



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



William Fernando Vieira

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE FÚNGICA EM  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
REATORES COM TECNOLOGIA DE MATERIAIS POLIMÉRICOS**

Uberlândia - MG  
Fevereiro de 2022





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



William Fernando Vieira

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE FÚNGICA EM  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO  
REATORES COM TECNOLOGIA DE MATERIAIS POLIMÉRICOS**

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

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho

Uberlândia - MG

Fevereiro de 2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

---

V658 Vieira, William Fernando, 1988  
2022 PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE FÚNGICA EM FERMENTAÇÃO EM ES-  
TADO SÓLIDO UTILIZANDO REATORES COM TECNOLOGIA DE MATERIAIS  
POLIMÉRICOS/ William Fernando Vieira. – 2022 .

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.115>

Inclui bibliografia.

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

---

CDU: 66.0

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto – CRB6/2091



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química  
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

|                                    |  |                 |       |                       |       |
|------------------------------------|--|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em:      | Engenharia Química   |                 |       |                       |       |
| Defesa de:                         | Tese de Doutorado, 01/2022, PPGEQ  |                 |       |                       |       |
| Data:                              | 23 de fevereiro de 2022  | Hora de início: | 09:00 | Hora de encerramento: | 12:10 |
| Matrícula do Discente:             | 11813EQU013  |                 |       |                       |       |
| Nome do Discente:                  | William Fernando Vieira  |                 |       |                       |       |
| Título do Trabalho:                | Produção de L-asparaginase fúngica em fermentação em estado sólido utilizando reatores com tecnologia de materiais poliméricos |                 |       |                       |       |
| Área de concentração:              | Desenvolvimento de Processos Químicos  |                 |       |                       |       |
| Linha de pesquisa:                 | Engenharia Bioquímica  |                 |       |                       |       |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais     |                 |       |                       |       |

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM; Nádia Guimarães Sousa - ICTE/UFTM; Miriam Maria de Resende - PPGEQ/UFU; Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU e Ubirajara Coutinho Filho - PPGEQ/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miriam Maria de Resende, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Diego Andrade Lemos, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Nádia Guimarães Sousa, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Coutinho Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3390800** e o código CRC **1B17C883**.

---



*Dedico este trabalho a Deus, a minha amada esposa Kellen Cristina companheira incondicional e fonte de segurança e amor em todos os momentos das nossas vidas juntos, a minha linda filha recém nascida Júlia, que preenche meu coração de amor e esperança, aos meus pais 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 (in memoriam), pelo exemplo de vida e boa conduta.*



# 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 da tese.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela parceria no projeto de pesquisa.

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

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 esposa 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.

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

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 enzima L-asparaginase é de fundamental importância na produção de medicamentos usados no tratamento de cânceres e doenças hematopoéticas, além disso é muito útil na indústria alimentícia no controle de acrilamida em alimentos processados em altas temperaturas. Grande parte da L-asparaginase produzida ainda é por fonte bacteriana em processo fermentativo submerso (FS), entretanto o uso de fungos capazes de produzir L-asparaginase em fermentação em estado sólido (FES) ganha mais atenção, juntamente ao desenvolvimento de novos biorreatores de FES capazes de produzir L-asparaginase fúngica por longos períodos de operação. Devido à importância da enzima L-asparaginase e a escassez de trabalhos descrevendo novos biorreatores de FES na produção contínua de L-asparaginase fúngica, dois novos biorreatores de FES capazes de produzir L-asparaginase continuamente foram investigados: o reator mult-fase com imobilização celular (MRIC) e reator modular com tecnologia polimérica (MRPT). Referente ao MRIC, o reator foi otimizado considerando as variáveis temperatura, pH e concentrações de glicose e L-asparagina, tempo de residência e tempo de fermentação usando um modelo de rede neural artificial (RNA) associado ao modelo de algoritmo genético (GA), sendo proposto em seguida um sistema de múltiplos reatores (MRICs) para produzir L-asparaginase por *Penicillium sp.* LAMAI 505, *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.* em FES operando continuamente. O sistema MRICs foi otimizado considerando os efeitos do número de reatores associados, composição de nutrientes, tempo de residência, reciclagem de nutrientes e ciclos de extração usando RNA e GA. O modelo de RNA foi satisfatório ( $R^2 > 0,85$  com erro menor que 2,4 %) e os MRICs tiveram bom desempenho quando comparados à literatura. A máxima atividade da L-asparaginase alcançada foi de 13,7 U/g em condições otimizadas que incluíram um tempo de residência de 33,5 min, pH de 5,1 e concentrações de L-asparagina e glicose de 1,2 e 3,0 g/L, respectivamente. Além disso, demonstramos que os MRICs são eficazes com outros fungos e podem ser usados para outros produtos derivados de microrganismos. Referente ao MRPT foi desenvolvido um novo reator para a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 capaz de operar em processo batelada e contínuo por longos períodos de operação. Os dados obtidos no reator MRPT foram ajustados e otimizados com RNA e o método de evolução diferencial (DE) obtendo um rendimento de L-asparaginase de 19,36 U/g e 6,78 U/g.h em condições otimizadas de operação contínua a 25 °C, 5,27 g/L de L-asparagina, 5,34 g/L de glicose e pH de 6,03. Além disso, demonstramos que o MRPT é capaz de atingir o rendimento de L-asparaginase para operação por longos períodos (mais de 1000 h). Os resultados indicam que a produção de L-asparaginase por FES usando os dois novos biorreatores é satisfatório quando comparado com a produção encontrada na literatura, o que sugere que os novos reatores são capazes de produzir L-asparaginase fúngica em FES batelada e operando continuamente.

**Palavras-chave:** L-asparaginase, fermentação em estado sólido, tecnologia polimérica.

# Abstract

The L-asparaginase enzyme is of fundamental importance in the production of drugs used in the treatment of cancers and hematopoietic diseases, in addition it is very useful in food industry in the control of acrylamide in foods processed at high temperatures. Much of the L-asparaginase produced is still from a bacterial source in process submerged fermentation (SmF), however the use of fungi capable of producing L-asparaginase in solid state fermentation (SSF) gains more attention, along with development of new SSF bioreactors capable of producing fungal L-asparaginase for long periods of operation. Due to the importance of the L-asparaginase enzyme and the scarcity of papers describing new SSF bioreactors in the continuous production of fungal L-asparaginase, two new SSF bioreactors capable of continuously producing L-asparaginase have been investigated: the multi-phase reactor with cell immobilization (MRIC) and modular reactor with technology polymeric (MRPT). Regarding the MRIC, the reactor was optimized considering the variables temperature, pH and concentrations of glucose and L-asparagine, residence time and time of fermentation using an artificial neural network (ANN) model associated with the model of genetic algorithm (GA), being proposed a system of multiple reactors (MRICs) for produce L-asparaginase by *Penicillium sp.* LAMAI 505, *Aspergillus sp.* and *Fusarium sp.* in SSF for long periods of operation. The MRICs system has been optimized considering the effects of number of associated reactors, nutrient composition, residence time, recycling of nutrients and extraction cycles using ANN and GA. The ANN model was satisfactory ( $R^2 > 0.85$  with error less than 2.4%) and the MRICs performed well when compared the literature. The maximum L-asparaginase activity achieved was 13.7 U/g under conditions optimized which included a residence time of 33.5 min, pH of 5.1 and concentrations of L-asparagine and glucose 1.2 and 3.0 g/L, respectively. In addition, we demonstrate that the MRICs are effective with other fungi and can be used for other products. Referent to MRPT was developed a new reactor for the production of L-asparaginase from *Penicillium sp.* LAMAI 505 capable of operating in batch and continuous process for long periods of operation. The data obtained in the MRPT reactor were adjusted and optimized with ANN and the differential evolution method (DE) obtaining an L-asparaginase yield of 19.36 U/g and 6.78 U/g.h under optimized conditions of continuous operation at 25 °C, 5.27 g/L of L-asparagine, 5.34 g/L of glucose and pH 6.03. In addition, we have demonstrated that the MRPT is capable of achieving the L-asparaginase yield for long-term operation (more than 1000 h). The results indicate that the production of L-asparaginase by SSF using the two new bioreactors is satisfactory when compared to the production found in the literature, which suggests that the new reactors are capable of producing fungal L-asparaginase in batch SSF and operating continuously.

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



# Lista de ilustrações

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Representação dos fungos filamentosos . . . . .  | 31 |
| Figura 2 – Cultivo de <i>Penicillium sp.</i> LAMAI 505 . . . . .  | 33 |
| Figura 3 – Exemplo do gênero <i>Fusarium</i> . . . . .  | 34 |
| Figura 4 – Exemplo do gênero <i>Aspergillus</i> . . . . .   | 35 |
| Figura 5 – Conversão de L-asparagina em L-aspartico e amônia . . . . .  | 35 |
| Figura 6 – Representação esquemática da LLA no plasma sanguíneo de crianças e adolescentes. . . . .   | 37 |
| Figura 7 – Exemplos esquemáticos de biorreatores usados em fermentação estado sólido . . . . .  | 45 |
| Figura 8 – Biorreator estático do tipo leito empacotado. . . . .  | 46 |
| Figura 9 – Biorreator do tipo leito de jorro. . . . .   | 47 |
| Figura 10 – Biorreator do tipo leito fluidizado. . . . .  | 47 |
| Figura 11 – Estrutura química do poliuretano . . . . .  | 51 |
| Figura 12 – Representação esquemática do modelo de redes neurais artificiais (RNA) . . . . .  | 53 |
| Figura 13 – Fluxograma esquemático do modelo de otimização de algoritmo genético (GA) . . . . .   | 56 |
| Figura 14 – Fluxograma esquemático do método de otimização por evolução diferencial (DE) . . . . .  | 57 |
| Figura 15 – Representação esquemática do ajuste de concentração de fungo na FES . . . . .   | 60 |
| Figura 16 – Imagem da unidade experimental, desenho esquemático e caracterização do novo reator MRIC . . . . .  | 61 |
| Figura 17 – Diferentes modos de operação são descritos a seguir: a) reciclagem de nutrientes, b) retirada intermitente de produto e c) adição intermitente de nutrientes. . . . . | 63 |
| Figura 18 – Fluxograma utilizado na modelagem e otimização de sistemas de fermentação em estado sólido (FES) com suporte sólido inerte constituído de poliuretano. . . . .        | 66 |
| Figura 19 – Ajuste da RNA obtido para a produção de L-asparaginase em FES usando MRIC. . . . .  | 70 |
| Figura 20 – Influência da temperatura em FES com suporte sólido de espuma de poliuretano usando novo biorreator com reciclagem de solução nutritiva. . . . .                      | 70 |
| Figura 21 – Atividade da L-asparaginase em múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs) submetidos à reciclagem do meio nutriente por 48 h. . . . .                        | 71 |
| Figura 22 – Diagrama esquemático RNA e resultados experimentais e calculados para o MRICs (R <sub>1</sub> a R <sub>4</sub> ). . . . .   | 74 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 23 – Produção de L-asparaginase em sistemas MRICs com diferentes formas de extração do produto. . . . .   | 76  |
| Figura 24 – Produção de L-asparaginase por fungos em sistemas de fermentação em estado sólido (FES) com MRICs otimizados (24 h por ciclo). . . . .   | 78  |
| Figura 25 – Imagens da unidade experimental de produção de L-asparaginase em fermentação em estado sólido . . . . .  | 83  |
| Figura 26 – Sistema inovador de produção de L-asparaginase em operação contínua FES usando uma sistema de reatores modulares com tecnologia polimérica (MRPTs) trabalhando em modo paralelo. . . . . | 84  |
| Figura 27 – Dimensões e características do novo reator modular com tecnologia polimérica . . . . .   | 85  |
| Figura 28 – Fluxograma do processo de produção de espuma de poliuretano . . . . .  | 86  |
| Figura 29 – Regiões selecionadas para as análises de crescimento celular e atividade de L-asparaginase . . . . .   | 92  |
| Figura 30 – Resultados iniciais da L-asparaginase na fermentação em estado sólido usando doze amostras diferentes de espuma de poliuretano. . . . .  | 95  |
| Figura 31 – Infravermelho das amostras de espuma de poliuretano . . . . .  | 96  |
| Figura 32 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de espuma de poliuretano produzidas e comercial . . . . .  | 97  |
| Figura 33 – Diferentes configurações do reator MRPT . . . . .  | 98  |
| Figura 34 – Ajuste dos dados experimentais na otimização do pH e meio nutritivo da FES100  |     |
| Figura 35 – Análise de pH e concentração de glicose na produção de L- asparaginase .   | 101 |
| Figura 36 – Análise de pH e concentração de L-asparagina na produção de L- asparaginase . . . . .  | 102 |
| Figura 37 – Análise da concentração de L-asparagina e glicose na produção de L- asparaginase . . . . .   | 102 |
| Figura 38 – Ajuste dos dados experimentais na otimização da dimensões características da matriz polimérica do MRPT . . . . .   | 104 |
| Figura 39 – Efeito das variáveis diâmetro (D) e comprimento (L) da matriz polimérica usada no MRPT para a produção de L-asparaginase . . . . .   | 105 |
| Figura 40 – Efeito das variáveis diâmetro da matriz polimérica (D) e volume de liquido nutritivo (V) no MRPT para a produção de L-asparaginase . . . . .   | 106 |
| Figura 41 – Efeito das variáveis Comprimento da matriz polimérica (C) e volume de liquido nutritivo (V) no RMTP para a produção de L-asparaginase . . . . .  | 106 |
| Figura 42 – Efeito das variáveis comprimento da matriz polimérica (L) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase . . . . .                                       | 107 |
| Figura 43 – Efeito das variáveis volume de liquido nutritivo (V) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase . . . . .  | 107 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 44 – Efeito das variáveis diâmetro da matriz polimérica (D) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase . . . . .   | 108 |
| Figura 45 – Regiões selecionadas para análise da atividade da L-asparaginase na direção axial (D <sub>1</sub> a D <sub>6</sub> ) e na direção do comprimento (L <sub>1</sub> a L <sub>6</sub> ) . . . . . | 109 |
| Figura 46 – Início do processo contínuo de produção de L-asparaginase em FES com MRPT . . . . .   | 110 |
| Figura 47 – Análise do reator RMTP em 900 h de FES com vazão constante . . . . .  | 111 |
| Figura 48 – Interferência da vazão de saída e entrada de líquido na produção contínua de L-asparaginase em FES . . . . .  | 112 |



# Lista de tabelas

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1  | – Exemplos de fungos usados na produção enzimática e pequenas moléculas   | 32 |
| Tabela 2  | – Lista de diferentes fontes microbianas de L-asparaginase. . . . .   | 36 |
| Tabela 3  | – Produção de L-asparaginase usando diferentes substratos e microrganismos  | 41 |
| Tabela 4  | – Diferentes biorreatores, substratos e microrganismos usados em fermentação estado sólido . . . . .  | 44 |
| Tabela 5  | – Vantagens e desvantagens de possíveis materiais para construção de reatores   | 49 |
| Tabela 6  | – Aplicações da espuma de poliuretano como matriz de suporte inerte em fermentações em estado sólido . . . . .  | 49 |
| Tabela 7  | – Componentes dos poliuretanos e razões para sua inclusão . . . . .   | 52 |
| Tabela 8  | – Exemplos de aplicação do método de modelagem e otimização por redes neurais artificiais. . . . .  | 54 |
| Tabela 9  | – Produção de L-asparaginase em FES realizados usando o reator MRIC . . .   | 62 |
| Tabela 10 | – Variáveis e intervalo experimental usados para estudar a fermentação da L-asparaginase em um sistema de múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs). . . . .                          | 65 |
| Tabela 11 | – Oito estratégias diferentes para operação de múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs) utilizando quatro reatores (o número ideal de reatores foi selecionado previamente). . . . . | 67 |
| Tabela 12 | – Resultados da FES usando MRIC na produção de L-asparaginase . . . . .   | 69 |
| Tabela 13 | – Meio nutritivo e condições operacionais utilizadas para otimização do número de reatores em MRICs. . . . .  | 71 |
| Tabela 14 | – Resultados experimentais e artificiais da rede neural (RNA) para quatro reatores MRICs usando espuma de poliuretano a 40 ° C. . . . .   | 73 |
| Tabela 15 | – Produção otimizada de L-asparaginase em fermentação em estado sólido (FES) usando sistemas de reatores múltiplos com células imobilizadas (MRICs). . . . .                                    | 75 |
| Tabela 16 | – Material e formulações iniciais usadas na produção de espuma de poliuretano   | 87 |
| Tabela 17 | – Análise inicial de diferentes reatores MRPT na produção de L-asparaginase em FES batelada a 25°C . . . . .  | 89 |
| Tabela 18 | – Efeito do pH e composição de nutrientes na produção de L-asparaginase .   | 89 |
| Tabela 19 | – Efeitos associados as dimensões do reator modular com tecnologia polimérica . . . . .   | 90 |
| Tabela 20 | – Efeito da taxa de fluxo em MRPT em operação constante de rendimento de L-asparaginase para fermentações a 25 ° C usando condições nutritivas otimizadas . . . . .                             | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 21 – Resultados de atividade de L-asparaginase e propriedades físico-químicas usando F <sub>1</sub> a F <sub>12</sub> em FES a 25°C. . . . . | 94  |
| Tabela 22 – Resultados experimentais e calculados de L-asparaginase em FES com MRPT100  |     |
| Tabela 23 – Resultados experimentais e calculados de L-asparaginase associados as dimensões da matriz polimérica do MRPT . . . . .                  | 103 |

# Lista de abreviaturas e siglas

|         |   |
|---------|---|
| GA      | Algoritmo Genético                                      |
| DE      | Evolução diferencial                                    |
| CRM     | Centro de Recurso Microbianos                           |
| EC      | <i>Enzime Commission</i>                                |
| FES     | Fermentação Estado Sólido                               |
| FS      | Fermentação Submersa                                    |
| FioCruz | Fundação Oswaldo Cruz                                   |
| LAMAI   | Código de armazenamento no CRM                          |
| LLA     | Leucemia Linfoblástica Aguda                            |
| MEV     | Microscópio Eletrônico de Varredura                     |
| RMSE    | Root Mean Square Error                                  |
| RNA     | Rede Neural Artificial                                  |
| UNESP   | Universidade Estadual Paulista                          |
| MRIC    | Multi-fase reator com imobilização celular              |
| MRPT    | Modular reator com tecnologia polimérica                |
| MRICs   | Sistema de múltiplos reatores com imobilização celular  |
| MRPTs   | Sistema de reatores modulares com tecnologia polimérica |
| PU      | Espuma de poliuretano                                   |
| ASN     | Concentração de L-asparagina                            |
| Glic    | Concentração de glicose                                 |
| RT      | Tempo de residência                                     |
| TC      | Tempo entre os ciclos de fermentação                    |
| GO      | Saída de gás  |
| GE      | Região gasosa do reator                                 |

|        |  |
|--------|--|
| SS     | Suporte sólido inerte de poliuretano               |
| RS     | Solução de reciclo                                 |
| I      | Entrada de solução nutritiva                       |
| W      | Retirada parcial de produto do reator              |
| NW     | Sem retirada parcial de produto do reator          |
| CC     | Concentração celular                               |
| Obs    | Valor de atividade de L-asparaginase observado     |
| Calc   | Valor de atividade de L-asparaginase calculado     |
| E      | Error relativo                                     |
| TD     | Tipo de dado                                       |
| C      | Critérios adotados na otimização de L-asparaginase |
| PVC    | Plástico de policloreto de vinil                   |
| PCH    | Suporte polimérico de células                      |
| PLH    | Suporte de PVC para a fase líquido do reator       |
| SAR    | Suporte para anexar o reator                       |
| O      | Saída de líquido do reator                         |
| D      | Diâmetro   |
| L      | Comprimento  |
| TF     | Tempo de fermentação                               |
| Q      | Vazão de reciclo de meio nutritivo                 |
| MDI    | Difenilmetano diisocianato                         |
| NA     | Não apresenta os dados                             |
| G      | Grau de inchaço da matriz polimérica               |
| ASNase | Valor de atividade de L-asparaginase               |
| Dp     | Diâmetro de poro da espuma de poliuretano          |
| DA     | Densidade aparente da matriz polimérica            |
| A      | Absorção de água pela matriz polimérica            |

# Lista de símbolos

|                 |  |
|-----------------|--|
| $\mu$           | Micro ou $10^{-6}$ unidade de medida                       |
| $\Lambda$       | Atividade de L-asparaginase                                |
| $\delta$        | Leitura de Absorbância                                     |
| $\theta$        | 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 |
| $R_n$           | Reatores (n = 1 até 5)                                     |
| $P_n$           | Bombas (n = 1 até 4)                                       |
| $T_n$           | Tanques (n = 1 até 2)                                      |
| $V_n$           | Válvulas (n = 1 até 3)                                     |
| $M_u$           | Massa úmida da matriz polimérica                           |
| $M_s$           | Massa seca da matriz polimérica                            |
| $M_i$           | Massa matriz polimérica imersa em água                     |
| $W_1$           | Peso matriz polimérica conhecido                           |
| $W_2$           | Peso matriz polimérica depois do tempo de espera           |



# Sumário

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO . . . . .  | 27 |
| 1.1   | Justificativa . . . . .   | 28 |
| 1.2   | Objetivos . . . . .   | 28 |
| 2     | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA . . . . .   | 31 |
| 2.1   | Fungos . . . . .  | 31 |
| 2.1.1 | Penicillium . . . . .   | 33 |
| 2.1.2 | Fusarium . . . . .  | 34 |
| 2.1.3 | Aspergillus . . . . .   | 34 |
| 2.2   | L-asparaginase . . . . .  | 35 |
| 2.2.1 | Aplicação farmacêutica da L-asparaginase . . . . .  | 37 |
| 2.2.2 | Aplicação da L-asparaginase na indústria de alimentos . . . . .   | 39 |
| 2.3   | Produção enzimática por processos fermentativos . . . . .   | 39 |
| 2.4   | Biorreatores destinados a FES . . . . .   | 43 |
| 2.5   | Materiais poliméricos na confecção de suportes e reatores . . . . .   | 48 |
| 2.5.1 | Espuma de poliuretano como material de confecção de reatores . . . . .  | 50 |
| 2.6   | Modelagem e otimização de reatores biológicos por RNA associadas a métodos de inteligência de enxame . . . . .            | 53 |
| 3     | REATOR MULT-FASE COM IMOBILIZAÇÃO CELULAR . . . . .   | 59 |
| 3.1   | Introdução . . . . .  | 59 |
| 3.2   | Microrganismo . . . . .   | 60 |
| 3.3   | MRIC . . . . .  | 61 |
| 3.3.1 | Fermentações usando o MRIC em FES . . . . .   | 61 |
| 3.4   | Sistema com múltiplos reatores (MRICs) . . . . .  | 63 |
| 3.4.1 | Otimização do número de reatores no sistema MRICs . . . . .   | 64 |
| 3.4.2 | Otimização das condições operacionais e composição de nutrientes em MRICs . . . . .                                       | 64 |
| 3.4.3 | Estratégias de otimização para extração de L-asparaginase e adição de nutrientes . . . . .                                | 66 |
| 3.4.4 | Avaliação de sistemas MRICs sob diferentes condições de produção . . . . .  | 67 |
| 3.5   | Método analítico de determinação de L-asparaginase . . . . .  | 67 |
| 3.6   | Resultados . . . . .  | 68 |
| 3.6.1 | Otimização da produção de L-asparaginase no MRIC . . . . .  | 68 |
| 3.6.2 | Otimização do número de reatores do sistema MRICs e descrição da produção de L-asparaginase com MRICs otimizado . . . . . | 71 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 3.6.3  | Otimização da produção de L-asparaginase . . . . .  | 75  |
| 3.6.4  | Seleção das estratégias de produção de L-asparaginase em FES contínua com MRICs . . . . .                 | 76  |
| 3.6.5  | Produção de L-asparaginase fúngica em FES ao longo de vários ciclos . .                                   | 77  |
| 3.7    | Discussão . . . . .   | 78  |
| 3.8    | Conclusão . . . . .   | 80  |
| 4      | REATOR MODULAR COM TECNOLOGIA POLIMÉRICA (MRPT) .   | 81  |
| 4.1    | Introdução . . . . .  | 81  |
| 4.2    | Microrganismo . . . . .   | 82  |
| 4.3    | MRPT . . . . .  | 83  |
| 4.4    | Produção de espuma de poliuretano . . . . .   | 86  |
| 4.4.1  | Caracterização da espuma de poliuretano . . . . .   | 87  |
| 4.5    | Avaliação da matriz polimérica do MRPT . . . . .  | 88  |
| 4.6    | Otimização do meio nutritivo e valores de pH . . . . .  | 89  |
| 4.7    | Otimização das condições operacionais do MRPT . . . . .   | 90  |
| 4.8    | Otimização da produção de L-asparaginase em MRPT . . . . .  | 91  |
| 4.9    | Avaliação do crescimento de células e atividade de L-asparaginase ao longo na matriz polimérica . . . . . | 91  |
| 4.10   | Otimização da taxa de fluxo e avaliação das condições de operação de longo prazo do MPPT . . . . .        | 92  |
| 4.11   | Método analítico de determinação de L-asparaginase . . . . .  | 93  |
| 4.12   | Resultados e discussão . . . . .  | 93  |
| 4.12.1 | Características e aplicação das espumas de poliuretano produzidas . . .                                   | 93  |
| 4.12.2 | Otimização da concentração de nutriente e pH . . . . .  | 98  |
| 4.12.3 | Otimização das dimensões da matriz polimérica usada no MRPT . . . .                                       | 103 |
| 4.12.4 | Validação da atividade de L-asparaginase otimizada em MRPT . . . . .                                      | 109 |
| 4.12.5 | Operação contínua do MRPT . . . . .   | 110 |
| 4.13   | Conclusão . . . . .   | 112 |
| 5      | CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS . . .   | 113 |
| 5.1    | Conclusão . . . . .   | 113 |
| 5.2    | Sugestões para Trabalhos Futuros . . . . .  | 113 |
|        | REFERÊNCIAS . . . . .   | 115 |

# 1 Introdução

A L-asparaginase (L-asparagina amido-hidrolase EC 3.5.1.1) é uma enzima de destaque, pois se caracteriza como peça chave em aplicações farmacêuticas e alimentares (CUNHA et al., 2018; SHIROMIZU et al., 2018; LYNGGAARD et al., 2021). Esta enzima pertencente ao grupo amidase, que catalisa a hidrólise do amino ácido L -asparagina a L -aspártico e amoníaco (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012; NORONKOSKI et al., 1997; BRIGITHA; PIETERS; van der Sluis, 2021).

Atualmente, a L-asparaginase é amplamente utilizada como agente terapêutico para o tratamento da leucemia linfocítica aguda (LLA) (principalmente em crianças e adolescentes), doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, tratamento com linfossarcoma e sarcoma melano (LI et al., 2014; BRIGITHA; PIETERS; van der Sluis, 2021; LYNGGAARD et al., 2021). Além disso, a L-asparaginase também tem aplicações significativas na indústria de alimentos para reduzir a formação de acrilamidas cancerígenas na batata frita (QESHMI et al., 2018; ABEDI; POURMOHAMMADI; SAYADI, 2022; CHI et al., 2021).

