porque eles crescem em todo o substrato sólido e são grandes produtores de enzimas (KAPNOOR; MULIMANI, 2010; PINTO, 2012; PEREIRA, 2014).

Além disso, a FES vem cada vez mais sendo utilizada na produção enzimática, devido o potencial produtivo associado as suas características, menor volume de reator, meio de fermentação barato e excelente produção (PANDEY et al., 1999; ZHANG; WANG; CHEN, 2017). Entre as várias formas de FES o uso de células imobilizadas em suportes inertes (FES-SI) se destaca por ser capaz de aumentar a produção de diferentes compostos (MURADO et al., 1997; PINTADO; GONZÁLEZ; MURADO, 1998; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2003; MIRÓN et al., 2010).

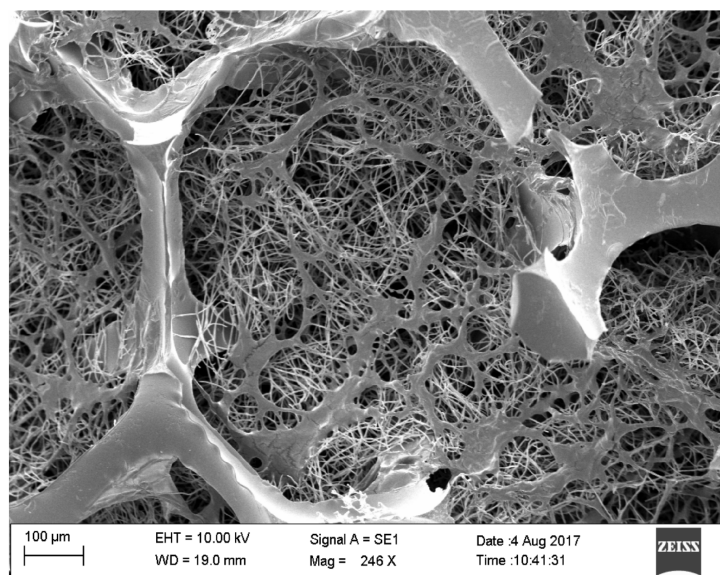
Entre as diferentes fontes de organismos vivos produtores de L-asparaginase pode-se destacar alguns fungos produtores, tais como, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (HOSAMANI; KALIWAL, 2011; DORIYA et al., 2016; PATRO; GUPTA, 2012; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). Essa tendência do uso dos fungos como microrganismos

para a produção de L-asparaginase é visando contornar os quadros alérgicos adversos, devido as reações de hipersensibilidade durante a terapia do LLA, quando utilizado a L-asparaginase bacteriana (MENEGUETTI, 2017; RODRÍGUEZ et al., 2017).

A espuma de poliuretana é um material sintético leve e de fácil manipulação que apresenta ótimas possibilidades para a FES-SI na busca por diferentes tipos de reatores, isso por que delimita fisicamente as células na região de atuação catalítica com possibilidade de aplicação do suporte em processos de operação contínua e descontínua (FARINAS, 2015). A FES-SI caracteriza-se por ser um método limpo e de grande potencial para reutilização do suporte inerte, além das fáceis condições operacionais (KOURKOUTAS; KANELAKI; KOUTINAS, 2006).

A imobilização de células de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana é função de sua resistência e durabilidade que possibilita o reúso, sua estrutura porosa que facilita crescimento das células no interior da poliuretana como mostra a Figura 2, permeabilidade que facilita o transporte de massa e calor (CHEN, 2013; ZHANG; WANG; CHEN, 2017). Portanto, por se tratar de material versátil, de fácil manipulação, por possuírem células abertas, permeáveis a gás e líquido, pela possibilidade de gerar materiais mais puros, as espumas flexíveis de poliuretana são ótimas opções de suporte sólido para a FES-SI.

Figura 2 – Imagem de microscopia eletrônica da poliuretana com *Penicillium sp.* LAMAI 505.



Nota: A imagem de espuma de poliuretana com o fungo *Penicillium sp* foi aumentada 246 vezes em relação ao tamanho original.

Fonte: Autor, (2018).

Assim, torna-se evidente a necessidade de novas formas de produção da L-asparaginase para reduzir os custos operacionais e aumentar a disponibilidade da enzima na formulação de fármacos produzidos em países que não são autossuficientes, como o Brasil. Neste contexto,

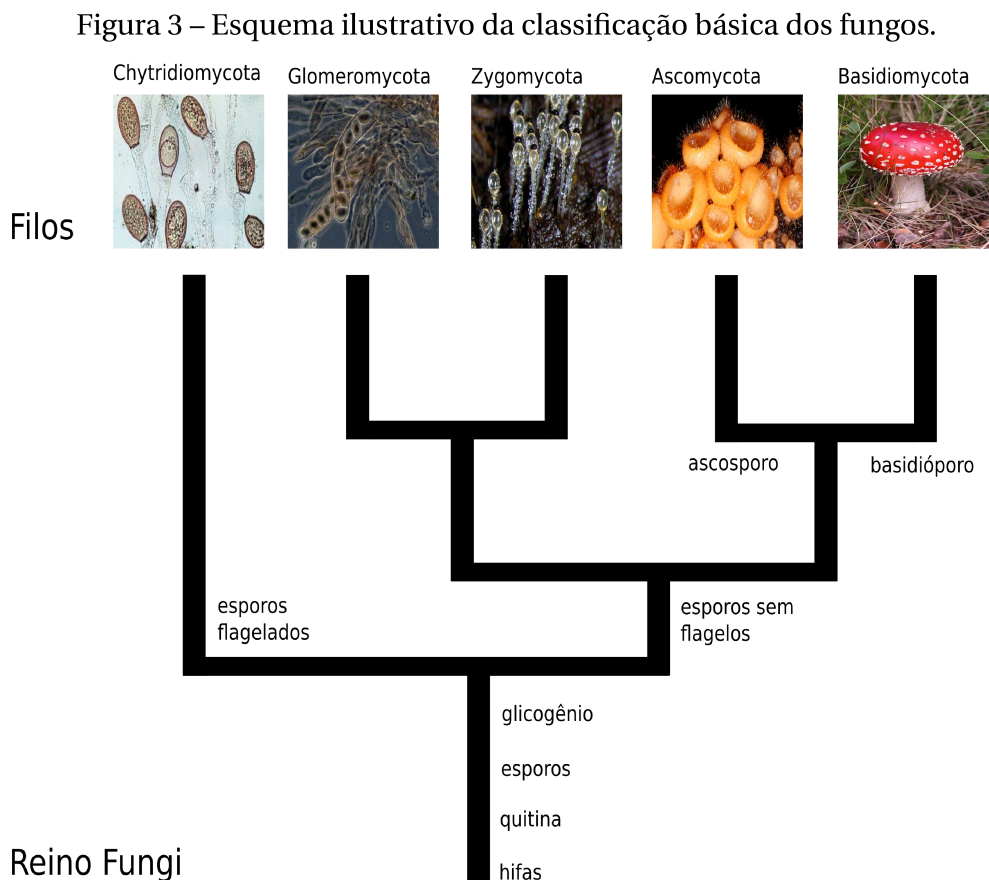
o presente trabalho tem por objetivo a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em espumas de poliuretana destinadas à imobilização das células do fungo filamentoso, utilizando formas inovadoras de reatores biológicos na produção de L-asparaginase fúngica, como o reator batelada isotérmico com reciclo de meio e o reator batelada alimentada com retiradas intermitentes de produto com o reuso das células e do suporte inerte de poliuretana.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Fungos

Em meados do século XIX, a manipulação de seres vivos para produção de diferentes bens e serviços passou a ser utilizada em processos de fermentação e técnicas de manipulação genética. A partir daí, a biotecnologia teve um grande crescimento e desenvolvimento com o uso de sistemas celulares para processos e produtos de interesses econômicos e sociais. Entre os sistemas celulares, os fungos são destaque nos processos biotecnológicos (SILVA; MALTA, 2016).

Os fungos são divididos em diversas classes de diferentes filos. A Figura 3 representa os cinco principais filos do reino fungi: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Glomeromycota e Chytridiomycota (VOLK, 2013). Dentro do Filo Ascomycota pode-se destacar das várias espécies e subespécies de fungos, como por exemplo o *Penicillium sp.*

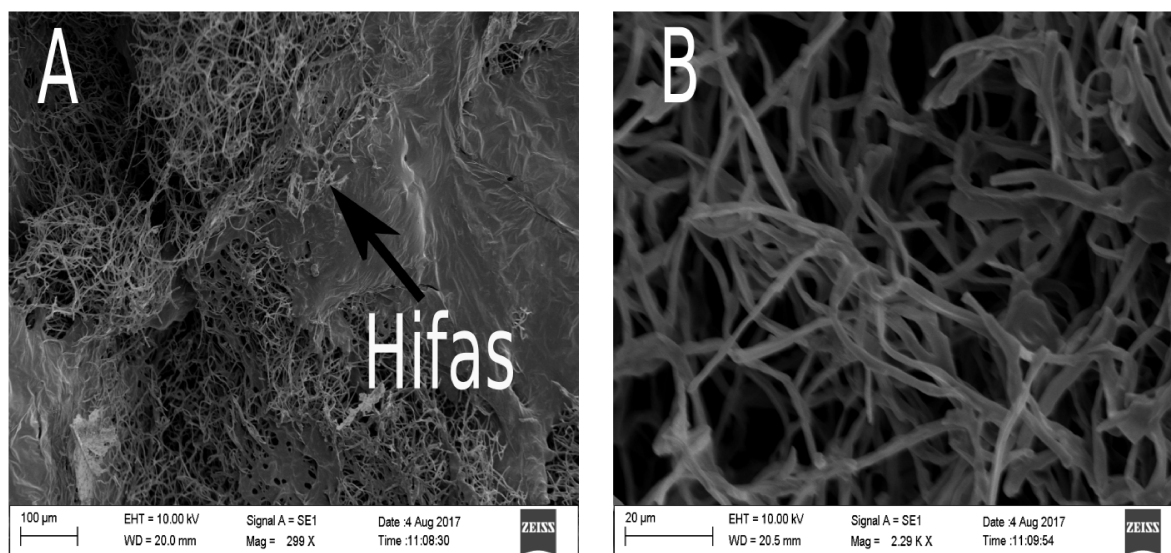


Nota: O esquema de classificação dos fungos, representa os principais filos do Reino Fungi.

Fonte: Adaptado de Volk (2013).

O *Penicillium sp.* utilizado na FES apresenta forma filamentosa que é constituída pelo conjunto de estruturas tubulares, denominadas de hifas. Estas hifas quando agrupadas constituem uma estrutura denominada de micélio (TORTORA; CASE; FUNKE, 2012). A Figura 4 ilustra a forma filamentosa do *Penicillium* utilizado no processo de produção de L-asparaginase por FES.

Figura 4 – Imagem de microscopia eletrônica (MEV) do *Penicillium sp.* utilizado na FES.



Nota: A - Imagem de MEV do *Penicillium sp.* foi aproximada em 299 vezes, B - Imagem de MEV do *Penicillium sp.* foi aproximada em $2,29 \times 10^3$ vezes.

Fonte: Autor, (2018).

Os fungos têm grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos. Além disso, estes microrganismos atualmente são muito importantes e influenciam a vida do homem participando da transformação de matéria prima em produto com alto valor agregado, como exemplo na indústria farmacêutica (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

2.2 Enzimas

As enzimas foram descobertas no século XIX por Frederick W.K. em estudo ao trabalho de Eduard Buchmer, que postulou a fermentação alcoólica com extrato de levedura, provando que a fermentação era feita por moléculas que continuavam ativas mesmo após serem removidas das células. Neste mesmo período ocorreram grandes avanços relacionados a

enzimas e suas funções e características. Entretanto, apesar dos avanços, somente em 1926 a natureza proteica da enzima foi descoberta, quando James Sumner purificou e cristalizou a enzima urease e comprovou que se tratava de uma proteína (GURUNG et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

As enzimas são classificadas em seis principais classes: oxidorreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, com mostra a Tabela 1. As enzimas podem também ser designadas por nomes que obedecem a uma sistemática e são divididas em duas partes: uma indicando o substrato e a outra indicando a natureza da reação, feita de acordo com o Enzyme Commission (E.C). Além disso, no nome da respectiva enzima é geralmente acrescentado o sufixo “ase” (CUESTA et al., 2015).

Tabela 1 – Principais classificações das classes de enzimas.

Classes	Função	Enzimas
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas	Sintetases
Isomerases	Isomerização	Epimerases
Liases	Remoção de grupos para formar ligações duplas	Descarboxilase
Hidrolases	Reações de hidrólise	L-asparaginase
Transferases	Transferência de grupos funcionais	Quinase
Oxidorreduases	Reações de oxidação e de redução	Desidrogenases

Fonte: Adaptado de Pradhan, Padhy e Sahoo (2017).

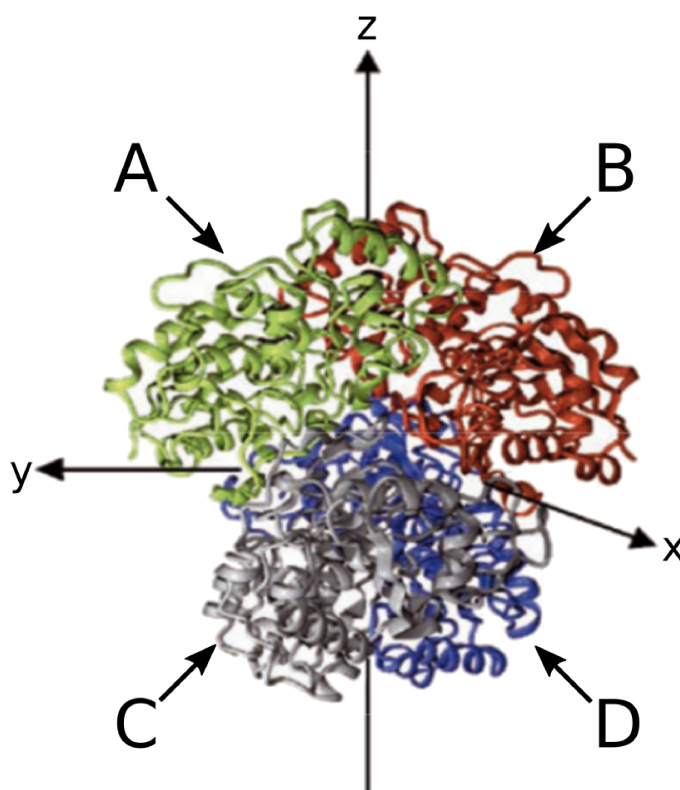
As enzimas são substâncias biológicas ou macromoléculas biológicas que são produzidas por organismos para provocar uma reação bioquímica específica. São utilizadas em diferentes áreas do conhecimento tais como a Bioquímica, a Engenharia Bioquímica, a Engenharia de Alimentos, na Medicina, entre outras, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos, no tratamento de resíduos, dentre outros (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002).

As enzimas são ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem baixos investimentos (PIZARRO; PARK, 2003; COLEN, 2006).

2.3 L-asparaginase

A L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase) é a enzima responsável pela hidrólise do grupo amida da cadeia do aminoácido L-asparagina, resultando como produtos da reação o ácido aspártico e amônia (LINCOLN; MORE, 2014). Reação genérica é representada pela Figura 1. A L-asparaginase pode assumir diferentes arranjos estruturais dependendo do microrganismo produtor, por exemplo a L-asparaginase produzida pela bactéria *Escherichia coli* que possui estrutura tetramétrica representada pela Figura 5, mostrando cada um dos quatro sítios ativos característicos para cada tipo de L-asparaginase (EINSFELDT, 2014).

Figura 5 – A estrutura tetramétrica da L-asparaginase de *Escherichia coli*.



Nota: Os pares A,B e C,D representam as subestruturas da L-asparaginase de *Escherichia coli*.

Fonte: adaptado de EINSFELDT (2014).

A L-asparaginase pode ser encontrada em plantas, tecidos de animais e em microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os principais representantes de bactérias reportados como produtores de L-asparaginase são *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus sp.*, *Thermus aquaticus*, *Pseudomonas ovalis* e *Serratia marcescens*. Quanto às leveduras, representantes dos gêneros *Rhodotorula*, *Candida* e *Pichia* têm sido reportados como produtores de L-asparaginase (LAPMAK et al., 2010).

Para os fungos filamentosos, a produção de L-asparaginase foi associada com as espécies *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus nidulans* e com os gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Desta forma, a utilização de fungos na produção de L-asparaginase é cada vez mais estudada em diferentes processos fermentativos, seja em fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (LAPMAK et al., 2010). A Tabela 2 mostra fungos utilizados na produção de L-asparaginase ao longo do tempo.

Tabela 2 – Espécies de fungos utilizados na produção de L-asparaginase ao longo do tempo.

Especies de Fungos	Autores
<i>Aspergillus terreus</i>	(DE-ANGELI et al., 1970; GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2011; FARAG et al., 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	(MISHRA, 2006; VALA et al., 2018)
<i>Aspergillus oryzae</i>	(DIAS; SATO, 2018)
<i>Fusarium equiseti</i>	(HOSAMANI; KALIWAL, 2011)
<i>Fusarium culmorum</i>	(MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017)
<i>Penicillium sp.</i>	(PATRO; GUPTA, 2012)
<i>Cladosporium sp.</i>	(KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013)

Fonte: Adaptado de Doriya et al. (2016).

A L-asparaginase tem sido utilizada como um biofármaco anti-tumoral clinicamente satisfatório para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e sarcoma linfático (PIETERS et al., 2011). Na indústria de alimentos é utilizada no controle de acrilamida em produtos processados em conduzido em alta temperatura.

2.3.1 Uso farmacêutico

O uso terapêutico de enzimas ocorre desde o final do século XIX, quando extratos brutos de enzimas pancreáticas eram utilizadas como auxiliares digestivos (CRUZ et al., 2010). Dentre as várias descobertas de medicamentos biológicos as enzimas se destacaram como tratamentos terapêuticos. A Tabela 3 apresenta algumas enzimas com função clínica importantes, como a L-asparaginase.

Tabela 3 – Enzimas utilizadas no tratamento terapêutico.