As L-asparaginases são encontradas em plantas, animais e microrganismos, sendo que a fonte mais importante de L-asparaginase são os microrganismos (BRUMANO et al., 2019). Embora atualmente a maior parte da produção comercial de L-asparaginase é realizada usando *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* em fermentação submersa (FS), a L-asparaginase de fonte de fungos ganhou muita atenção por ser considerada uma enzima segura devido à sua estabilidade, alta produtividade e fáceis condições culturais (CACHUMBA et al., 2016; SHAKAMBARI; ASHOKKUMAR; VARALAKSHMI, 2019; CUNHA et al., 2019; FREITAS et al., 2021).

Diante das ótimas características apresentadas pela L-asparaginase fúngica, do interesse no aumento da produção de L-asparaginase por fungos e a alta demanda de L-asparaginase comercial, há necessidade de novas técnicas de produção de L-asparaginase para aumentar o rendimento e a qualidade do produto L-asparaginase (EL-NAGGAR et al., 2018; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017; EL-GENDY et al., 2021a). Desta forma, a fermentação em estado sólido (FES), ganhou muito interesse nos últimos anos e emergiu como um processo econômico e alternativo para a produção de enzimas, utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais como substratos que são convertidos em produtos de alto valor comercial (ALAM et al., 2018; DIAS et al., 2016).

Além disso, a FES possui mais vantagens do que a FS utilizada industrialmente, como menor custo de produção com melhores propriedades fisiológicas, menor volume do reator e meios de fermentação mais baratos, maior taxa de produção e e facilitação na etapa de purificação (ACHAPPA, 2019; PARMAR et al., 2019; SOCCOL et al., 2017). A FES é um pro-

cesso importante na produção de alimentos fermentados e enriquecidos, além de produtos metabólitos de alto valor, como antibióticos, biopesticidas, aromas, hormônios e enzimas (LIZARDI-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017). Devido o aumento na produção de biomoléculas em FES, há importantes insumos de pesquisa, eventualmente ajudando nas melhores estratégias de projeto, operação e expansão em biorreatores relacionados ao processo de FES (ALLAN; De Bank; ELLIS, 2019; ARORA; RANI; GHOSH, 2018; KRISHANIA et al., 2017).

Apesar dos avanços relacionados ao desenvolvimento de biorreatores utilizados em processo de FES, o maior obstáculo à industrialização do processo FES é a falta de soluções simples, eficientes e facilmente escaláveis dos biorreatores, resolvendo com êxito o acúmulo de calor, a heterogeneidade (calor e massa) e ao mesmo tempo operar com a máxima esterilidade em regime de batelada ou continuamente (FUJITA et al., 2000). No entanto, nos últimos anos, houve relatos de poucos sistemas de biorreatores que superaram esses desafios pelo menos parcialmente para uma aplicação específica na produção de L-asparaginase fúngica, ainda existe um vasto escopo de aprimoramento para abordar e um amplo espectro de aplicações biotecnológicas (SPIER et al., 2011).

## 1.1 Justificativa

Dois aspectos de destaque no desenvolvimento de biorreatores de FES para a produção de L-asparaginase fúngica e pouco explorado na literatura a possibilidade de operação contínua por longos períodos e o uso de materiais poliméricos de baixo custo, o que justifica a construção deste trabalho. Neste contexto o uso tecnologia polimérica na construção de novos reatores biológicos é promissora pois os polímeros pode ser moldados a baixas temperaturas, tem a capacidade de reter células, facilidade manipulação e uso, além do baixo custo. Portanto, o presente trabalho é proposto, avaliado e otimizado de dois novos biorreatores usando material polimérico na construção e aplicação visando a produção contínua de L-asparaginase.

## 1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi produzir L-asparaginase fúngica em fermentação em estado sólido (FES) utilizando glicose e L-asparagina como fontes principais de carbono e espuma de poliuretano (PU) como suporte inerte capaz de imobilizar células. Para tanto, dois novos reatores biológicos para FES foram propostos e construídos utilizando materiais poliméricos buscando o maior rendimento de L-asparaginase, o reator mult-fase com imobilização de células (MRIC) e o reator modular com tecnologia polimérica (MRPT).

Os objetivos específicos considerando os dois novos biorreatores MRIC e MRPT foram

destacados abaixo:

- Avaliar os efeitos das variáveis concentração de L-asparagina, concentração de glicose, valores de pH, temperatura, tempo de residência, tempo de fermentação, vazão de reciclo de nutrientes e vazão de produto;
- Avaliar a influência dos ciclos de fermentação batelada no rendimento de L-asparaginase em cada reator;
- Obter os modelo experimentais usando redes neurais artificiais (RNA);
- Obter as condições otimizadas para cada reator biológico usando os modelos de otimização de algoritmo genético (GA) e evolução diferencial (DE) aplicados ao modelo de RNA obtido;
- Validar experimentalmente os valores ótimos de L-asparaginase obtidos pelos modelos RNA associados as variáveis otimizadas;
- Estudar as condições otimizadas de produção de L-asparaginase em processo de FES contínuo.



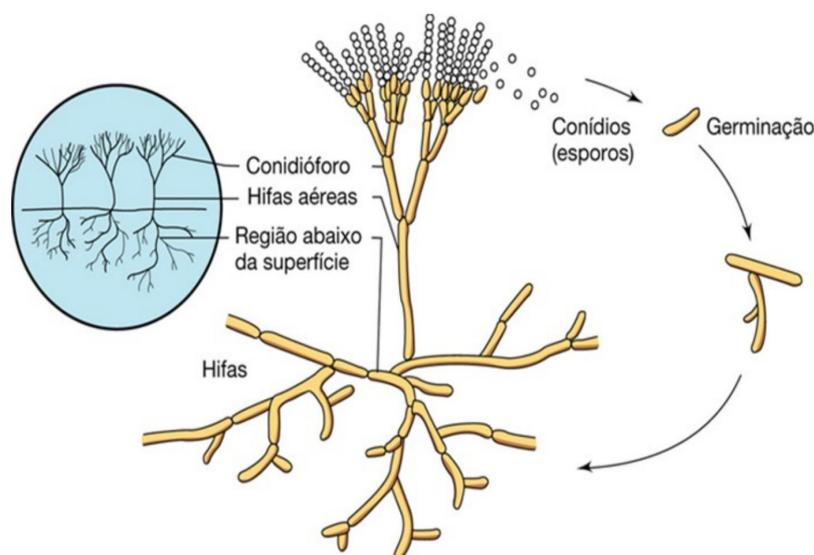
## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Fungos

Os fungos certamente desempenham um papel substancial como fontes de novos produtos farmacêuticos, alimentares, têxteis, agroquímicos, produtos naturais ou mesmo como plataformas para gerar novos compostos por meio da biologia sintética (ALBERTI; FOSTER; BAILEY, 2017; VONGSANGNAK; NIELSEN, 2013). Além disso, esses organismos atuam como recicladores de matéria orgânica e com uma estimativa de mais de 1 milhão de espécies diferentes, os fungos representam um reino extremamente diverso morfológica, fisiologicamente e ecologicamente (CHROUMPI; MÄKELÄ; VRIES, 2020; WÖSTEN, 2019). O reino dos fungos é composto de organismos eucarióticos diferenciados por paredes celulares quitinosas sendo classificados em quitridiomicetos (Filo Chytridiomycota), zigomicetos (Filo Zygomycota), ascomicetos (Filo Ascomycota), basidiomicetos (Filo Basidiomycota) e deuteromicetos (Filo Deuteromycota).

Um tipo distinto de fungos, os fungos filamentosos, são distinguidos por um micélio composto de hifas septadas, ou filamentos ramificados que são divididos em seções distintas (TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020), como mostra o esquema na Figura 1. Além disso, os fungos filamentosos são caracterizados por uma alta capacidade de produção de enzimas extracelulares e ácidos orgânicos, dentre outros produtos importantes comercialmente, como ilustra a Tabela 1.

Figura 1 – Representação dos fungos filamentosos



Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2020)

Tabela 1 – Exemplos de fungos usados na produção enzimática e pequenas moléculas

| <b>Produtos</b>    | <b>Formulários</b>  | <b>Hospedeiro</b>                                       | <b>Referência</b>                    |
|--------------------|---|---|--------------------------------------|
| L-asparaginase     | Medicamento e industria de alimentos                                    | <i>Penicillium sp.</i>                                  | (VIEIRA et al., 2020)                |
| Amilase            | Fabricação de pão e produção de xarope de glicose                       | <i>Aspergillus niger</i> ,<br><i>Aspergillus oryzae</i> | (KHVEDELIDZE et al., 2017)           |
| Protease           | Alimentos, sabão em pó, couro, farmacêuticos                            | <i>Aspergillus oryzae</i> ,<br><i>A. niger</i>          | (SALIHI; ASOO-DEH; ALIABADIAN, 2017) |
| Pectinase          | Limpeza de sucos e vinho  | <i>Aspergillus niger</i> ,<br><i>Aspergillus oryzae</i> | (LI et al., 2020)                    |
| Celulase           | Amaciante de roupas   | <i>Trichoderma viride</i>                               | (LAN et al., 2013)                   |
| Colagenase         | Segmentos médico, farmacêutico, alimentício, cosmético, têxtil e couros | <i>Penicillium aurantiogriseum</i>                      | (WANDERLEY et al., 2017)             |
| L-glutaminase      | Importante enzima terapêutica e alimentar                               | <i>Aspergillus oryzae</i>                               | (BINOD et al., 2017)                 |
| Penicilina         | Antibiótico, principalmente bactérias Gram-positivas                    | <i>Penicillium chrysogenum</i>                          | (DAYALAN; DARWIN; PRAKASH, 2011)     |
| Cefalosporina      | Antibiótico de amplo espectro   | <i>Acremonium chrysogenum</i>                           | (HU; ZHU, 2016)                      |
| Lovastatina        | Tratamento da hipercolesterolemia                                       | <i>Aspergillus terreus</i>                              | (SABERI et al., 2020)                |
| Ácido cítrico      | Alimentos, bebidas, cosméticos, sabão em pó                             | <i>Aspergillus niger</i>                                | (ABOYEJI et al., 2020)               |
| Ácido glucônico    | Alimentos, produtos farmacêuticos e higiênicos                          | <i>Aspergillus niger</i>                                | (LU et al., 2015)                    |
| Ácido itacônico    | Composto vinílico versátil  | <i>Aspergillus terreus</i>                              | (SANO et al., 2019)                  |
| Ácido micofenólico | Uso farmacêuticos   | <i>Penicillium brevicompactum</i>                       | (PATEL et al., 2018)                 |
| Biossurfactante    | Alimentos, produtos farmacêuticos e higiênicos                          | <i>Aspergillus fumigatus</i>                            | (COSTA et al., 2018)                 |

A enorme capacidade de secreção dos fungos já é utilizada pela indústria há décadas para produzir ácidos orgânicos, drogas de pequenas moléculas e proteínas homólogas e heterólogas. Essa qualidade tem sido explorada pela humanidade há milênios e está crescendo em importância, pois o modo filamentososo de crescimento permite a colonização eficaz de substratos e fornece uma grande proporção entre superfície e volume, facilitando a absorção de nutrientes (CHROUMPI; MÄKELÄ; VRIES, 2020).

Na indústria a investigação dos processos celulares envolvidos na produção de enzimas, bem como a otimização de misturas de enzimas para maior eficiência de hidrólise, têm fornecido alvos eficazes para a engenharia de fungos. Recentemente, o desenvolvimento de sistemas eficientes de fungos abre a possibilidade de grandes avanços e destaca as lacunas de pesquisa nesta área, como por exemplo a produção da enzima L-asparaginase usando *Penicillium sp.* LAMAI 505 em fermentação em estado sólido, fonte importante na produção de medicamentos e insumos na indústria de alimentos (VIEIRA et al., 2020).

### 2.1.1 *Penicillium*

*Penicillium* é do gênero de fungos ascomicetos e tem papel importante em diversos processos naturais. De acordo com a literatura, o *Penicillium* é um dos fungos mais comuns com enorme diversidade e um grande potencial de uso para várias aplicações ambientais, biotecnológicas e indústrias (YADAV et al., 2018).

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming produzida pelo fungo filamentososo *Penicillium notatum*, o gênero *Penicillium* vem sendo profundamente estudado por sua capacidade de produzir uma ampla gama de produtos naturais, muitos deles com aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (ASHTEKAR et al., 2021). Neste contexto, o *Penicillium sp.* LAMAI 505 (Figura 2) foi utilizado como fonte capaz de produzir L-asparaginase, produto enzimático de grande importância comercial no setor industrial e terapêutico.

Figura 2 – Cultivo de *Penicillium sp.* LAMAI 505

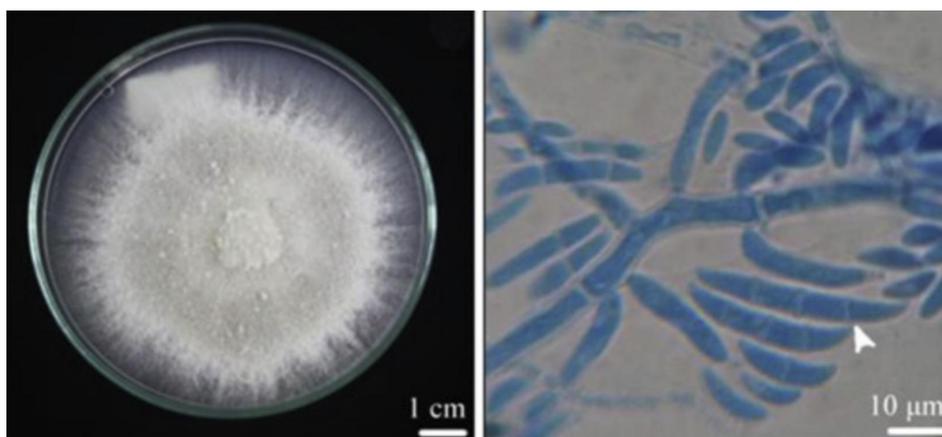


Fonte: Autor.

### 2.1.2 Fusarium

*Fusarium* é um gênero de fungos da classe *Sordariomycetes* (Subfilo *Ascomycota*), em geral agrupando espécies que formam filamentos e produzem manchas brancas em substratos. A reprodução com esporos facilmente reconhecíveis ao microscópio pela sua forma de meia-lua ou de canoa. A maioria das espécies são saprófitos amplamente distribuídos no solo, constituindo membros relativamente abundantes do microbiota do solo das regiões temperadas e subtropicais. Estes fungos capazes de sobreviver na água e solo alimentando-se de materiais em decomposição (K. NAKAHAMA, A. IMADA, 1973). Além disso, os fungos filamentosos são muito usados na produção enzimática, em destaque neste caso o *Fusarium sp.* utilizado neste trabalho na produção de L-asparaginase em FES com suporte inerte de poliuretano (EL-GENDY et al., 2021b; FREITAS et al., 2021). A Figura 3 mostra um exemplo de *Fusarium sp.* em placa petri e a imagem de microscópio.

Figura 3 – Exemplo do gênero *Fusarium*



Fonte: Adaptada de Khamchatra et al. (2016).

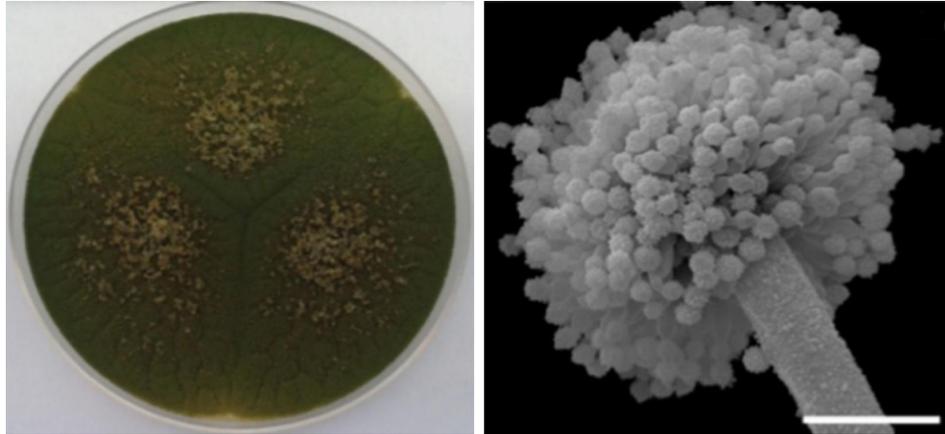
### 2.1.3 Aspergillus

O gênero *Aspergillus* pertence ao filo *Ascomycota*, ao reino Fungi, à ordem Eurotiales e à família Thichonomacea. Os pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se por serem organismos filamentosos. Na fase anamórficas, ou seja, assexuadas, a reprodução é realizada através de esporos assexuais, chamados conídios. Este gênero é considerado bastante diverso, sendo constituído por 344 espécies tendo um grande impacto econômico e também social. As espécies pertencentes a este gênero podem-se encontrar em todo o mundo e em diversos habitats (CUNHA et al., 2021).

Muitas espécies de *Aspergillus sp.* são utilizadas na biotecnologia para a produção de vários metabolitos tais como antibióticos, ácidos orgânicos, enzimas, medicamentos, ou como fermentadores na indústria alimentar. Em destaque a enzima L-asparaginase peça

chave na indústria farmacêutica e alimentícia (SHARMA; MISHRA, 2021; EKPENYONG et al., 2021). A Figura 4 mostra um exemplo de *Aspergillus sp.* e a imagem de microscópio.

Figura 4 – Exemplo do gênero *Aspergillus*

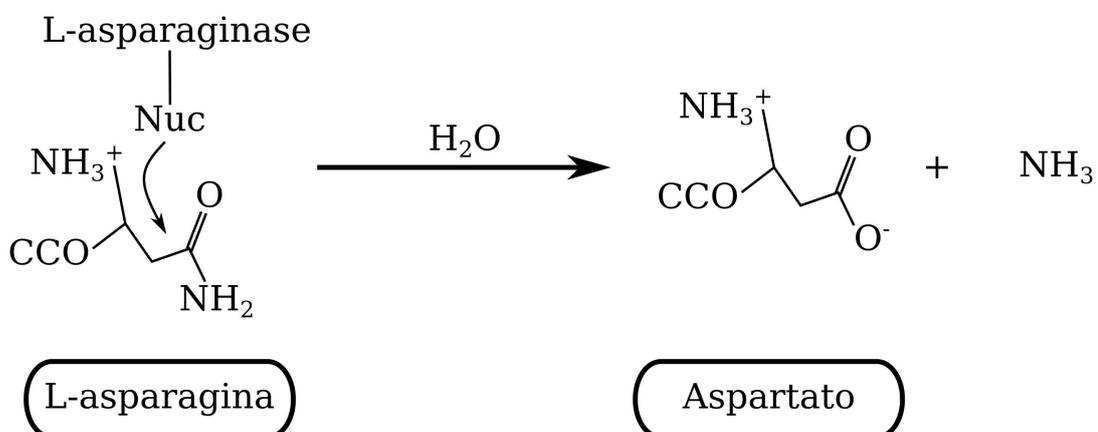


Fonte: Adaptada de Iamanaka et al. (2019).

## 2.2 L-asparaginase

A L-asparaginase (L-asparagina amido-hidrolase, EC 3.5.1.1) 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, reação ilustrada de forma genérica na Figura 5 (WLODARCZYK et al., 2019). Portanto, a atuação específica da enzima L-asparaginase é peça chave no tratamento de câncer, como por exemplo a leucemia linfoblástica aguda (LLA) e agente principal no controle de acrilamida em alimentos processados a altas temperaturas (HINZE et al., 2019; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016; CACHUMBA et al., 2016).

Figura 5 – Conversão de L-asparagina em L-aspártico e amônia



Fonte: Adaptado de Nguyen, Su e Lavie (2016).

A enzima L-asparaginase pode ser encontrada em diferentes microrganismos (bactérias, fungos, leveduras, actinomicetos e algas) e organismos superiores (plantas, vertebrados e tecidos de animais). Os microrganismos podem produzir vários tipos de L-asparaginase que diferem em sua localização (intracelular e extracelular) e propriedades, assumindo diferentes arranjos estruturais dependendo do microrganismo produtor (ENZYME, 2016; CUNHA et al., 2018; CORREA et al., 2020).

Atualmente, a L-asparaginase disponível comercialmente para uso farmacêutico é de origem bacteriana: *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* são as principais produtoras da enzima L-asparaginase (GOSWAMI; VEERANKI; MISHRA, 2019; BELÉN et al., 2019). Nestes casos, a L-asparaginase bacteriana é produzida por fermentação submersa em processo de grande escala (QESHMI et al., 2018). A Tabela 2 ilustra alguns dos exemplos de microrganismos capazes de produzir a enzima L-asparaginase.

Tabela 2 – Lista de diferentes fontes microbianas de L-asparaginase.

| <b>Microrganismo</b> | <b>Nome</b>                        | <b>Referência</b>                   |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Bactérias            | <i>Escherichia coli</i>            | (KENARI; ALEMZADEH; MAGHSODI, 2011) |
|                      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | (FATIMA; KHAN; KHAN, 2019)          |
|                      | <i>Erwinia chrysanthemi</i>        | (SUDHIR et al., 2014)               |
|                      | <i>Bacillus licheniformis</i>      | (WLODARCZYK et al., 2019)           |
|                      | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | (POKROVSKAYA et al., 2012)          |
| Fungos               | <i>Fusarium solani</i>             | (EL-HADI et al., 2017)              |
|                      | <i>Aspergillus sp.</i>             | (DORIYA; KUMAR, 2018)               |
|                      | <i>Penicillium digitatum</i>       | (SHRIVASTAVA et al., 2012)          |
|                      | <i>Cladosporium sp.</i>            | (Mohan Kumar; MANONMANI, 2013)      |
|                      | <i>Penicillium sp.</i>             | (VIEIRA et al., 2020)               |
| Leveduras            | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>   | (CORREA et al., 2020)               |
|                      | <i>Candida glabrata</i>            |                                     |
|                      | <i>Leucosporidium scottii</i>      |                                     |
|                      | <i>Pichia anomalous</i>            |                                     |
|                      | <i>Cryptococcus victoriae</i>      |                                     |
| Algas                | <i>Chlamydomonas sp.</i>           | (PAUL; COOKSEY, 1979)               |
|                      | <i>Chlorella vulgaris</i>          | (EBRAHIMINEZHAD et al., 2014)       |
|                      | <i>Spirulina maxima</i>            | (Abd El Baky; El Baroty, 2016)      |

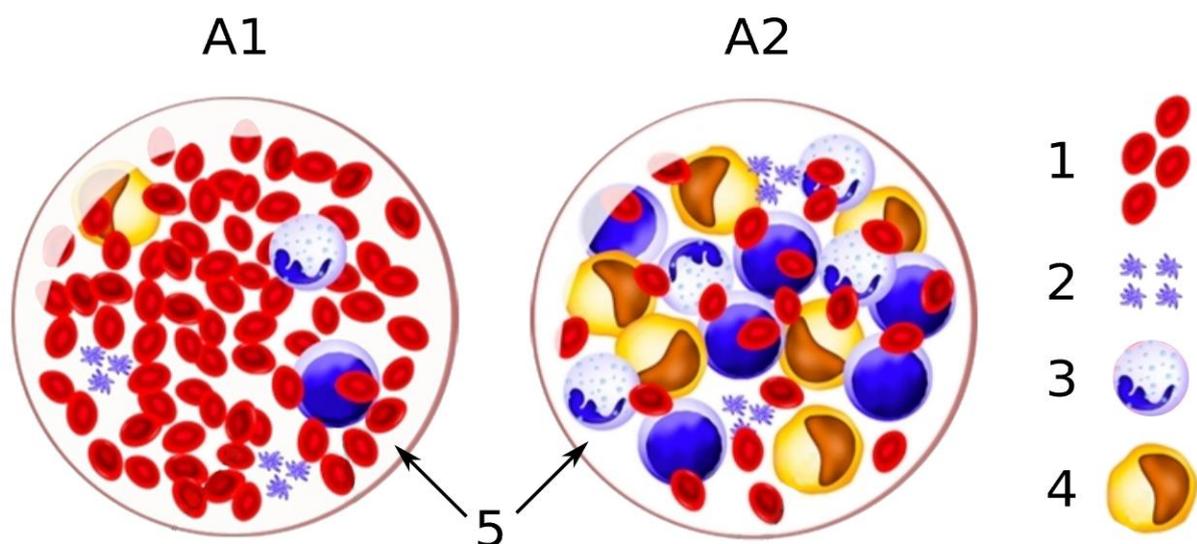
Fonte: Adaptado de Ashok et al. (2019)

### 2.2.1 Aplicação farmacêutica da L-asparaginase

Os principais medicamentos existentes no mercado são Elspar<sup>®</sup>, Crasnitin<sup>®</sup> e Kidrolase<sup>®</sup> (de origem de *E. coli*) e Erwinase<sup>®</sup> (de origem de *E. chrysanthemi*) (ROTH et al., 2013; SHRIVASTAVA et al., 2016). 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 (BELÉN et al., 2019; POKROVSKY et al., 2016; SAFARY et al., 2019; ZHANG et al., 2005; CACHUMBA et al., 2016; EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016; QESHMI et al., 2018).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um tipo de câncer que se desenvolve nas células linfoides 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, 2016). 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, 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 (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016; VEMURI et al., 2017; HEO; SYED; KEAM, 2019).

A L-Asparaginase tem demonstrado ser um fármaco eficaz para pacientes leucêmicos (ASHOK et al., 2019). O modo de ação da L-Asparaginase é o esgotamento do grupo circulante de L-asparagina e a inibição resultante da síntese proteica (CHEOK et al., 2009). 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 (BRUMANO et al., 2019).

A limitação do uso da L-asparaginase de *Escherichia 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 (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

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 (CACHUMBA et al., 2016).

A produção de L-asparaginase fúngica torna-se importante, devido aos casos recorrentes de hipersensibilidade e reações adversas nos pacientes medicados com L-asparaginase de origem bacteriana. Além disso, o uso de fungos na produção de L-asparaginase destaca-se pela capacidade de produção no ambiente extracelular, fácil extração e processamento a jusante (BATOOL et al., 2016). Portanto, Uma ótima alternativa para atender a grande demanda de L-asparaginase no mercado é o uso de novas fontes microbianas na produção de L-asparaginase, como os fungos. O *Penicillium sp.* LAMAI 505 foi utilizado neste trabalho como fonte produtora de L-asparaginase, considerando sua capacidade produtiva em processos de FES.

### 2.2.2 Aplicação da L-asparaginase na indústria de alimentos

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., 2009). 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 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 (SINGH; KUSHWAH, 2018). 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.

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 (MUNIR et al., 2019; SARMIENTO; PERALTA; BLAMEY, 2015). As empresas Novozymes<sup>®</sup> e Danisco<sup>®</sup> lideram o mercado mundial de enzimas com 45 % e 17 % do total de vendas, respectivamente, seguidas pelas empresas DSM<sup>®</sup> e BASF<sup>®</sup> com 5 % e 4 % do mercado (MIGUEL et al., 2013). As L-asparaginases fúngicas usadas na indústria de alimentos são consideradas GRAS (geralmente reconhecidas como seguras) e são obtidas de *A. oryzae* e *A. niger*. Comercialmente, as preparações PreventASe<sup>®</sup> (DSM) e Acrylaway<sup>®</sup> (Novozymes) estão atualmente disponíveis para a redução da acrilamida na indústria de alimentos. O PreventASe foi obtido por *Aspergillus niger*, apresentando um pH ótimo entre 4 e 5 e uma temperatura ideal de 50 °C. O PreventASe<sup>®</sup> reduz a formação de acrilamida em aplicações de alto pH (até 9), como chips de milho, biscoitos e bolachas (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

## 2.3 Produção enzimática por processos fermentativos

Atualmente grande parte da L-asparaginase comercial é produzida em processo de fermentação submersa (FS), 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 meio de fermentação e uma alta concentração de oxigênio (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). Entretanto, a fermentação estado sólido (FES) vem ganhando espaço nos últimos anos e emergiu como um processo

econômico e alternativo para a produção de enzimas. O uso de resíduos agrícolas, agroindustriais e industriais como substratos convertidos em produtos com alto valor comercial e estudado em diversos trabalhos na literatura considerando o uso da FES na produção de L-asparaginase (Tabela 3).

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; INNASIMUTHU; MARMUR, 2014). Esses substratos atuam tanto como suporte físico como fonte de nutrientes e influenciam a produção de enzimas.

Tabela 3 – Produção de L-asparaginase usando diferentes substratos e microrganismos

| Fungos                     | Substrato sólido   | pH  | T (°C) | Unidade (%) | Atividade de L-asparaginase | Referência                                       |
|----------------------------|--|-----|--------|-------------|-----------------------------|--|
| <i>Aspergillus niger</i>   | Farelo de soja   | 6,5 | 30 ± 2 | 70          | 40,9 ± 3,35 U/g             | (MISHRA, 2006)                                   |
| <i>Aspergillus sp.</i>     | Torta de algodão, farelo de trigo e casca de grama vermelha. | 8   | 35     | 70          | 12,57 U/mL                  | (DORIYA; KUMAR, 2018)                            |
| <i>Aspergillus niger</i>   | Bolo de óleo de gergelim                                     | 6,5 | 29,31  | 96,02       | 355,88 U/gds                | (UPPULURI; REDDY, 2009)                          |
| <i>Aspergillus niger</i>   | Farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão.         | -   | 30     | 50          | 89,22 U/g                   | (DIAS et al., 2015)                              |
| <i>Cladosporium sp.</i>    | Farelo de trigo, farelo de arroz e bagaço                    | 5,8 | 30     | 58          | 3,74 U                      | (Mohhan Kumar; MANNONMANI, 2013)                 |
| <i>Fusarium equiseti</i>   | Grãos de soja  | 7   | 45     | 70          | 3,26 U                      | (B B; R, 2011)                                   |
| <i>Penicillium sp.</i>     | Suporte inerte de espuma de poliuretano                      | 5,1 | 40     | 80          | 13.7 U/gds                  | (VIEIRA et al., 2020)                            |
| <i>Fusarium culmorum</i>   | Grãos de soja  | 7   | 30     | 70          | 7,21 U/gds                  | (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017)                 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | bagaço de cana-de-açúcar                                     | —   | 30     | 80          | 44,95 U/g                   | (MUSO CACHUMBA et al., 2019)                     |
| <i>Aspergillus terreus</i> | Farinha de semente de baira                                  | 8   | 30     | 70          | 273.3 U/gds                 | (RAJU, 2013)                                     |
| <i>Aspergillus niger</i>   | Resíduos agroindustriais (Farelo de trigo, arroz e soja)     | —   | 25     | 70          | 3746,78 U/gds               | (CUNHA et al., 2018)                             |
| <i>Aspergillus niger</i>   | Matéria-prima seca em bolo de óleo de gengibre               | 5-7 | 40     | 60          | 88 U/gds                    | (VIVEKANANDHA; SANKARESWARAN; PRABHAVATHI, 2013) |

Fonte: Adaptado de Naser et al. (2020)

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 (PRABANINGTYAS et al., 2018).

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 (LOPEZ-RAMIREZ et al., 2018).

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 espuma de poliuretano 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; INNASIMUTHU; MARMUR, 2014).

Além disso, este tipo de fermentação se assemelha ao habitat natural de microrganismos e está bem adaptado ao metabolismo de fungos. Existem vários fatores importantes que têm um enorme impacto no sucesso do FES. Esses fatores incluem pH, temperatura, aeração,

atividade de água e umidade, origem do substrato sólido e tamanho e forma das partículas. Entre vários fatores críticos, a umidade e a origem do substrato sólido são os fatores mais importantes que afetam os processos FES. A seleção da umidade depende do microrganismo empregado e da origem do substrato. Os fungos precisam de baixa umidade entre 40 e 60 %, no entanto, a seleção do substrato depende de vários fatores, principalmente relacionados à disponibilidade e custo (SINGHANIA et al., 2009).

Substratos sólidos, principalmente resíduos ou subprodutos agrícolas, estão sendo utilizados como substratos para a produção de L-asparaginase fúngica (ARORA; RANI; GHOSH, 2018; DIAS et al., 2016). Esses substratos atuam como suporte físico e fonte de nutrientes para a produção de enzimas. Portanto, para a produção comercial da enzima, a seleção de um substrato apropriado é uma etapa importante (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017).

## 2.4 Biorreatores destinados a FES

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 (ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

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 sob medida para melhor otimização (ÁVILA et al., 2019; MITCHELL et al., 2006).

As principais categorias de biorreatores incluem tanques agitados, camas fixas e embaladas, plataformas de balanço e sistemas de fibra oca. Essas categorias diferem-se de forma geometria e no tipo de 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 Tabela 4 mostra os principais reatores utilizados em FES com diferentes fungos.

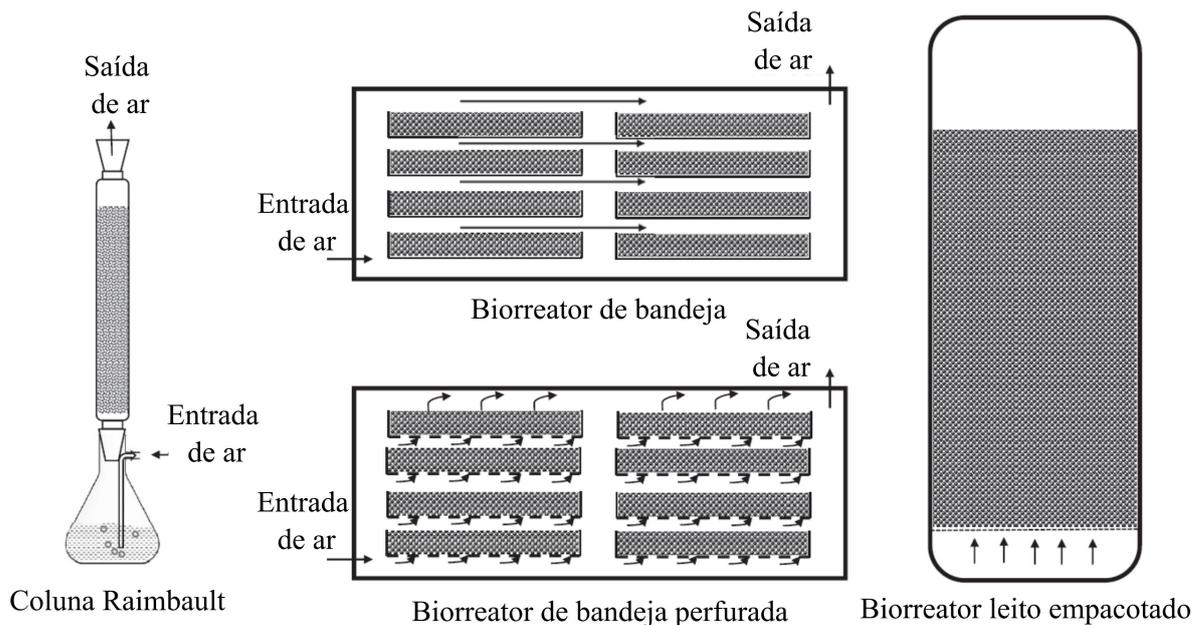
Tabela 4 – Diferentes biorreatores, substratos e microrganismos usados em fermentação estado sólido

| <b>Tipos de biorreatores</b>                 | <b>Substrato usados</b>   | <b>Produtos</b>     | <b>Microrganismo</b>             | <b>Produção</b> | <b>Referência</b>        |
|--|---|---------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Bandeja                                      | Farelo de trigo   | Poligalac touronase | <i>Aspergillus oryzae</i>        | 298 U/g         | (DEMIR; TARI, 2016)      |
| Cama embalada                                | Farelo de trigo e bagaço de cana                                    | Pectinase           | <i>Aspergillus niger</i>         | 22 U/g          | (FINKLER et al., 2017)   |
| Cama estática                                | Farelo de trigo   | Endoglucanase       | <i>Aspergillus niger</i>         | 29,8 U/gds      | (FARINAS et al., 2011)   |
| Tambor rotativo                              | Grãos de soja   | Fitase              | <i>Aspergillus niger</i>         | 580 U/gds       | (SAITHI; TONGTA, 2016)   |
| FES com dupla dinâmica de gás                | —   | Cellulase           | <i>Penicillium decumbens</i>     | 18 U/gds        | (CHEN et al., 2013)      |
| Pulsação por pressão de ar                   | Espiga de milho e Farelo de trigo                                   | Xilanase            | <i>Thermomyces lanuginosus</i>   | 8237 U/g        | (YANG; HOU; ZHANG, 2011) |
| Bandeja de coluna                            | Bagaço de casca de limão, farelo de trigo e bolo de óleo de linhaça | Fitase              | <i>Aspergillus niger</i>         | 148.98 U/g      | (RUIZ et al., 2012)      |
| Leito estático com aeração forçada           | Farelo de trigo   | Endoglucanase       | <i>Aspergillus niger</i>         | 50,2 U/g        | (FARINAS et al., 2011)   |
| Múltiplos reatores com reciclo de nutrientes | Glicose e L-asparagina  | L-asparaginase      | <i>Penicillium sp. LAMAI 505</i> | 13,7 U/g        | (VIEIRA et al., 2020)    |
| Leito estático com suporte inerte            | Larva de <i>Tenebrio molitor</i>                                    | L-asparaginase      | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 1.1 U/g         | (CORREA et al., 2020)    |
| Tambor giratório                             | Fibra de cacho de frutas de palma vazia                             | CMCase              | <i>Penicillium</i>               | 6,5 U/g         | (KIM; KIM, 2012)         |
| Tambor giratório                             | Farelo de arroz desengordurado                                      | Amiloglucosidase    | <i>Aspergillus niger</i>         | 135 U/L         | (NORATIQA et al., 2013)  |

Fonte: Adaptado de Arora, Rani e Ghosh (2018)

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 et al., 2006; ARORA; RANI; GHOSH, 2018). A Figura 7 mostra um exemplo do primeiro grupo de biorreatores, o biorreator de leito estático do tipo bandeja. As bandejas geralmente são de madeira, metal ou plástico, com ou sem perfurações, embaladas com substrato-suporte e empilhadas umas sobre as outras em ambientes com temperatura e umidade controladas (Figura 7). O aumento de escala geralmente é obtido aumentando a área de superfície (número de bandejas). Nesse tipo de biorreator tem-se a possibilidade de uso de diferentes substratos-suportes para a produção de enzimas (Tabela 4). A discussão tem sido nas alturas do leito operacional, natureza química e teor de umidade inicial do suporte do substrato e seu efeito na produtividade (ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

Figura 7 – Exemplos esquemáticos de biorreatores usados em fermentação estado sólido



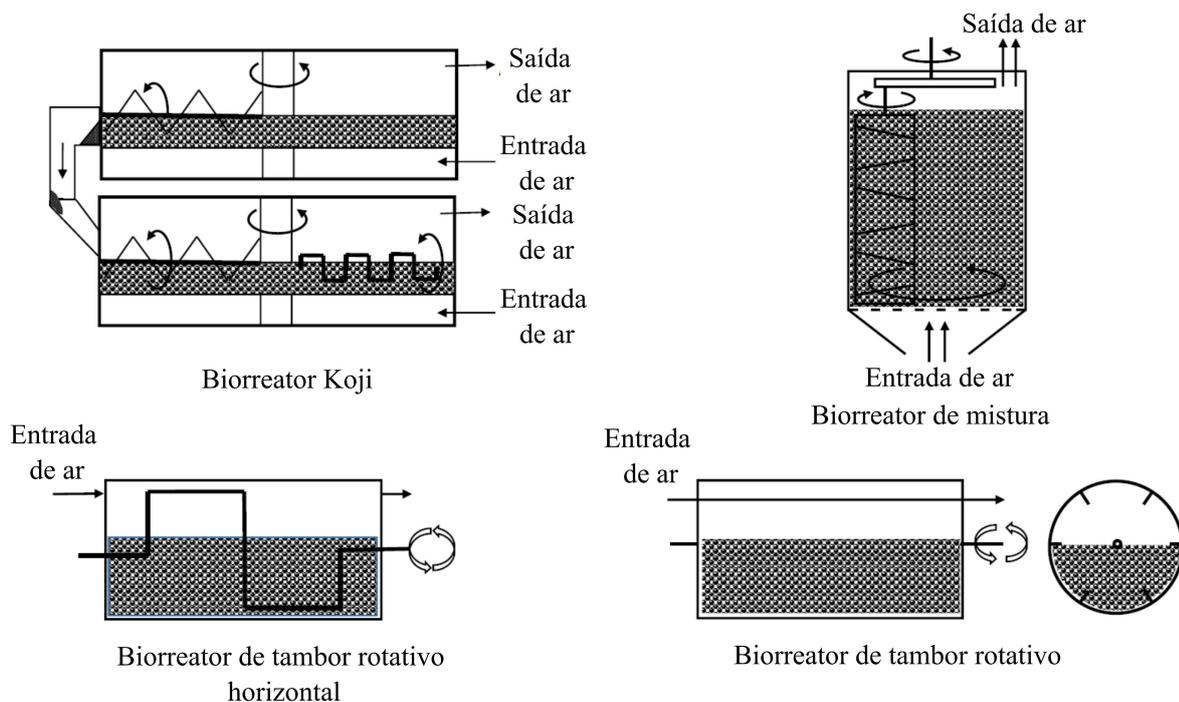
Fonte: Adaptado de Robinson e Nigam (2003).

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 8, o biorreator do tipo leito empacotado. A característica de um biorreator do tipo leito empacotado é a aeração forçada através de leito estático que auxilia na reposição de  $O_2$  e umidade e mitiga o acúmulo de calor e  $CO_2$ . O biorreator do tipo leito empacotado são geralmente empregados onde a mistura é indesejável ou deletéria para o crescimento microbiano. A construção geralmente consiste em um tubo ou tambor cilíndrico de vidro

ou metal, que aloja o substrato e as paredes do cilindro ou tambor podem ser encamisadas. A aeração forçada no biorreator, o efeito das altas taxas de fluxo de ar e o desempenho do biorreator devem sempre observados e avaliados (MALHOTRA, 2019; ARORA; RANI; GHOSH, 2018; ROBINSON; NIGAM, 2003).

A Figura 8, representa características do biorreator do tipo tambor rotativo, utilizado no processo em fermentação estado sólido. Os biorreatores nesta categoria compreendem agitação suave e aeração forçada para aumentar a transferência de calor e massa e o crescimento microbiano. A mistura aumenta o transporte convectivo, pois aumenta a área de superfície do substrato exposto ao ar úmido. A atividade biológica, transferência de calor e massa e produtividade do processo em biorreator de tambor rotativo e outros sistemas agitados de forma intermitente ou contínua representam desafios neste processos (NORATIQAHA et al., 2013; ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

Figura 8 – Biorreator estático do tipo leito empacotado.

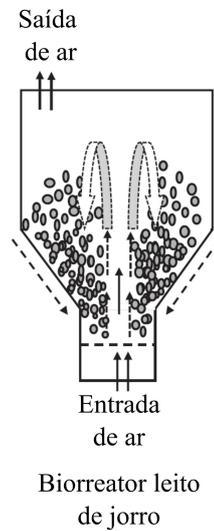


Fonte: Adaptado de Robinson e Nigam (2003).

O biorreator do tipo tambor rotativo compreende um recipiente em forma de tambor que pode ser montado em um rolo (dispositivo rotativo) e geralmente consiste em três subsistemas, ou seja, a parede do tambor, o espaço superior e o substrato. O ar é tipicamente soprado através do espaço superior acima de um leito de partículas de substrato e o biorreator pode ser girado de forma intermitente ou contínua. A mistura do leito de substrato é geralmente facilitada pela ação de rotação do tambor em torno de seu eixo central (KIM; KIM,

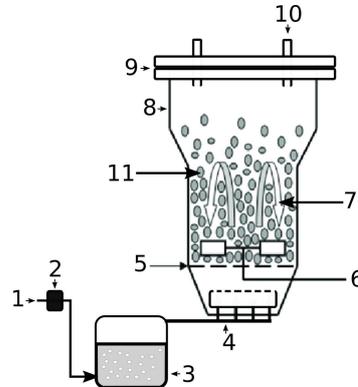
2012; MALHOTRA, 2019).

Figura 9 – Biorreator do tipo leito de jorro.



Fonte: Adaptado de Robinson e Nigam (2003).

Figura 10 – 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 et al. (2006).

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 último ilustrado na Figura 9.

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 10, com tambor mecânico e vários outros biorreatores agitados.

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 (MISHRA, 2006).

Os reatores de FES também podem ser composto com matrizes inertes, como a espuma de poliuretano, capazes de imobilizar as células dos microrganismos. A imobilização de células (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 permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células (ALESSANDRELLO et al., 2017).

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 (ALESSANDRELLO et al., 2017; COVIZZI et al., 2007).

A importância industrial da imobilização de células na produção enzimática é principalmente orientada para a aplicação, na medida em que deve haver uma vantagem diferenciadora oferecida por esse biocatalisador sobre as células livres no meio, células inteiras ou catalisadores químicos. Em processos industriais, a contribuição de custo da imobilização de células depende dos materiais, da produção, mas também do número de ciclos realizado pelo biocatalisador com rendimento satisfatório (BASSO; SERBAN, 2019).

## 2.5 Materiais poliméricos na confecção de suportes e reatores

Como discutido anteriormente, os reatores são peças chave de grande importância no setor industrial e acadêmico. Um aspecto importante nos reatores, além da forma de operação, e a sua construção como destaque para os materiais usados (OSADOLOR; LENNARTSSON;

TAHERZADEH, 2014). Embora grande parte dos reatores industriais modernos sejam feitos de aço o uso de diferentes materiais como cerâmicos, plásticos, fibra e espuma são aplicadas na confecção de reatores como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de possíveis materiais para construção de reatores

| <b>Material</b>        | <b>Vantagens</b>   | <b>Desvantagens</b>  |
|------------------------|--|--|
| Aço carbono            | Mais barato que o aço inoxidável, À prova de vazamentos.   | Corrosão e contaminação                                      |
| Aço inoxidável         | À prova de vazamentos, Boa esterilidade, Pode suportar altas temperaturas e pressão, À prova de corrosão e Longa vida útil | Muito caro   |
| Cerâmicos              | Quimicamente estável e Resistente ao desgaste  | Frágil e Propenso a choque térmico                           |
| Espumas de poliuretano | Versátil, Resistentes, Portáteis, Fácil modelagem, Baixo custo e Boa durabilidade  | Não suporta altas temperaturas                               |
| Plásticos              | Muito portátil e Barato  | Vazamentos e vida útil curta e Altas chances de contaminação |
| Têxtil                 | Portátil, À prova de corrosão, Boa esterilidade, Pode suportar altas temperaturas, À prova de vazamentos, Longa vida útil  | Limitações na direção vertical                               |
| Vidro borossilicato    | Transparente, fácil limpeza e Inerte a produtos químicos   | Muito frágil   |

Fonte: Adaptado de Osadolor, Lennartsson e Taherzadeh (2014)

No que se refere as espumas, o uso de poliuretano se destaca como material versátil, fácil manipulação e barato, sendo de grande interesse em processos biológicos, como a produção de biomoléculas e o tratamento de resíduos (Tabela 6).

Tabela 6 – Aplicações da espuma de poliuretano como matriz de suporte inerte em fermentações em estado sólido

| <b>Aplicação</b>         | <b>Microrganismo imobilizado</b> | <b>Referência</b>         |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Descoloração de corantes | <i>Bacillus subtilis</i>         | (SHALINI; PYDI, 2019)     |
| Imobilização de lipase   | <i>Candida antarctica</i>        | (NYARI et al., 2016)      |
| Produção de tanase       | <i>Bacillus gottheilii</i>       | (SUBBALAXMI; MURTY, 2016) |
| Produção de celulose     | <i>Trichoderma Veride</i>        | (HU et al., 2011)         |
| Lovastatina              | <i>Aspergillus terreus</i>       | (BAÑOS et al., 2009)      |
| L-asparaginase           | <i>Penicillium sp.</i>           | (VIEIRA et al., 2020)     |

Embora a literatura restrinja o uso de espuma de poliuretano como material inerte,

trata-se de um dos materiais mais comuns, versáteis e pesquisados no mundo (GAMA; FERREIRA; BARROS-TIMMONS, 2018). Esses materiais combinam com durabilidade, resistência e elasticidade, tornando-se adequada para substituir metais, plásticos e borrachas em vários produtos de engenharia, biomédicos, têxtil, etc (SOMARATHNA et al., 2018).

### 2.5.1 Espuma de poliuretano como material de confecção de reatores

As espumas de poliuretano podem ser facilmente adaptadas para obter produtos específicos, alterando apenas os tipos e quantidades de surfactantes, catalisadores, agentes de expansão, isocianato e polioliol usados em sua fabricação, bem como a extensão da intercalação e esfoliação entre os enchimentos e matrizes. atenda ao objetivo desejado (KIM et al., 2017). Especificamente, os poliuretanos encontram ampla aplicação em revestimentos devido às suas propriedades específicas, como excelente resistência mecânica, tenacidade, boa abrasão, corrosão e resistência química e flexibilidade a baixas temperaturas.

Além disso, a espuma de poliuretano também pode ser aplicada com suporte para fermentação em estado sólido, imobilização de células e enzimas, devido a sua resistência e durabilidade, sua estrutura de poros, a facilidade de controle de poros durante a síntese, sua área superficial, permeabilidade, facilidade do transporte de massa, espaço para o crescimento de biomassa, baixa toxicidade e baixo preço (KARIMI; DROGHETTI; MARCHISIO, 2017).

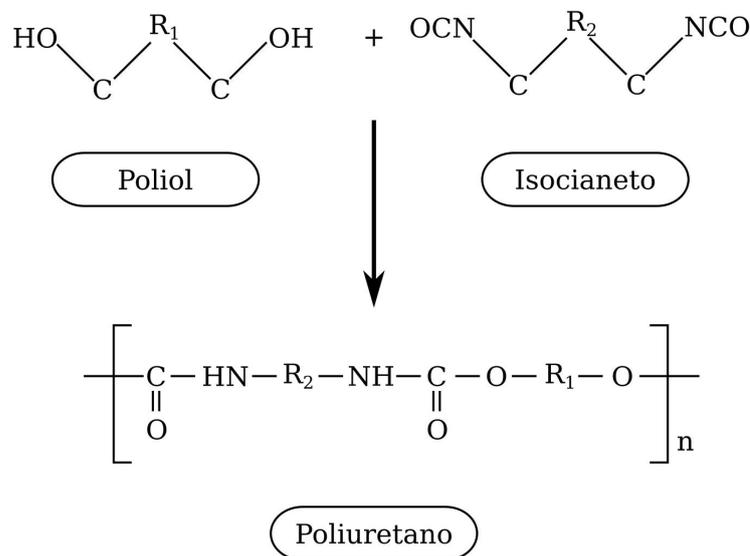
Do ponto de vista químico, os principais componentes da espuma de poliuretano são os polióis e isocianatos destaque para os grupos funcionais hidroxila e amida. Esses dois grupos funcionais formam cadeias e redes estendidas ligadas por ligação de uretano, que é formada como resultado de reação exotérmica. O PU pode ser sintetizado para obter propriedades mecânicas. abrangentes para atender aos requisitos de material para aplicações (VELAYUTHAM et al., 2009).

A estrutura química da PU é apresentada na Figura 11. Em termos de síntese de PU, os três componentes principais são polioliol, isocianato e extensor de corrente. As propriedades mecânicas e físicas da PU dependem muito dos tipos de polióis e isocianatos que são usados para síntese (KARIMI; DROGHETTI; MARCHISIO, 2017).

A fabricação da maioria dos produtos de PU é diferente de muitos outros polímeros, porque geralmente a polimerização no caso da produção de PU é feito no molde, portanto já gera o produto final ao invés das etapas separadas de polimerização e modelagem. No caso da etapa de separação, como o polietileno e o polipropeno, são produzidos em locais diferentes e vendidos como grânulos, pós ou filmes, e subsequentemente fabricam os produtos necessários por aquecimento, modelagem sob pressão e resfriamento, o que resulta quase completamente dependente das propriedades dos produtos finais comparado ao polímero original (LEE et al., 2018).

Na Figura 11 é mostrada uma representação esquemática da reação de polimerização de PU na qual o grupo polioliol reage com isocianeto formando a estrutura monomérica que constitui a espuma de PU. Além da reação de propagação da cadeia polimérica (Figura 11) há outras reações que ocorrem simultaneamente, como a reação de isocianeto com água que gera ácido carbônico que se decompõe em amina e dióxido de carbono. O dióxido de carbono atua como agente de expansão que gera o crescimento da massa polimérica com espaços vazios (inicialmente preenchidos pelo gás) que caracteriza a porosidade final do produto. Já amina reage com isocianeto produzindo segmentos rígidos de poliureia que atribuem a rigidez da PU.

Figura 11 – Estrutura química do poliuretano



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2018)

Elastômeros, espumas e adesivos são os três principais produtos de PU usados, principalmente nas indústrias da construção. Os elastômeros podem ser produzidos por reação de um diisocianato com um diol de alto peso molecular e um diol de baixo peso molecular; espumas são sintetizadas por reação de diisocianato com um elevado triol de peso molecular e H<sub>2</sub>O, e os adesivos de PU são formados por reação de um diisocianato em excesso estequiométrico com uma mistura de dois macrodióis - um cristalino e um amorfo (ZHANG et al., 2017).

O polioliol de cadeia longa e de baixa funcionalidade produz produtos macios e elásticos, enquanto o polioliol de cadeia curta e alta funcionalidade forma produtos rígidos de PU reticulados. Além disso, o aromático do diisocianato leva a propriedades mais rígidas das UPs quando comparado aos polímeros alifáticos (LEMONS; ZHANG, 2020).

Os catalisadores são geralmente adicionados para obter uma taxa de reação controlada

a uma temperatura mais baixa porque a reação é exotérmica. Produção de PU pode ser conseguido através de métodos diferentes, tais como a pré-polimerização, de um único passo de polimerização, e quase pré-polímero (AKINDOYO et al., 2016).