Enzimas	Número E.C.	Fonte	Uso terapêutico	Referencia
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Auxiliar digestivo	(LEONAVICIUTE et al., 2018)
Celulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma viride</i>	Auxiliar digestivo	(GARVEY et al., 2013)
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	Intolerância a lactose	(DZIALANSKI et al., 2016)
Esfericase	3.4.21	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bronquite crônica, Pneumonia aguda	(ALMOG et al., 2003)
Colagenase	3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i>	Úlceras de pele	(GANESHPURKAR; KUMAR; SINGH, 2018)
L-asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia carotovora</i>	Leucemia linfoblástica aguda	(IZADPANAHA et al., 2018)

Fonte: Adaptado de Zimmer et al. (2009).

BROOME (1968) foi um dos primeiros autores capazes de identificar a L-Asparaginase como sendo uma enzima com potencial anti carcinogênico. Também identificou que enzimas provenientes de diferentes fontes tem diferentes capacidades de inibição de crescimento de tumores. Deduziu-se, então, que essa alta capacidade de inibição tumoral tem como base 3 fatores:

- A alta afinidade da enzima pela L-asparagina, demonstrada pelo baixo valor da constante de Michaelis-Menten;
- A L-Asparaginase continua altamente ativa mesmo após sua retirada do sangue;
- A L-Asparaginase apresenta alta afinidade pelo substrato, baixa imunogenicidade e alta estabilidade (NAGARETHINAM et al., 2005).

A L-asparaginase pode ser extraída de *Escherichia coli*, proporcionando a produção em larga escala da enzima, utilizando o processo de produção em fermentação submersa, apropriada para experimentações clínicas (WINK, 2009; MASHBURN; WRISTON, 1964).

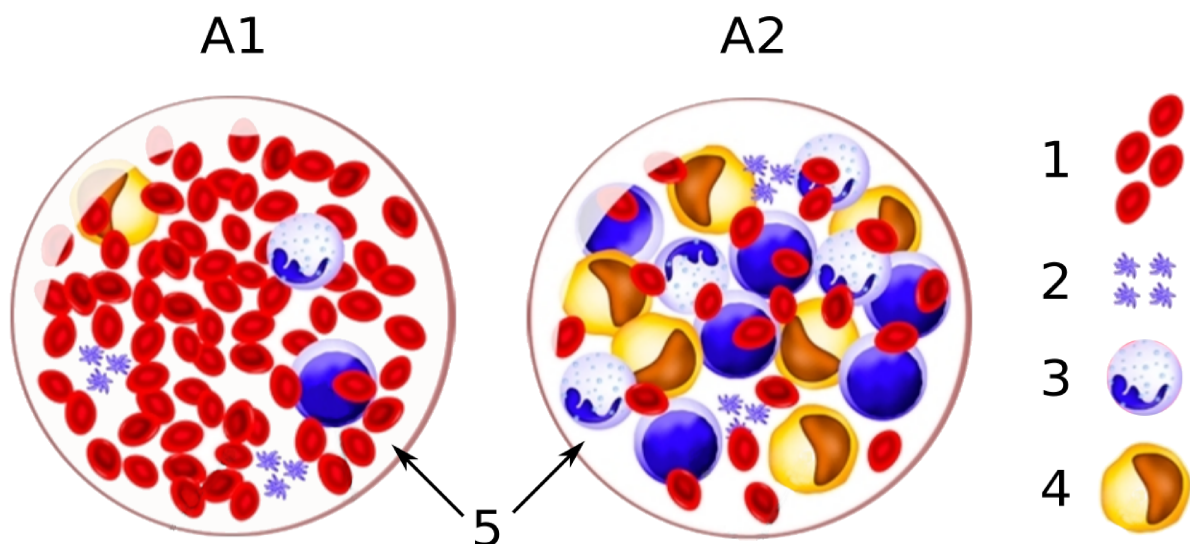
Atualmente, a L-asparaginase disponível comercialmente possui duas origens: *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*, ambas as L-asparaginases são produzidas por fermentação submersa em grande escala (IZADPANA et al., 2018).

As duas drogas apresentam mecanismos de ação e toxicidade idênticos, embora suas propriedades farmacocinéticas difiram. As principais drogas existentes no mercado são Elspar[®], Crasnitin[®] e Kidrolase[®] (de origem de *E. coli*) e Erwinase[®] (de origem de *E. chrysanthemi*) (KRASOTKINA et al., 2004; KOTZIA; LABROU, 2005; SHRIVASTAVA et al., 2016).

2.3.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A LLA é um tipo de câncer que se desenvolve nas células linfóides da medula. Esses tipos de células dão origem aos linfócitos, um dos principais tipos de glóbulos brancos que ajudam a defender o organismo. Os dois subtipos principais de LLA, são categorizados em LLA de células B e LLA de células T. Este é o tipo mais comum de câncer em crianças, representa aproximadamente 25 % dos diagnósticos de câncer em crianças menores de 15 anos (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2017). A Figura 6 ilustra a manifestação da leucemia no corpo de adolescentes e crianças.

Figura 6 – Representação esquemática da LLA no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes.



Nota: A1 - representa o indivíduo normal, A2 - representa o indivíduo com LLA; onde os números 1,2,3,4 e 5 são respectivamente, glóbulos vermelhos, plaquetas, glóbulos brancos granulócitos, glóbulos brancos agranulócitos e o plasma sanguíneo.

O tratamento da LLA passa pela prática da quimioterapia com L-Asparaginase. Esta enzima é injetada por via intravenosa ou intramuscular para esgotar a concentração de L-Asparagina no plasma, dificultando seletivamente o crescimento das células malignas. Devido a este mecanismo, a L-Asparaginase é utilizada no tratamento de uma variedade de distúrbios linfoproliferativos e linfomas, e outros cânceres e doenças inflamatórias (DIVINO, 2015; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2017).

A L-Asparaginase tem demonstrado ser um fármaco eficaz para pacientes leucêmicos (WU et al., 2014). O modo de ação da L-Asparaginase é o esgotamento do grupo circulante de L-asparagina e a inibição resultante da síntese proteica (BERG, 2011). A taxa de sobrevivência global depende da idade, estágio da doença e do estado de desempenho da enzima. A importância da L-Asparaginase como agente antitumoral despertou a atenção dos pesquisadores, levando à busca de novas formas de produção dessa enzima (MENEGUETTI, 2017).

2.3.3 Toxicidade e Hipersensibilidade

A limitação do uso da L-asparaginase de *E. coli* é o desenvolvimento de hipersensibilidade, a qual alcança desde reações alérgicas leves a choque anafilático (MOOLA et al., 1994). A hipersensibilidade está associada com a produção de anticorpos a droga, podendo reduzir a atividade da L-asparaginase, causando o aumento do aminoácido L-asparagina e o possível desenvolvimento de resistência a esse medicamento (WINK, 2009).

A L-asparaginase fúngica apresenta propriedades distintas das enzimas bacterianas. Passam por processos pós-traducionais que as tornam mais semelhantes as proteínas humanas, reduzindo assim sua imunogenicidade sem a necessidade de modificações químicas na estrutura das moléculas. Já a L-asparaginase bacteriana pode passar por processos químicos como por exemplo a esterificação de cadeias de polietilenoglicol aos polipeptídeos, na tentativa de reduzir os casos de hipersensibilidade (MENEGUETTI, 2017; SOLER, 2015).

Uma alternativa para a produção de L-asparaginase, devido aos casos recorrentes de hipersensibilidade e reações adversas nos pacientes é a produção da L-asparaginase fúngica. O uso do *Penicillium sp.* como bio produtor da enzima é uma alternativa, considerando sua capacidade produtiva em processos de Fermentação estado sólido.

2.4 Uso na indústria de alimentos

A aplicação da enzima L-Asparaginase passou a ser empregada em casos já conhecidos, como o potencial tóxico da acrilamida desde 1964, quando modelos animais indicaram irritações na pele e olhos quando em contato com esse composto, além de efeitos neurotóxicos sob exposição prolongada (MCCOLLISTER; OYEN; ROWE, 1964; IARC, 1994). Durante anos seu potencial carcinogênico também foi investigado quando finalmente, em 1994, a International Agency for Research Cancer (IARC), associada à Organização Mundial da Saúde

OMS, acrescentou a acrilamida à sua lista de agentes potencialmente carcinogênicos para humanos (IARC, 2017).

O mecanismo de formação da acrilamida nesses alimentos envolve a reação de alguns aminoácidos livres com açúcares redutores sob altas temperaturas, sendo a L-asparagina o aminoácido de maior importância. ZYZAK et al. (2003) detectaram que a cadeia amida presente na acrilamida provém da L-asparagina. A L-asparagina é um aminoácido abundante em alguns vegetais como por exemplo na batata, muito utilizada na indústria de alimentos, representando mais de 50 % de todo o teor de aminoácidos livres (BETHKE; BUSSAN, 2013). Este aminoácido é importante para o crescimento da planta, e também é reagente chave para a formação de acrilamida (KORNBRUST et al., 2010).

A enzima L-Asparaginase passou a ser mais utilizada no decorrer do tempo. Hoje pode ser utilizada em diferentes setores como exemplo a indústria de alimentos, onde atua na contenção de substâncias tóxicas geradas no processamento dos alimentos, como a acrilamida produzida na fritura da batata (CÂNDIDO, 2015). O uso da enzima L-asparaginase antes do processamento do alimento reduz os níveis de L-asparagina na massa dos produtos. Logo, a reação de Maillard de caramelização que produz a acrilamida é inibida de maneira específica (QUINTAS; BRANDAO; SILVA, 2007).

Em estudos sobre o tratamento de fatias de batatas com L-Asparaginase visando à redução da acrilamida, foi observado que o branqueamento torna os tecidos mais permeáveis e, conseqüentemente, a enzima fica mais acessível ao substrato. Desta forma, a combinação dos dois tratamentos reduziu em 90 % a quantidade de acrilamida nas batatas (HENDRIKSEN et al., 2009; PEDRESCHI et al., 2011).

Devido à sua ampla aplicação industrial, o mercado global de enzimas cresceu significativamente nos últimos anos. As enzimas com aplicação no setor de alimentos e bebidas ocupam o maior espaço do mercado (DEWAN, 2014). As empresas Novozymes[®] e Danisco[®] lideram o mercado mundial de enzimas com 45 % e 17 % do total de vendas, respectivamente, seguidas pelas empresas DSM[®] e BASF[®] com 5 % e 4 % do mercado (FERNANDES, 2010).

2.5 Produção de L-asparaginase

Nesta sessão é apresentado as formas de fermentação utilizadas na produção de L-asparaginase, primeiramente a fermentação submersa em seguida a fermentação estado sólido.

2.5.1 Fermentação submersa (FS)

A FS é um processo no qual o crescimento de microrganismos ocorre em meio líquido com nutrientes necessários para o melhor cultivo dos microrganismos. Isso envolve

um cuidado especial com os microrganismos em um reator fechado contendo o meio de fermentação e uma alta concentração de oxigênio (KUMAR; SOBHA, 2010).

Atualmente a indústria de fermentação dá preferência ao cultivo de fungos e alguns outros microrganismos por fermentação com substratos líquidos na produção da enzima L-asparaginase, técnica conhecida como fermentação submersa. Entretanto, a fermentação estado sólido ganhou espaço nos últimos anos e emergiu como um processo econômico e alternativo para a produção de enzimas, utilizando resíduos agrícolas, agroindustriais e industriais como substratos que são convertidos em produtos com alto valor comercial (PANDEY, 1992).

O uso de FES para a produção de enzimas têm muitas vantagens em relação à FS, como menor custo de produção com melhores propriedades fisiológicas, menor volume de reator e meios de fermentação mais baratos, maior taxa de produção e processamento a jusante mais fácil (PANDEY et al., 1999). Os substratos sólidos, principalmente materiais baseados em resíduos, são utilizados como substratos para a produção de L-asparaginase (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). Esses substratos atuam tanto como suporte físico como fonte de nutrientes e influenciam a produção de enzimas.

2.5.2 Fermentação estado sólido (FES)

A FES envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas, em situações em que os espaços entre as partículas contêm uma fase gasosa contínua e um mínimo de água visível. Embora existam gotas de água entre as partículas, e pode haver filmes finos de água na superfície da partícula, a fase de água entre partículas é descontínua e a maior parte do espaço entre partículas é preenchida pela fase gasosa (DORIYA et al., 2016).

A FES é utilizada para obter grandes quantidades de produtos através do crescimento de células microbianas em uma matriz sólida que atua como uma superfície e contém a fonte de carbono, nutrientes e água adsorvida que são necessárias para o crescimento (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Em FES, os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados ao processo pois crescem naturalmente em superfícies sólidas com menor teor de água e podem degradar macromoléculas e polímeros naturais. No entanto o processo de produção industrial por FES é considerado difícil por causa de problemas de controle de fermentação, padronização de produtos e conhecimento limitado sobre a fisiologia e morfologia dos microrganismos (DORIYA et al., 2016).

A FES pode ser definida como um processo fermentativo realizado sobre um meio sólido insolúvel o qual age como suporte físico e como fonte de nutrientes para os microrganismos, com uma quantidade de água suficiente para garantir o crescimento microbiano e as atividades metabólicas das células, sem exceder a capacidade de retenção de água do substrato sólido. Este processo natural pode ser utilizado em aplicações industriais para produzir

o produto desejado, operando sob condições controladas (DURAND; BROISE; BLACHERE, 1988; RANI et al., 2009).

Processos por FES podem utilizar um meio poroso inerte, que serve como suporte a um substrato aquoso e, podem utilizar as próprias partículas como fonte de nutrientes aos microrganismos. As reações podem ocorrer na superfície das partículas ou em seu interior, definindo diversos mecanismos de transferência de massa. Parte do interesse científico e industrial pela FES é a possibilidade da utilização de resíduos sólidos como matriz porosa, agregando valor a estes rejeitos e minimizando problemas ambientais devido a descartes inadequados (LAURENTINO, 2007; RANI et al., 2009).

Na FES, fungos crescem e desenvolvem suas atividades metabólicas com grande sucesso porque as condições de cultivo são similares às encontradas no seu ambiente natural, tais como rejeitos orgânicos e árvores. A poliuretana é uma ótima alternativa, pois delimita fisicamente as células na região de atuação catalítica com possibilidade de aplicação do suporte em processos de operação contínua e descontínua. Além disso melhora a transferências de massa e de calor, melhorando assim o crescimento e desempenho dos fungos nas fermentações sólidas (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013).

2.5.3 Suporte inerte de poliuretana

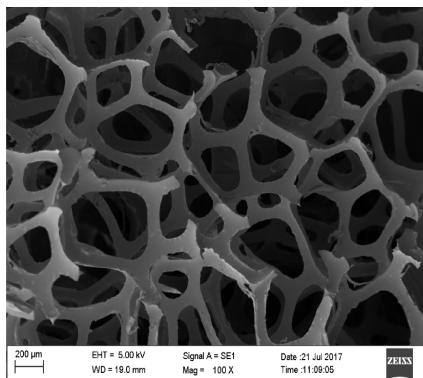
As espumas de poliuretana são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, o que permite a adaptação do processo e da composição para a obtenção de materiais para as mais variadas exigências (ZECK, 2004).

As diferentes características químicas e físicas são obtidas pela adição de compostos químicos que atuam como catalisadores, agentes de expansão, agentes de reticulação, agentes de extensão de cadeia, surfatantes e aditivos, permitindo que o polímero forme estruturas celulares distintas como espumas, elastômeros, membranas, dentre outras (SOARES, 2012).

O suporte inerte de poliuretana possui uma estrutura de células abertas e bem definidas, possibilitando a entrada e saída de líquidos e gases do suporte com maior facilidade. Assim o suporte de poliuretana apresenta também propriedades como maciez, resistência mecânica e resiliência, que podem ser utilizadas em inúmeras funções relacionadas às FES. Estas características são favoráveis para o crescimento do *Penicillium sp.*, pois a estrutura rígida e de grande área proporciona uma transferência de massa e calor na fermentação estado sólido com suporte inerte de poliuretana (CORCUERA et al., 2010).

A Figura 7 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura de uma espuma de poliuretana.

Figura 7 – Espuma de poliuretana utilizada na FES com suporte inerte.



Fonte: Autor, (2018).

2.5.4 Imobilização de células (IC)

A IC consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas. A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de microrganismos imobilizados (MI) permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células. (FREEMAN; LILLY, 1998).

A maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Além disso, facilita a recuperação dos produtos do metabolismo de interesse na fase de “downstream” e ajuda na manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos (KOURKOUTAS; KANELAKI; KOUTINAS, 2006; COVIZZI et al., 2007).

2.6 Biorreatores

Os biorreatores são muito utilizados nas Engenharias Química e Bioquímica para alcançar melhores resultados na produção de diferentes produtos, A inovação dos biorreatores é muito recorrente nos trabalhos científicos. Em particular, os métodos de engenharia são aplicados aos desafios relacionados aos sistemas de aumento de escala que surgem em diferentes graus para cada tipo de biorreator. Abordagens de caracterização e compreensão fundamental estão bem desenvolvidas para biorreatores comuns em sistemas de agitação e seu impacto em escala baseado na compreensão fundamental da dinâmica de fluidos é particularmente bem desenvolvido para biorreatores de tanques agitados (EAKER et al., 2017).

O uso de biorreatores na produção de compostos derivados de células estão disponíveis para qualquer requisito de cultura. A variedade é particularmente útil para modelar diferentes cultivos celulares, que muitas vezes requerem complexidades tais como alimentação

intermitente, reciclo de meio nutritivo, fabricação específica de produto, baixa concentração de oxigênio. Além disso, a maioria dos processos celulares requerem que os biorreatores sejam feitos sobre medida para melhor otimização (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

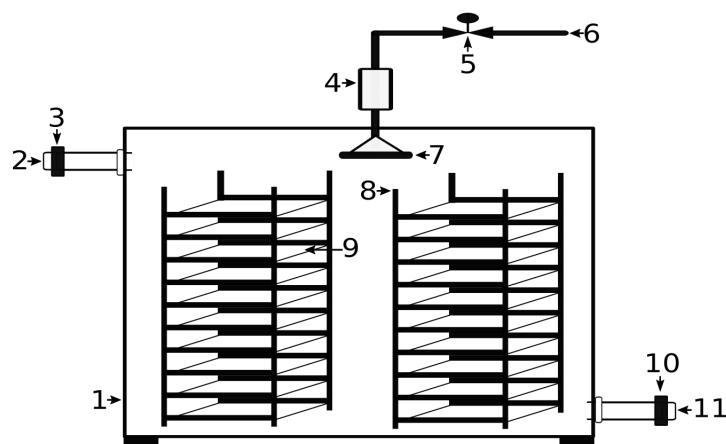
As principais categorias de biorreatores incluem tanques agitados, camas fixas e embaladas, plataformas de balanço e sistemas de fibra oca. Essas categorias diferem de forma muito dramática em métodos de geometria e agitação de fluidos, que incluem a agitação por um impulsor ou uma varinha de pêndulo, um fluxo de mídia de balanço ou massa (EAKER et al., 2017).