Os aditivos que podem ser incorporados na síntese de PU incluem retardadores de chama, pigmentos, reticuladores, cargas, agentes de expansão e surfactantes. As PUs podem ser fabricadas de qualquer forma com uma variedade de propriedades, como dureza e densidade, apenas variando a quantidade e os tipos de polioliol, isocianato ou aditivos (KHARBAS; ELLINGHAM; TURNG, 2018). Os componentes mais comuns que podem ser encontrados nas UPs típicas e os motivos de sua inclusão são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Componentes dos poliuretanos e razões para sua inclusão

| <b>Aditivos</b>                        | <b>Motivos de uso</b>   | <b>Referência</b>                            |
|--|---|--|
| Isocianato                             | Responsável pelas propriedades de reatividade e cura da PU  | (FANG et al., 2014)                          |
| Polióis                                | Contribui com segmentos longos flexíveis, que produz polímeros elásticos macios                                     | (Tibério Cardoso; Claro Neto; VECCHIA, 2012) |
| Catalisadores                          | Acelerar a reação entre o isocianato e os polióis e permitir a reação a uma temperatura de reação mais baixa        | (CHATTOPADHYAY; RAJU, 2007)                  |
| Surfactantes                           | Para produzir materiais PU coloridos, especialmente para fins estéticos   | (SEGURA et al., 2005)                        |
| Reticuladores (extensores de corrente) | Para modificação estrutural da molécula de PU e oferecer suporte mecânico que melhorará as propriedades do material | (SHEIKHY et al., 2013)                       |
| Enchimentos                            | Para minimizar os custos e melhorar as propriedades do material, como rigidez e resistência à tração                | (TAHERI; SAYYAH, 2016)                       |
| Retardadores de chamas                 | Para reduzir a inflamabilidade do material  | (PATEL; SHAH; PATEL, 2011)                   |
| Retardadores de fumaça                 | Reduzir a taxa de possível geração de fumaça quando o material é queimado   | (ZHANG et al., 2015)                         |

As espumas flexíveis compreendem a grupos de copolímeros em blocos cuja flexibilidade é baseada nas separações de fase entre os segmentos mole e duro. Assim, as espumas de PU podem ser modificadas através do controle deliberado das razões composicionais individuais que geram alterações na densidade, durabilidade, firmeza, resistividade ao rasgo, combustibilidade, elasticidade da superfície, etc., onde uma combinação dessas propriedades pode garantir uma boa flexibilidade no composto de PU. As Animas terciárias e compostos organometálicos são catalisadores mais utilizados, as aminas regulam a formação de espuma

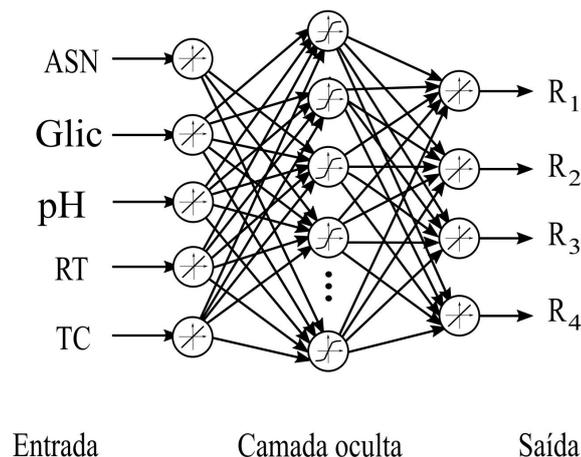
e os organometálicos atuam na reação de polimerização (SINGHAL et al., 2014; AKINDOYO et al., 2016).

## 2.6 Modelagem e otimização de reatores biológicos por RNA associadas a métodos de inteligência de enxame

A RNA é um dos meios usados para implementar algoritmos de aprendizado de máquina. Na base, as RNAs são desenvolvidas para imitar a estrutura neural biológica dos cérebros de organismos vivos. O poder das RNAs é a facilidade de aprender o padrão linear ou não linear e a correlação entre os parâmetros de entrada e saída e, assim, prever o resultado de um sistema complexo que é muito difícil de expressar matematicamente ou implementar diretamente no computador para resolver. Uma RNA aprende com o treinamento realizado iterativamente e é considerada como tendo aprendido se puder lidar com informações probabilísticas vagas sem afetar o resultado e generalizar novas tarefas sobre o tarefas experientes (HAYKIN, 2009).

Uma das etapas da RNA utilizada com bastante sucesso na modelagem de reatores biológicos são as redes do tipo "feedforward backpropagation", que caracterizadas pelo uso de camada oculta e funções de transferência do tipo "tansig" e "purelim", como mostra a Figura 12. Com o intuito de melhorar o desempenho, a normalização dos dados de entrada e de resposta são ajustados no intervalo -1 a 1 usando a Equação 2.1.

Figura 12 – Representação esquemática do modelo de redes neurais artificiais (RNA)



Nota: ASN, Glic, pH, RT e TC são variáveis e R<sub>1</sub> a R<sub>4</sub> são as respostas

$$X^{cod} = \frac{2X^{real}}{x^{max} - x^{min}} - \frac{x^{min} - x^{max}}{x^{max} - x^{min}} \quad (2.1)$$

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. A literatura cita diferentes autores que utilizam as RNAs com forma de modelagem e otimização das variáveis estudadas, como é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Exemplos de aplicação do método de modelagem e otimização por redes neurais artificiais.

| <b>Produtos</b> | <b>Motivos de uso</b>   | <b>Referência</b>              |
|-----------------|---|--------------------------------|
| Biohidrogênio   | Otimização da fermentação escura para produção de biohidrogênio usando uma abordagem de rede neural artificial híbrida (RNA) e metodologia de superfície de resposta (RSM)  | (WANG et al., 2021)            |
| Cream cheese    | Modelagem de rede neural artificial para previsão de pH de fermentação de cream cheese em escala de laboratório e industrial  | (EBRAHIMPOUR; YU; YOUNG, 2021) |
| Etanol          | Otimização de parâmetros de processo para sacarificação bioenzimática e enzimática de resíduos de arroz quebrado para produção de etanol usando metodologia de superfície de resposta e rede neural artificial - algoritmo genético | (MONDAL et al., 2021)          |
| Pululano        | A produção de pululano a partir de <i>Aureobasidium pullulans</i> foi explorada para aumentar a produtividade com método de redes neurais artificiais   | (BADHWAR et al., 2020)         |
| Quitinase       | Otimização dos parâmetros do processo para melhorar a atividade da quitinase de <i>Thermomyces sp.</i> usando rede neural artificial e algoritmo genético   | (SURYAWANSHI et al., 2020)     |
| Exoglucanase    | Otimização da Produção de Exoglucanase por <i>Penicillium Roqueforti</i> ATCC 10110 Por Fermentação em Estado Sólido Usando uma Mistura de Resíduos Agroindustriais   | (da Silva Nunes et al., 2020)  |
| L-asparaginase  | Produção de L-asparaginase por <i>Penicillium sp.</i> LAMAI 505 usando um novo sistema de reatores com células imobilizadas   | (VIEIRA et al., 2020)          |

Na obtenção de condições ótimas os modelos que descrevem a produção enzimática ou do produto de interesse, necessitam ser avaliados no que se refere à obtenção dos valores das variáveis em relação a resposta ótima ou respostas ótimas de interesse. Estas respostas ótimas obtidas caracterizam a função objetivo de um problema de otimização. Os problemas de otimização podem ser descritos matematicamente como mostra a Equação 2.2.

$$F_{obj} = f(x) \quad (2.2)$$

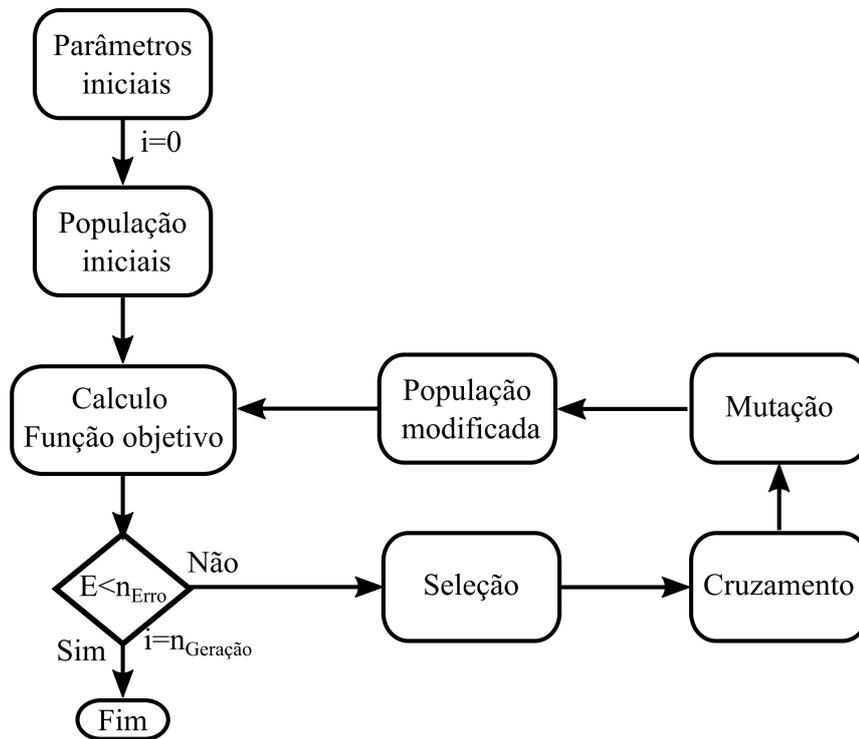
Sendo que  $F_{obj}$  representa a função objetivo que representa um ponto máximo ou ótimo descrito no problema de otimização e  $x$  e o vetor que representa as variáveis, como o tempo de fermentação, temperatura, tempo de residência, concentração de meio nutritivo, vazão, etc. Entre os diferentes métodos de otimização se destacam os métodos de inteligência de enxame, também conhecidos como métodos populacionais heurísticos que inicia o processo de otimização com um conjunto de soluções, denominado população inicial, sendo que cada indivíduo representa uma solução viável para o problema. Iterativamente ela gera novos indivíduos e troca a população corrente por uma nova população de soluções. Na fase de geração, uma nova população de soluções é gerada a partir da população anterior. Na fase de troca, a seleção acontece considerando a população corrente e a nova população de soluções. As melhores soluções vão compor a nova população. Este processo continua iterativamente até que algum critério de parada seja satisfeito.

Entre os diferentes métodos heurísticos de otimização os evolucionários como os modelos de algoritmo genético (GA) e evolução diferencial (DE) são usados por estudos de fermentação com uma certa frequência pela sua capacidade de obter ótimo global, não necessitar de descrição, descrever as condições de modelos complexos e representar satisfatoriamente os dados ajustados.

O GA é um tipo clássico de otimização da computação evolutiva e inteligência artificial computacional que apresenta aplicação em diversas áreas do conhecimento (COLHERINHAS, 2015; LI et al., 2021). O método referencia-se em cromossomos ou indivíduos da população que se associam em uma solução problema desejada e cada gene está associado a uma variável desse problema chave. A iteração dos parametros e as sequências de etapas lógicas levam a população de indivíduos a evolui-se com o passar das gerações até a obtenção de cromossomos ideais (resposta do problema) (DASH; DAS, 2021; Sales de Menezes et al., 2021). A Figura 13 mostra o fluxograma esquemático de otimização do modelo GA.

O modelo GA associado a RNA ajustada foi usado, neste trabalho, para otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES, obtendo as condições otimizadas das variáveis concentração de glicose (Glic), concentração de L-asparagina (ASN), valores de pH, tempos de residência (TR) e tempo entre os ciclos de retirada de produto e adição de nutriente.

Figura 13 – Fluxograma esquemático do modelo de otimização de algoritmo genético (GA)

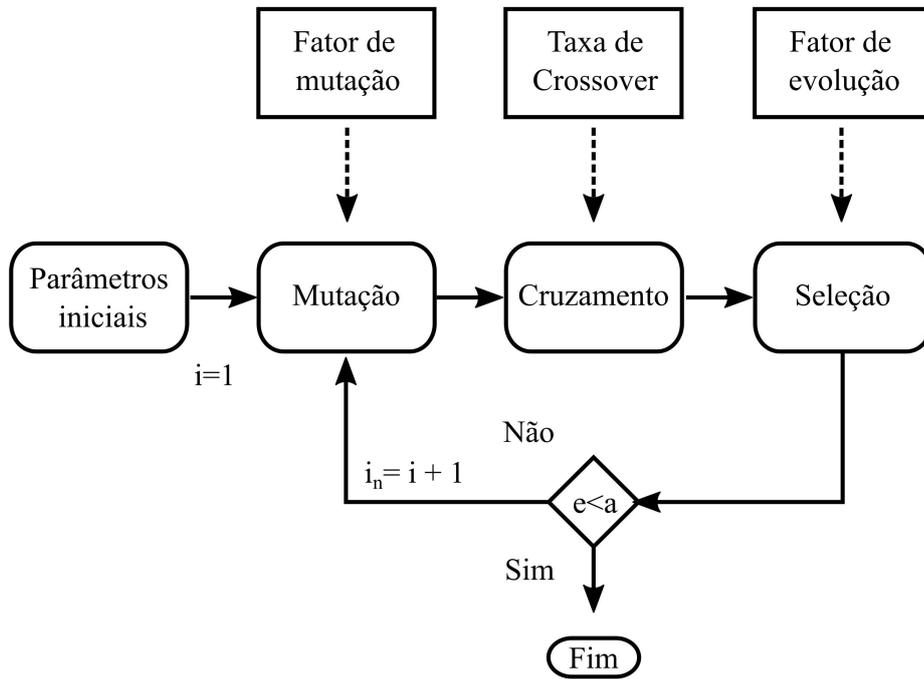


Outro método de otimização populacional é a evolução diferencial (DE) que busca uma metaheurística baseada em população que otimiza um problema melhorando iterativamente uma solução candidata com base em um processo evolutivo. Esses algoritmos fazem parte ou nenhuma suposição sobre o problema de otimização subjacente e podem explorar grandes espaços de design. DE é indiscutivelmente um dos algoritmos de pesquisa baseados em população mais versáteis e estáveis que exibem robustez para multimodais (GEORGIODAKIS; PLEVRIS, 2020).

O DE é usado para funções de valor real multidimensionais, mas não usa o gradiente do problema que está sendo otimizado, o que significa que DE não exige que o problema de otimização seja diferenciável, como é exigido por métodos de otimização clássicos, como descida de gradiente e método newton. O DE pode, portanto, também ser usado em problemas de otimização contínuos (WU; GONG; WANG, 2021). A Figura 14 mostra o fluxograma do método de evolução diferencial (DE) de forma simplificada.

O DE associado a RNA ajustada foi usado na otimização da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES, obtendo as condições ótimas de operação para o reator. As condições ótimas foram determinadas considerando DE (evolução diferencial) otimizar com a população de parâmetros fixos, fatores de crossover e mutação, respectivamente, 300, 0,5 e 0,5.

Figura 14 – Fluxograma esquemático do método de otimização por evolução diferencial (DE)



Nota: a, representa o crit rio de para adotado no ciclo de otimiza o do modelo de evolu o diferencial.



## 3 Reator mult-fase com imobilização celular

Neste capítulo, o reator mult-fase com células imobilizadas (MRIC) e o sistema de múltiplos reatores em série (MRICs) foram propostos para produzir L-asparaginase por *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES. O reator MRIC e o sistema MRICs foram otimizados avaliando os efeitos do número de reatores associados ao sistema MRICs, a composição de nutrientes, tempo de residência para ciclagem de nutrientes, tempo de fermentação, valores de pH e ciclos de extração de produto foram investigados usando um modelo de rede neural artificial (RNA). O modelo de RNA foi satisfatório ( $R^2 > 0,85$  com erro menor que 2,4 %) e os MRICs tiveram bom desempenho quando comparados à literatura. A operação cíclica do sistema MRICs pode regenerar células fúngicas de dentro do suporte inerte de poliuretano, permitindo a produção contínua de L-asparaginase em FES. A atividade máxima de L-asparaginase alcançada foi de 13,7 U/g em condições otimizadas que incluíram um tempo de residência de 33,5 min, pH de 5,1 e concentrações de L-asparagina e glicose de 1,2 e 3,0 g/L. Além disso, demonstramos que o sistema MRICs foram eficazes na produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* LAMAI 505 e outros fungos (*Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*), sendo que o sistema reatores e microrganismos também foram capazes de produzir outro produto como a enzima protease.

### 3.1 Introdução

A L-asparaginase de fungos já tem sido usada na indústria de alimentos e tem efeitos positivos contra as células cancerosas, é livre de atividade da glutaminase e da urease e pode ser produzida em quantidades significativas (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). Entre os gêneros de fungos investigados para a produção de L-asparaginase estão: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium* são citados com mais frequência na literatura (RAHIMI et al., 2019).

Na utilização de fungos para a produção de L-asparaginase e outras biomoléculas, a fermentação em estado sólido (FES) se destaca como um processo importante. O FES pode ser definido como um processo de fermentação que ocorre no substrato sólido com baixa necessidade de água ou como fermentação em um material de suporte sólido inerte com uma solução nutritiva enriquecida (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). As vantagens que o FES apresenta sobre o FS, incluem resistência à contaminação, simplicidade, baixo custo e maior crescimento e secreção enzimática como resultado do meio sólido que se assemelha ao habitat natural dos fungos (MUSO CACHUMBA et al., 2019).

Na literatura o uso de FES para produzir enzimas descreve diferentes substratos sólidos e diferentes particularidades necessárias para atingir as condições de atividade e

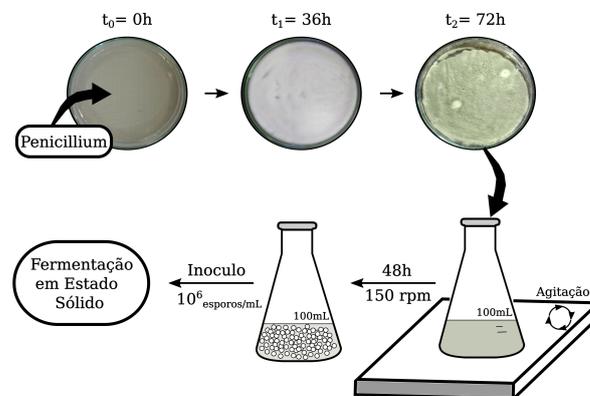
rendimento enzimático ideal (DORIYA et al., 2016). Ainda descreve uma ampla gama de substratos usados na produção L-asparaginase, incluindo farelo de soja, casca de maracujá, semente de algodão e farelo de trigo, etc (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017). O uso de novos reatores de FES batelada para a produção de L-asparaginase é pouco relatado, sendo que o uso de novos reatores de FES para a produção de L-asparaginase contínua ainda foi descrito na literatura.

O reator multi-fase com células imobilizadas em suporte inerte de poliuretano foi proposto e estudado para a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES. Os dados experimentais foram ajustados com o modelo RNA e otimizados usando o método GA. Em seguida diferentes estratégias de retirada parcial de produto foram avaliadas no sistema MRICs otimizado buscando operação contínua. Até onde sabemos, a produção a contínua de L-asparaginase em FES com fungos filamentosos não foi relatada na literatura.

### 3.2 Microrganismo

A Figura 15 mostra esquematicamente a preparação do meio celular usado nas fermentações, pode-se observar as etapas realizadas para o *Penicillium sp.* LAMAI 505 a exemplo.

Figura 15 – Representação esquemática do ajuste de concentração de fungo na FES



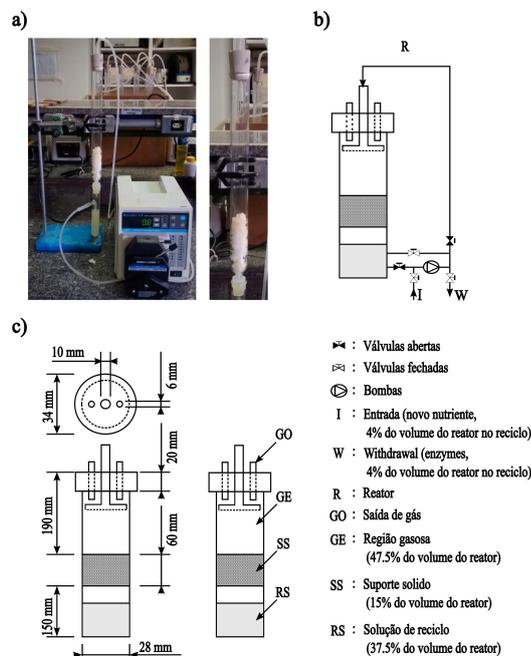
Os microrganismos produtores de L-asparaginase em FES foram os fungos *Penicillium sp.* LAMAI 505, *Fusarium sp.* e *Aspergillus sp.* obtidos do Centro de Recursos Microbianos do Instituto de Biotecnologia da UNESP (CRM - UNESP). O fungo foi mantido em meio nutritivo Czapek (25 °C, 72h), contendo em g/L:  $NaNO_3$ , 2,0;  $K_2HPO_4$ , 1,0;  $MgSO_4$ , 0,5;  $KCl$ , 0,5;  $FeSO_4$ , 0,01; Sacarose 30,0; e Agar, 20,0. Após o tempo de crescimento as células fúngicas foram transferidas para um reator cônico agitado (48h, 150 rpm) com 100 mL de solução nutritiva Czapek. Em todas as FES o substrato foi inoculado com esporos fúngicos ressuspensos em meio nutritivo com concentrações de células ajustadas para  $10^6$  esporos/mL pela metodologia espectrofotométrica, conforme descrito por Aberkane et al. (2002) e Espinel-Ingroff e Kerkerling (1991). Resumidamente, as células centrifugadas colhidas dos meios

fermentados foram ressuspensas em novos meios para produzir  $10^6$  esporos/mL, onde o ajuste da concentração foi obtido usando uma curva de calibração ajustada que forneceu correlação direta entre os valores de absorvância a 530 nm e a concentração de fungos.

### 3.3 MRIC

A Figura 16 mostra a unidade experimental do reator MRIC (Fig. 16.a), a representação esquemática do reator e o sistema de reciclo de nutriente, entrada de nutriente e retirada parcial de produto (Fig. 16.b) e as dimensões características (Fig. 16.c).

Figura 16 – Imagem da unidade experimental, desenho esquemático e caracterização do novo reator MRIC



Nota: As unidades das regiões SS e RS são gramas (g) e mililitro (mL), respectivamente.

O novo reator MRIC está acoplado ao sistema com válvulas e bombas para garantir a movimentação da solução de reciclo (RS), ao suporte sólido inerte de espuma de poliuretano (SS), região gasosa (GE) e saída de gás superior (GO). Além disso a Figura 16 mostra a entrada de novo meio líquido nutritivo (I) e a retirada parcial de produto (W).

#### 3.3.1 Fermentações usando o MRIC em FES

A Tabela 9 mostra as condições experimentais em 37 ensaios avaliando meio nutritivo, pH, tempo de residência e de fermentação.

Tabela 9 – Produção de L-asparaginase em FES realizados usando o reator MRIC

| Ensaio | L-asparagina (g/L) | Glicose (g/L) | pH  | Tempo de residência (min) | Tempo de fermentação (h) |
|--------|--------------------|---------------|-----|---------------------------|--------------------------|
| 1      | 5,0                | 4,0           | 6,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 2      | 13,0               | 4,0           | 6,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 3      | 5,0                | 8,0           | 6,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 4      | 13,0               | 8,0           | 6,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 5      | 5,0                | 4,0           | 8,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 6      | 13,0               | 4,0           | 8,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 7      | 5,0                | 8,0           | 8,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 8      | 13,0               | 8,0           | 8,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 9      | 5,0                | 4,0           | 6,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 10     | 13,0               | 4,0           | 6,0 | 5,3                       | 48,0                     |
| 11     | 5,0                | 8,0           | 6,0 | 5,3                       | 48,0                     |
| 12     | 13,0               | 8,0           | 6,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 13     | 5,0                | 4,0           | 8,0 | 5,3                       | 48,0                     |
| 14     | 13,0               | 4,0           | 8,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 15     | 5,0                | 8,0           | 8,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 16     | 13,0               | 8,0           | 8,0 | 5,3                       | 48,0                     |
| 17     | 1,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 18     | 17,0               | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 19     | 9,0                | 2,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 20     | 9,0                | 10,0          | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 21     | 9,0                | 6,0           | 5,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 22     | 9,0                | 6,0           | 9,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 23     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 36,9                      | 36,0                     |
| 24     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 4,1                       | 36,0                     |
| 25     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 12,0                     |
| 26     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 60,0                     |
| 27     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 28     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 29     | 9,0                | 6,0           | 7,0 | 7,4                       | 36,0                     |
| 30     | 0,0                | 4,0           | 6,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 31     | 0,0                | 8,0           | 6,0 | 12,3                      | 24,0                     |
| 32     | 0,0                | 4,0           | 6,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 33     | 0,0                | 8,0           | 6,0 | 5,3                       | 24,0                     |
| 34     | 0,0                | 4,0           | 6,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 35     | 0,0                | 8,0           | 6,0 | 12,3                      | 48,0                     |
| 36     | 0,0                | 4,0           | 6,0 | 5,3                       | 48,0                     |
| 37     | 0,0                | 8,0           | 6,0 | 5,3                       | 48,0                     |

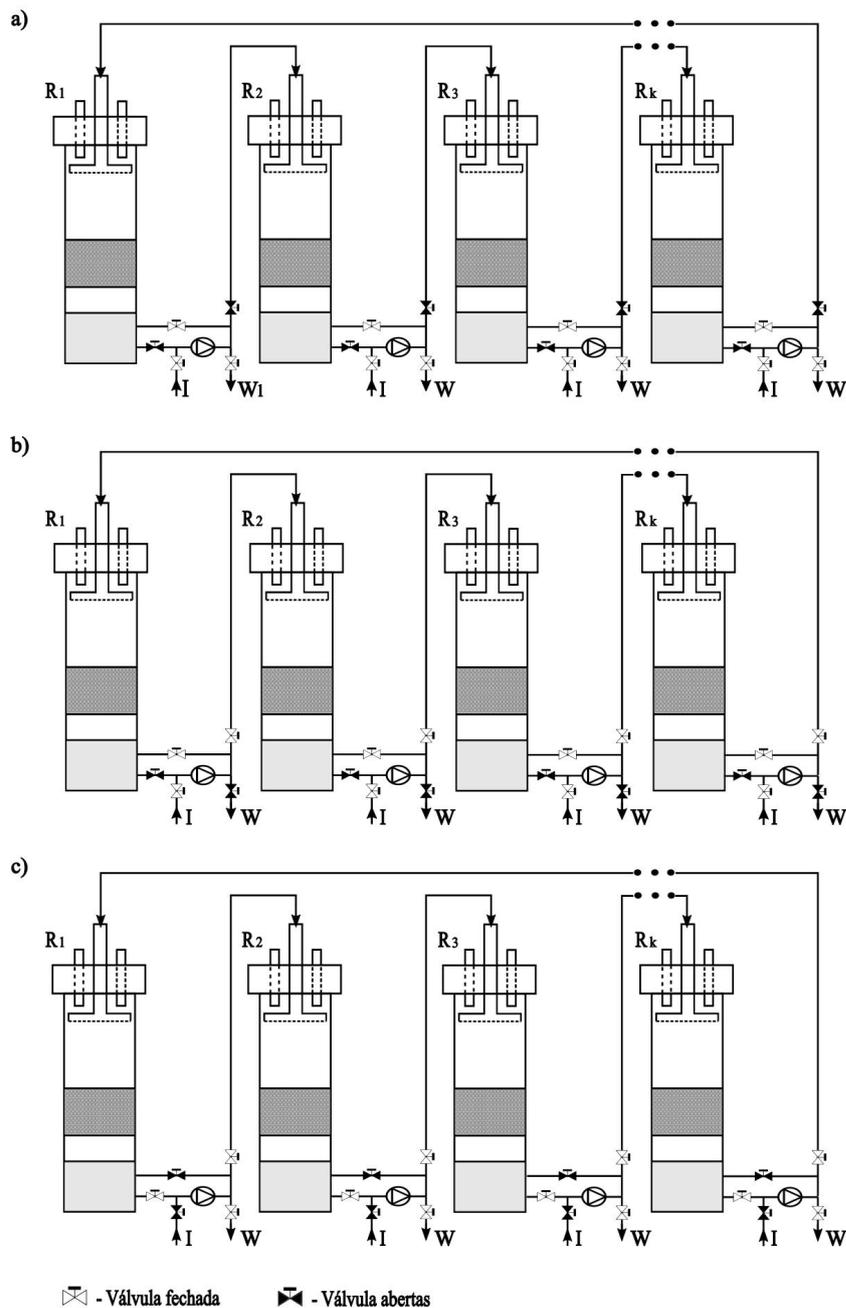
Nota: Todos os ensaios foram realizados em triplicata ( $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ )

Nesta etapa de ensaios experimentais foram considerado a ausência de L-asparagina em algumas condições, buscando avaliar a capacidade o fungo *Penicillium sp.* LAMAI 505 de produzir a L-asparaginase sem a presença de L-asparagina no meio de fermentação.