A maioria dos biorreatores são de monitoramento em tempo real e controle automatizado de parâmetros de cultura, como controle de dióxido de carbono dissolvido e oxigênio, temperatura e pH por CO_2 ou adição de ácido ou base. Além disso, usam manipulações do sistema fechado e filtração de gás para prevenir a contaminação microbiana e a contaminação cruzada (MISHRA et al., 2016).

2.6.1 Biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido

Os biorreatores utilizados na FES podem ser classificados em grupos com base nas semelhanças dos sistemas e das operações do processo, diferenciando os grupos quanto as formas que são misturados e arejados. O primeiro grupo são os biorreatores de leito estático (não são misturados e a circulação de ar não é forçada) (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). A Figura 8 mostra um exemplo do primeiro grupo de biorreatores, o biorreator leito estático do tipo bandeja.

Figura 8 – Biorreator leito estático do tipo bandeja.

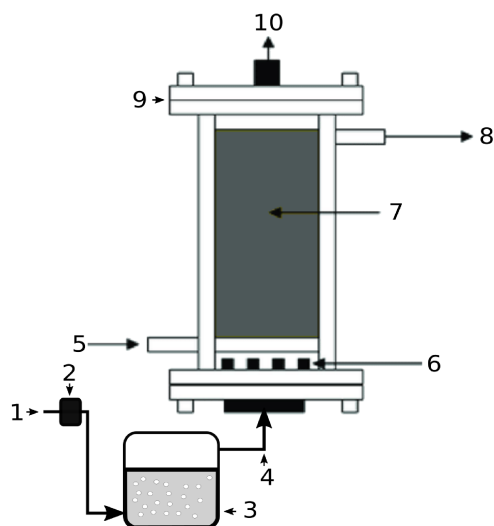


Nota: 1 – Biorreator de bandeja koji, 2 – Saída de ar, 3 – Filtro de ar na entrada, 4 – Lâmpada UV, 5 – Válvula de controle de entrada de água, 6 – Entrada de água, 7 – Umidificador de ar, 8 – Suporte de bandeja, 9 – Bandeja de FES, 10 – Filtro de ar na saída e 11 – Entrada de ar.

Fonte: Adaptado de Robinson e Nigam (2003).

No segundo grupo de classificação o leito é estático e não misturado, porém a circulação de ar no leito é forçada. Um exemplo desse tipo de biorreator está apresentado na Figura 9, o biorreator do tipo leito empacotado.

Figura 9 – Biorreator estático do tipo leito empacotado.

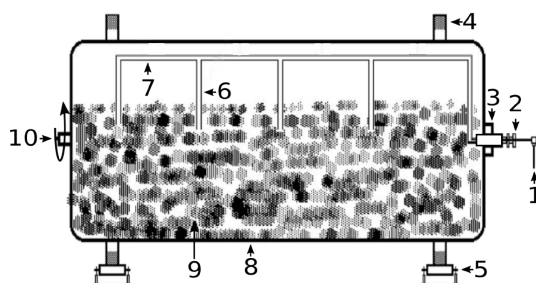


Nota: Os números da figura representam, 1 – Entrada de ar, 2 – Filtro de ar, 3 – Tanque de água para obter ar úmido, 4 – Linha de ar úmido, 5 – Entrada de água na jaqueta do biorreator, 6 – Entrada de ar úmido no biorreator de leito fixo, 7 – Suporte sólido da FES, 8 – Saída de água da jaqueta do biorreator, 9 – Biorreator de leito fixo e 10 – Saída de ar.

Fonte: Adaptado de [Robinson e Nigam \(2003\)](#).

A Figura 10, representa características do biorreator do tipo tambor rotativo, utilizado no processo em fermentação estado sólido.

Figura 10 – Biorreator do tipo tambor rotativo.



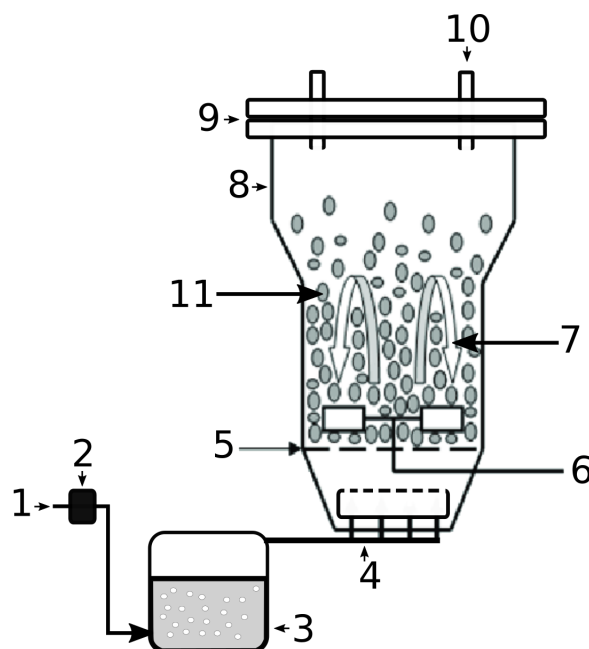
Nota: Os números da figura representam, 1 – Entrada de Ar filtrado e esterilizado no sistema de fermentação estado sólido, 2 – Junta rotativa, 3 – Engate com rolamento, 4 – Aros laterais, 5 – Rolos, 6 – Bicos de Ar, 7 – Linha de Ar fixa (não entra em movimento com o biorreator), 8 – Biorreator tambor rotativo, 9 – Suporte sólido da FES e 10 – Eixo de rotação do Biorreator.

Fonte: Adaptado de [Robinson e Nigam \(2003\)](#), [SALHANI e UELKER-DEFFUR \(1998\)](#).

No terceiro grupo de biorreatores o leito é continuamente misturado ou misturado de forma intermitente, mas o ar circula ao redor do leito de forma natural. Dois biorreatores que têm este modo de operação, usando diferentes mecanismos para conseguir a agitação, são "biorreatores de tambor agitado" e "biorreatores de tambor rotativo", sendo o ultimo ilustrado na Figura 10.

Já no quarto grupo de biorreatores o leito é agitado e o ar é circulado de forma forçada. Este tipo de biorreator normalmente pode ser operado em dois modos: os misturados continuamente e os misturados intermitentemente. Vários desenhos cumprem esses critérios, como por exemplo o biorreator do tipo leito fluidizado a gás sólido representado na Figura 11, com tambor mecânico e vários outros biorreatores agitados.

Figura 11 – Biorreator do tipo leito fluidizado.



Nota: As características do biorreator estão representadas nos números, 1- Entrada de Ar, 2- Filtro de Ar, 3- Tanque de água para umidificação do Ar, 4- Linha de Ar úmido, 5- Base perfurada para distribuição do Ar no biorreator, 6- Disjuntores de fluxo de Ar, 7- Representação do fluxo de Ar no biorreator leito fluidizado, 8- Biorreator leito fluidizado, 9- Suporte de cabeça do biorreator, 10- Saída controlada de Ar e 11- Suporte sólido da FES.

Fonte: Adaptado de [Mitchell, Krieger e Berovic \(2006\)](#).

Os biorreatores são equipamentos caros e difíceis de serem construídos, pois apresentam um número maior de variáveis que devem ser controladas, como por exemplo a aeração, a contaminação, a distribuição de umidade e de temperatura no suporte sólido. As características construtivas dos biorreatores para FES devem prevenir a entrada de microrganismos contaminantes, além de evitar a emissão de microrganismos, produtos e substrato para o ambiente. Também devem promover aeração eficiente, manter a uniformidade e integridade

do substrato, facilitar as etapas do processo como preparação do substrato, esterilização, recuperação de biomassa e carga e descarga do equipamento ([AGUDELO, 2010](#)).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a produção extracelular da L-asparaginase de *Penicillium sp.* em fermentação estado sólido em diferentes biorreatores com meio sólido constituído de poliuretana e nutrientes.

3.2 Objetivos específicos

Nos objetivos específicos foram pontoados tópicos com grande relevância para um bom desenvolvimento teórico e prático do tema proposto neste trabalho, que são:

- Avaliar os efeitos das variáveis inoculo, concentração de L-asparagina, concentração de glicose, pH e temperatura na Fermentação estado sólido com poliuretana;
- Comparar os suportes sólidos de biomassas farelo de arroz e torta de cerveja com o suporte inerte poliuretana;
- Modelar a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por fermentação estado sólido com suporte inerte;
- Obter condições otimizadas do processo de produção de L-asparaginase por FES-SI utilizando redes neurais artificiais;
- Validar o modelo de RNA proposto e otimizar o Modelo utilizando algoritmo genético na rede neural artificial;
- Estudar a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI em diferentes biorreatores.

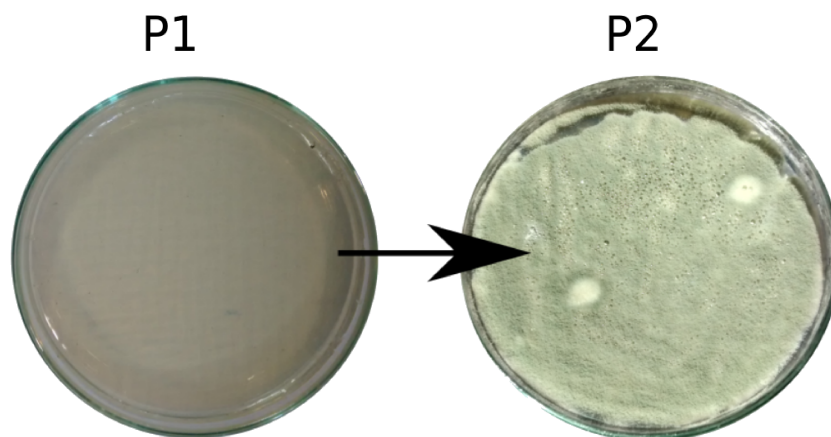
4 Materiais e métodos

No presente trabalho todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata, sendo que a média foi utilizada como valor representativo e os erros ilustrados nos gráficos referem-se aos desvios padrões.

4.1 Fungo utilizado na produção de enzimas

O microrganismo produtor de L-asparaginase utilizado foi o *Penicillium sp.* LAMAI 505 obtido da Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biotecnologia da UNESP (CRM – UNESP). O fungo filamentoso foi mantido em placa de Petri de vidro devidamente esterilizada, com meio nutritivo de Czapek sólido, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO_3 , 2,0; K_2HPO_4 , 1,0; MgSO_4 , 0,5 ;KCl, 0,5; FeSO_4 , 0,01 ; Sacarose, 30,0; Agar, 20,0. A Figura 12 mostra o antes e o depois da adição de microrganismo na placa de Petri com Czapek.

Figura 12 – Cultivo do *Penicillium sp.* em Czapek.



Nota: P1 - adição de células do *Penicillium sp.* na placa de Petri com meio Czapek sólido; P2 - placa de Petri com microrganismo após 4 dias de crescimento.

Fonte: Autor, (2018).

As células do *Penicillium sp.*, após período de cultivo, foram transferidas para reatores cônicos com capacidade de 250 mL com uma solução de 100 mL de Czapek, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO_3 , 2,0; K_2HPO_4 , 1,0; MgSO_4 , 0,5 ;KCl, 0,5; FeSO_4 , 0,01 ; Sacarose, 30,0, previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Essa etapa de cultivo líquido foi realizada em mesa giratória a 150 rpm em temperatura ambiente (25 °C) e o tempo de fermentação do inóculo foi de 72 h, garantindo o crescimento e o aumento da concentração

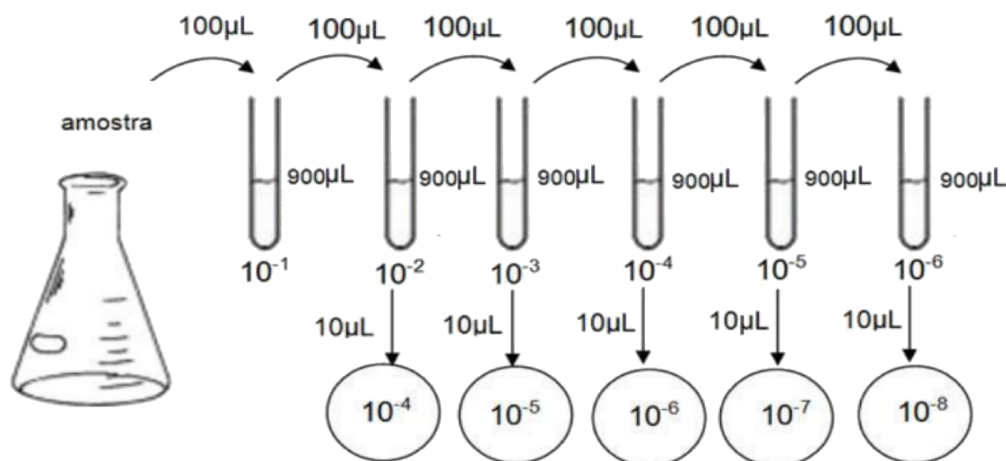
celular. Ao terminar o preparo do pré-inóculo, o fermentado foi centrifugado e as células recolocadas em suspensão em 100 mL de água destilada estéril. Essas células foram, então, utilizadas nas FES. O sobrenadante foi descartada nesta etapa.

4.2 Suportes sólidos utilizados inicialmente na FES

A FES foi realizada utilizando 10^7 células/mL no tempo zero da FES nos diferentes materiais sólidos. Essa concentração celular foi avaliada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). As análises foram realizadas com 100 μ L do cultivo, os quais passaram por diluições seriadas em água estéril. Foram colocados 10 μ L de cada diluição, em no mínimo 3 réplicas, em placas com Czapek(EINSFELDT, 2014).

A contagem das colônias de fungos, foi realizada utilizando software de otimização e processamento de imagem Imagej. A Figura 13 mostra o esquema das etapas realizadas na análise da UFC.

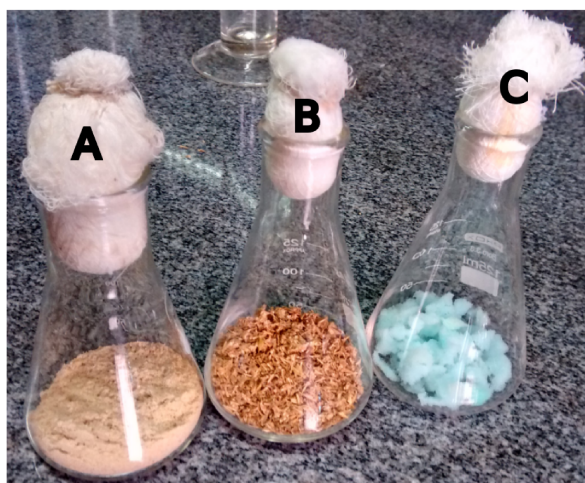
Figura 13 – Procedimento de contagem de células de fungo na solução utilizada na FES.



Fonte: Adaptado de EINSFELDT (2014).

Inicialmente foram utilizados três suportes sólidos na FES para a produção de L-asparaginase fúngica: farelo de arroz, bagaço de malte e espuma de poliuretana. A Figura 14 mostra a imagem dos biorreatores estático com capacidade de 250 mL, contendo os suportes sólidos utilizados nas FES.

Figura 14 – Imagem dos suportes sólidos de farelo de arroz, bagaço de malte e espuma de poliuretana, respectivamente da esquerda para direita.



Nota: A – Biorreator com suporte sólido de farelo de arroz; B – Biorreator com suporte sólido de bagaço de malte; C – Biorreator com suporte sólido inerte, espuma de poliuretana.

Fonte: Autor.

Ambas as FES foram realizadas em biorreator estático isotérmico com o mesmo volume de sólido, para que a transferência de massa e color nos suportes sólido fiquem iguais ou relativamente próximas. O meio líquido nutritivo utilizado foi o Czapek modificado com adição de L-asparagina e glicose, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO_3 , 2,0; K_2HPO_4 , 1,0; MgSO_4 , 0,5; KCl , 0,5; FeSO_4 , 0,01; glicose, 10,0; L-asparagina, 1,0. Foi variada a adição de meio nutritivo para cada suporte sólido da FES como mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Análise dos suportes sólidos na FES.

Sólidos	Volume de sólido (mL)	Massa de sólido (g)	Quantidade de meio nutritivo adicionado (g/g)			
			30 %	50 %	67 %	80 %
Espuma de poliuretana ^a	25,00	0,50	0,15	0,25	0,34	0,40
Farelo de arroz ^b	25,00	10,00	3,00	5,00	6,70	8,00
Bagaço de malte ^c	25,00	5,00	1,50	2,50	3,35	4,00

Nota: a – Espuma de poliuretana: densidade (20 kg/m^3), diâmetro médio de poro ($281,89 \mu\text{m}$); b – Farelo de arroz (peso seco): proteína (10,3 %), cinza (6,3 %), lípido (14,9 %), Amido (15,0 %), açúcares redutores (4,4 %), celulose (29,3 %), hemicelulose (11,2 %), Lignina (8,6 %); c – Bagaço de malte (peso seco): proteína (15,8 %), cinza (2,22 %), lipídeo (13,55 %), Amido (17,0 %), açúcares redutores totais (6,4 %), celulose (21,48 %), hemicelulose (14,78 %), lignina (8,77 %).