### 3.4 Sistema com múltiplos reatores (MRICs)

Processo de fermentação em estado sólido (FES) usando múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs) com espuma de poliuretano como suporte inerte pode ser representado esquematicamente na Figura 17.

Figura 17 – Diferentes modos de operação são descritos a seguir: a) reciclagem de nutrientes, b) retirada intermitente de produto e c) adição intermitente de nutrientes.



Nota: O suporte inerte usado foi a espuma de poliuretano comercial em cúbico (dentro de 0,5 mm da borda, densidade 20 kg/m<sup>3</sup>, diâmetro de poro médio 281,89 μm).

O sistema de biorreator consiste em reatores modulares de 0,24 L associados feitos de vidro. Cada reator é equipado com bomba peristáltica (Masterflex L/S, modelo 7519-20), controle de temperatura e válvulas para operação no reciclado (Figura 17.a), modos de retirada de produto (Fig. 17.b) e de adição de nutrientes (Fig. 17.c).

### 3.4.1 Otimização do número de reatores no sistema MRICs

O número de reatores utilizados no sistema MRICs foi selecionado comparando-se os resultados obtidos em estudos com números variáveis de reatores (dois até cinco reatores) em ensaios utilizando meios nutritivos otimizados para um reator MRIC (item 3.3.1).

### 3.4.2 Otimização das condições operacionais e composição de nutrientes em MRICs

O modelo RNA foi usado para otimizar a atividade da L-asparaginase em um sistema MRICs com um número fixo de reatores (obtido conforme descrito na seção 3.4.1). Uma RNA de retro-propagação do tipo feedforward foi implementada com a caixa de ferramentas AMORE na linguagem R (<http://cran.r-project.org/web/packages/AMORE>) (HAYKIN, 2009). O modelo de RNA foi obtido em 29 condições diferentes refletindo variações no nível de pH (pH), tempo de residência (TR), tempo de fermentação (TF) e concentração de glicose e L-asparagina, (Glic e ASN, respectivamente). Os intervalos experimentais para as variáveis são apresentados na Tabela 14. Durante o ajuste do modelo de RNA, o número de neurônios ocultos foi avaliado usando a raiz quadrada do erro médio (RMSE, Equação 3.1 e o coeficiente de determinação ( $R^2$ , Equação 3.2) como segue :

$$RMSE = \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_i^{exp})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_i^{exp})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_m)^2} \quad (3.2)$$

Nas Equações 3.1 e 3.2,  $Y^{calc}$  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.

Tabela 10 – Variáveis e intervalo experimental usados para estudar a fermentação da L-asparaginase em um sistema de múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs).

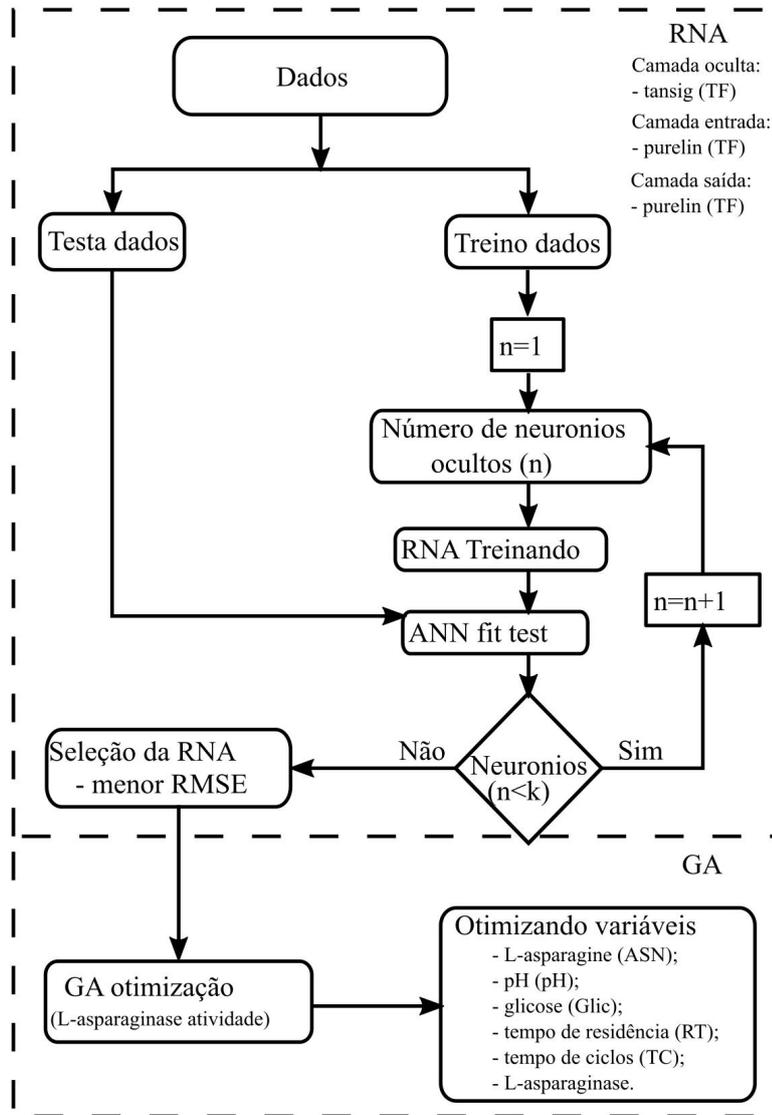
| Testes | Asparagina<br>(g/L) | Glicose<br>(g/L) | pH  | TR<br>(min) | TF<br>(h) |
|--------|---------------------|------------------|-----|-------------|-----------|
| 1      | 5,0                 | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      |
| 2      | 13,0                | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      |
| 3      | 5,0                 | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      |
| 4      | 13,0                | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      |
| 5      | 5,0                 | 4,0              | 8,0 | 12,3        | 24,0      |
| 6      | 13,0                | 4,0              | 8,0 | 12,3        | 48,0      |
| 7      | 5,0                 | 8,0              | 8,0 | 12,3        | 48,0      |
| 8      | 13,0                | 8,0              | 8,0 | 12,3        | 24,0      |
| 9      | 5,0                 | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      |
| 10     | 13,0                | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      |
| 11     | 5,0                 | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      |
| 12     | 13,0                | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      |
| 13     | 5,0                 | 4,0              | 8,0 | 5,3         | 48,0      |
| 14     | 13,0                | 4,0              | 8,0 | 5,3         | 24,0      |
| 15     | 5,0                 | 8,0              | 8,0 | 5,3         | 24,0      |
| 16     | 13,0                | 8,0              | 8,0 | 5,3         | 48,0      |
| 17     | 1,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 18     | 17,0                | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 19     | 9,0                 | 2,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 20     | 9,0                 | 10,0             | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 21     | 9,0                 | 6,0              | 5,0 | 7,4         | 36,0      |
| 22     | 9,0                 | 6,0              | 9,0 | 7,4         | 36,0      |
| 23     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 36,9        | 36,0      |
| 24     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 4,1         | 36,0      |
| 25     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 12,0      |
| 26     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 60,0      |
| 27     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 28     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |
| 29     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      |

Nota: TF, tempo de fermentação; pH valores; TR, tempo de residência, Glic, concentração de glicose; ASN, concentração de L-asparagina. Todas as fermentações nesta etapa foram realizadas na temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

A otimização das condições experimentais de TF, pH, TR, Glic e ASN foi feita usando um algoritmo genético (GA) da biblioteca GA em R (<https://cran.r-project.org/web/packages/GA/>). A Figura 18 mostra as etapas necessárias para obter o número oculto de neurônios no modelo de RNA e otimizar as condições operacionais de produção de L-asparaginase usando FES. Na etapa de modelagem, a otimização do número de neurônios na camada oculta foi realizada usando um conjunto de dados para treinamento e outro para validação. Em relação à etapa de otimização, as condições operacionais e a composição nutricional foram obtidas com a

máxima atividade da L-asparaginase como função objetivo.

Figura 18 – Fluxograma utilizado na modelagem e otimização de sistemas de fermentação em estado sólido (FES) com suporte sólido inerte constituído de poliuretano.



Notas: k = valor máximo dos testes ( $k = 50$ ); RNA, estágio de modelagem de rede neural artificial; GA, etapa de aplicação do método do algoritmo genético; TF, função de transferência; RMSE, raiz quadrada média do erro; Dados, atividade da L-asparaginase para diferentes valores de concentração de glicose e asparagina, valores de pH, tempo de residência e tempo de fermentação; dados de teste e treinamento: 20% e 80% dos dados, respectivamente.

### 3.4.3 Estratégias de otimização para extração de L-asparaginase e adição de nutrientes

Nesta etapa, Os ensaios experimentais foram realizados considerando os melhores resultados obtidos em etapas anteriores de otimização de meio nutritivo e condições operaci-

onais. A Tabela 11 mostra as oito diferentes estratégias utilizadas na operação dos MRICs com 4 reatores (E<sub>1</sub>-E<sub>8</sub>) com a retirada parcial do produto e a adição de uma nova solução nutritiva ocorrendo após os tempos de ciclos (TC) de 24 e 48 horas de operação. A cada ciclo, o MRICs trabalha com a retirada do produto e a adição de nutrientes ocorrendo de forma intermitente através da troca de válvulas que regulam o abastecimento da bomba com uma vazão que garante tempo de residência. Durante um ciclo de operação em tempo fixo (TC fixo), a adição de novos nutrientes (I) e a retirada de enzimas (W) são realizadas sequencialmente.

Tabela 11 – Oito estratégias diferentes para operação de múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs) utilizando quatro reatores (o número ideal de reatores foi selecionado previamente).

| Reatores       | Estratégias    |                |                |                |                |                |                |                |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                | E <sub>1</sub> | E <sub>2</sub> | E <sub>3</sub> | E <sub>4</sub> | E <sub>5</sub> | E <sub>6</sub> | E <sub>7</sub> | E <sub>8</sub> |
| R <sub>1</sub> | NW             | W              | W              | NW             | W              | NW             | NW             | NW             |
| R <sub>2</sub> | W              | NW             | NW             | W              | NW             | W              | NW             | NW             |
| R <sub>3</sub> | NW             | W              | NW             | W              | NW             | NW             | W              | NW             |
| R <sub>4</sub> | W              | NW             | W              | NW             | NW             | NW             | NW             | W              |

Notas: W, retirada em ciclo; NW, sem retirada no ciclo; E<sub>1</sub>-E<sub>8</sub>, diferentes estratégias utilizadas para TC (Tempo entre cada ciclo de fermentação) de 24h e 48h.

#### 3.4.4 Avaliação de sistemas MRICs sob diferentes condições de produção

O novo sistema MRICs foi avaliado com condições otimizadas para *Penicillium sp.* LAMAI 505 usando a operação de longo prazo (24 ciclos com TC correspondendo ao melhor valor obtido na seção 3.4.2) e com fermentações usando diferentes microrganismos (*Aspergillus terreus* e *Fusarium sp.*) Para produzir L-asparaginase e protease. As fermentações realizadas com microrganismos diferentes de *Penicillium* no sistema MRICs foi avaliado durante 8 ciclos com o mesmo TC usado em operação de longo prazo de operação de produção de L-asparaginase.

### 3.5 Método analítico de determinação de L-asparaginase

A atividade enzimática da L-asparaginase foi avaliada em ensaios utilizando hidroxilamina como descrito por (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). Nestes ensaios, 0,1 mL de amostra de enzima misturada em 1,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,6, 20 mM) contendo L-asparagina (10 mM) e hidroxilamina (100 mM) foi incubada durante 30 minutos.

A reação foi terminada com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico (10 %) num meio contendo ácido tricloroacético (5 %) e ácido clorídrico (0,66 M). O meio foi centrifugado (10000g, Avanti J-26XP Series), em seguida o conteúdo de ácido  $\beta$ -hidroxílico foi obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240, Shimadzu).

A atividade enzimática foi definida em unidades (U), correspondendo cada unidade a 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de ácido  $\beta$ -hidroxílico produzido e a atividade calculada como mostra a Equação 3.3. A atividade específica foi definida em termos de unidades de L-asparaginase por mg de proteína determinada pelo método de Lowry.

$$\lambda \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{\delta \times Vol_{Ext} \times F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta \times m_{Sólido}} \quad (3.3)$$

Sendo que  $\lambda$  representa a atividade em U/g (Unidade por grama de suporte sólido) calculada pela Equação 3.3,  $\delta$  é a leitura de absorvância 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,  $\theta$  representa o tempo de incubação e o  $m_{Sólido}$  é a massa de suporte sólido utilizada na FES.

## 3.6 Resultados

### 3.6.1 Otimização da produção de L-asparaginase no MRIC

A Figura 19 e a Tabela 12 mostram os resultados experimentais e os resultados obtidos pelo RNA com 10 neurônios na camada oculta. Pode-se observar que o modelo de RNA representa satisfatoriamente a FES utilizando o MRIC com suporte sólido inerte de espuma de poliuretano, com erros menores que 1,82% e coeficientes de correlação maiores que 0,96 (treinamento e teste  $R^2$ , respectivamente, 0,98 e 0,96).

O modelo de RNA obtido pela modelagem dos dados apresentados na Tabela 12 foi otimizado pelo método GA, obtendo-se os resultados de concentração de L-asparagina, 9,83 (g/L), concentração de glicose, 2,05 (g/L), pH, 5,20, tempo de residência, 34,52 (min), tempo de fermentação, 45,07 (h) e atividade da L-asparaginase, 7.61 U/g (36,10 U/mg de proteína), com erro inferior a 3,2%.

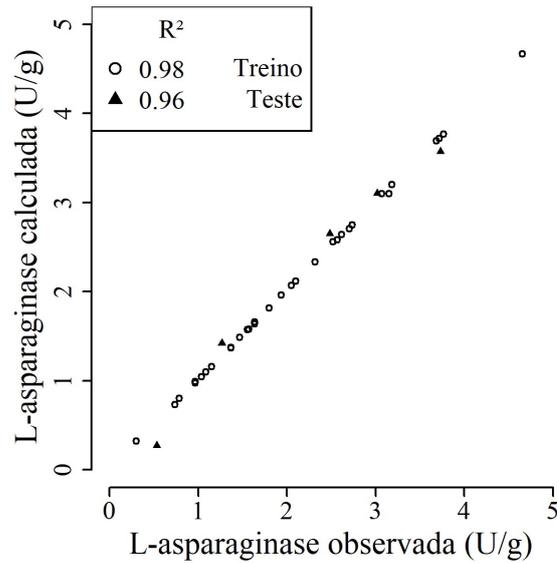
A produção de L-asparaginase obtida a partir do MRIC é promissora quando comparada a outras FES de autores que utilizam outros suportes sólidos para produzir a mesma enzima. Mohan Kumar e Manonmani (2013) e colaboradores usando *Cladosporium sp.* em FES de farelo de trigo encontraram atividade de 10,82 U/mg de proteína em condições otimizadas em 96h, Meghavarnam e Janakiraman (2017) em FES com *Fusarium culmorum* (ASP-87) encontraram atividade de 1,3 U/g na biomassa de arroz.

Tabela 12 – Resultados da FES usando MRIC na produção de L-asparaginase

| Testes | Asparagina<br>(g/L) | Glicose<br>(g/L) | pH  | TR<br>(min) | TF<br>(h) | L-asparaginase (U/g) |           | Erro<br>(%) |
|--------|---------------------|------------------|-----|-------------|-----------|----------------------|-----------|-------------|
|        |                     |                  |     |             |           | Observado            | Calculado |             |
| 1      | 5,0                 | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      | 4,65                 | 4,64      | 0,2         |
| 2      | 13,0                | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      | 1,46                 | 1,47      | 0,6         |
| 3      | 5,0                 | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      | 2,61                 | 2,62      | 0,4         |
| 4      | 13,0                | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      | 3,68                 | 2,68      | 0,1         |
| 5      | 5,0                 | 4,0              | 8,0 | 12,3        | 24,0      | 1,08                 | 1,09      | 0,9         |
| 6      | 13,0                | 4,0              | 8,0 | 12,3        | 48,0      | 2,56                 | 2,57      | 0,4         |
| 7      | 5,0                 | 8,0              | 8,0 | 12,3        | 48,0      | 2,48                 | 2,51      | 1,2         |
| 8      | 13,0                | 8,0              | 8,0 | 12,3        | 24,0      | 1,15                 | 1,15      | 0,1         |
| 9      | 5,0                 | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      | 0,73                 | 0,74      | 1,4         |
| 10     | 13,0                | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      | 2,05                 | 2,06      | 0,5         |
| 11     | 5,0                 | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      | 1,93                 | 1,94      | 0,5         |
| 12     | 13,0                | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      | 0,78                 | 0,78      | 0,1         |
| 13     | 5,0                 | 4,0              | 8,0 | 5,3         | 48,0      | 1,56                 | 1,57      | 0,3         |
| 14     | 13,0                | 4,0              | 8,0 | 5,3         | 24,0      | 1,36                 | 1,36      | 0,1         |
| 15     | 5,0                 | 8,0              | 8,0 | 5,3         | 24,0      | 1,55                 | 1,55      | 0,1         |
| 16     | 13,0                | 8,0              | 8,0 | 5,3         | 48,0      | 2,10                 | 2,11      | 0,2         |
| 17     | 1,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 3,71                 | 3,72      | 0,3         |
| 18     | 17,0                | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 2,69                 | 2,70      | 0,5         |
| 19     | 9,0                 | 2,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 2,51                 | 2,52      | 0,3         |
| 20     | 9,0                 | 10,0             | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 3,73                 | 3,67      | 0,8         |
| 21     | 9,0                 | 6,0              | 5,0 | 7,4         | 36,0      | 3,18                 | 3,18      | 0,1         |
| 22     | 9,0                 | 6,0              | 9,0 | 7,4         | 36,0      | 1,63                 | 1,64      | 0,3         |
| 23     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 36,9        | 36,0      | 3,74                 | 3,77      | 0,6         |
| 24     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 4,1         | 36,0      | 1,64                 | 1,65      | 0,4         |
| 25     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 12,0      | 2,73                 | 2,73      | 0,1         |
| 26     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 60,0      | 2,31                 | 2,32      | 0,2         |
| 27     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 3,02                 | 3,01      | 0,2         |
| 28     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 3,07                 | 3,04      | 0,5         |
| 29     | 9,0                 | 6,0              | 7,0 | 7,4         | 36,0      | 3,15                 | 3,15      | 0,1         |
| 30     | 0,0                 | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      | 0,53                 | 0,60      | 3,2         |
| 31     | 0,0                 | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 24,0      | 1,26                 | 1,20      | 1,5         |
| 32     | 0,0                 | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      | 0,30                 | 0,30      | 0,1         |
| 33     | 0,0                 | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 24,0      | 0,96                 | 0,97      | 0,9         |
| 34     | 0,0                 | 4,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      | 1,36                 | 1,36      | 0,1         |
| 35     | 0,0                 | 8,0              | 6,0 | 12,3        | 48,0      | 1,80                 | 1,80      | 0,1         |
| 36     | 0,0                 | 4,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      | 0,97                 | 0,96      | 0,9         |
| 37     | 0,0                 | 8,0              | 6,0 | 5,3         | 48,0      | 1,03                 | 1,04      | 1,1         |

Nota: Os dados para teste e treinamento da RNA correspondem a 20% e 80% dos dados, respectivamente. Todas as fermentações foram realizadas a temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

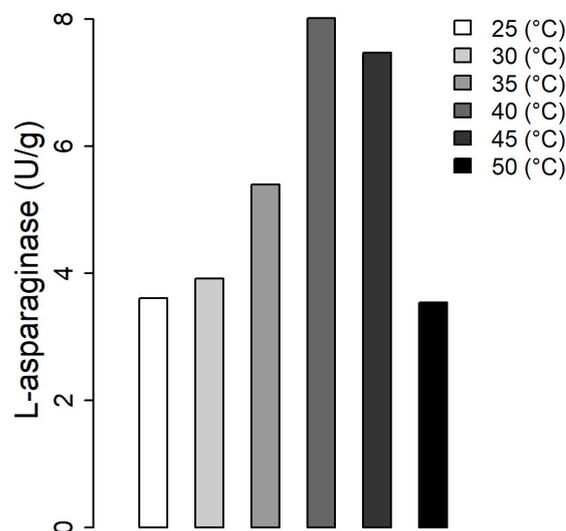
Figura 19 – Ajuste da RNA obtido para a produção de L-asparaginase em FES usando MRIC.



Nota: O RMSE calculado pelo modelo de RNA no ajuste dos dados experimentais foi de 0,088 e a temperatura de fermentação utilizada foi de  $25\text{ °C} \pm 1$ .

A Figura 20 ilustra a influência da temperatura na FES usando MRIC em condições otimizadas. Pode-se observar que a temperatura de  $40\text{ °C} \pm 1$  ( $8,02\text{ U/g}$ ) aumentou a produção de L-asparaginase em 5,3% em relação MRIC otimizado. A literatura apresenta diversos trabalhos de FES com *Penicillium sp.* sob condições de temperatura operacional entre  $30\text{ °C}$  e  $55\text{ °C} (\pm 1)$ . Doriya e Kumar (2018) produtores de L-asparaginase de *Aspergillus tubingensis* pela FES usaram a temperatura otimizada de  $35\text{ °C} \pm 1$ .

Figura 20 – Influência da temperatura em FES com suporte sólido de espuma de poliuretano usando novo biorreator com reciclagem de solução nutritiva.



A composição do meio nutritivo utilizado para otimização do número de reatores do sistema MRICs é apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 – Meio nutritivo e condições operacionais utilizadas para otimização do número de reatores em MRICs.

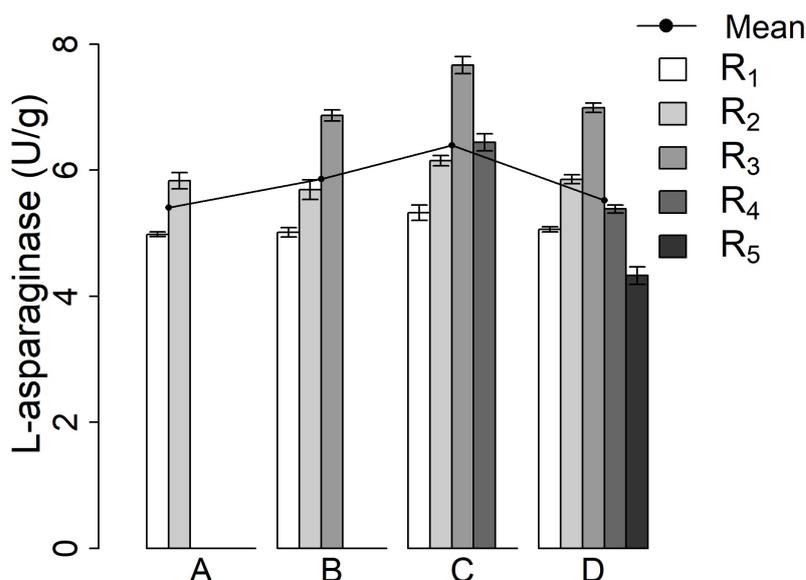
| TF (h) | L-asparagina (g/L) | Glicose (g/L) | CC (esporos/mL) | TR (min) | Solução mineral <sup>a</sup> | L-asparaginase U/g |
|--------|--------------------|---------------|-----------------|----------|------------------------------|--------------------|
| 48,0   | 8,3                | 2,6           | 10 <sup>6</sup> | 4,5      | Sim                          | 8,02               |

Nota: <sup>a</sup>  $NaNO_3$ , 2,0;  $K_2HPO_4$ , 1,0;  $MgSO_4$ , 0,5;  $KCl$ , 0,5;  $FeSO_4$ , 0,01; CC, concentração celular; TR, tempo de residência.

### 3.6.2 Otimização do número de reatores do sistema MRICs e descrição da produção de L-asparaginase com MRICs otimizado

A Figura 21 mostra os resultados da produção de L-asparaginase usando um sistema MRICs considerando de dois a cinco reatores, com extração do produto ocorrendo após 48 h. As condições ótimas para o rendimento da L-asparaginase foram obtidas utilizando quatro reatores em série, que corresponderam a uma atividade enzimática média de 6,4 U/g (atividade específica de 29,45 U/mg de proteína). Com base nesses resultados, o uso de quatro reatores em MRICs foi selecionado para experimentos subsequentes.

Figura 21 – Atividade da L-asparaginase em múltiplos reatores com células imobilizadas (MRICs) submetidos à reciclagem do meio nutriente por 48 h.



Nota: A, B, C e D representam o sistema com MRICs consistindo de 2, 3, 4 e 5 reatores, respectivamente; R<sub>1</sub> a R<sub>5</sub> são os reatores de reciclagem dos nutrientes. Os pontos representam valores médios de atividade enzimática da L-asparaginase/reator em sistemas MRICs.

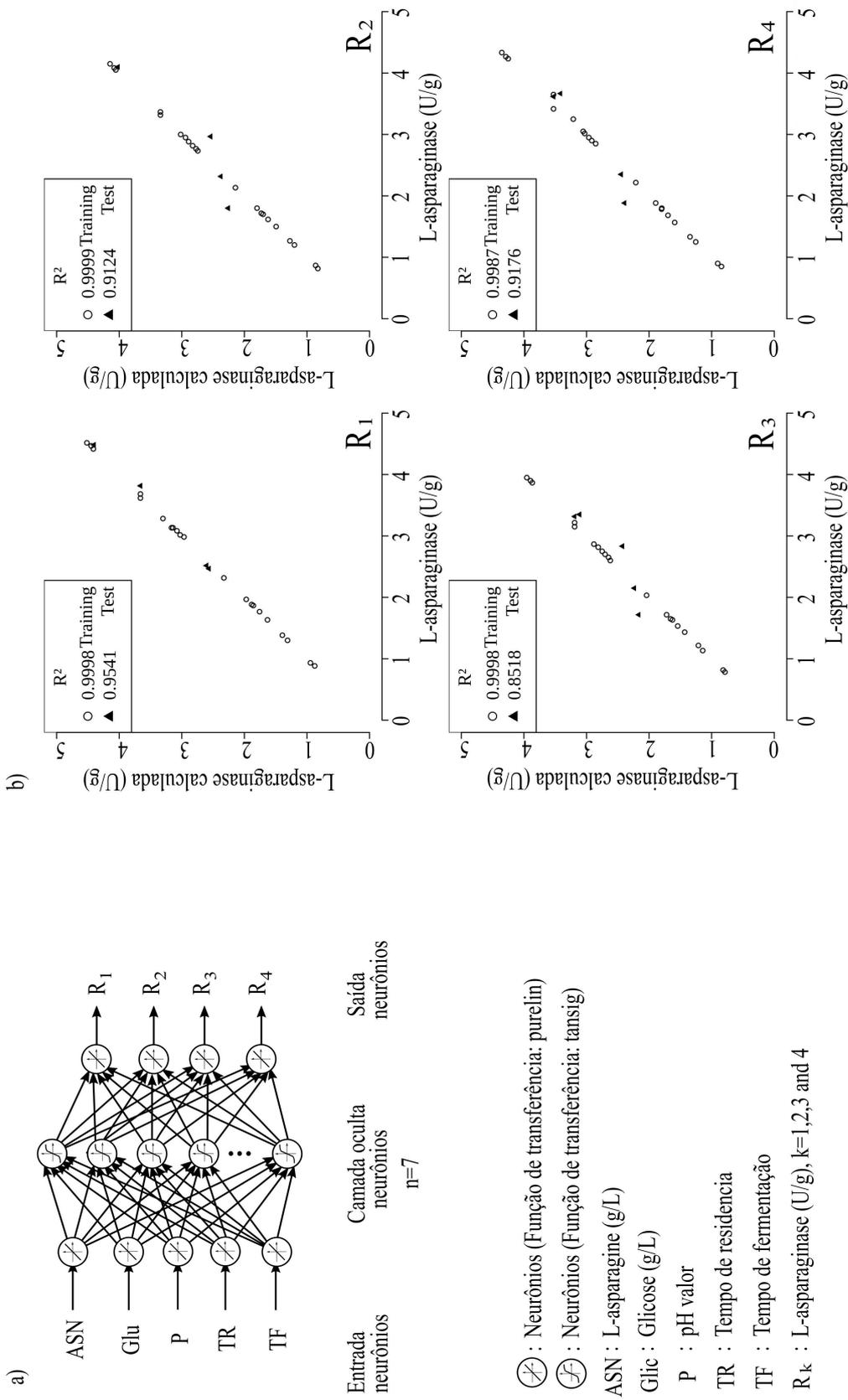
A Tabela 14 e a Figura 22 mostram os resultados da atividade da L-asparaginase obtidos usando um modelo de RNA com sete neurônios na camada oculta (melhor RNA selecionada para descrever a MRICs com quatro reatores).

O modelo RNA prevê de forma satisfatória o FES usando os MRICs com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,85 (Figura 22) e uma taxa de erro inferior a 2,4% (Tabela 14). Embora o sistema MRICs com quatro reatores seja um sistema complexo, o modelo RNA foi capaz de descrever a atividade da L-asparaginase com diferentes entradas de pH, tempo de fermentação (TF), tempo de residência (TR), concentração de L-asparagina (ASN) e concentração de glicose (Glic). Uma boa descrição do sistema por RNA é importante para encontrar condições otimizadas. De acordo com os resultados da Tabela 14, os maiores valores de atividade não correspondem às maiores concentrações de glicose e L-asparagina. A atividade ótima de L-asparaginase de 4,5 U/g ocorreu em experimentos realizados com pH de 6,0 e concentrações de glicose e L-asparagina menores que 7,0 g/L e 10,0 g/L, respectivamente, como pode ser observado nos experimentos 1 e 23.

Tabela 14 – Resultados experimentais e artificiais da rede neural (RNA) para quatro reatores MRICs usando espuma de poliuretano a 40 ° C.

| N  | ASN (g/L) | GLI (g/L) | pH  | TR (min) | TF (h) | L-asparaginase (U/g) |      |      |             |      |      |             |      |      |             |      |      |
|----|-----------|-----------|-----|----------|--------|----------------------|------|------|-------------|------|------|-------------|------|------|-------------|------|------|
|    |           |           |     |          |        | Obs                  | Calc | E    | Obs         | Calc | E    | Obs         | Calc | E    |             |      |      |
| 1  | 5,0       | 4,0       | 6,0 | 12,3     | 48     | 5,58 ± 0,05          | 5,57 | 0,19 | 4,88 ± 0,04 | 4,88 | 0,00 | 5,11 ± 0,05 | 5,11 | 0,05 | 5,35 ± 0,03 | 5,35 | 0,13 |
| 2  | 13,0      | 4,0       | 6,0 | 12,3     | 24     | 1,76 ± 0,02          | 1,75 | 0,64 | 1,53 ± 0,01 | 1,53 | 0,33 | 1,61 ± 0,05 | 1,61 | 0,14 | 1,68 ± 0,05 | 1,69 | 0,44 |
| 3  | 5,0       | 8,0       | 6,0 | 12,3     | 24     | 3,13 ± 0,01          | 3,14 | 0,30 | 2,75 ± 0,01 | 2,74 | 0,28 | 2,88 ± 0,09 | 2,87 | 0,15 | 3,01 ± 0,01 | 3,02 | 0,14 |
| 4  | 13,0      | 8,0       | 6,0 | 12,3     | 48     | 4,41 ± 0,01          | 4,48 | 1,44 | 3,86 ± 0,02 | 3,88 | 0,37 | 4,06 ± 0,01 | 4,05 | 0,22 | 4,23 ± 0,03 | 4,20 | 0,64 |
| 5  | 5,0       | 4,0       | 8,0 | 12,3     | 24     | 1,30 ± 0,05          | 1,32 | 1,55 | 1,13 ± 0,03 | 1,15 | 1,48 | 1,21 ± 0,02 | 1,20 | 0,09 | 1,25 ± 0,05 | 1,23 | 1,19 |
| 6  | 13,0      | 4,0       | 8,0 | 12,3     | 48     | 3,08 ± 0,05          | 3,06 | 0,68 | 2,70 ± 0,03 | 2,69 | 0,11 | 2,81 ± 0,02 | 2,82 | 0,21 | 2,95 ± 0,01 | 2,94 | 0,02 |
| 7  | 5,0       | 8,0       | 8,0 | 12,3     | 48     | 2,98 ± 0,04          | 2,95 | 0,88 | 2,60 ± 0,05 | 2,59 | 0,06 | 2,73 ± 0,01 | 2,72 | 0,41 | 2,85 ± 0,02 | 2,82 | 1,03 |
| 8  | 13,0      | 8,0       | 8,0 | 12,3     | 24     | 1,38 ± 0,04          | 1,37 | 0,84 | 1,21 ± 0,02 | 1,20 | 1,31 | 1,26 ± 0,01 | 1,26 | 0,51 | 1,33 ± 0,03 | 1,32 | 0,45 |
| 9  | 5,0       | 4,0       | 6,0 | 5,3      | 24     | 0,88 ± 0,10          | 0,87 | 0,46 | 0,78 ± 0,05 | 0,77 | 1,48 | 0,81 ± 0,09 | 0,80 | 1,04 | 0,85 ± 0,03 | 0,83 | 2,35 |
| 10 | 13,0      | 4,0       | 6,0 | 5,3      | 48     | 2,46 ± 0,01          | 2,43 | 1,26 | 2,15 ± 0,07 | 2,14 | 0,21 | 2,25 ± 0,09 | 2,24 | 0,13 | 2,35 ± 0,04 | 2,33 | 0,57 |
| 11 | 5,0       | 8,0       | 6,0 | 5,3      | 48     | 2,31 ± 0,05          | 2,31 | 0,19 | 2,03 ± 0,08 | 2,03 | 0,27 | 2,13 ± 0,07 | 2,14 | 0,19 | 2,21 ± 0,07 | 2,20 | 0,56 |
| 12 | 13,0      | 8,0       | 6,0 | 5,3      | 24     | 0,93 ± 0,07          | 0,92 | 0,74 | 0,81 ± 0,09 | 0,81 | 0,00 | 0,86 ± 0,09 | 0,86 | 0,55 | 0,90 ± 0,08 | 0,91 | 1,27 |
| 13 | 5,0       | 4,0       | 8,0 | 5,3      | 48     | 1,88 ± 0,06          | 1,86 | 0,87 | 1,65 ± 0,09 | 1,65 | 0,45 | 1,71 ± 0,09 | 1,73 | 0,94 | 1,80 ± 0,09 | 1,78 | 0,57 |
| 14 | 13,0      | 4,0       | 8,0 | 5,3      | 24     | 1,63 ± 0,05          | 1,62 | 0,53 | 1,43 ± 0,05 | 1,41 | 1,57 | 1,50 ± 0,05 | 1,47 | 1,72 | 1,56 ± 0,09 | 1,55 | 0,61 |
| 15 | 5,0       | 8,0       | 8,0 | 5,3      | 24     | 1,86 ± 0,05          | 1,86 | 0,13 | 1,63 ± 0,02 | 1,62 | 0,55 | 1,70 ± 0,03 | 1,69 | 0,25 | 1,78 ± 0,09 | 1,79 | 0,93 |
| 16 | 13,0      | 8,0       | 8,0 | 5,3      | 48     | 2,51 ± 0,08          | 2,49 | 0,71 | 2,20 ± 0,01 | 2,21 | 0,55 | 2,31 ± 0,03 | 2,33 | 0,15 | 2,41 ± 0,05 | 2,42 | 0,27 |
| 17 | 1,0       | 6,0       | 7,0 | 7,4      | 36     | 4,46 ± 0,02          | 4,45 | 0,32 | 3,90 ± 0,01 | 3,89 | 0,14 | 4,08 ± 0,01 | 4,07 | 0,19 | 4,26 ± 0,01 | 4,27 | 0,30 |
| 18 | 17,0      | 6,0       | 7,0 | 7,4      | 36     | 3,23 ± 0,03          | 3,25 | 0,53 | 2,83 ± 0,03 | 2,83 | 0,21 | 2,96 ± 0,02 | 2,96 | 0,19 | 3,10 ± 0,05 | 3,10 | 0,07 |
| 19 | 9,0       | 2,0       | 7,0 | 7,4      | 36     | 3,01 ± 0,05          | 3,02 | 0,39 | 2,65 ± 0,01 | 2,64 | 0,21 | 2,76 ± 0,01 | 2,76 | 0,02 | 2,90 ± 0,05 | 2,89 | 0,20 |
| 20 | 9,0       | 10,0      | 7,0 | 7,4      | 36     | 4,48 ± 0,01          | 4,48 | 0,04 | 3,91 ± 0,02 | 3,96 | 1,12 | 4,10 ± 0,03 | 4,09 | 0,09 | 4,30 ± 0,01 | 4,31 | 0,24 |
| 21 | 9,0       | 6,0       | 5,0 | 7,4      | 36     | 3,81 ± 0,05          | 3,79 | 0,45 | 3,35 ± 0,03 | 3,32 | 0,62 | 3,50 ± 0,05 | 3,49 | 0,23 | 3,66 ± 0,01 | 3,66 | 0,06 |
| 22 | 9,0       | 6,0       | 9,0 | 7,4      | 36     | 1,96 ± 0,09          | 1,96 | 0,03 | 1,71 ± 0,05 | 1,72 | 0,39 | 1,80 ± 0,05 | 1,79 | 0,04 | 1,88 ± 0,03 | 1,87 | 0,34 |
| 23 | 9,0       | 6,0       | 7,0 | 36,9     | 36     | 4,51 ± 0,10          | 4,51 | 0,04 | 3,95 ± 0,01 | 3,95 | 0,05 | 4,15 ± 0,02 | 4,14 | 0,22 | 4,33 ± 0,05 | 4,34 | 0,19 |
| 24 | 9,0       | 6,0       | 7,0 | 4,1      | 36     | 1,96 ± 0,01          | 1,96 | 0,11 | 1,71 ± 0,03 | 1,72 | 0,17 | 1,80 ± 0,01 | 1,79 | 0,09 | 1,88 ± 0,05 | 1,88 | 0,02 |
| 25 | 9,0       | 6,0       | 7,0 | 7,4      | 12     | 3,28 ± 0,05          | 3,29 | 0,29 | 2,86 ± 0,01 | 2,87 | 0,41 | 3,00 ± 0,06 | 3,01 | 0,56 | 3,25 ± 0,05 | 3,24 | 0,29 |
| 26 | 9,0       | 6,0       | 7,0 | 7,4      | 60     | 3,13 ± 0,04          | 3,13 | 0,15 | 2,81 ± 0,06 | 2,80 | 0,54 | 2,55 ± 0,01 | 2,53 | 0,60 | 3,05 ± 0,04 | 3,05 | 0,18 |
| 27 | 9,0       | 6,0       | 7,0 | 7,4      | 36     | 3,61 ± 0,02          | 3,62 | 0,22 | 3,15 ± 0,03 | 3,12 | 0,90 | 3,31 ± 0,02 | 3,32 | 0,21 | 3,41 ± 0,01 | 3,42 | 0,14 |

Figura 22 – Diagrama esquemático RNA e resultados experimentais e calculados para o MRICs ( $R_1$  a  $R_4$ ).



Nota: Os resultados dos reatores nas etapas de treinamento (círculo) e teste (triângulo) para MRICs foram obtidos a 40 °C.

### 3.6.3 Otimização da produção de L-asparaginase

A Tabela 15 resume os melhores valores de ASN, Glic, TR, TF e pH para o rendimento máximo de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMI 505 usando três critérios diferentes para otimização da RNA com GA: rendimento médio de L-asparaginase de quatro reatores em MRIC (AvgRea, Tabela 15, item 1), rendimento de L-asparaginase no reator com o maior valor de atividade de L-asparaginase (HiOne, Tabela 15, linha 2) e rendimento de L-asparaginase no reator com a atividade mais baixa (ImpLow, Tabela 15, linha 3).

Também são apresentados na Tabela 15 os resultados da validação experimental obtidos usando as condições ótimas previstas pelo modelo RNA combinado com um GA (RNA-GA) para os três critérios. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 15, os valores estimados obtidos com RNA-GA estão em boa concordância com os resultados experimentais, com erros menores que 1,83%; os três critérios de otimização (AvgRea, HiOne e ImpLow) correspondem a condições semelhantes.

Uma comparação entre os resultados das condições otimizadas descritas na Tabela 15 e os resultados apresentados na Tabela 14 mostra que as condições otimizadas resultam em 1,70 a 2,11 vezes mais atividade. A comparação também mostra que o consumo de L-asparagina e glicose pode ser reduzido em até 4,17 e 1,33 vezes, respectivamente (ver Experimento 1 na Tabela 14). Duas razões possíveis para a menor necessidade de glicose e L-asparagina são 1) o efeito de inibição associado aos produtos catabólicos do metabolismo da glicose e L-asparagina e 2) a necessidade de equilíbrio entre as fontes de carbono e nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com o critério AvgRea; assim, as condições obtidas usando AvgRea foram escolhidas para as etapas subsequentes.

Tabela 15 – Produção otimizada de L-asparaginase em fermentação em estado sólido (FES) usando sistemas de reatores múltiplos com células imobilizadas (MRICs).

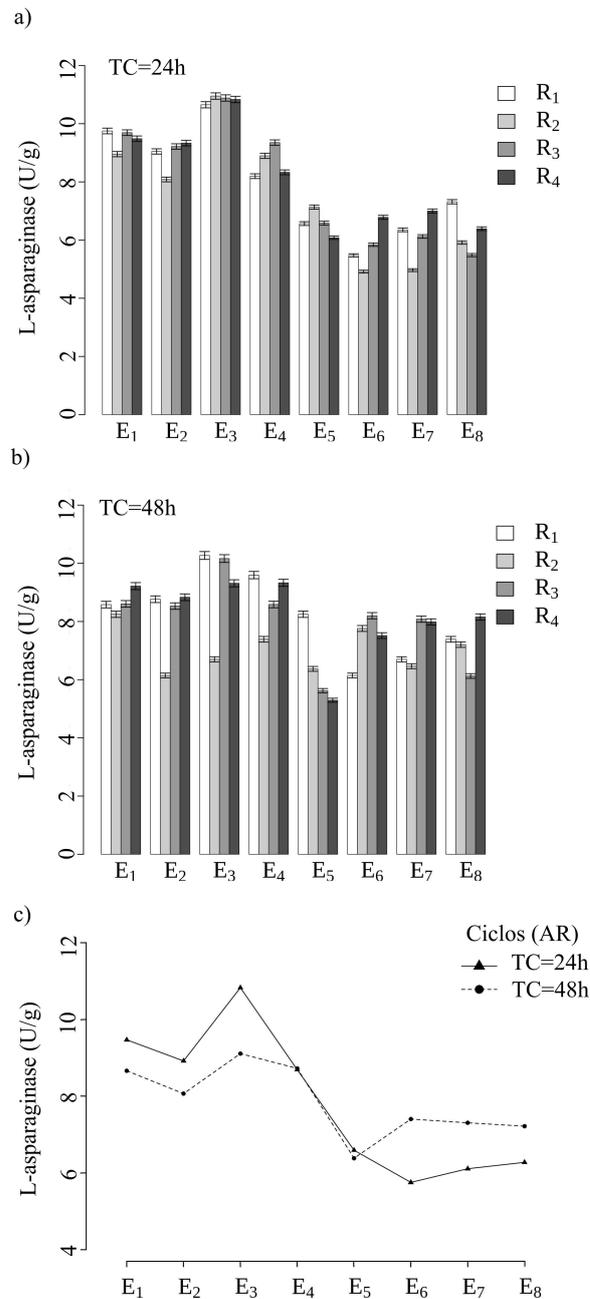
| C | ASN<br>(g/L) | Glic<br>(g/L) | pH  | TR<br>(min) | TF<br>(h) | TD | L-asparaginase (U/g) |                |                |                | E   |
|---|--------------|---------------|-----|-------------|-----------|----|----------------------|----------------|----------------|----------------|-----|
|   |              |               |     |             |           |    | R <sub>1</sub>       | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |     |
| 1 | 1,2          | 3,0           | 5,1 | 33,5        | 48,3      | E  | 9,5 ± 0,02           | 8,3 ± 0,02     | 8,7 ± 0,06     | 9,2 ± 0,05     | 0,3 |
|   |              |               |     |             |           | S  | 9,5                  | 8,3            | 8,7            | 9,2            |     |
| 2 | 1,1          | 2,9           | 5,2 | 33,5        | 48,1      | E  | 9,4 ± 0,03           | 8,3 ± 0,01     | 8,7 ± 0,05     | 9,1 ± 0,05     | 1,8 |
|   |              |               |     |             |           | S  | 9,3                  | 8,2            | 8,6            | 9,1            |     |
| 3 | 1,2          | 2,6           | 5,2 | 30,5        | 47,6      | E  | 9,4 ± 0,01           | 8,2 ± 0,03     | 8,6 ± 0,04     | 9,1 ± 0,05     | 0,3 |
|   |              |               |     |             |           | S  | 9,4                  | 8,1            | 8,6            | 9,1            |     |

Nota: Notas: um erro relativo máximo; 1 – AvgRea, produção média de um sistema com MRICs; 2 – HiOne, melhor desempenho do reator em MRICs com a maior produção; 3 – ImpLow, melhor desempenho do reator em MRICs com a atividade mais baixa; ASN, concentração de L-asparagina (g/L); Glic, concentração de glicose (g/L); valor de pH (pH); TR, tempo de residência; TF, tempo de fermentação; TD, tipo de dados; C, critérios adotados; E e S, resultados experimentais e simulados, respectivamente.

### 3.6.4 Seleção das estratégias de produção de L-asparaginase em FES contínua com MRICs

A Figura 23 mostra os rendimentos de L-asparaginase em 16 condições experimentais correspondentes a oito estratégias diferentes avaliadas para 24h (TC de 24h, Figura 23.a) e 48h (TC de 48h, Figura 23.b).

Figura 23 – Produção de L-asparaginase em sistemas MRICs com diferentes formas de extração do produto.



Notas: E<sub>1</sub> – E<sub>8</sub> representam os tipos de extrações parciais de produtos com adição de soluções nutritivas; TC - Tempo entre ciclos; AvgRea, produção média de um sistema com MRICs.

Embora o modelo de rede neural artificial associado ao modelo de otimização de algoritmo genético (RNA-GA) tenha previsto as maiores atividades para um tempo de fermentação TF de 48h operando em processo batelada (9,5 U/g), as maiores atividades da L-asparaginase foram observadas para as estratégias E<sub>1</sub> a E<sub>4</sub> no tempo de ciclo de extração TC de 24h em processo de fermentação contínua com rendimento de 11,7 U/g de L-asparaginase.

As menores atividades de L-asparaginase foram observadas para as estratégias E<sub>6</sub> a E<sub>8</sub> com TC de 24h e 48h, considerando que, nestas estratégias a retirada de produto foi realizada em apenas um reator por ciclo de extração de produto, aumentando o tempo de fermentação e o uso dos suportes inertes de PU com células imobilizadas provocando queda de rendimento na produção de L-asparaginase.

Além disso, o modelo de RNA-GA descreve que a maior atividade de L-asparaginase em processo de FES batelada foi a TF de 48h, consistente com os resultados observados nas estratégia E<sub>3</sub> a TC de 24h (Figura 23), e as altas atividades para TC de 24h observadas nas estratégias E<sub>1</sub> a E<sub>3</sub> são consistentes com o fato de que o a retirada parcial do produto influencia no sistema MRICs considerando a produção de L-asparaginase, aumentando o rendimento de L-asparaginase no processo contínuo de produção. Com base nesses resultados, a estratégia E<sub>3</sub> foi selecionada para experimentos posteriores de FES contínua.

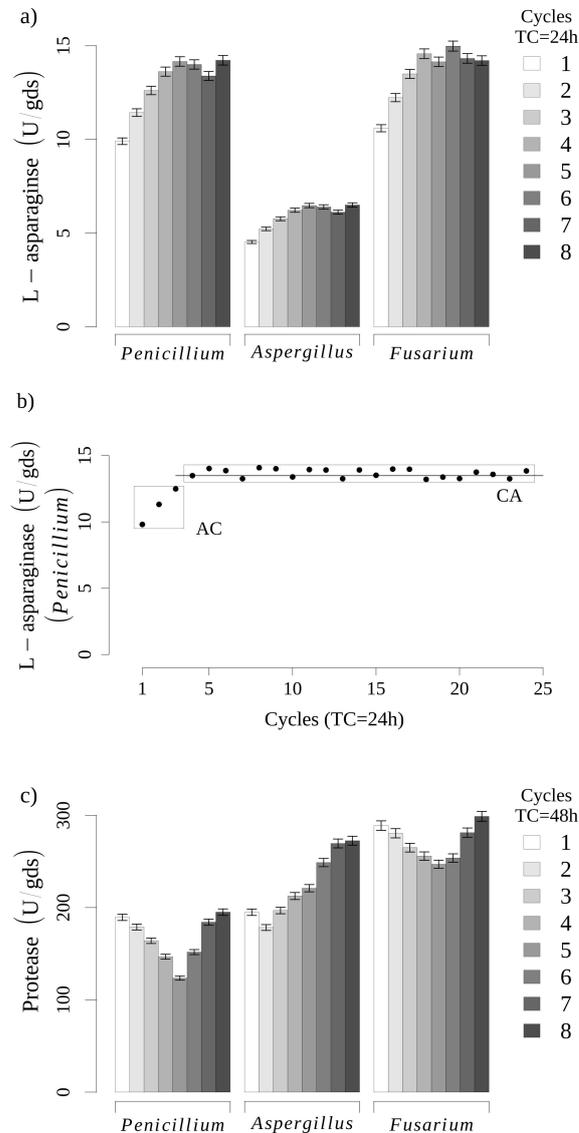
### 3.6.5 Produção de L-asparaginase fúngica em FES ao longo de vários ciclos

A Figura 24 mostra o comportamento cíclico dos MRICs na produção de L-asparaginase e protease. Na Figura 24.a, os rendimentos de L-asparaginase e protease por *Penicillium sp.* LAMAI 505, *Aspergillus terreus* e *Fusarium sp.* são dados.

Monitorar o sistema MRICs para diferentes microrganismos e produtos ao longo de vários ciclos de utilização é importante para avaliar a estabilidade do sistema e a possibilidade de operação em outros processos com outros produtos ou microrganismos. Em relação à atividade da L-asparaginase, pode-se observar que, embora o potencial dos MRICs em produzir L-asparaginase tenha sido avaliado e otimizado para *Penicillium sp.* LAMAI 505, os resultados podem ser aplicados diretamente a outros microrganismos produtores de L-asparaginase (*Aspergillus terreus* e *Fusarium sp.*). Conforme mostrado na Figura 24.b, espera-se que o MRICs, na ausência de contaminação, seja capaz de produzir L-asparaginase a longo prazo com uma atividade enzimática média de 13,7 U/g, o que representa 2,94 vezes a produção em um Sistema MRICs sem condições otimizadas.

Além disso, a Figura 24.b mostra que o aumento da produção nos primeiros quatro ciclos (Região AC) com um aumento no rendimento de 1,44 vezes em comparação com as condições otimizadas mostradas na Tabela 15. O sistema MRICs pode ser usado com outros produtos como a protease ( Figura 24.c). Isso é importante porque permite a aplicação do sistema MRICs a diferentes microrganismos com outros produtos.

Figura 24 – Produção de L-asparaginase por fungos em sistemas de fermentação em estado sólido (FES) com MRICs otimizados (24 h por ciclo).



Nota: TC, tempo entre ciclos; AC, Ciclos de adaptação; CA, Ciclos atingem atividade; 1-8, ciclos de operação.

### 3.7 Discussão

O projeto de novos biorreatores para fermentação em estado sólido tem sido amplamente discutido para melhorar a produção de biomoléculas para diversos usos, incluindo a produção de alimentos, produtos farmacêuticos, biocombustíveis, entre outros (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). Embora muitas alternativas para o projeto do reator tenham sido propostas nos últimos anos, há uma pesquisa limitada focada em novos reatores para produzir moléculas complexas de fungos, e nenhum artigo descreve um novo para produzir L-asparaginase.

Os melhores resultados encontrados aqui para MRICs trabalhando em uma execução simples, 9,52 U/g ou 45 U/mg de proteína (Tabela 15), são promissores quando comparados com reatores convencionais para produzir L-asparaginase. Kumar, Innasimuthu e Marmur (2014) encontraram atividade específica de 10,82 U/mg de proteína em condições otimizadas, usando *Cladosporium sp.* no FES de farelo de trigo ao longo de 96 h. Meghavarnam e Janakiraman (2017) obtiveram uma atividade de 1,25 U/g para FES da biomassa de arroz usando *Fusarium culmorum*. Usando *Aspergillus tubingensis*, Doriya e Kumar (2018) produziu L-asparaginase em FES com um substrato misto, obtendo uma atividade de 20,6 U/g.

Biomoléculas produzidas por fungos do gênero *Penicillium* têm potencial em diferentes aplicações incluindo antibióticos, L-asparaginase e uma ampla gama de metabólitos secundários com valores terapêuticos como fungisporina, roquefortinas, sorbicilinoídes, etc. (GUZMÁN-CHÁVEZ et al., 2018). Em relação à L-asparaginase, algumas espécies de *Penicillium* têm se mostrado uma fonte de enzimas úteis na indústria alimentícia e com potencial para uso clínico (ABDELRAZEK et al., 2019).