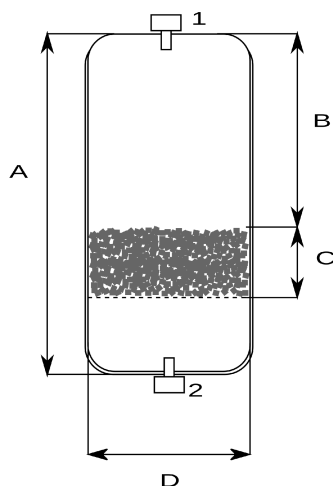
4.3 Fermentação em estado sólido com suporte inerte (FES-SI)

Nas FES-SI foram utilizados diferentes configurações de reatores biológicos isotérmicos na produção de L-asparaginase, correspondendo à fermentação estática, fermentação com reciclo de meio nutritivo e fermentação com alimentação e retirada intermitente do produto.

Na fermentação estática na ausência de alimentação de meio foi utilizada em estudos comparativos das FES em poliuretana com as biomassas: bagaço de malte e farelo de arroz. Além disso, a fermentação estática foi utilizada na otimização do meio nutritivo e das condições operacionais (pH, temperatura, concentração de L-asparagina, concentração de glicose e tempo) com células imobilizadas em FES-SI.

A Figura 15 mostra o desenho esquemático do biorreator estático utilizado na fermentação em estado sólido com espuma de poliuretana.

Figura 15 – Representação esquemática do biorreator estático isotérmico.



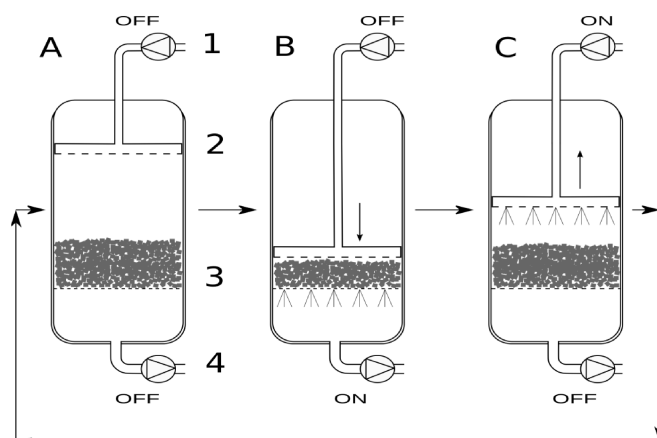
Nota: As dimensões do biorreator são: A - Altura do total do biorreator (400 mm); B - Altura da coluna de ar (190 mm); C - Região da FES com espuma de poliuretana (60 mm); D - Diâmetro do biorreator (28 mm); 1 e 2 são entra e saída de meio nutritivo, respectivamente.

Fonte: Autor, (2018).

A FES-SI com alimentação e retirada de produto intermitente foi utilizada em estudos comparativos de desempenho com as fermentações estática convencional e com a fermentação de reciclo de meio nutritivo em condições otimizadas.

Na Figura 16 mostra o desenho esquemático do biorreator batelada com alimentação e retirada intermitente do produto em três etapas. A primeira etapa é o período de fermentação em estado sólido. A segunda etapa é a extração parcial de produto fermentado. Em terceiro a etapa que fecha o ciclo de reuso, a adição de meio nutritivo sem adicionar novo inóculo e novo suporte sólido.

Figura 16 – Representação esquemática do biorreator batelada alimentada.



Nota: A - Etapa de fermentação; B - Etapa de retirada parcial do produto; C - Etapa de adição de meio nutritivo. Já os números 1, 2, 3 e 4 são respectivamente: a bomba de alimentação, a haste móvel, o suporte sólido de poliuretana e a bomba de retirada de produto.

Fonte: Autor, (2018).

Nas Figuras 16 e 17, as palavras "OFF" e "ON", representam respectivamente o não funcionamento e funcionamento das bombas utilizadas no processo de FES.

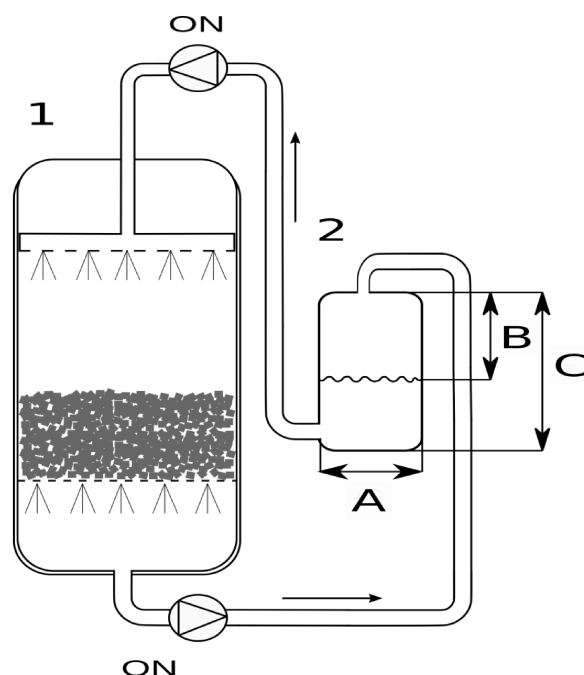
Já no biorreator de FES-SI de reciclo de meio foram avaliadas as condições ótimas de produção de L-asparaginase obtida no biorreator estático. Além disso, foram efetuados ensaios em condições ótimas de pH, temperatura, concentração de L-asparagina, concentração de glicose para diferentes vazões de reciclo ao longo do tempo, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação da vazão e do tempo no biorreator leito gotejante.

Ensaio	Vazão (mL/min)	Tempo de fermentação (h)
1	0,15	24,00
2	0,15	48,00
3	0,15	72,00
4	0,25	24,00
5	0,25	48,00
6	0,25	72,00
7	0,50	24,00
8	0,50	48,00
9	0,50	72,00
10	2,00	24,00
11	2,00	48,00
12	2,00	72,00

A Figura 17 representa o esquema do biorreator de reciclo de meio nutritivo, utilizado na FES-SI com poliuretana.

Figura 17 – Representação esquemática do biorreator leito gotejante.



Nota: A - Diâmetro do tanque de meio nutritivo do biorreator (100 mm); B - Altura total do tanque de meio nutritivo do biorreator (50 mm); C - Coluna de ar (26 mm). Os números representam, 1 - O biorreator de reciclo de meio nutritivo com dimensões estruturais idênticas ao biorreator estático, 2- Tanque de meio nutritivo do biorreator.

Fonte: Autor, (2018).

Os três tipos de biorreatores utilizados na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.*, são analisados de forma individual e comparativa, onde o biorreator estático representado pela Figura 15 é otimizado e posteriormente comparado com a literatura e os outros dois tipos de biorreatores, representados nas Figuras 16 e 17.

4.3.1 Otimização da FES-SI

Na otimização foram avaliados 34 condições operacionais diferentes de concentração de L-asparagina (x1), concentração de glicose (x2), pH (x3), temperatura (x4) e complemento de nutrientes (x5) como mostra a Tabela 6, que também apresenta os dados utilizados no modelo de RNA. Na obtenção do referido modelo de RNA foram utilizados 29 condições experimentais na etapa de treinamento da RNA e 5 na etapa de validação da RNA.

Tabela 6 – Planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.*.

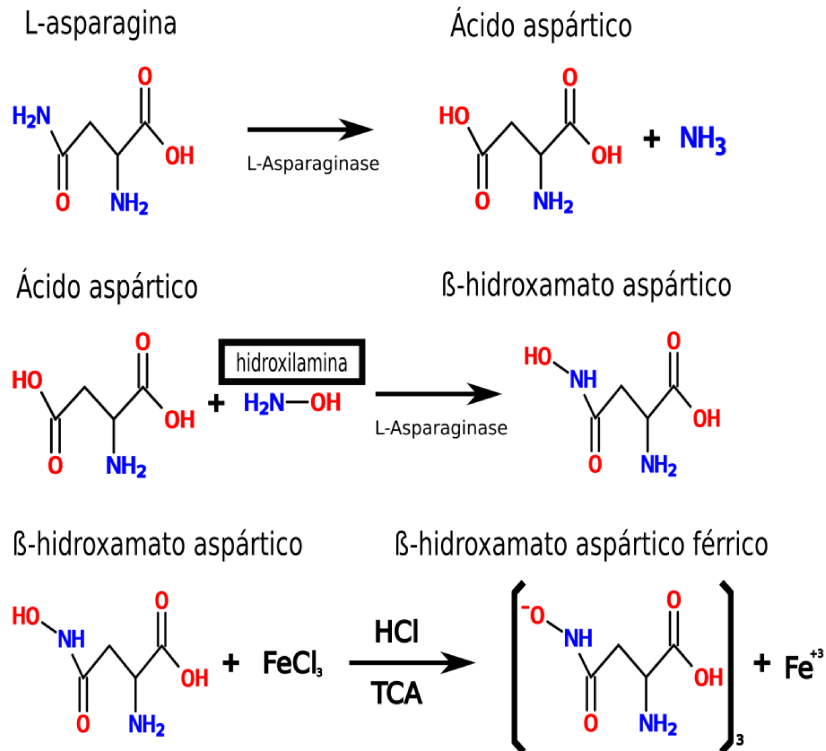
Ensaio	x1 ^a (g/L)	x2 ^b (g/L)	x3 ^c pH	x4 ^d (°C)	x5 ^e (mL)
1	13,0	8,0	8,0	30,0	6,0
2	13,0	8,0	6,0	30,0	3,0
3	5,0	8,0	6,0	30,0	6,0
4	13,0	8,0	8,0	30,0	3,0
5	13,0	4,0	6,0	30,0	6,0
6	13,0	4,0	8,0	30,0	3,0
7	5,0	4,0	8,0	30,0	6,0
8	5,0	4,0	6,0	30,0	3,0
9	13,0	8,0	6,0	40,0	6,0
10	13,0	8,0	8,0	40,0	3,0
11	5,0	8,0	8,0	40,0	6,0
12	5,0	8,0	6,0	40,0	3,0
13	13,0	4,0	8,0	40,0	6,0
14	13,0	4,0	6,0	40,0	3,0
15	5,0	4,0	6,0	40,0	6,0
16	5,0	4,0	8,0	40,0	3,0
17	9,0	6,0	7,0	35,0	8,5
18	9,0	6,0	7,0	35,0	0,5
19	17,0	6,0	7,0	35,0	4,5
20	1,0	6,0	7,0	35,0	4,5
21	9,0	10,0	7,0	35,0	4,5
22	9,0	2,0	7,0	35,0	4,5
23	9,0	6,0	7,0	25,0	4,5
24	9,0	6,0	7,0	45,0	4,5
25	9,0	6,0	5,0	35,0	4,5
26	9,0	6,0	9,0	35,0	4,5
27	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5
28	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5
29	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5
30 ^f	8,0	10,0	6,0	45,0	8,0
31 ^f	12,0	6,0	5,0	45,0	8,0
32 ^f	8,0	4,0	6,0	28,0	7,0
33 ^f	12,0	10,0	9,0	28,0	7,0
34 ^f	12,0	6,0	5,0	28,0	7,0

Nota: a – Representa concentração de L-asparagina (x1), b – Representa concentração de glicose (x2), c – Representa o valor de pH (x3), d – Representa a temperatura (x4), e – Representa o complemento de nutrientes adicionados na FES-SI (x5) e f – Ilustra os pontos utilizados na validação do modelo de RMA.

4.4 Análise da L-asparaginase

A L-asparaginase foi avaliada em ensaios de atividade enzimática utilizando hidroxilamina conforme descrito por DRAINAS, KINGHORN e PATEMAN (1997). A Figura 18 apresenta as reações que ocorrem durante o processo de quantificação da atividade enzimática da L-asparaginase.

Figura 18 – Reações para a quantificação de L-asparaginase.



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

Nestes ensaios, 0,5 mL de amostra de enzima misturada em 1,5 mL de tampão Tris - HCl (pH 8,6, 20 mM) contendo 0,2 mL de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL de hidroxilamina (1 M) é incubada por 30 minutos a uma temperatura de 37°C. A reação é terminada com adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico (10 %) em meio contendo ácido tricloroacético (5 %) e ácido clorídrico (0,66 M). O meio é centrifugado por 10 minutos (10000g, Avanti J-26XP Series) e em seguida o teor de ácido β -hidroxilâmico é obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240). A unidade enzimática é definida como 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ácido β -hidroxilâmico produzido e a atividade calculada como mostra na Equação 4.1 (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1997; DIVINO, 2015).

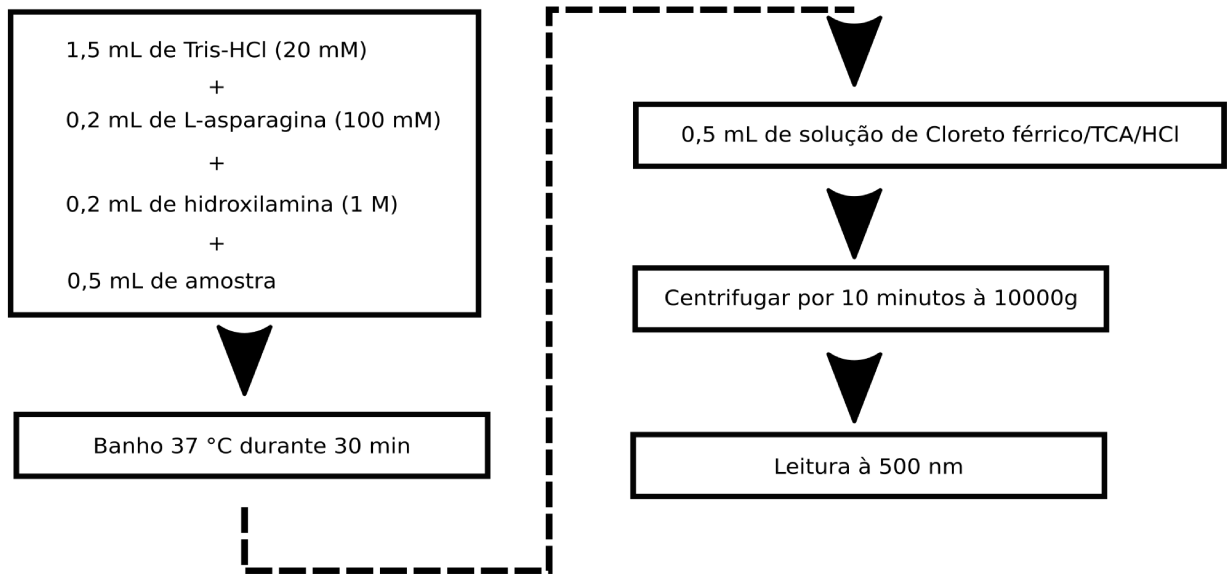
$$\lambda \left(\frac{U}{kg} \right) = 1000 \times \left(\frac{\delta \times Vol_{Ext} \times F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta \times m_{Sólido}} \right) \quad (4.1)$$

Sendo que λ representa a atividade em U/kg calculada pela Equação 4.1, δ é a leitura

de absorbância a 500 nm, Vol_{Ext} é o volume de extração, solução tween 80 (1 %), $F_{Diluição}$ é o fator de diluição das amostra que foram analisadas, $Vol_{Amostra}$ é o volume da amostra inserida na reação de análise de L-asparaginase, θ representa o tempo de incubação e o $m_{Sólido}$ é a massa de suporte sólido utilizada na FES.

A Figura representa o diagrama simplificado das etapas adotadas no procedimento de análise enzimática da L-asparaginase.

Figura 19 – Procedimento de análise da L-asparaginase.



Fonte: Adaptado de (PINHEIRO, 2017).

4.5 Modelagem da produção de L-asparaginase

4.5.1 Rede neural artificial

Na modelagem do processo de produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-IS, foi utilizado o modelo de rede neural artificial "feedfoword backpropagation" com uma camada oculta e funções de transferência do tipo tansig na camada de entrada e purelin na camada de saída obtidos pelo software AMORE da linguagem R (<http://cran.r-project.org/web/packages/AMORE/>). Com o intuito de melhorar o desempenho da RNA foi feita a normalização dos dados de entrada e de resposta no intervalo -1 a 1. Calculo realizado pela Equação 4.2.

$$X^{cod} = \frac{2X^{real}}{x^{max} - x^{min}} - \frac{x^{min} - x^{max}}{x^{max} - x^{min}} \quad (4.2)$$

Sendo que X^{cod} representa os valores reais no intervalo codificado, X^{real} é o valor real adotado para cada variável, x^{max} e x^{min} são o maior e o menor valor de cada variável

respectivamente. Na etapa de treinamento foi utilizado (85,3 %, experimentos 1 a 29) e validação (14,7 %, experimentos 30 a 34), no qual o número de neurônios da camada oculta que resulte em menor erro quadrático médio (RMSE - root mean square error, Equação 4.3) e melhor coeficiente de determinação (R^2 , Equação 4.4).

$$RMSE = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_i^{exp})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4.3)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_i^{exp})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_m)^2} \quad (4.4)$$

Nas Equações 4.3 e 4.4, Y^{calc} representa o valor de atividade calculado pelo modelo de RNA, Y^{exp} é o valor de atividade experimental, Y^m é o valor médio de todos os pontos experimentais. As condições operacionais empregadas na RNA foram otimizadas utilizando o método de algoritmo genético (AG) da biblioteca AG na linguagem R (<https://cran.r-project.org/web/packages/GA/>).

4.5.2 Algoritmo genético aplicado na RNA (RNA-AG)

O AG é um método de otimização inspirado no princípio Darwiniano da evolução das espécies e na genética. São algoritmos probabilísticos que fornecem mecanismo de busca paralela e adaptativa baseado no princípio de sobrevivência dos mais aptos e na reprodução (GOLDBERG, 1989; SAW et al., 2017). Com essa lógica, foi buscada a melhor solução para a produção de L-asparaginase com a restrição e sem a restrição de L-asparagina 1 g/L, através da evolução de populações de soluções codificadas através de cromossomos artificiais.