Em relação à produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* LAMAI 505, o MRICs utilizado neste trabalho foi capaz de atingir valores de atividade mais elevados ao operar em ciclos do que os observados como resultado da melhor adaptação das células ao meio sólido ao longo dos ciclos (Figura 24.b). A atividade da L-asparaginase obtida de *Penicillium sp.* foi de 13,7 U/g (63,04 U/mg de proteína), o que é promissor quando comparado com a L-asparaginase produzida por *Penicillium sp.* (purificado e não purificado) descrito na literatura. PATRO e GUPTA (2012) obteve 14,0 U/mg de proteína na purificação de L-asparaginase de *Penicillium sp.* (ELSHAFEI et al., 2012) produziu L-asparaginase de *Penicillium brevicompactum* por fermentação submersa e encontrou um atividade de 3,8 U/mg de proteína. (SHRIVASTAVA et al., 2012)] encontraram 13,7 U/mg de proteína na L-asparaginase bruta produzida por *Penicillium digitatum* em fermentação submersa. Shafei et al. (2015) encontraram 750 U/mg de proteína no fermentação submersa de *Penicillium cyclopium*.

O uso bem-sucedido de MRICs para fermentação com outros fungos também foi observado. Em relação à protease, observou-se atividade superior a 200 U/gds independente do fungo utilizado. Novelli, Barros e Fleuri (2016) obteve 155 U/g de protease com *Aspergillus oryzae* usando diferentes substratos. Meena et al. (2013), produziu protease de *Pseudomonas aeruginosas* em FES e obteve 582,25 U/g.

Em relação à atividade de L-asparaginase, o *Fusarium sp.* mesmo em condições não otimizadas, foi possível obter em FES e MRICs com 4 reatores um rendimento de de 14,36 U/g de L-asparaginase, o que está de acordo com os resultados observados na literatura, considerando L-asparaginase de *Fusarium*. Meghavarnam e Janakiraman (2017) produziu L-asparaginase de *Fusarium culmorum* por FES e encontrou uma atividade de 1,25 U/g. Kumar, Innasimuthu e Marmur (2014) produziram L-asparaginase de *Fusarium sp.* em fermentação submersa e encontraram uma atividade de 1,10 U/g. B B e R (2011) relataram um 8,51 U/g de

extrato bruto usando farinha de soja em FES por *Fusarium equiseti*. Tippani (2012) produziu L-asparaginase de *Fusarium oxysporum* por fermentação submersa e encontrou 3,60 U/g.

### 3.8 Conclusão

O reator mult-fase com células imobilizadas (MRIC) e o sistema reatores em série (MRICs) foram desenvolvidos para a produção contínua de L-asparaginase por *Penicillium sp.* LAMAI 505 em fermentação em estado sólido (FES), obtendo um rendimento máximo de L-asparaginase de 13,7 U/g de suporte sólido. Além disso, o sistema MRICs provou ser útil para a produção de L-asparaginase e outros produtos enzimáticos como a protease usando diferentes microrganismos (*Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*). A produção contínua de L-asparaginase em FES indica uma grande potencial para o sistema MRICs.

## 4 Reator modular com tecnologia polimérica (MRPT)

A tecnologia dos materiais poliméricos já é utilizada na construção e operação de reatores biológicos e vem ganhando interesse no projeto de novos biorreatores devido ao seu baixo custo de implementação, propriedades mecânicas, físico-químicas e versatilidade de uso em condições estéreis. No entanto, o desenvolvimento de processos contínuos e aumento de escala para reatores biológicos com materiais poliméricos destinados a fermentação em estado sólido (FES) têm sido grandes desafios. No presente trabalho foi desenvolvido um novo reator modular com tecnologia polimérica (MRPT) para a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES batelada e contínua. O reator MRPT obteve resultados satisfatórios e alcançou um rendimento de L-asparaginase em FES batelada e contínua de 19,36 U/g e 6,78 U/g.h, respectivamente, otimizando as variáveis concentração de glicose, concentração de asparagina, valores de pH, tempo de residência e tempo de fermentação, além das dimensões características do reator como diâmetro, comprimento e volume de líquido nutritivo. O reator biológico MRPT foi otimizado em processo de fermentação batelada e avaliado em operação contínua a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$  em condições ótimas de 5,27 g/L de L-asparagina, 5,34 g/L de glicose e pH de 6,03. Além disso, demonstramos que o MRPT é capaz de atingir o rendimento de L-asparaginase para operação contínua de FES (mais de 1000 h).

### 4.1 Introdução

Os materiais poliméricos desempenham um papel fundamental em aplicações comerciais, industriais e de pesquisa como embalagens, têxteis, automotivo, eletrônico, biomédico e usos bioquímicos (LI et al., 2021; SHARMA et al., 2020; LIU et al., 2020; CHAKRABORTY; BISWAS, 2020; SAADATI; HASANZADEH; SEIDI, 2021; CARAVACA et al., 2019; AKINDOYO et al., 2016; LEE et al., 2020). Os materiais poliméricos estão disponíveis para diferentes escalas de biorreatores, incluindo reatores de membrana extrativa, leitos preenchidos com transportadores inertes, reatores fluidizados com materiais plásticos como meio fluidizado, reatores plásticos descartáveis para produtos terapêuticos (PEYRTON; AVÉROUS, 2021; HU et al., 2011; DENG et al., 2020).

A espuma de poliuretano (PU) representa um material facilmente sintetizado usado para biorreator como uma matriz polimérica devido à possibilidade de reter a alta densidade de microrganismos desejados, incluindo propriedades químicas inertes e características de versatilidade estrutural (BAÑOS et al., 2009). Uma versão particular de reatores de PU são biorreatores de leito fixo usados na produção de diferentes compostos, incluindo agen-

tes terapêuticos, tratamento de resíduos e aplicações biomédicas como órgãos artificiais (ASADPOUR et al., 2018).

Entre os agentes terapêuticos, as enzimas microbianas representam um exemplo de sucesso do uso de biorreatores, incluindo aqui a produção de enzimas anticâncer que inibem o crescimento do tumor por meio da redução do nível plasmático de aminoácidos, como asparagina, lisina e metionina (POKROVSKY et al., 2019). A L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é um exemplo de uma enzima cujo potencial hidrolítico tem sido usado como um agente anticâncer para leucemia e também usado na indústria de alimentos como um agente anti-acrilamida (EVLI et al., 2021).

A produção de L-asparaginase de fungos tem sido usada como um agente anti-acrilamida e investigada contra células cancerosas, e pode ser produzida em quantidades significativas (FAZELI; ALIMADADI; NASR, 2021). A demanda por grande quantidade de produtos alimentícios e farmacêuticos tornou a tecnologia de fermentação em estado sólido (FES) um método de produção alternativo à fermentação submersa (FS) para produtos de L-asparaginase (KHALIL et al., 2021; CUNHA et al., 2021). Além disso, há também uma popularidade crescente de FES para ser usado como tecnologia de produção de enzima, as aplicações das quais podem incluir processo de fermentação em batelada, processo de fermentação com reciclagem de nutrientes e processo contínuo FES (CASTRO et al., 2021).

No entanto, existem biorreatores associados ao uso de suportes poliméricos em diferentes áreas, incluindo a produção enzimática em FES. Nenhum trabalho na literatura refere-se à construção de reatores com tecnologia polimérica e fermentação contínua em FES. No presente trabalho, um novo reator modular com tecnologia polimérica (MRPT) com capacidade de produzir L-asparaginase em FES batelada e processo FES contínuo foi proposto e otimizado. A principal contribuição deste trabalho pode ser considerada o preenchimento de uma lacuna na literatura que descreve um processo contínuo para fermentação em estado sólido considerando o uso de tecnologia polimérica e a capacidade de ser utilizada em diferentes escalas de processo.

## 4.2 Microrganismo

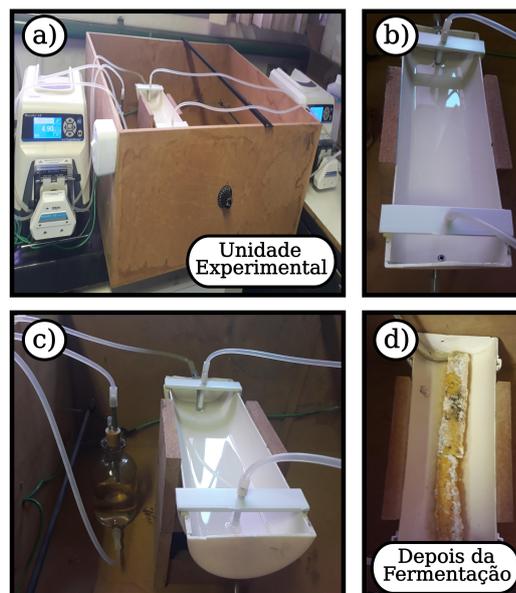
Amostras do fungo *Penicillium sp.* O LAMAI 505 do Centro de Recursos Microbianos do Instituto de Biotecnologia da UNESP (CRM - UNESP) foi utilizado para produzir a L-asparaginase. O fungo selecionado foi inoculado em meio nutritivo contendo 2,0 g / L de  $\text{NaNO}_3$ , 1,0 g / L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g / L de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 g / L de  $\text{KCl}$ , 0,01 g / L de  $\text{FeSO}_4$  e 20,0 g / L de glicose e incubados a 30 ° C observando o período de crescimento de 48h (150 rpm, GEHAKA-A0-370) (VIEIRA et al., 2020). Em seguida, as células centrifugadas colhidas do meio de fermentação foram ressuspensas em novos meios para produzir  $10^6$  esporos/mL, onde a concentração ajustada foi obtida usando uma curva de calibração ajustada que forneceu

uma correlação direta entre os valores de absorvância em 530 nm e a concentração de fungos (ABERKANE et al., 2002; ESPINEL-INGROFF; KERKERING, 1991).

### 4.3 MRPT

A Figura 25 mostra a imagem da unidade experimental de produção de L-asparaginase e o reator modular com tecnologia polimérica (MRPT) proposto. A unidade experimental apresenta controle de temperatura e unidade em um sistema fechado, diminuindo os riscos de contaminação do sistema (Figura 25.a). O reator MRPT foi construído com tubos plásticos do tipo PVC, tubos de inox nas entradas e saídas e tubos flexíveis de plástico no sistema de reciclo de meio nutritivo (Figura 25.b.c). A Figura 25.d mostra em destaque a espuma de poliuretano após um processo de fermentação.

Figura 25 – Imagens da unidade experimental de produção de L-asparaginase em fermentação em estado sólido



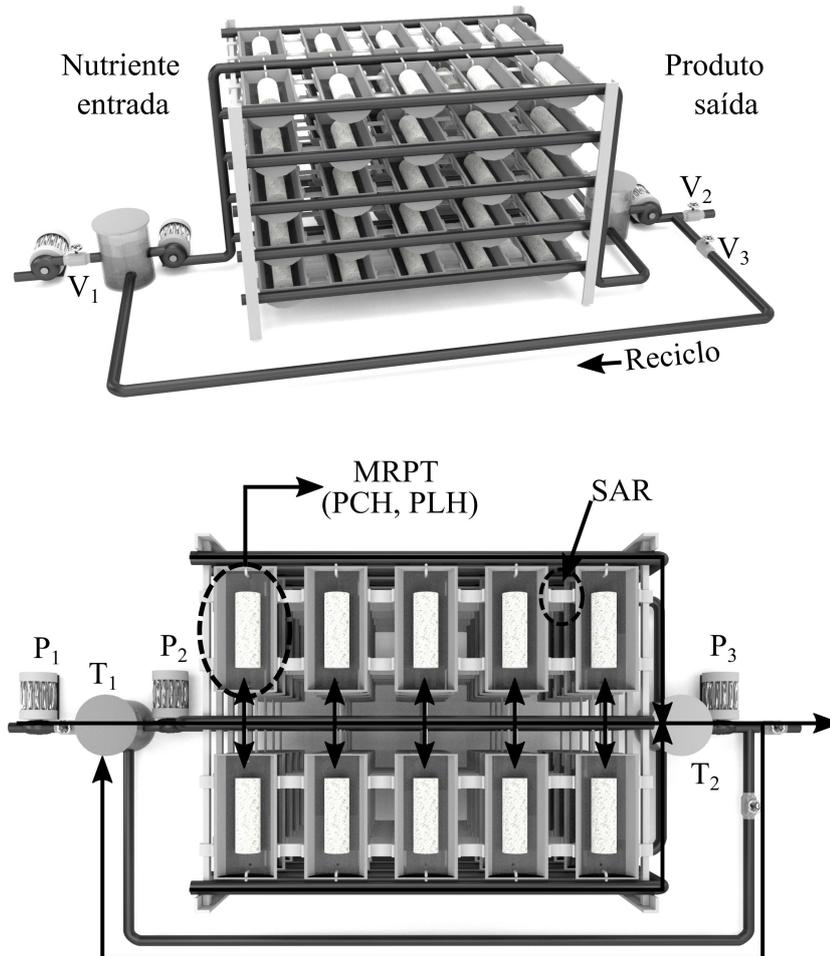
Nota: Unidade experimental referente ao reator modular com tecnologia polimérica (MRPT)

A estrutura do reator de PVC (policloreto de vinil) tem formato semi cilíndrico que comporta uma matriz polimérica de espuma de poliuretano (região de crescimento e imobilização do fungo *Penicillium sp.* LAMAI 505) e a solução com nutriente e produtos enzimáticos constantemente renovada e retirada do sistema. A Figura 25d ilustra a espuma de poliuretano após a fermentação no MRPT.

A Figura 26 mostra a representação esquemática do sistema MRPTs trabalhando no modo paralelo proposto usando PU como suporte de células poliméricas (PCH) e policloreto de vinil como suporte de líquidos (PLH) para manter as células em contato com a fase nutritiva. Outras partes do MRPTs incluem bombas ( $P_1$  a  $P_4$ ), tanques ( $T_1$  e  $T_2$ ), válvulas ( $V_1$  a

V<sub>3</sub>), células poliméricas e suportes de líquidos (PCH, PLH), suporte para conectar o reator (SAR) e um sistema para controlar a temperatura a  $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Figura 26 – Sistema inovador de produção de L-asparaginase em operação contínua FES usando uma sistema de reatores modulares com tecnologia polimérica (MRPTs) trabalhando em modo paralelo.

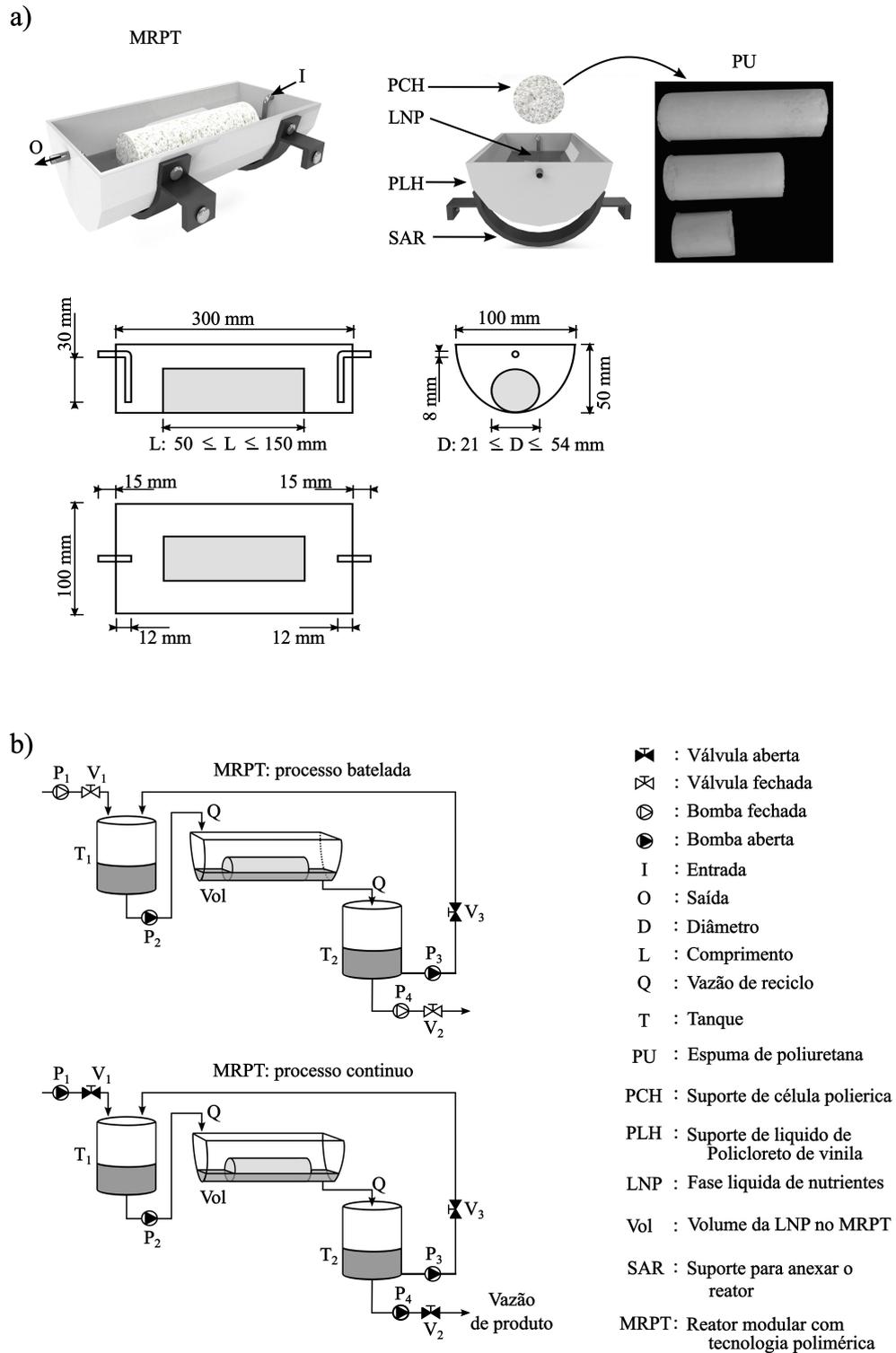


Nota: T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>, representam as tanques de entrada de nutrientes e de retirada de L-asparaginase; P<sub>1</sub>, bomba de entrada de nutriente no sistema; P<sub>2</sub>, bomba de entrada de meio líquido no sistema; P<sub>3</sub>, bomba de reciclo da fase líquida do MRPTs e retirada de produto; V<sub>1</sub>, válvula controle de entrada de nutriente no sistema; V<sub>2</sub>, válvula de controle de saída de produto no sistema; V<sub>3</sub>, válvula de controle de reciclo da fase líquida do MRPTs; SAR, suporte para anexar o reator MRPT; PCH, suporte de células poliméricas; PLH, suporte para a fase líquida (policloreto de vinil – PVC); MRPTs, sistema de reatores modulares com tecnologia polimérica.

A Figura 27 mostra o reator modular de tecnologia polimérica proposto no presente trabalho para produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES. No referido MRPT há adição de nutriente e retirada de produto de forma contínua e intermitente, e reciclo de solução nutritiva (Q) com bombeamento contínuo garantindo o permanente contato da fase com líquido nutritivo (LNP) com o polímero de imobilização das células (PCH), suporte

da LNP feito de PVC (PLH).

Figura 27 – Dimensões e características do novo reator modular com tecnologia polimérica



Fonte: Autor

O MRPT apresenta características específicas, com o módulo de acoplamento (SAR), entrada de líquido (I), saída de líquido (O), o comprimento (L) e diâmetro (D) (Figura 27.a); e

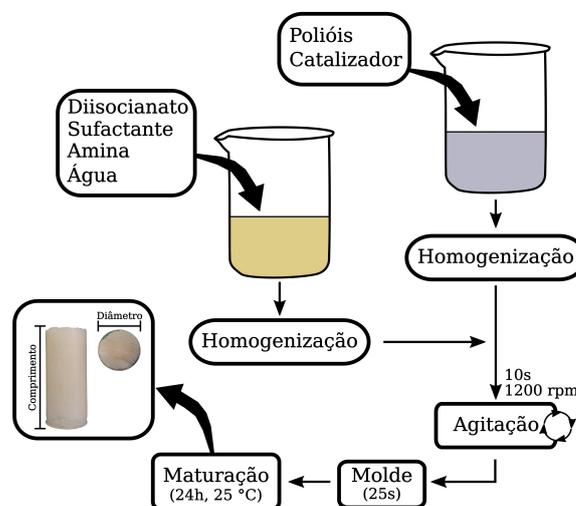
diferentes configurações operacionais, como o processo de fermentação em estado sólido batelada e contínuo (Figura 27.b). Referente ao processo produção de L-asparaginase em FES batelada o meio nutritivo é mantido no tanque ( $T_1$ ) sendo transferido para o MRPT e tanque  $T_2$  usando a bomba  $P_1$ , o reciclo de nutriente é realizado com auxílio da  $P_3$  durante o tempo de fermentação adequado. Já no processo de FES contínua, o sistema de válvulas é aberto, garantindo a recirculação de meio nutritivo e a retirada contínua de produto, em conjunto é ligado bombeamento com o novo meio nutritivo ( $P_1$ ), garantindo a manutenção do nível de  $T_1$  e o suprimento nutritivo necessário para FES contínua.

#### 4.4 Produção de espuma de poliuretano

As espumas de poliuretano (PU) usadas como suporte inerte no reator MRPT foram produzidas em diferentes composições e avaliadas buscando a máxima produção de L-asparaginase na FES com *Penicillium sp.* LAMAI 505. A produção de espuma de poliuretano consiste na diretamente da reação de polimerização (LEE et al., 2018). O processo base de produção de espuma apresenta um mistura de polióis com uma mistura de diisocianato mais aditivos ASA (água, surfactante e amina), a proporção dos reagentes é apresentada na Tabela 16.

Em seguida essa mistura é homogenizada (10s, 1200 rpm) e transferida para outro recipiente (formato desejado). Nesta etapa acontece a reação polimerização (exotérmica) liberando calor e aumentando significativamente o volume da mistura (25s). Depois de pronta a espuma de poliuretano é deixada em repouso (24h, 25°C) para a maturação e aplicação na FES. A Figura 28 ilustra as etapas do processo de produção da espuma de poliuretano bem como uma ilustração do molde da estrutura usada no novo reator de PU (PCH) do MRPT.

Figura 28 – Fluxograma do processo de produção de espuma de poliuretano



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2018)

A Tabela 16 mostra 12 diferentes formulações usada na síntese de espuma de poliuretano, sendo que, F<sub>1</sub> a F<sub>11</sub> foram produzidas em laboratório e a F<sub>12</sub> representa uma espuma de poliuretano comercial.

As diferentes espuma de poliuretano (PUs) foram avaliadas considerando os parâmetros de flexibilidade, absorção de água, densidade aparente, porosidade, diâmetro media e grau de inchamento, considerando a máxima atividade de L-asparaginase (U/g) produzida. Em teste iniciais todas as fermentações em estado sólido foram realizadas em condições constantes de temperatura (25 °C), pH (7,0), concentração de glicose (10 g/L), concentração de asparagina (1 g/L) e tempo de fermentação de 48h.

Tabela 16 – Material e formulações iniciais usadas na produção de espuma de poliuretano

| Código                       | Componentes (% p/p) |                |        |                 |      |             |
|------------------------------|---------------------|----------------|--------|-----------------|------|-------------|
|                              | MDI                 | Etileno glicol | Poliol | Trietil diamina | Água | Surfactante |
| F <sub>1</sub>               | 69,9                | 27,8           | –      | 0,8             | 1,5  | –           |
| F <sub>2</sub>               | 69,4                | –              | 27,8   | –               | 1,4  | 1,4         |
| F <sub>3</sub>               | 69,4                | 13,2           | 13,2   | 1,0             | 1,6  | 1,6         |
| F <sub>4</sub>               | 27,8                | 69,9           | –      | 0,8             | 1,5  | –           |
| F <sub>5</sub>               | 26,4                | –              | 69,4   | 1,0             | 1,6  | 1,6         |
| F <sub>6</sub>               | 26,4                | 34,7           | 34,7   | 1,0             | 1,6  | 1,6         |
| F <sub>7</sub>               | 7,1                 | 21,3           | 70,9   | 0,7             | –    | –           |
| F <sub>8</sub>               | 14,2                | 14,2           | 70,9   | 0,7             | –    | –           |
| F <sub>9</sub>               | 20,8                | 6,9            | 69,5   | –               | 1,5  | 1,5         |
| F <sub>10</sub>              | 28,4                | –              | 70,9   | 0,7             | –    | –           |
| F <sub>11</sub>              | 34,7                | –              | 62,5   | –               | 1,4  | 1,4         |
| F <sub>12</sub> <sup>b</sup> | NA                  | NA             | NA     | NA              | NA   | NA          |

Nota: F<sub>1</sub> até F<sub>12</sub> são as diferentes condições experimentais usadas na produção de espuma de poliuretano; MDI, difenilmetano diisocianato; EG, etileno glicol; Lupranol, mistura de polioliol com peso molecular de 4000 g/mol 2004/1 (BASF®); TD, trietil diamina; Tegostab®, surfactante comercial (Evonik®).

#### 4.4.1 Caracterização da espuma de poliuretano

As espumas de poliuretano produzidas foram submetidas inicialmente ao procedimento de envelhecimento à 30 °C com 50 % de umidade relativa durante 24 h. Em seguida as amostras foram cortadas para análise da estrutura celular e medição das propriedades físico-mecânicas da espuma.

O diâmetro médio e a distribuição dos poros (Dp) foram determinados com imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Zeiss, EVOMA 15) e analisadas com o software Image (ImageJ) baseado em cálculos de porosimetria; o tamanho médio da célula foi obtido ajustando o tamanho da célula a uma distribuição normal.

A análise de espectroscopia de infravermelho de transferência de Fourier (FTIR)

usando no modo de reflexão total atenuada (ATR) (espectrômetro Perkin Elmer) com 32 varreduras de cada amostra variando de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $1000 \text{ cm}^{-1}$  foi usada para a caracterização das amostras das espumas.

A densidade aparente (Ad) das espumas foi medida de acordo com os testes da norma ISO 845 (ZHANG et al., 2012); porosidade é uma razão entre o volume de ar na espuma e o volume total da espuma. Foi calculado pela Equação 4.1.

$$P(\%) = \left( \frac{M_u - M_s}{M_u - M_i} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

Sendo que P é a porosidade aparente,  $M_u$  é a massa úmida,  $M_s$  é a massa seca,  $M_i$  é a massa da espuma imersa em água.

O teste de flexibilidade foi avaliado, observando-se a resistência mecânica a compressão de espumas compostas, avaliada de acordo com o método de teste padrão, aplicando uma carga de compressão em corpos de prova com seção quadrada ( $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ ).

Os ensaios de compressão foram realizados à temperatura e umidade ambientes, utilizando uma força de 0,25 kN por 1h hora. Assim, quando a deformação maior que 40 % do tamanho original do corpo de prova é marcada como positiva (+ + +), caso contrário é marcada (- - -) (De Luca Bossa et al., 2020; PARK et al., 2019).