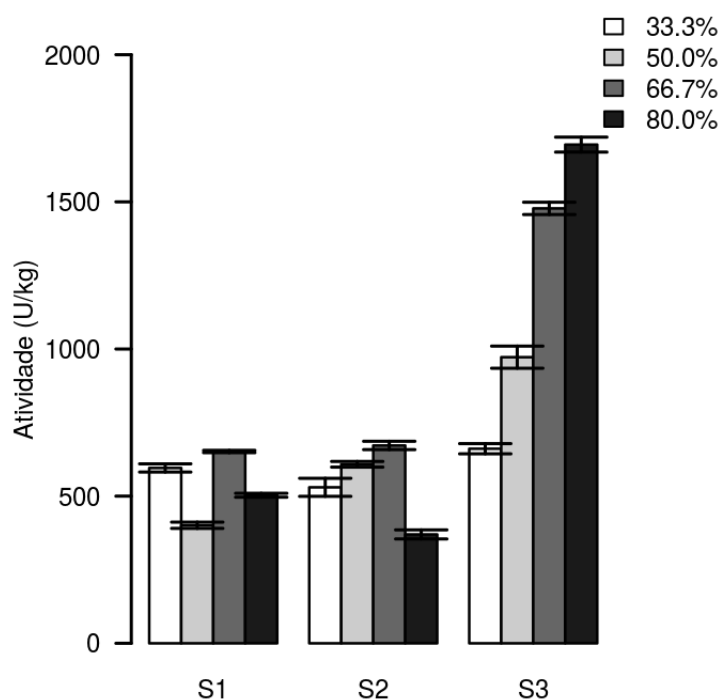
A otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI utilizando redes neurais artificiais com algoritmo genético para calcular o máximo da Equação 4.1, sendo a máxima produção de L-asparaginase a função objetivo. Os parâmetros utilizados no algoritmo genético para a otimização foram uma taxa de mutação de 0,1, taxa de crossover igual a 0,8 e uma população de 600.

5 Resultados e discussões

5.1 Comparação dos suportes sólidos na produção de L-asparaginase

A Figura 20 mostra que entre os meios sólidos espuma de poliuretana, torta de cerveja e farelo de arroz, o uso de espuma de poliuretana se destaca com meio capaz de gerar maior produção de L-asparaginase com atividade de 1600 U/kg de suporte sólido (7,62 U/mg de proteína) o que corresponde a um valor 2,6 e 2,5 vezes maiores, respectivamente, que o observado na torta de cerveja e farelo de arroz.

Figura 20 – Produção de L-asparaginase em FES-SI (espuma de poliuretana) e FES (biomassas farelo de arroz e bagaço de malte), em diferentes teores de unidades.



Nota: Condições de temperatura (25 °C), tempo de fermentação (72 h), S1 – farelo de arroz, S2 – bagaço de malte e S3 – espuma de poliuretana. As FES foram realizadas em diferentes umidades (g de meio nutritivo/g de suporte sólido) de 33,3 %, 50,0 %, 66,7 % e 80,0 %.

Como pode ser observado nas FES com biomassas de farelo de arroz e torta de cerveja, apresentaram a maior produção de L-asparaginase na condição de umidade em 66,7 %. Essas FES com biomassas apresentam decaimento na produção de L-asparaginase na condição de umidade de 80 %. Já na FES com suporte inerte de poliuretana apresenta a maior atividade de L-asparaginase em 80,0 % de umidade.

A diferença produtiva entre os suportes sólidos na condição de umidade em 80 %,

pode ser explicada pela alta capacidade de retenção de líquido da espuma de poliuretana, mantendo caracterizada a fermentação em estado sólido. Já os suportes sólidos de biomassas ocorre a saturação da matriz sólida, caracterizando a fermentação submersa diminuindo a produção da L-asparaginase neste caso.

A Tabela 7 mostra alguns trabalhos que utilizaram a FES para a produção de L-asparaginase. Porém cada trabalho utilizou suportes sólidos e microrganismos diferentes para produzir a enzima L-asparaginase, o que confirma a capacidade produtiva do *Penicillium sp.*.

Tabela 7 – Comparação da FES com a literatura.

Microrganismos	Suportes sólidos	Atividade		Referências
		U/kg *	U/mg **	
<i>Cladosporium sp.</i>	Farelo de trigo	–	10,82	KUMAR, RAMASAMY e MANONMANI (2013)
<i>Fusarium culmorum</i>	Biomassas de arroz	1250,00	–	MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN (2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caseína e milhacina	–	11,20	OLAMA et al. (2002)
<i>Penicillium sp.</i>	Espuma de poliuretana	1600,00	7,62	Este trabalho.

Nota: * – U/kg de suporte sólido, ** – U/mg de proteína.

Fonte: Autor, (2018).

A produção de enzimas obtida em FES com suporte de poliuretana é promissora, pois em experimentos iniciais a produção de L-asparaginase foi satisfatória quando comparado com outras FES na literatura. Como por exemplo em [KUMAR, RAMASAMY e MANONMANI \(2013\)](#) utilizando *Cladosporium sp.* em fermentação estado sólido de farelo de trigo encontraram atividade de 10,82 U/mg de proteína em condições otimizadas em 96 h de cultivo.

Em [MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN \(2017\)](#) realizaram experimentos em fermentação estado sólido com o microrganismo *Fusarium culmorum* (ASP-87) e encontraram, em condições otimizadas, a atividade de 1250,0 U/kg de suporte sólido em biomassas de arroz.

Já em [OLAMA et al. \(2002\)](#) em fermentação estado sólido utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* em meio otimizado contendo caseína e milhacina, encontraram atividade enzimática específica de 11,2 U/mg de proteína.

O uso das células de *Penicillium sp.* imobilizadas em suportes inertes de poliuretana

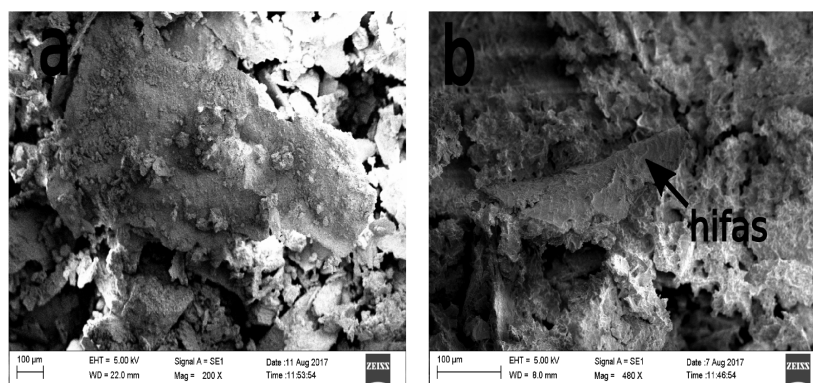
para fermentação estado sólido se destacou por ser um método capaz de aumentar a produção de L-asparaginase com o aumento de meio nutritivo no suporte inerte de poliuretana, como foi mostrado anteriormente na Figura 20 e na Tabela 7.

A imobilização em suportes inertes também foi utilizada com sucesso na produção de diferentes produtos biotecnológicos, tais como a amilase, o ácido cítrico, a glucose e o bacteriocina. Além disso, a fermentação em estado sólido com suporte inerte de poliuretana é um método limpo e de grande potencial no processo de produção de diferentes componentes, pela possibilidade de reutilização, fáceis condições operacionais, melhor resistência das células imobilizadas e altas concentrações de células no meio (MISHRA et al., 2016; QURESHI et al., 2016; BIZ et al., 2016; AMANI; JALILNEJAD, 2017).

Nas Figuras 21, 22 e 23, são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica dos meios sólidos não fermentados e fermentados considerando as condições ótimas. Foram utilizadas as condições otimizadas do processo de produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES de farelo de arroz, bagaço de malte e espuma de poliuretana para o maior contraste de crescimento do *Penicillium sp.* nas respectivas imagens das matrizes sólidas.

A Figura 21 apresenta o suporte sólido farelo de arroz. Na biomassa de farelo de arroz utilizada na FES, pode-se observar que trata-se de um meio pouco poroso; que neste caso dificulta as transferências de massa e de calor no processo de fermentação em estado sólido, limitando o crescimento e a produção do *Penicillium sp.* no suporte sólido de farelo de arroz.

Figura 21 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido de farelo de arroz antes e depois da fermentação.



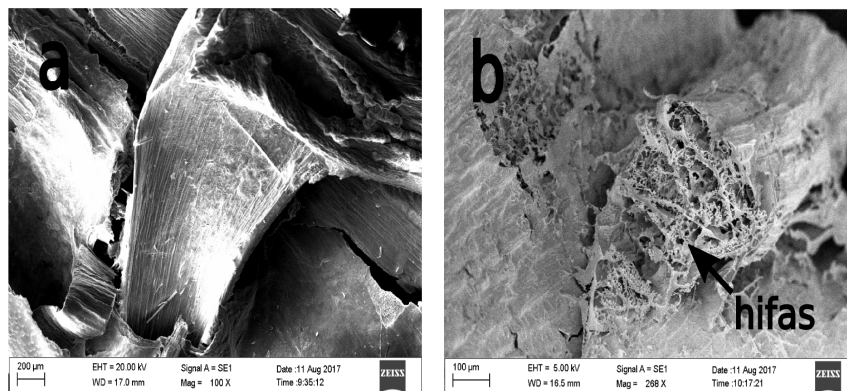
Nota: (25 °C, 72 h de fermentação), respectivamente, onde a - antes da fermentação, b - depois da fermentação.

Fonte: Autor, (2018).

No suporte sólido de bagaço de malte representado na Figura 22 o comportamento é similar ao apresentado na biomassa de farelo de arroz, com dificuldade no crescimento uniforme do fungo e na transferências de massa e calor durante a FES. No entanto, pode-se

observar que o *Penicillium sp.* cresce mais no suporte sólido de bagaço de malte, por ser mais poroso que o suporte sólido de farelo de arroz.

Figura 22 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido de bagaço de malte antes e depois da fermentação.

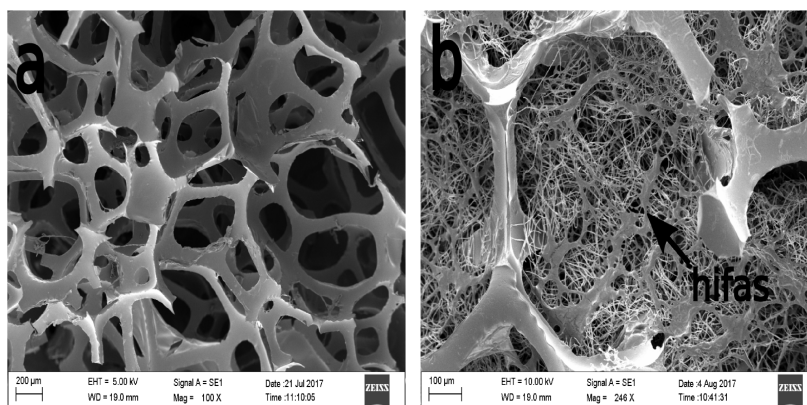


Nota: (25 °C, 72 h de fermentação), respectivamente, onde a - antes da fermentação, b - depois da fermentação.

Fonte: Autor, (2018).

Já na Figura 23 pode-se observar que o meio de poliuretana possibilitou um crescimento mais uniforme das hifas do *Penicillium sp* no interior do meio o que é condizente com as maiores atividades observadas em poliuretana pois a distribuição uniforme das hifas favorece a transferência de massa e calor que são dificuldades comuns na FES utilizando como suporte sólido as biomassas de bagaço de malte e farelo de arroz (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013; SOCCOL et al., 2017)

Figura 23 – Imagens de microscopia eletrônica do suporte sólido inerte de poliuretana antes e depois da fermentação.



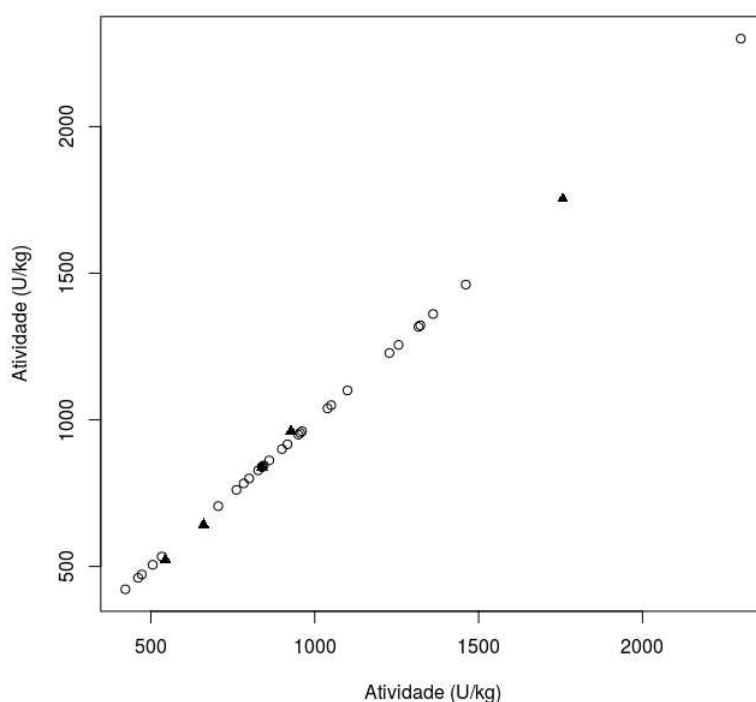
Nota: (25 °C, 72 h de fermentação), respectivamente, onde a - antes da fermentação, b - depois da fermentação.

Fonte: Autor, (2018).

5.2 Modelagem e otimização da produção de L-asparaginase

Na Figura 24 e Tabela 9 e 10 são apresentados os resultados dos pontos experimentais do planejamento e dos melhores ajustes e das condições da RNA, respectivamente. Pode-se observar que o modelo de RNA é adequado para descrever a FES-SI por representar os dados experimentais com R^2 superior a 0,98, confirmando a potencialidade da RNA na modelagem da FES-SI como cita a literatura (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Figura 24 – Gráfico dos ajustes das etapas de treinamento e validação dos dados experimentais utilizado RMA-AG.



Nota: Os círculos representam os pontos utilizados na fase de treinamento da rede, os triângulos representam os pontos utilizados na fase de validação.

Os resultados otimizados pelo modelo de RNA com os melhores ajustes são apresentados na Tabela 8. A RNA contém uma camada oculta com 18 neurônios e as funções de transferência da rede neural foram a tansig e a purelin que atuaram nas camadas de entrada e de saída, respectivamente.

Tabela 8 – Ajustes nas etapas de treinamento e validação de modelo de RNA.

Erros	Etapas	
	Treinamento	Validação
R^2	0,99	0,98
RMSE	0,1149802	0,124982

Na Tabela 9 são apresentados os valores calculados pelo modelo de RNA e os valores experimentais observados com os seus respectivos erros, diferença entre os valores calculados pela RNA e os observados experimentalmente.

Tabela 9 – Resultados da otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium* sp..

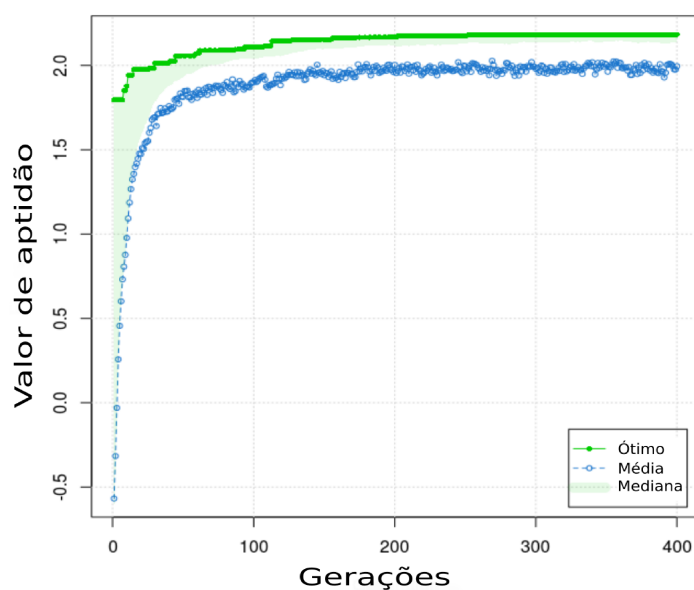
Ensaio	x1 (g/L)	x2 (g/L)	x3 pH	x4 (°C)	x5 (mL)	Atividade U/kg		Erro U/kg
						Calculado	Observado	
1	13,0	8,0	8,0	30,0	6,0	1461,13	1461,11	0,02
2	13,0	8,0	6,0	30,0	3,0	705,60	705,56	0,04
3	5,0	8,0	6,0	30,0	6,0	1322,22	1322,22	-0,01
4	13,0	8,0	8,0	30,0	3,0	716,69	716,67	0,03
5	13,0	4,0	6,0	30,0	6,0	1255,56	1255,56	0,01
6	13,0	4,0	8,0	30,0	3,0	561,21	561,11	0,09
7	5,0	4,0	8,0	30,0	6,0	1100,00	1100,00	0,00
8	5,0	4,0	6,0	30,0	3,0	505,57	505,56	0,02
9	13,0	8,0	6,0	40,0	6,0	861,14	861,11	0,03
10	13,0	8,0	8,0	40,0	3,0	644,50	644,44	0,06
11	5,0	8,0	8,0	40,0	6,0	1038,86	1038,89	-0,03
12	5,0	8,0	6,0	40,0	3,0	783,37	783,33	0,04
13	13,0	4,0	8,0	40,0	6,0	472,35	472,22	0,12
14	13,0	4,0	6,0	40,0	3,0	800,06	800,00	0,06
15	5,0	4,0	6,0	40,0	6,0	1316,74	1316,67	0,08
16	5,0	4,0	8,0	40,0	3,0	900,12	900,00	0,12
17	9,0	6,0	7,0	35,0	8,5	2300,02	2300,00	0,02
18	9,0	6,0	7,0	35,0	0,5	533,34	533,33	0,00
19	17,0	6,0	7,0	35,0	4,5	950,00	950,00	0,00
20	1,0	6,0	7,0	35,0	4,5	827,81	827,78	0,03
21	9,0	10,0	7,0	35,0	4,5	955,70	955,56	0,14
22	9,0	2,0	7,0	35,0	4,5	916,74	916,67	0,08
23	9,0	6,0	7,0	25,0	4,5	461,12	461,11	0,01
24	9,0	6,0	7,0	45,0	4,5	422,22	422,22	0,00
25	9,0	6,0	5,0	35,0	4,5	927,79	927,78	0,01
26	9,0	6,0	9,0	35,0	4,5	1227,76	1227,78	-0,02
27	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5	838,84	838,89	-0,05
28	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5	838,84	838,89	-0,05
29	9,0	6,0	7,0	35,0	4,5	838,84	838,89	-0,05
30*	8,0	10,0	6,0	45,0	8,0	844,44	844,44	0,00
31*	12,0	6,0	5,0	45,0	8,0	1361,11	1361,11	0,00
32*	8,0	4,0	6,0	28,0	7,0	588,88	588,89	-0,01
33*	12,0	10,0	9,0	28,0	7,0	894,44	894,45	-0,01
34*	12,0	6,0	5,0	28,0	7,0	583,35	583,33	0,01

Nota: * - pontos utilizados na validação do modelo de RNA.

São listados 34 pontos experimentais na Tabela 9, nos quais 29 pontos foram utilizados para treinamento da RNA e 5 pontos para a validação da RNA. Na otimização da produção de L-asparaginase foi utilizado o software AG com a RNA, visando a máxima produção de L-asparaginase para duas condições da variável concentração de L-asparagina, a primeira com restrição de 1 g/L de L-asparaginase na FES-SI e a segundo sem a restrição na variável.

Na Figura 25 pode-se observar a projeção dos cálculos da AG para cada geração de dados até atingir a produção ótima de L-asparaginase com restrição. Visando uma ótima produção de L-asparaginase com o menor gasto de L-asparagina e devido a proximidade dos resultados mostrados na Tabela 10, foi aplicado a restrição de concentração de L-asparagina (1 g/L) nos diferentes tipos de reatores biológicos.

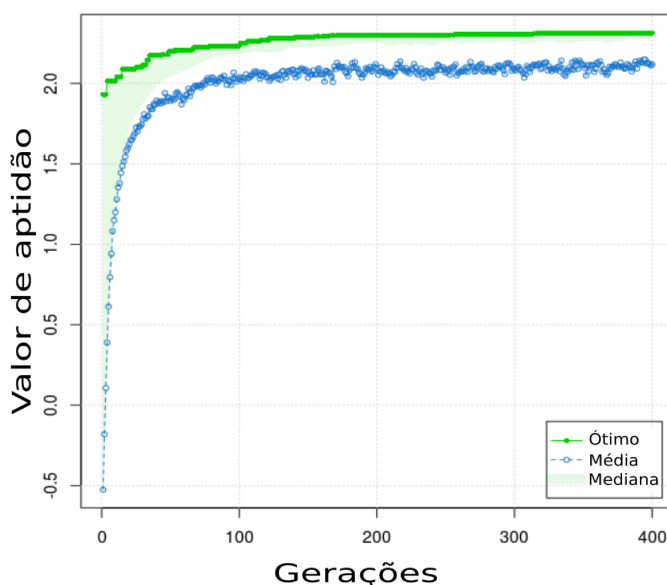
Figura 25 – Curva de ajusta da RNA-AG com restrição de adição de L-asparagina.



Na Figura 26 pode-se observar a projeção dos cálculos do AG para cada geração de dados até atingir a produção ótima de L-asparaginase sem a restrição na variável concentração de L-asparaginase. A otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI utilizando RNA com AG é um método satisfatório, pois descreve o processo de produção e otimiza os resultados com pequenos erros.

Os paramentos utilizados no AG para a otimização foram uma taxa de mutação de 0,1, que são pequenas inserções ou deleções nas variáveis analisadas; taxa de crossover igual a 0,8, que deve ser maior que a taxa de mutação garantindo a variação dos dados; população de 600, conjunto dos dados que foram utilizados pela AG na otimização dos resultados calculados pela RNA.

Figura 26 – Curva de ajusta da RNA-AG sem restrição de adição de L-asparagina.



Pode-se observar que não houve mudança no comportamento das curvas representadas nas Figuras 25 e 26, devido a ótima representatividade dos dados pelo modelo de RNA-AG proposto. Além disso, os valores otimizados da produção de L-asparaginase das duas curvas foram próximos, facilitando a escolha pela condição com o menor consumo de L-asparagina na FES-SI, Figura 25.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados de otimização e respectivas ensaios de validações na produção de L-asparaginase por FES-SI nas condições de restrição no uso de L-asparagina ($L\text{-asparagina} \leq 1 \text{ g/L}$) e sem restrição de concentração de L-asparagina, utilizando o modelo de rede neural artificial com otimização por algoritmo genético (RNA-AG).

Tabela 10 – Resultados otimizados obtidos com o modelo de RNA-AG no tempo de fermentação de 72 h.

Ensaio	x1 (g/L)	x2 (g/L)	x3 pH	x4 (°C)	x5 (mL)	Atividade U/kg		Erro U/kg
						Calculado	Observado	
1	1,00*	5,24	5,00	44,32	8,48	3411,60	3400,00	11,60
2	4,73	6,62	5,00	40,76	8,49	3534,60	3514,00	20,60

Nota: * restrição de concentração de L-asparagina.

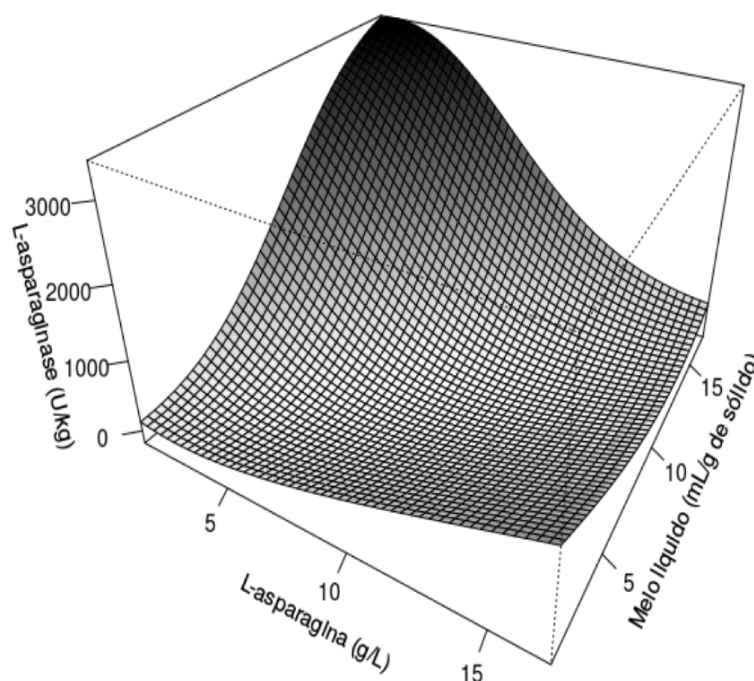
Pode-se observar que o modelo RNA-AG foi satisfatório na obtenção das condições

otimizadas pois apresentou erros inferiores a 0,6 % e que a redução da concentração de L-asparagina de 4,73 g/L para 1 g/L reduz a produção de L-asparaginase em apenas 3,5 %, garantindo uma economia do reagente L-asparagina com uma produção satisfatória de L-asparaginase na condição otimizada com restrição de L-asparagina em 1 g/L.

Para facilitar a compreensão e visualização das variáveis meio nutritivo/g de suporte sólido, concentração de L-asparaginase, concentração de glicose, pH e temperatura, analisadas na FES-SI, foram construídas superfícies tridimensionais na condição otimizada 1 da Tabela 10. Os gráficos tridimensionais foram construídos pela RNA-AG, fixando três variáveis na condição otimizada e variando as outras duas variáveis nos respectivos intervalos adotados neste trabalho.

A Figura 27 mostra o gráfico tridimensional que representa a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI em diferentes valores das variáveis meio líquido e concentração de L-asparagina, fixando as outras variáveis do processo na condição otimizada.

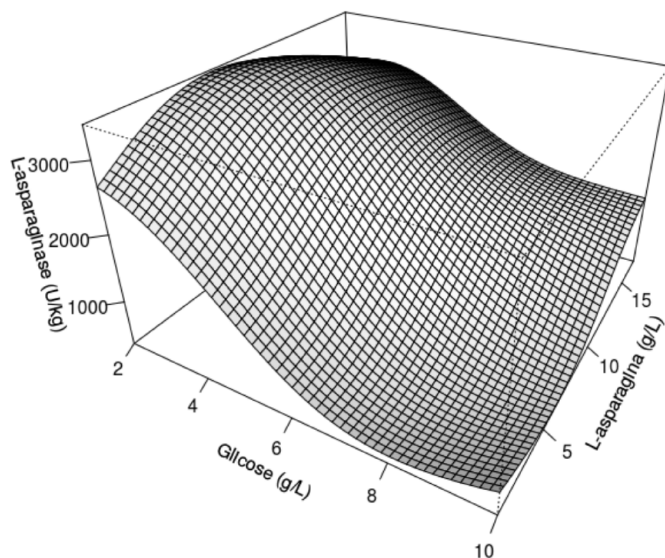
Figura 27 – Análise do meio líquido e concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.



Como pode ser observado na superfície de resposta o aumento da proporção de líquido por grama suporte de poliuretana da FES aliado a uma condição de baixa concentração de L-asparagina foi capaz de produzir a enzima L-asparaginase.

Na Figura 28 mostra a influência das variáveis concentração de glicose e concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.

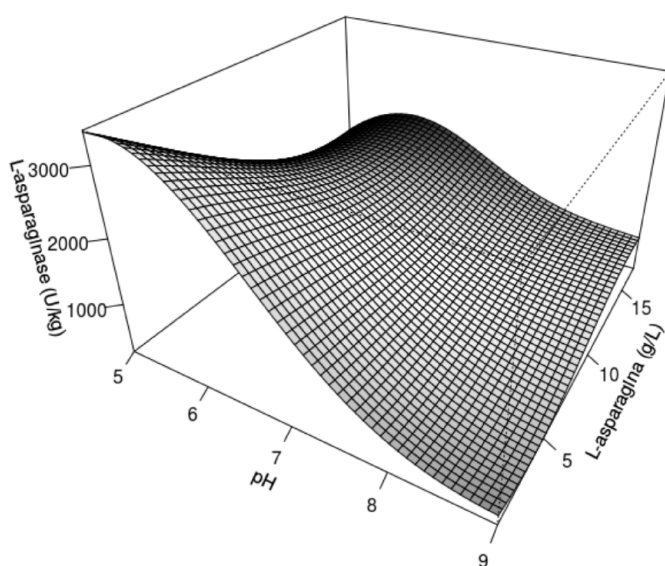
Figura 28 – Análise da superfície de resposta das fontes de carbono (glicose e asparagina) utilizadas na FES-SI.



As variáveis concentração de glicose e concentração de L-asparagina, utilizadas como fontes de carbono na FES-SI, como pode ser observado, são influentes na produção de L-asparaginase. Desta forma, foi possível observar a ótima produção enzimática mesmo com baixos valores da variável concentração de L-asparagina.

A Figura 29 ilustra as variáveis pH e concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase por FES-SI.

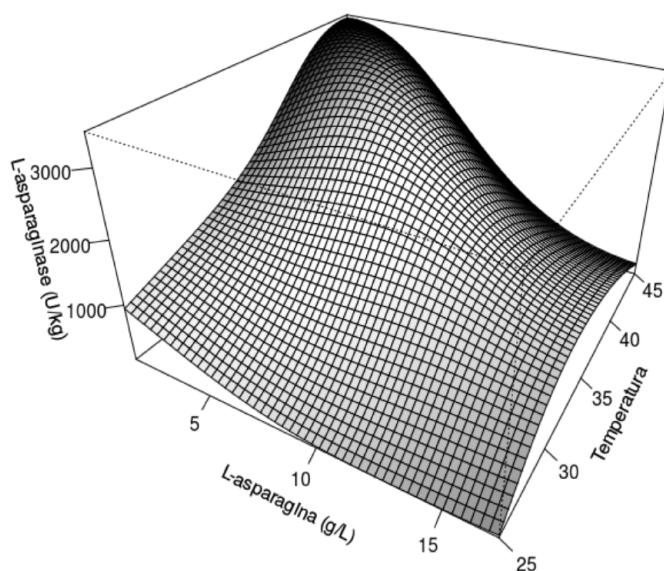
Figura 29 – Análise da superfície de resposta do pH e da concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.



Pode-se observar que a maior produção de L-asparaginase para essas variáveis foi com um valor de pH de aproximadamente 5, com baixos valores de concentração de L-asparagina,

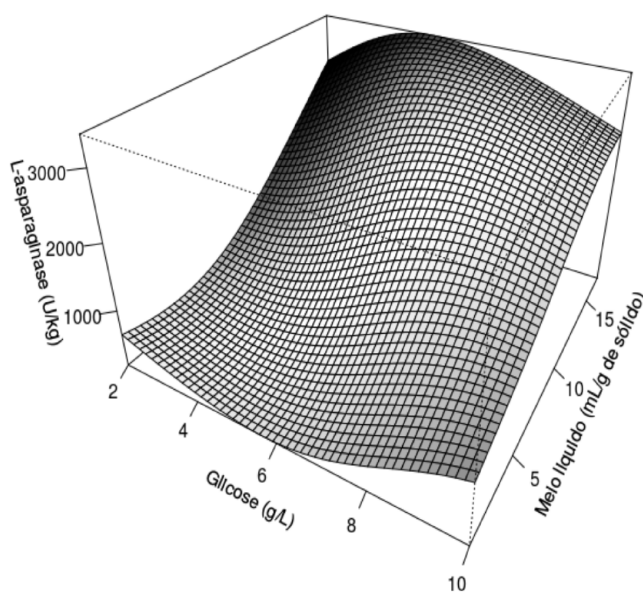
como observado anteriormente na Tabela 10. Na Figura 30 representa a ação das variáveis temperatura e concentração de L-asparagina na FES-SI.

Figura 30 – Análise da superfície de resposta da temperatura e da concentração de L-asparagina na produção de L-asparaginase.



Como pode ser observado o aumento da temperatura de fermentação juntamente com as baixas concentrações de L-asparagina representa uma região de ótima produção de L-asparaginase. A Figura 31 mostra a representatividade da variável inócuo e da concentração de glicose, uma das fontes de carbono utilizadas na FES-SI.

Figura 31 – Análise do meio líquido e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.

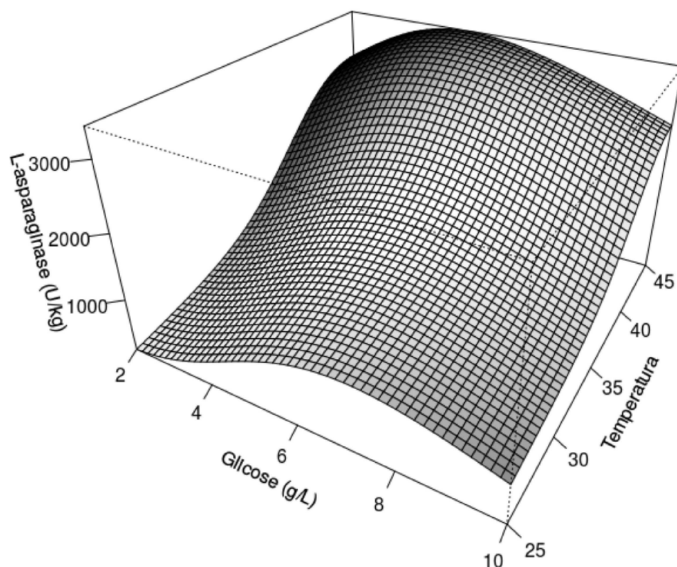


Nesta superfície de resposta a região que apresenta os maiores valores de produção

de L-asparaginase, são com elevados valores de meio líquido por grama de suporte sólido de poliuretana combinados com valores intermediários para a variável concentração de glicose.

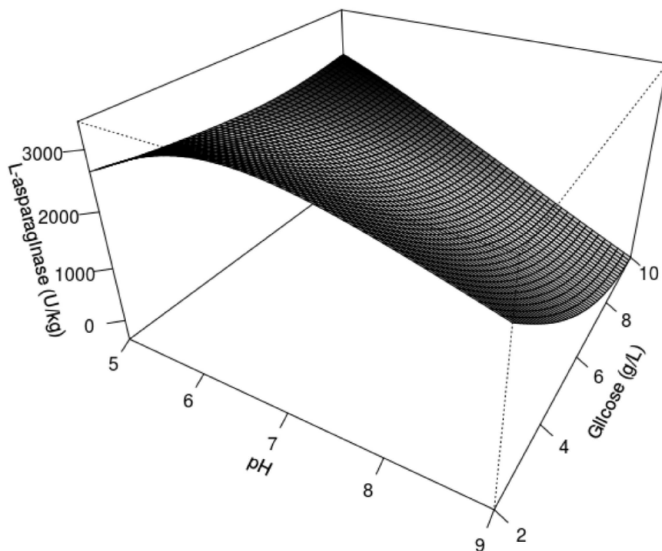
A Figura 32 ilustra a combinação as variáveis temperatura e concentração de glicose na FES-SI.

Figura 32 – Análise da temperatura e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.



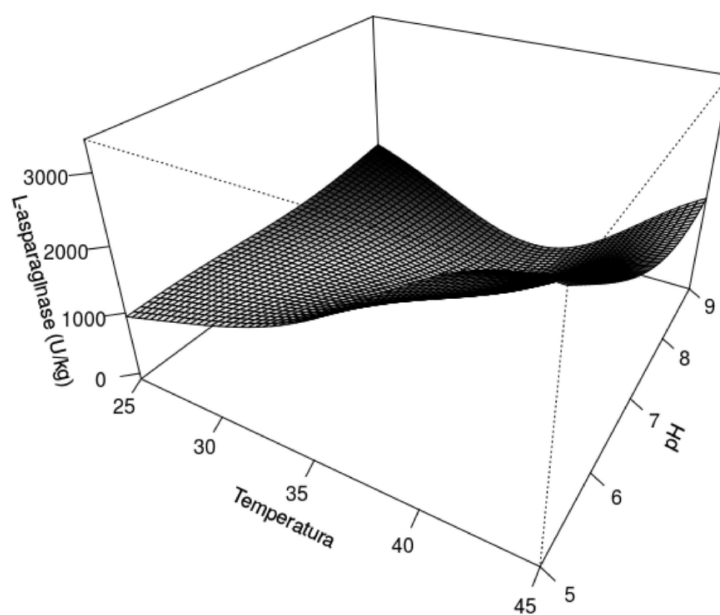
Como pode ser observado o aumento da temperatura favorece a produção de L-asparaginase, além do disso o resultado ótimo e encontrado em valores intermediários da variável concentração de glicose em altas temperatura de fermentação. A Figura 33 mostra a resposta da combinação entre pH e concentração de glicose na FES-SI.

Figura 33 – Análise do pH e da concentração de glicose na produção de L-asparaginase.



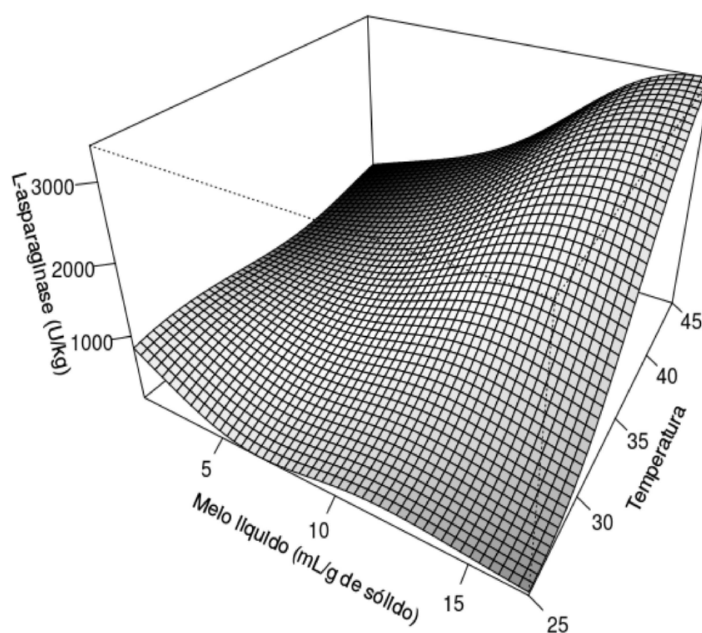
O *Penicillium sp.* utilizado na produção de L-asparaginase em FES-SI é capaz de produzir a enzima em todo intervalo de pH, com destaque para os valores de pH próximos a 5, isso em diferentes concentrações de glicose como pode ser observado na Figura 33. Já na Figura 34 mostra as variáveis pH e Temperatura.

Figura 34 – Análise do pH e da temperatura na produção de L-asparaginase.



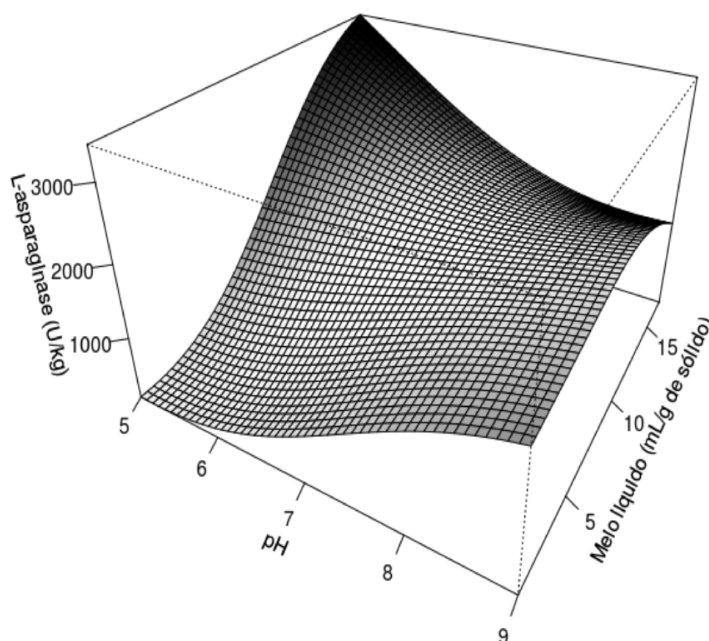
Como pode ser observado a maior produção da FES-SI, neste caso está associada a um baixo valor de pH e alto valor de temperatura, como foi apresentado nas condições otimizadas da Tabela 10. A Figura 35 mostra as variáveis inócuo e temperatura na FES-SI.

Figura 35 – Análise do meio líquido e da temperatura na produção de L-asparaginase.



O ponto ótimo de produção de L-asparaginase, considerando as variáveis meio líquido por grama de suporte sólido de poliuretana e temperatura, é em valores altas de unidade no suporte sólido com a temperatura aproximadamente 45 °C. Por fim a Figura 36 mostra a influencia as variáveis pH e inócuo na FES-SI.

Figura 36 – Análise do meio liquido e do pH na produção de L-asparaginase.



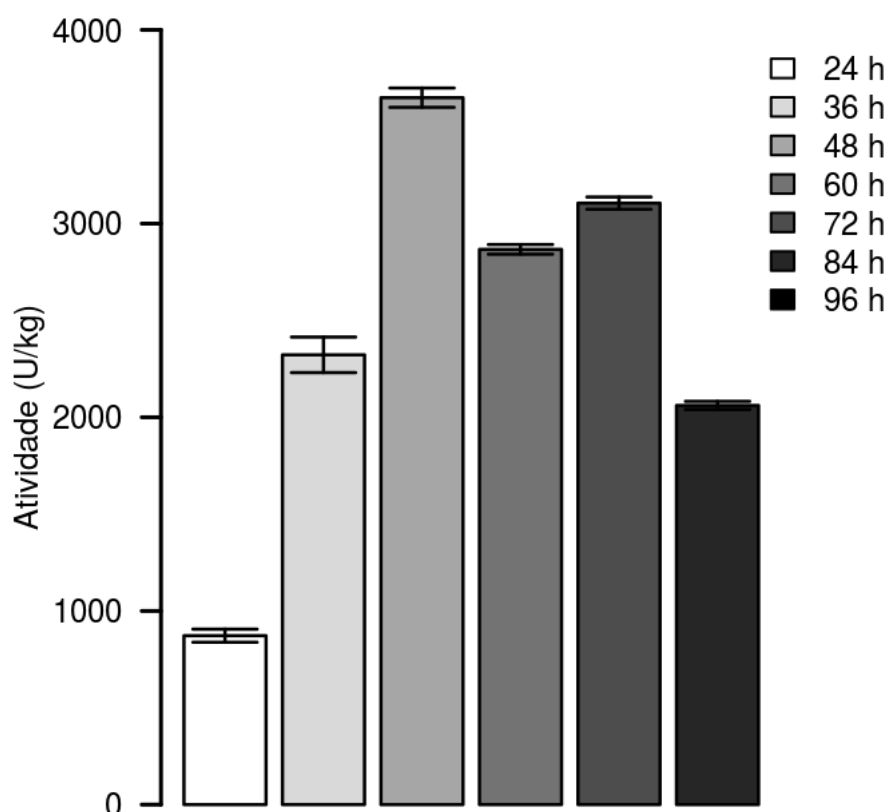
Pode-se observar que em altas valores de unidade do suporte sólido de poliuretana e valores de pH levemente ácidos, aproximadamente 5, a produção de L-asparaginase aumenta significativamente comparadas as outras regiões da superfície de resposta.

As Figuras 27 a 36 representam satisfatoriamente a produção otimizada de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI. O que foi observado em todas as combinações das variáveis analisadas pelas superfícies de respostas condiz com a condição otimizada com restrição de L-asparagina calculada pela RNA-AG, ilustrada na Tabela 10.

5.3 Aplicação das condições ótimas no tempo

A Figura 37 apresenta o efeito da variável do tempo de fermentação na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* por FES-SI em condições otimizadas com restrição da variável concentração de L-asparagina em 1,0 g/L, representadas na condição 1 da Tabela 10. A produção otimizada de L-asparaginase em biorreator estático em FES-SI no tempo fermentação fixo de 72 h foi de 3411,6 U/kg de suporte sólido.

Figura 37 – Efeitos no tempo de FES-SI na produção de L-asparaginase.



Nota: As condições otimizadas utilizadas na análise do tempo de fermentação foram: concentração de L-asparagina (x1), 1,00 g/L, concentração de glicose (x2), 5,24 g/L, pH (x3), 5,00, temperatura (x4), 44,3 °C e complemento de nutrientes adicionados na FES-SI (x5), 8,48 mL.

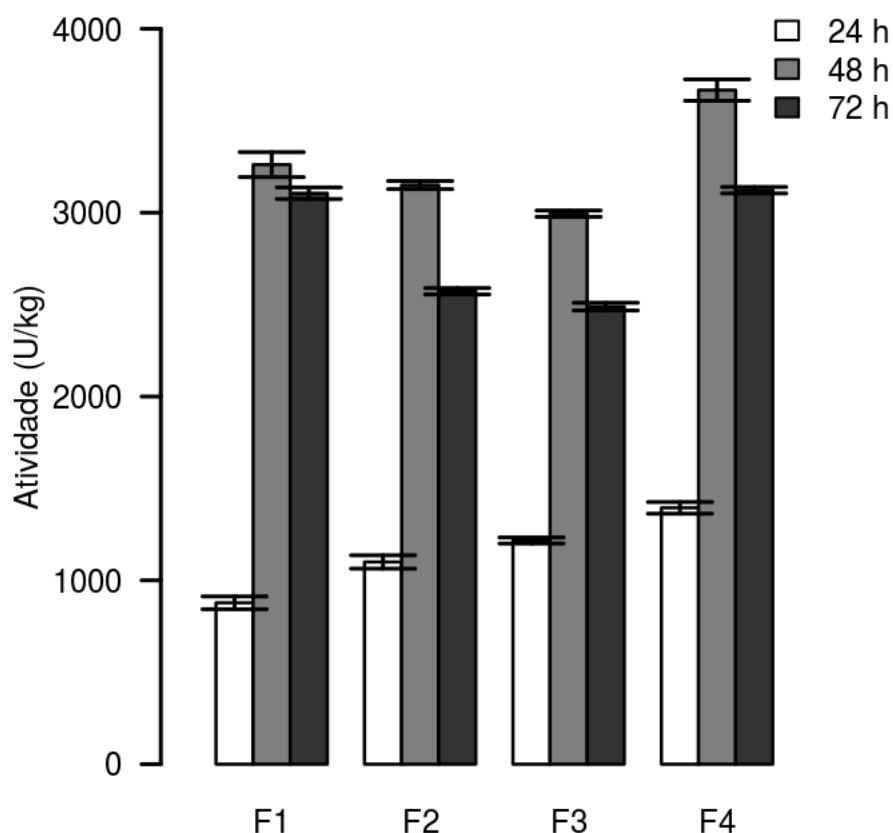
Como pode ser observado no tempo de 48 h de FES-SI foi obtido a melhor produção de L-asparaginase (3650 U/kg, 76,04 U/kg.h). Este valor obtido é 1,61 vezes maior que o observado em 72 h nas fermentações ilustradas na Tabela 10. Desta forma a variável tempo de fermentação atua positivamente na FES-SI, melhorando a produção de L-asparaginase por tempo de batelada.

5.4 Análise dos reatores utilizados nas FES-SI

5.4.1 Reator de reciclo de meio (leito gotejante)

Como pode ser observado na Figura 38 o reator FES-SI com reciclo de meio foi superior a FES-SI convencional com um aumento de 9,3 % da atividade de L-asparaginase. Este aumento pode ser associado a uma melhor transferência de massa e calor gerado pela movimentação da fase líquida, pois a situação de maior vazão representa a condição de melhor resultado.

Figura 38 – Gráfico de produção de L-asparaginase no reator batelada com reciclo de meio nutritivo otimizado em biorreator estático.



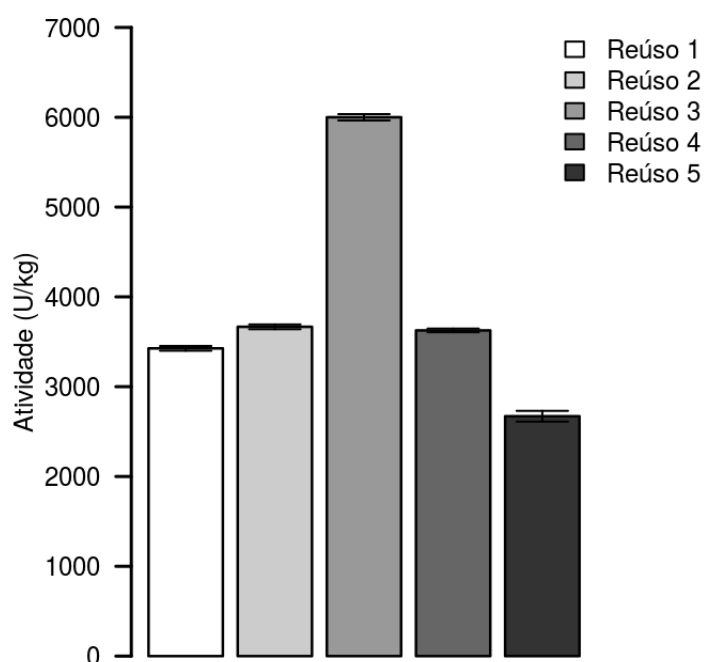
Nota: Onde F1, F2, F3 e F4 representam respectivamente as vazões de reciclo, 0,15, 0,25, 0,50 e 2,0, em mL/min, em cada conjunto de ensaios experimentais. Todos os ensaios experimentais foram realizados nos tempos de 24, 48 e 72 horas de fermentação. As condições otimizadas utilizadas foram: concentração de L-asparagina (x1), 1,00 g/L, concentração de glicose (x2), 5,24 g/L, pH (x3), 5,00, temperatura (x4), 44,3 °C e complemento de nutrientes adicionados na FES-SI (x5), 8,48 mL.

Na análise do tempo da FES-SI no biorreator de reciclo de meio nutritivo, Figura 38, pode-se observar que a vazão de reciclo não interfere no tempo de fermentação, pois o tempo ótimo de fermentação do biorreator de reciclo e o mesmo encontrado no biorreator estático convencional da Figura 37.

5.4.2 Reator com alimentação e retirada de produto intermitentes

A Figura 39 mostra que a proposta inovadora envolvendo o reator batelada alimentada com retiradas intermitentes com adição de meio nutritivo sem reposição de células e troca do suporte sólido é promissora. Pode-se observar que o funcionamento do reator com retiradas intermitentes de produto conferiu um desempenho superior ao reator batelada convencional com uma produção máxima de 6050,0 U/kg.

Figura 39 – Gráfico de reuso poliuretano na produção de L-asparaginase utilizando biorreator com alimentação e retirada de produto.



As condições otimizadas utilizadas na fermentação de reuso foram: concentração de L-asparagina (x1), 1,00 g/L, concentração de glicose (x2), 5,24 g/L, pH (x3), 5,00, temperatura (x4), 44,3 °C e complemento de nutrientes adicionados na FES-SI (x5), 8,48 mL.

Nas FES-SI com alimentação e retiradas de produto intermitentes foram considerados as condições ótimas da Tabela 10 e Figura 37. Analisando todos os cinco ciclos de reuso obtêm-se média de 3878,0 U/kg, que representa um aumento de 14,1 % na atividade de L-asparaginase comparado ao processo com biorreator estático, sem a necessidade de adição de mais células e troca do suporte de poliuretano.

6 Conclusão

Nesta parte foram apresentadas as considerações dos temas abordados no trabalho. Analisando comparativamente os resultados e concluindo sobre os aspectos importantes anteriormente mencionados.

Analisando o fungo produtor da enzima L-asparaginase o *Penicillium sp.*, provou ser uma boa alternativa de microrganismo para ser usado em FES e FES-SI, pois esse produziu de forma satisfatória a enzima L-asparaginase nos suportes de biomassas, farelo de arroz e bagaço de malte, e no suporte inerte de espuma de poliuretana.

A poliuretana material sintético mostrou características favoráveis para o uso em FES-SI, pois os espaços estruturais da espuma de poliuretana facilita as transferências de calor e massa durante a FES-SI. Assim o *Penicillium sp.* cresce de forma uniforme, melhorando a eficiência do processo de FES.

A FES-SI realizada em biorreator estático, apresentou ótimos resultados quando comparamos com as FES de biomassa de farelo de arroz e torta de cerveja. A produção de L-asparaginase em FES-SI superior ao dobro quando comparamos com a FES, além de gerar um produto mais limpo no final do processo de fermentação.

Desta forma duas novas abordagens de uso de reatores na FES associados à produção de L-asparaginase em suporte inerte foram investigadas. Na primeira, foi observado o biorreator inovador com recirculação de meio nutritivo no suporte sólido inerte de espuma de poliuretana, onde foi alcançada uma produção de L-asparaginase 9,3 % maior em relação à configuração de biorreatores estáticos.

O segundo processo foi a estratégia de repetição no uso dos suportes com células, gerando um aumento de 14,1 % se mostraram superiores a FES-SI utilizando biorreator estático. A máxima atividade enzimática obtida foi de 6050,0 U/kg na configuração de reator com reúso de suporte inerte com células e 3716,7 U/kg na configuração de reciclo de meio.

Pode-se dizer que o uso de rede neural artificial associado ao algoritmo genético na descrição e otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* com espuma de poliuretana foi ótimo, garantindo uma boa representatividade dos dados experimentais com um R^2 de 0,99 na etapa de treinamento e 0,98 na validação da RNA-AG.

7 Sugestões para trabalhos futuros

Nesta parte foi apresentado algumas sugestões para pesquisa e desenvolvimento do tema, produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* em espuma de poliuretana para diferentes biorreatores, trabalhos futuros.

- a – Caracterizar a L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI-505;
- b – Avaliar os biorreatores em maiores escalas de tamanho, comparando com os biorreatores utilizados neste trabalho;
- c – Avaliar a cinética de crescimento do *Penicillium sp.* ao longo do processo de produção da L-asparaginase;
- d – Otimizar a forma de crescimento do *Penicillium sp.* na espuma de poliuretana.

Referências

ABREU, J.; ROVIDA, A.; PAMPHILE, J. Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas. *Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review*, v. 21, p. 55–59, 2015. ISSN 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>>. Citado na página 30.

AGUDELO, L. M. G. *Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido*. São José do Rio Preto, SP, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/90745>>. Citado na página 44.

ALMOG, O. et al. The 0.93a crystal structure of sphericase: A calcium-loaded serine protease from bacillus sphaericus. *Journal of Molecular Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.011>, v. 332, p. 1071–1082, 2003. Citado na página 34.

AMANI, A.; JALILNEJAD, E. Cfd modeling of formaldehyde biodegradation in an immobilized cell bioreactor with disc-shaped kissiris support. *Biochemical Engineering Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.014>, v. 4, p. 47–59, 2017. Citado na página 59.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância sanitária. *Ministério da Saúde utilizará medicamento em programa de saúde pública. Importação excepcional garante abastecimento*. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br.htm>>. Acesso em: 8 Abril 2017. Citado na página 25.

BERG, H. V. D. Asparaginase revisited. *Leukemia and Lymphoma*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.537796>, v. 52, p. 168–178, 2011. 2. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 36.

BETHKE, P; BUSSAN, A. Acrylamide in processed potato products. *American Journal of Potato Research*, <https://doi.org/10.1007/s12230-013-9321-4>, v. 90, p. 403–424, 2013. Citado na página 37.

BIZ, A. et al. Production of pectinases by solid state fermentation of a mixture of citrus waste and sugar cane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 54–62, 2016. Citado na página 59.

BROOME, J. Studies on the mechanism of tumor inhibition by l-asparaginase: Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood normal tissues and 6c3hed lymphomas of mice: difference in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells. *J.Exp. Med.*, v. 127, p. 1055–1072, 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2138499/>>. Citado na página 34.

CACHUMBA, J. et al. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>, p. 77–85, 2016. Citado na página 25.

CHEN, H. *Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0956-9>: Food and Bioprocess Technology, 2013. v. 6. 2916-2924 p. ISBN 1935-5149. Citado na página 27.

COLEN, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. Belo Horizonte, MG, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/MAFB-72BGXL>>. Citado na página 31.

CORCUERA, M. et al. Microstruture and properties of polyurethanes derived from castor oil. *Polymer Degradation an Stability*, <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.001>, v. 95, p. 2175–2184, 2010. Citado na página 39.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Ciências Exatas e Tecnológicas*, <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2007v28n2p143>, v. 28, p. 143–160, 2007. Citado na página 40.

CRUZ, T. et al. Quantitative microscopy characterization of hydrous niobium phosphate into bleached cellulose. *Micron*, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.02.012>, v. 41, p. 402–411, 2010. Citado na página 33.

CUESTA, S. M. et al. The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical Journal*, <http://10.1016/j.bpj.2015.04.020>, v. 109, p. 1082–1086, 2015. Citado na página 31.

CÂNDIDO, M. A. *Formação de acrilamida em alimentos processados e sua possível ação carcinogênica*. Lorena, SP, 2015. Disponível em: <<https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2015/MEQ15043.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 37.

DE-ANGELI, L. et al. Effect of l-asparaginase from aspergillus terreus on ascites sarcoma in the rat. *Nature*, <http://doi:10.1038/225549a0>, v. 225, p. 549–550, 1970. Citado na página 33.

DEWAN, S. Global markets for enzymes in industrial applications, report code-bio030h. *BCC Research*, v. 7215, p. 537–545, 2014. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>. Citado na página 37.

DIAS, F. F.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum l-asparaginase production from aspergillus oryzae cct 3940. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <http://10.1016/j.bcab.2016.02.006>, v. 6, p. 33–39, 2018. Citado na página 33.

DIAS, F. F. G. et al. Purification, characterization and antiproliferative activity of l-asparaginase from aspergillus oryzae cct 3940 with no glutaminase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.007>, p. 785–794, 2017. Citado na página 26.

DIVINO, B. de S. *Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo Pichia pastoris*. São Paulo, SP, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/15122015/Bruna_de_Souza_Divino_ME_corrigida.pdf>. Citado 3 vezes nas páginas 35, 36 e 54.

DORIYA, K. et al. *Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase*. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>: Advances in Food and Nutrition Research, 2016. v. 78. ISBN 1043-4526. Citado 3 vezes nas páginas 26, 33 e 38.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J.; PATEMAN, J. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus aspergillus nidulans. *Journal of General Microniology*, v. 13, p. 493–501, 1997. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/98/2/mic-98-2-493.pdf>>. Citado na página 54.

DURAND, A.; BROISE, D. D. L.; BLACHERE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 59–66, 1988. Citado na página 39.

DZIALANSKI, Z. et al. Lactase persistence versus lactose intolerance: Is there an intermediate phenotype? *Clinical Biochemistry*, <http://10.1016/j.clinbiochem.2015.11.001>, v. 49, p. 248–252, 2016. Citado na página 34.

DZIEZAK, J. Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, v. 45, p. 78–85, 1991. Citado na página 31.

EAKER, S. et al. Bioreactors for cell therapies: Current status and future advances. *Cytotherapy*, <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.011>, v. 19, p. 9–18, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 41.

EFSA. European Food Safety Authority. *Scientific Opinion on acrylamide in food*. Italy, 2015. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/efsajournal.htm>>. Acesso em: 18 Abril 2017. Citado na página 26.

EGLER, R.; AHUJA, S.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, <http://10.4103/0976-500X.184769>, p. 62–71, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 25, 35 e 36.

EINSFELDT, K. *Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de Zymomonas mobilis para aplicação como biofármaco*. Rio de Janeiro, RJ, 2014. Disponível em: <<http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/producao-academica/teses-de-doutorado/2014>>. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 48.

ELSHAFEI, A. M. et al. Purification, characterization and antitumoractivity of l-asparaginase from penicillium brevicompactum nrc 829. *British Microbiology Research Journal*, <http://10.9734/BMRJ/2012/1735>, p. 158–174, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 54.

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*, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.002>, v. 41, p. 295–302, 2015. Citado na página 33.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, <http://10.1016/j.rser.2015.07.092>, p. 179–188, 2015. Citado na página 27.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme research*, <http://10.4061/2010/862537>, v. 10, p. 1–19, 2010. Citado na página 37.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 335–345, 1998. Citado na página 40.

GANESHPURKAR, A.; KUMAR, D.; SINGH, S. K. Design, synthesis and collagenase inhibitory activity of some novel phenylglycine derivatives as metalloproteinase inhibitors. *International Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.008>, v. 107, p. 1491–1500, 2018. Citado na página 34.

GARVEY, M. et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends in Biotechnology*, <http://10.1016/j.tibtech.2013.06.006>, v. 31, p. 581–593, 2013. Citado na página 34.

GOLDBERG, D. Genetic algorithms in search. *Optimization and Machine Learning*, v. 3, p. 95–99, 1989. Citado na página 56.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Design of experiments and artificial neural network linked genetic algorithm for modeling and optimization of l-asparaginase production by *aspergillus terreus* mtcc 1782. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0119-7>, v. 16, p. 50–58, 2011. Citado na página 33.

GURUNG, N. et al. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>, v. 3, p. 18, 2013. Citado na página 31.

HENDRIKSEN, H. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *aspergillus oryzae*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, <http://10.1021/jf900174q>, v. 90, p. 4168–4176, 2009. Citado na página 37.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. L-asparaginase-an anti tumor agent production by *fusarium equiseti* using solid state fermentation. *International Journal of Drug Discovery*, <http://doi.10.9735/0975-4423>, v. 3, p. 88–99, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 33.

IARC International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. France, 1994. v. 59. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol59/mono59.pdf>>. Acesso em: 19 Abril 2017. Citado na página 36.

IARC International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. France, 2017. v. 59. Disponível em: <<http://http://www.iarc.fr/en/cancertopics/index.php>>. Acesso em: 14 Abril 2017. Citado na página 37.

IRFAN, M. et al. Goptimization of process parameters for xylanase production by *bacillus* sp. in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.008>, p. 139–147, 2016. Citado na página 26.

IZADPANA, F. et al. Marine microbial l-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research*, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.011>, v. 2, p. 1, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 35.

KAPNOOR, S.; MULIMANI, V. Production of α -galactosidase by *aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk galacto oligosaccharide hydrolysis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 211–218, 2010. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/babt/v53n1/26.pdf>. Citado na página 26.

KORNBRUST, B. et al. Asparaginase – an enzyme for acrylamide reduction in food products. *Enzyme Food Technology*, v. 2, p. 59–87, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 37.

KOTZIA, G.; LABROU, N. Cloning, expression and characterisation of *erwinia carotovora* l-asparaginase. *Journal Biotechnol*, <http://10.1016/j.jbiotec.2005.04.016>, v. 119, p. 309–323, 2005. Citado na página 35.

KOURKOUTAS, Y.; KANELAKI, M.; KOUTINAS, A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Sciety and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.024>, p. 980–986, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 40.

KRASOTKINA, J. et al. One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from erwinia carotovora. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, <http://10.1042/BA20030138>, v. 39, p. 215–221, 2004. Citado na página 35.

KUMAR, D.; SOBHA, K. L-asparaginase from microbes: a comprehensive review. *Advances in Bioreserach*, v. 3, p. 137–157, 2010. Disponível em: <http://www.soeagra.com/abr/abrdec_2012/22.pdf>. Citado na página 38.

KUMAR, N.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. Production and optimization of l-asparaginase from cladosporium sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.023>, p. 150–158, 2013. Citado 5 vezes nas páginas 26, 33, 38, 39 e 58.

LAPMAK, K. et al. L-asparaginase production by bipolaris sp . br438 isolated from brown rice in thailand. *Science: Journal Articles*, v. 4, p. 5, 2010. Disponível em: <<http://www.thaiscience.info/journals/Article/CMJS/10905508.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 33.

LAURENTINO, C. *Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido*. São José do Rio Preto, SP, 2007. Disponível em: <http://200.145.6.238/bitstream/handle/11449/90750/laurentino_cl_me_sjrp.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Citado na página 39.

LEONAVICIUTE, G. et al. Impact of lipases on the protective effect of sedds for incorporated peptide drugs towards intestinal peptidases. *International Journal of Pharmaceutics*, <http://10.1016/j.ijpharm.2016.04.044>, v. 508, p. 102–108, 2018. Citado na página 34.

LINCOLN, L.; MORE, S. Isolation and production of clinical and food grade asparaginase enzyme from fungi. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 38, p. 1, 2014. Disponível em: <<http://www.phytojournal.com/archives/2014/vol3issue3/PartC/48.1-375.pdf>>. Citado na página 32.

MASHBURN, L.; WRISTON, J. Tumor inhibitory effect of l-asparaginase from escherichia coli. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 105, p. 450–453, 1964. Citado na página 35.

MCCOLLISTER, D.; OYEN, F.; ROWE, V. Toxicology of acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 6, p. 172–181, 1964. Citado na página 36.

MEGHAVARNAM, A.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of l-asparaginase by fusarium culmorum (asp-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.001>, p. 124–130, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 25, 33 e 58.

MENEGUETTI, G. P. *Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação*. São Paulo, SP, 2017. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 36.

MIRÓN, J. et al. Enhancement glucose oxidase production by solid-state fermentation of aspergillus niger on polyurethane foams using mussel processing wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.07.008>, p. 21–27, 2010. Citado na página 26.

MISHRA, A. Production of l-asparaginase, an anticancer agent, from aspergillus niger using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1385/ABAB:135:1:33>, v. 135, p. 33–42, 2006. Citado na página 33.

MISHRA, A. et al. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized saccharomyces cerevisiae in packed bed reactor. *Renewable Energy*, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.010>, v. 4, p. 57–63, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 59.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. [http://dx.doi.org/DOI 10.1007/3540312854](http://dx.doi.org/DOI%2010.1007/3540312854): Editora springer, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 43.

MOOLA, Z. et al. Erwinia chrysanthemi l-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochemical Journal*, v. 302, p. 921–927, 1994. Citado na página 36.

MURADO, M. et al. Amylase production by solid state culture of aspergillus oryzae on polyurethane foams. some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochemistry*, p. 35–42, 1997. Citado na página 26.

NAGARETHINAM, S. et al. Microbial l-asparaginase and its future prospects. *Asian Journal of Medical Research*, v. 1, p. 159–168, 2005. 4. Citado na página 34.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. [S.l.]: ARTMED EDITORA LTDA, 2014. v. 6. 1229 p. ISBN 9781429234146. Citado na página 31.

OLAMA et al. L-asparaginase production by pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00067-5), v. 1, p. 115–122, 2002. Citado na página 58.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 27, p. 109–117, 1992. Citado na página 38.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology, biotechnology applied chemistry. *Chemical Engineering Science*, p. 119–131, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 38.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153–1169, 2000. Citado na página 38.

PATEL, R. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00186-2), v. 31, p. 804–826, 2002. Citado na página 31.

- PATRO, K.; GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of l-asparaginase from penicillium sp. by submerged fermentation. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, v. 3, p. 30–34, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 33.
- PEDRESCHI, F. et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT - Food Science and Technology*, <http://doi:10.1016/j.lwt.2011.02.004>, v. 44, p. 1473–1476, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 37.
- PEREIRA, J. L. *PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS POR ASPERGILLUS ORYZAE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO*. BRASÍLIA, DF, 2014. Disponível em: <bdm.unb.br/handle/10483/10388>. Citado na página 26.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25489>, v. 117, p. 238–249, 2011. Citado na página 33.
- PINHEIRO, T. M. A. *PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES BIOSSURFACTANTE E L-ASPARAGINASE PELO USO DE FUNGOS*. Uberlândia, MG, 2017. Citado na página 55.
- PINTADO, J.; GONZÁLEZ, M.; MURADO, M. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of aspergillus niger on polyurethane foams. *Enzyme and Microbial Technology*, p. 149–156, 1998. Citado na página 26.
- PINTO, A. *Caracterização do secretoma de Aspergillus oryzae crescido em estado sólido de bagaço de cana*. BRASÍLIA, DF, 2012. Disponível em: <repositorio.unb.br/handle/10482/11308>. Citado na página 26.
- PIZARRO, A.; PARK, E. Lipasecatalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activatedbleaching earth. *Process Biochemistry*, [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00241-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00241-8), v. 38, p. 1077–1082, 2003. Citado na página 31.
- PRADHAN, D.; PADHY, S.; SAHOO, B. Enzyme classification using multiclass support vector machine and feature subset selection. *Computational Biology and Chemistry*, <http://10.1016/j.compbiolchem.2017.08.009>, v. 70, p. 211–219, 2017. Citado na página 31.
- QUINTAS, M.; BRANDAO, T.; SILVA, C. Modelling autocatalytic behaviour of a food model system – sucrose thermal degradation at high concentrations. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 537–545, 2007. 2. Citado na página 37.
- QURESHI, A. et al. Coproduction of protease and amylase by thermophilic bacillus sp. bbxs-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <http://10.1016/j.bcab.2016.09.006>, v. 2, p. 146–151, 2016. Citado na página 59.
- RANI, R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, <http://10.1016/j.bej.2008.10.019>, v. 44, p. 13–18, 2009. Citado na página 39.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 197–203, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 42.
- RODRÍGUEZ, G. G. et al. Do immunoglobulin g and immunoglobulin e anti-l-asparaginase antibodies have distinct implications in children with acute lymphoblastic leukemia? a cross-sectional study. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*, <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.11.006>, p. 202–209, 2017. Citado na página 27.

- SAEED, H. et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant aspergillus terreus l-asparaginase in escherichia coli. *Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.110>, 2017. Citado na página 26.
- SALHANI, N.; UELKER-DEFFUR, A. Improved quantification of aggregated bacteria by combined enzymatic and mechanical treatment of flocs and biofilm from a rotating drum bioreactor. *Printed in Great Britain*, v. 32, p. 1287–1295, 1998. Citado na página 42.
- SAW, L. H. et al. Sensitivity analysis of drill wear and optimization using adaptive neuro fuzzy–genetic algorithm technique toward sustainable machining. *Journal of Cleaner Production*, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.303>, v. 30, p. 1–10, 2017. Citado na página 56.
- SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 100, p. 1–10, 2016. Disponível em: <[http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(15\)00003-7/pdf](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(15)00003-7/pdf)>. Citado na página 35.
- SILVA, C. J. A. da; MALTA, D. J. do N. A importância dos fungos na biotecnologia. *Ciências biológicas e da saúde*, v. 2, p. 1980–1769, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.set.edu.br/index.php/facipesaude/article/pdf>>. Citado na página 29.
- SOARES, M. S. *Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel*. Lorena, SP, 2012. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses>. Citado na página 39.
- SOCCOL, C. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>, v. 8, p. 1–20, 2017. Citado na página 60.
- SOLER, M. F. D. C. R. *Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras*. Lorena, SP, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses>. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 36.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in soli-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, p. 146–161, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 60 e 61.
- TORTORA, G.; CASE, C.; FUNKE, B. *Microbiologia*. 8. ed. [S.L.]: Editora Atheneu, 2012. v. 3. Citado na página 30.
- VALA, A. K. et al. Characterization of l-asparaginase from marine-derived aspergillus niger akv-mkbu, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 41–46, 2018. Citado na página 33.
- VINCI, S. et al. Genetic variants in mir-146a, mir-149, mir-196a2, mir-499 and their influence on relative expression in lung cancers. *Clinical Biochemistry*, <http://10.1515/CCLM.2011.708>, p. 2073–2080, 2011. Citado na página 26.
- VOLK, T. *Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00062-9>: Reference Module in Life Sciences Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition), 2013. v. 3. 624–640 p. Citado na página 29.

- VÁZQUEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; MURADO, M. Substrate inhibition of *pediococcus acidilactici* by glucose on a waste medium. simulations and experimental results. *Letters in Applied Microbiology*, p. 365–369, 2003. Citado na página 26.
- WINK, P. L. *PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTILEUCÊMICA L-ASPARAGINASE II A PARTIR DA CLONAGEM DO GENE ErA DE ERWINIA CAROTOVORA SUPSP. ATROSEPTICA EM ESCHERICHIA COLI*. Porto Alegre, RS, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/4409>>. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.
- WU, F. et al. L-asparaginase-induced severe acute pancreatitis in an adult with extranodal natural killer/t-cell lymphoma, nasal type: A case report and review of the literature. *Oncology Letters*, <http://10.3892/ol.2014.1871>, p. 1305–1307, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 36.
- ZECK, S. *Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB*. Curitiba, PR, 2004. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses>. Citado na página 39.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, <http://10.1016/j.ces.2017.02.039>, p. 65–73, 2017. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.
- ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, v. 10, p. 123–137, 2009. Disponível em: <www.liberato.com.br>. Citado na página 34.
- ZYZAK, D. V. et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, <http://10.1021/jf034180i>, v. 51, p. 4782–4787, 2003. 16. Citado na página 37.