A absorção de água foi medida imergindo inicialmente um peso conhecido ( $W_1$ ) da espuma de poliuretano seco em água à 25 °C. Depois que a água residual foi removida dos filmes usando papel de filtro, o peso ( $W_2$ ) do filme úmido foi medido imediatamente. A absorção de água, A (mL de água/g de suporte sólido), foi obtida usando a seguinte Equação 4.2.

$$A \left( \frac{\text{mL}}{\text{g}} \right) = \left( \frac{W_2 - W_1}{W_1} \right) \cdot \frac{1}{\rho_{\text{Água}}} \quad (4.2)$$

O grau de intumescimento em água foi realizado imergindo um volume conhecido ( $V_1$ ) da espuma de poliuretano seco ( $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ ) em água a 25 °C. Após a remoção da água residual com papel filtro, o volume ( $V_2$ ) da espuma foi medido imediatamente com paquímetro digital. O grau de inchaço G (%) foi calculado de acordo com a seguinte Equação 4.3.

$$G = \frac{V_F - V_I}{V_I} \quad (4.3)$$

## 4.5 Avaliação da matriz polimérica do MRPT

A Tabela 17 mostra seis diferentes configurações estruturais ( $M_1 - M_6$ ) do suporte polimérico de imobilização de células avaliados na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.*

LAMAI 505 em processo de FES batelada (Figura 27.c), sendo que nesta etapa as fermentações foram realizadas em condições constantes de temperatura (25°C), pH (7,0), concentração de glicose (10 g/L), concentração de asparagina (1 g/L) e volume de líquido no RMTP (120 mL) para os tempos de fermentação de 24h, 48h e 72h.

Tabela 17 – Análise inicial de diferentes reatores MRPT na produção de L-asparaginase em FES batelada a 25°C

| Reatores         | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>3</sub> | M <sub>4</sub> | M <sub>5</sub> | M <sub>6</sub> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Diâmetro (mm)    | 34,0           | 34,0           | 34,0           | 21,0           | 21,0           | 21,0           |
| Comprimento (mm) | 150,0          | 100,0          | 50,0           | 150,0          | 100,0          | 50,0           |

Nota: M<sub>1</sub> até M<sub>6</sub> são diferentes reatores MRPT

## 4.6 Otimização do meio nutritivo e valores de pH

A Tabela 18 mostra os ensaios realizados na otimização do pH e meio nutritivo (L-asparagina e glicose).

Tabela 18 – Efeito do pH e composição de nutrientes na produção de L-asparaginase

| Testes | pH (x <sub>1</sub> ) | Glicose (x <sub>2</sub> )<br>(g/L) | L-asparagina (x <sub>3</sub> )<br>(g/L) |
|--------|----------------------|------------------------------------|---|
| 1      | 4,0                  | 3,0                                | 4,0                                     |
| 2      | 6,0                  | 3,0                                | 4,0                                     |
| 3      | 4,0                  | 10,0                               | 4,0                                     |
| 4      | 6,0                  | 10,0                               | 4,0                                     |
| 5      | 4,0                  | 3,0                                | 8,0                                     |
| 6      | 6,0                  | 3,0                                | 8,0                                     |
| 7      | 4,0                  | 10,0                               | 8,0                                     |
| 8      | 6,0                  | 10,0                               | 8,0                                     |
| 9      | 3,32                 | 6,50                               | 6,0                                     |
| 10     | 6,68                 | 6,50                               | 6,0                                     |
| 11     | 5,0                  | 0,62                               | 6,0                                     |
| 12     | 5,0                  | 12,38                              | 6,0                                     |
| 13     | 5,0                  | 6,50                               | 2,64                                    |
| 14     | 5,0                  | 6,50                               | 9,36                                    |
| 15     | 5,0                  | 6,50                               | 6,0                                     |
| 16     | 5,0                  | 6,50                               | 6,0                                     |
| 17     | 5,0                  | 6,50                               | 6,0                                     |

A otimização do MRPT para a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 foi realizada em duas etapas consecutivas. Na primeira foi determinado a condição ótima do meio nutritivo de alimentação do reator avaliando a concentração de glicose (g/L), concentração de L-asparagina (g/L) e pH. Na segunda foi analisado os efeitos das variáveis

vazão de reciclo, volume de líquido no MRPT, diâmetro e comprimento do suporte polimérico na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em processo de FES com reciclo de solução nutritiva. Na etapa de otimização do meio nutritivo de alimentação do MRPT foram realizados 17 testes experimentais (Tabela 18), considerado a melhor condição obtida no item 4.5.

## 4.7 Otimização das condições operacionais do MRPT

Nesta etapa foram realizados 27 teste experimentais (Tabela 19) usados no treinamento e validação da RNA-DE.

Tabela 19 – Efeitos associados as dimensões do reator modular com tecnologia polimérica

| Testes | Vazão de reciclo (Q)<br>(mL/min) | Diâmetro (D)<br>(mm) | Comprimento (L)<br>(mm) | Volume LNP (Vol)<br>(mL) |
|--------|----------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1      | 20,0                             | 46,0                 | 150,0                   | 300,0                    |
| 2      | 20,0                             | 46,0                 | 100,0                   | 300,0                    |
| 3      | 20,0                             | 34,0                 | 150,0                   | 300,0                    |
| 4      | 20,0                             | 34,0                 | 100,0                   | 300,0                    |
| 5      | 15,0                             | 46,0                 | 150,0                   | 300,0                    |
| 6      | 15,0                             | 46,0                 | 100,0                   | 300,0                    |
| 7      | 15,0                             | 34,0                 | 150,0                   | 300,0                    |
| 8      | 15,0                             | 34,0                 | 100,0                   | 300,0                    |
| 9      | 20,0                             | 46,0                 | 150,0                   | 450,0                    |
| 10     | 20,0                             | 46,0                 | 100,0                   | 450,0                    |
| 11     | 20,0                             | 34,0                 | 150,0                   | 450,0                    |
| 12     | 20,0                             | 34,0                 | 100,0                   | 450,0                    |
| 13     | 15,0                             | 46,0                 | 150,0                   | 450,0                    |
| 14     | 15,0                             | 46,0                 | 100,0                   | 450,0                    |
| 15     | 15,0                             | 34,0                 | 150,0                   | 450,0                    |
| 16     | 15,0                             | 34,0                 | 100,0                   | 450,0                    |
| 17     | 5,0                              | 40,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 18     | 35,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 19     | 20,0                             | 21,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 20     | 20,0                             | 54,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 21     | 20,0                             | 40,0                 | 50,0                    | 375,0                    |
| 22     | 20,0                             | 40,0                 | 200,0                   | 375,0                    |
| 23     | 20,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 150,0                    |
| 24     | 20,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 600,0                    |
| 25     | 20,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 26     | 20,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 375,0                    |
| 27     | 20,0                             | 40,0                 | 125,0                   | 375,0                    |

A segunda etapa de otimização foi realizada utilizando as condições ótimas de meio nutritivo e pH obtidas anteriormente. O efeito das variáveis vazão de reciclo de solução

nutritiva (Q, mL/min), diâmetro (D, mm) e comprimento (L, mm) do suporte polimérico cilíndrico destinado a imobilização das células e o volume de meio líquido (Vol, mL) em contato com as células imobilizadas no polímero foram otimizadas usando RNA com o modelo de otimização por evolução diferencial (RNA-DE).

## 4.8 Otimização da produção de L-asparaginase em MRPT

Os modelos de RNA contendo três camadas foram implementados e usados para encontrar as condições iniciais ideais e dimensões empregando a linguagem *Python* 3.10 e as bibliotecas *Scikit learn MLPR* para otimização. Primeiro, os valores das variáveis e respostas ( Tabela 18 e 19 ) foram normalizados no intervalo - 1 a 1 e o conjunto de dados foi categorizado em teste e treinamento conforme apresentado nas Tabela 18 e 19.

Em segundo lugar, o melhor número de neurônios ocultos para RNA foram determinado considerando a raiz quadrada do erro médio (Equação 4.4) e o coeficiente de determinação (Equação 4.5) para rede *feedforward backpropagation* usando a função de transferência *tansig* e *purelin*, respectivamente, na camada oculta e na camada de saída por busca em grade considerando o número de neurônios variável de 1 a 20 neurônios. Terceiro, as condições ótimas foram determinadas considerando DE (evolução diferencial) otimizar com a população de parâmetros fixos, fatores de "crossover" e mutação, respectivamente, 300, 0,5 e 0,5.

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

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_i^{exp})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{calc} - Y_m)^2} \quad (4.5)$$

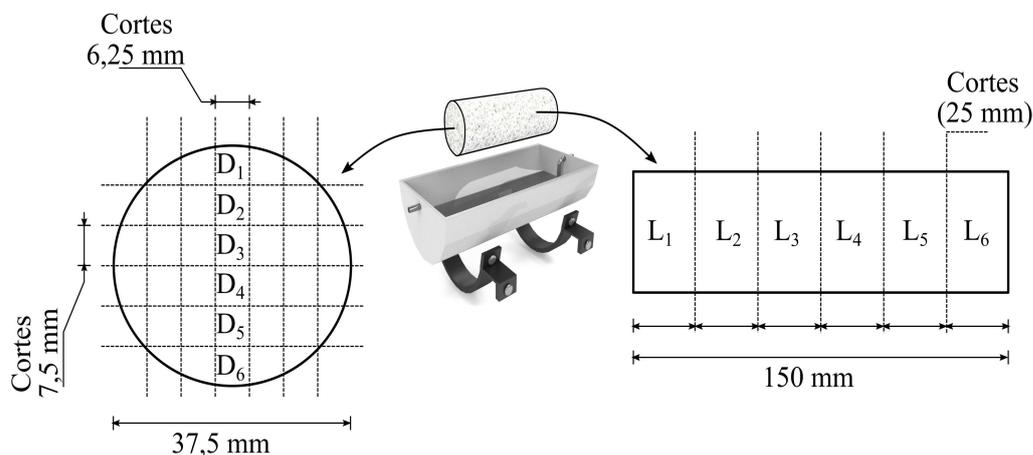
Nas Equações 4.4 e 4.5,  $Y^{calc}$  representa o valor de atividade calculado pelo modelo de RNA,  $Y^{exp}$  é o valor de atividade experimental,  $Y^m$  é o valor médio de todos os pontos experimentais. As condições operacionais empregadas na RNA foram otimizadas utilizando o método de otimização por evolução diferencial (DE).

## 4.9 Avaliação do crescimento de células e atividade de L-asparaginase ao longo na matriz polimérica

O reator MRPT operando em processo batelada (48h) e condição otimizada anterior foi avaliado quanto à atividade da L-asparaginase e crescimento celular considerando a matriz polimérica PCH do reator MRPT. A Figura 29 mostra os cortes estratégicos (axiais e radiais)

realizados na matriz polimérica do MRPT e as regiões selecionadas para análise, sendo que D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub> e D<sub>6</sub> representam as regiões que podem ser submersas com líquido nutritivo do sistema.

Figura 29 – Regiões selecionadas para as análises de crescimento celular e atividade de L-asparaginase



D<sub>1</sub> a D<sub>6</sub>, representam a posição radial de corte do reator polimérico PCH do MRPT; L<sub>1</sub> a L<sub>6</sub>, representam a posição axial de corte do reator polimérico PCH do MRPT; As fermentações foram realizadas em processo batelada a temperatura de 25°C ± 1°, em 24h, 48h e 72h.

#### 4.10 Otimização da taxa de fluxo e avaliação das condições de operação de longo prazo do MPPT

O efeito da taxa de fluxo de MRPT foi avaliado em ensaios de taxa de fluxo constante e ensaios de taxa de fluxo variável, conforme descrito na Tabela 20. Em ensaios de taxa de fluxo constante, foi testada a operação contínua durante 120 h (teste, 1 a 4) e 948h ( teste 5). Em ensaios de taxa de fluxo variável (teste 6), a taxa de fluxo foi aumentada de 20 para 50 mL/h para manter a taxa de fluxo constante após cada aumento durante 108h.

Tabela 20 – Efeito da taxa de fluxo em MRPT em operação constante de rendimento de L-asparaginase para fermentações a 25 ° C usando condições nutritivas otimizadas

| Testes | Vazão de produto (mL/min) | Tempo de operação continua (h) |
|--------|---------------------------|--------------------------------|
| 1      | 5,0                       | 120                            |
| 2      | 10,0                      | 120                            |
| 3      | 15,0                      | 120                            |
| 4      | 20,0                      | 120                            |
| 5      | 20,0                      | 948                            |
| 6      | 20 até 50 <sup>a</sup>    | 732                            |

Nota:<sup>a</sup> taxa de fluxo variável aumentando 5 mL/min após cada 108h de operação.

## 4.11 Método analítico de determinação de L-asparaginase

A atividade enzimática da L-asparaginase foi avaliada em ensaios utilizando hidroxilamina como descrito por (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). Nestes ensaios, 0,1 mL de amostra de enzima misturada em 1,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,6, 20 mM) contendo L-asparagina (10 mM) e hidroxilamina (100 mM) foi incubada durante 30 minutos. A reação foi terminada com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico (10 %) num meio contendo ácido tricloroacético (5 %) e ácido clorídrico (0,66 M). O meio foi centrifugado (10000g, Avanti J-26XP Series), em seguida o conteúdo de ácido  $\beta$ -hidroxílico foi obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240, Shimadzu). A atividade enzimática foi definida em unidades (U), correspondendo cada unidade a 1  $\mu$ mol/min de ácido  $\beta$ -hidroxílico produzido e a atividade calculada como mostra a Equação 4.6. A atividade específica foi definida em termos de unidades de L-asparaginase por mg de proteína determinada pelo método de Lowry.

$$\lambda \left( \frac{U}{g} \right) = \frac{\delta \times Vol_{ret} \times F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta \times m_{Sólido}} \quad (4.6)$$

Sendo que  $\lambda$  representa a atividade em U/g calculada pela Equação 4.6,  $\delta$  é a leitura de absorbância a 500 nm,  $Vol_{ret}$  é o volume de líquido retirado do reator para análise,  $F_{Diluição}$  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,  $\theta$  representa o tempo de incubação e o  $m_{Sólido}$  é a massa de suporte sólido utilizada na FES. A atividade de L-asparaginase também pode ser calculada utilizando a Equação 4.7, sendo que neste caso a atividade de L-asparaginase ( $\lambda$ ) é definida em (U/h) em um processo de produção contínua.

$$\lambda \left( \frac{U}{h} \right) = \frac{\delta \times V_S}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta} \quad (4.7)$$

Sendo que  $\delta$  é a leitura de absorbância a 500 nm,  $Vol_{Amostra}$  (mL) é o volume da amostra inserida na reação de análise de L-asparaginase,  $\theta$  representa o tempo de incubação e  $V_S$  (mL/h) é a vazão de entrada e saída de líquido do MRPT.

## 4.12 Resultados e discussão

### 4.12.1 Características e aplicação das espumas de poliuretano produzidas

A Tabela 21 e Figura 30 mostram os resultados da produção de L-asparaginase em FES com o reator MRPT em processo batelada (ASNase, U/g) e as propriedades físico-mecânicas das espumas de poliuretano produzidas ( $F_1$  a  $F_{12}$ ). As propriedades foram determinadas por análise simples de Flexibilidade; A, absorção de água; DA, densidade aparente; P, porosidade; Dp, diâmetro do poro, G, grau de intumescimento, como está apresentado na Tabela 21.

Pode-se observar que as amostras com maior flexibilidade, absorção de água ( $A > 5,4$  mL/g) apresentou maior rendimento na produção de L-asparaginase em FES (ASNase  $> 0,9$  U/g) e os resultados de DA ( $66,7 \text{ kg/m}^3$ ), A ( $19,9 \text{ mL/g}$ ), P (89,9%) e atividade da L-asparaginase ( $1,8 \text{ U/g}$ ) são destaques da amostra F<sub>9</sub> em comparação com as outras amostras. Considerando a aplicação de espumas de poliuretano como suporte inerte em FES e a capacidade das células imobilizadas, um dos parâmetros mais importantes das espumas de poliuretano é seu desempenho mecânico e sua capacidade de absorção de água, como pode ser observado em diferentes trabalhos sobre produção de espuma de poliuretano na literatura (LEE et al., 2020; LEE et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2021).

Tabela 21 – Resultados de atividade de L-asparaginase e propriedades físico-químicas usando F<sub>1</sub> a F<sub>12</sub> em FES a 25°C.

| Testes          | Flexibilidade | A<br>(mL/g) | DA<br>(kg/m <sup>3</sup> ) | P<br>(%) | Dp<br>(μm)  | G<br>(%) | ASNase<br>(U/g) |
|-----------------|---------------|-------------|----------------------------|----------|-------------|----------|-----------------|
| F <sub>1</sub>  | ---           | 1,2 ± 0,1   | 59,5 ± 2,1                 | 12,4     | 107,5 ± 1,2 | 5        | 0,4 ± 0,01      |
| F <sub>2</sub>  | ---           | 4,5 ± 0,2   | 84,4 ± 1,2                 | 23,5     | 148,2 ± 1,3 | 25       | 0,6 ± 0,12      |
| F <sub>3</sub>  | ---           | 5,1 ± 0,2   | 96,8 ± 3,2                 | 37,1     | 98,7 ± 1,7  | 49       | 0,8 ± 0,04      |
| F <sub>4</sub>  | +++           | 6,5 ± 0,4   | 91,3 ± 2,2                 | 55,5     | 123,6 ± 2,1 | 93       | 0,9 ± 0,03      |
| F <sub>5</sub>  | +++           | 12,3 ± 0,3  | 62,9 ± 1,1                 | 71,1     | 145,1 ± 2,5 | 82       | 1,4 ± 0,09      |
| F <sub>6</sub>  | +++           | 8,9 ± 0,1   | 79,0 ± 0,9                 | 62,3     | 134,6 ± 1,9 | 75       | 1,1 ± 0,13      |
| F <sub>7</sub>  | ---           | 7,4 ± 0,1   | 169,8 ± 7,4                | 68,0     | 108,2 ± 1,8 | 182      | 0,6 ± 0,01      |
| F <sub>8</sub>  | +++           | 15,7 ± 0,5  | 101,4 ± 4,3                | 72,2     | 138,2 ± 5,2 | 98       | 1,1 ± 0,05      |
| F <sub>9</sub>  | +++           | 19,9 ± 0,7  | 66,7 ± 3,2                 | 89,9     | 162,1 ± 6,3 | 95       | 1,8 ± 0,18      |
| F <sub>10</sub> | +++           | 11,7 ± 0,1  | 79,7 ± 1,3                 | 55,7     | 148,8 ± 3,1 | 65       | 1,3 ± 0,14      |
| F <sub>11</sub> | ---           | 5,4 ± 0,3   | 95,0 ± 1,0                 | 26,6     | 264,8 ± 6,4 | 22       | 0,4 ± 0,01      |
| F <sub>12</sub> | +++           | 18,3 ± 0,2  | 50,0 ± 0,5                 | 85,2     | 233,8 ± 5,5 | 88       | 1,6 ± 0,12      |

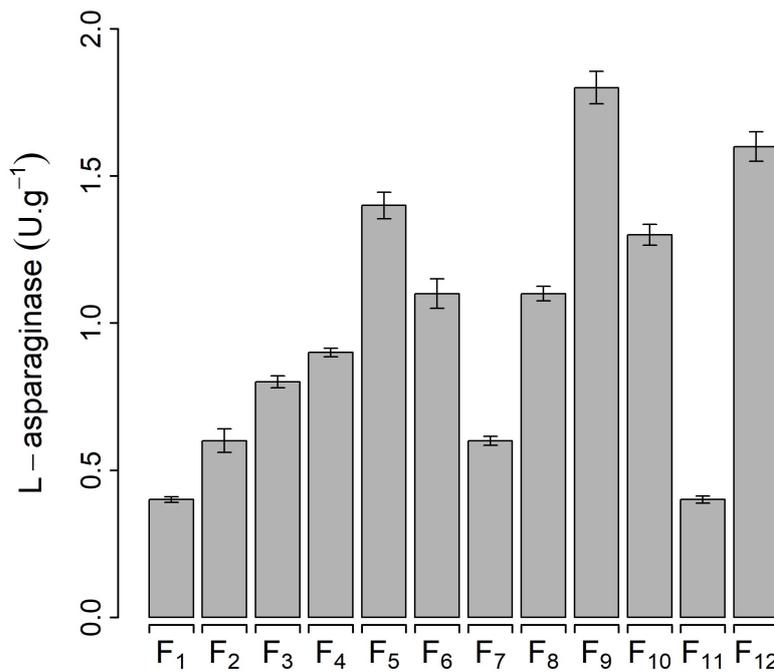
Nota: F<sub>1</sub> a F<sub>11</sub>, formulações utilizadas na produção de espuma de poliuretano; F<sub>12</sub>, espuma de poliuretano comercial; Flexibilidade, avaliação da resistência mecânica à compressão das espumas de poliuretano produzidas; A, absorção de água (mL de água/g de espuma de poliuretano); Ad, densidade aparente; P, porosidade; Dp, diâmetro do poro, G, grau de intumescimento; ASNase, atividade da L-asparaginase (U/g de suporte inerte).

Os resultados iniciais da produção de L-asparaginase em FES utilizando doze amostras diferentes de espuma de poliuretano (F<sub>1</sub> a F<sub>12</sub>) como suporte sólido inerte são apresentados na Figura 30. Pode-se observar as características das espumas de poliuretano utilizadas na construção dos reatores poliméricos influenciam a atividade da L-asparaginase, e as três condições com maiores resultados de atividade da L-asparaginase (F<sub>5</sub>, F<sub>9</sub>, F<sub>12</sub>) correspondem às amostras de espuma de poliuretano com maiores valores de absorção de água e porosidade.

Embora não haja referência na literatura à associação entre as características das espumas de poliuretano e a atividade da L-asparaginase, a influência da variável absorção de água e porosidade pode estar associada à disponibilidade de água na matriz polimérica e ao processo de massa e transferência de calor conforme (MALDONADO et al., 2018; LIU

et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2021; ŠELO et al., 2021; YE et al., 2021). Considerando os resultados obtidos nos testes iniciais, a condição F<sub>9</sub> foi selecionada para a construção da peça de PU utilizada no MRPT (PCH).

Figura 30 – Resultados iniciais da L-asparaginase na fermentação em estado sólido usando doze amostras diferentes de espuma de poliuretano.



Nota: As fermentações foram realizadas a 25 °C ± 1°, valor de pH 7,0 e meio contendo 2,0 g / L de NaNO<sub>3</sub>, 1,0 g / L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g / L de MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g / L de KCl, 0,01 g / L de FeSO<sub>4</sub>, 1,0 g / L.

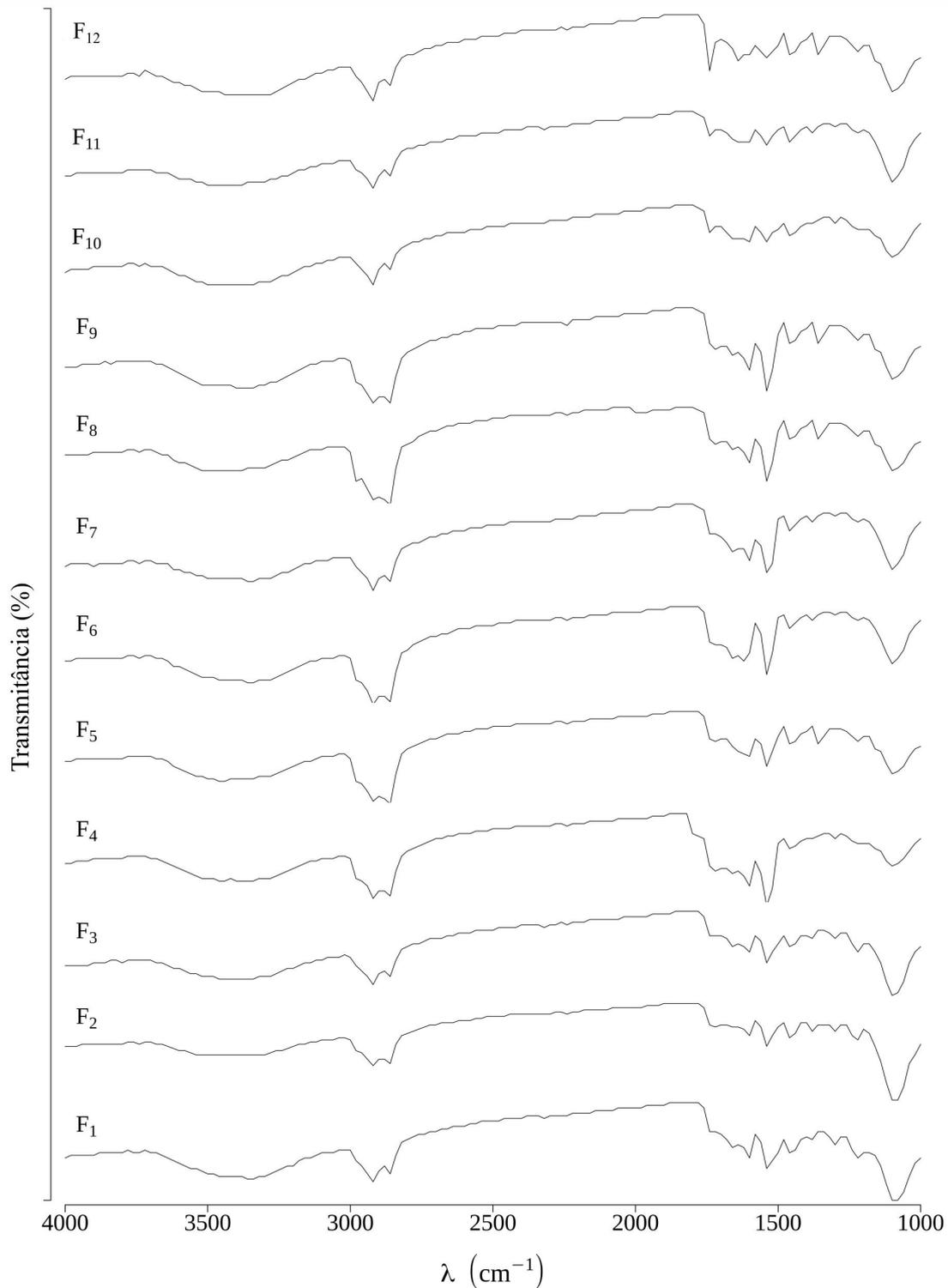
Os espectros de infravermelho das amostras de espuma (F<sub>1</sub> a F<sub>12</sub>) obtidos em FTIR-ATR ("Fourier transform infrared attenuated total reflectance") são mostrados na Figura 31.

Houve picos de absorção característicos de amostras de espuma produzidas quando comparadas com PU comercial F<sub>12</sub>, os picos em 3340 cm<sup>-1</sup>, 1500 cm<sup>-1</sup> e 800 cm<sup>-1</sup> são devidos ao alongamento -NH dos grupos de uretano (JIANG et al., 2019).

Picos de alongamento -C-H alifático em 2900 cm<sup>-1</sup> e 1039 cm<sup>-1</sup> são atribuídos a grupos -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub> de cadeia alquílica e grupo -C-O-C de alongamento (FU et al., 2015; Gurusamy Thangavelu et al., 2020).

Os picos de absorção em 1700 cm<sup>-1</sup> corresponderam às vibrações de alongamento das ligações -C = O. Sinais a 1200 cm<sup>-1</sup> podem ser associados a vibrações de alongamento de ligações -C-N em ligações de uretano (HEJNA et al., 2017). Pode-se observar que todas as amostras de espuma apoiaram a formação da ligação de uretano.

Figura 31 – Infravermelho das amostras de espuma de poliuretano

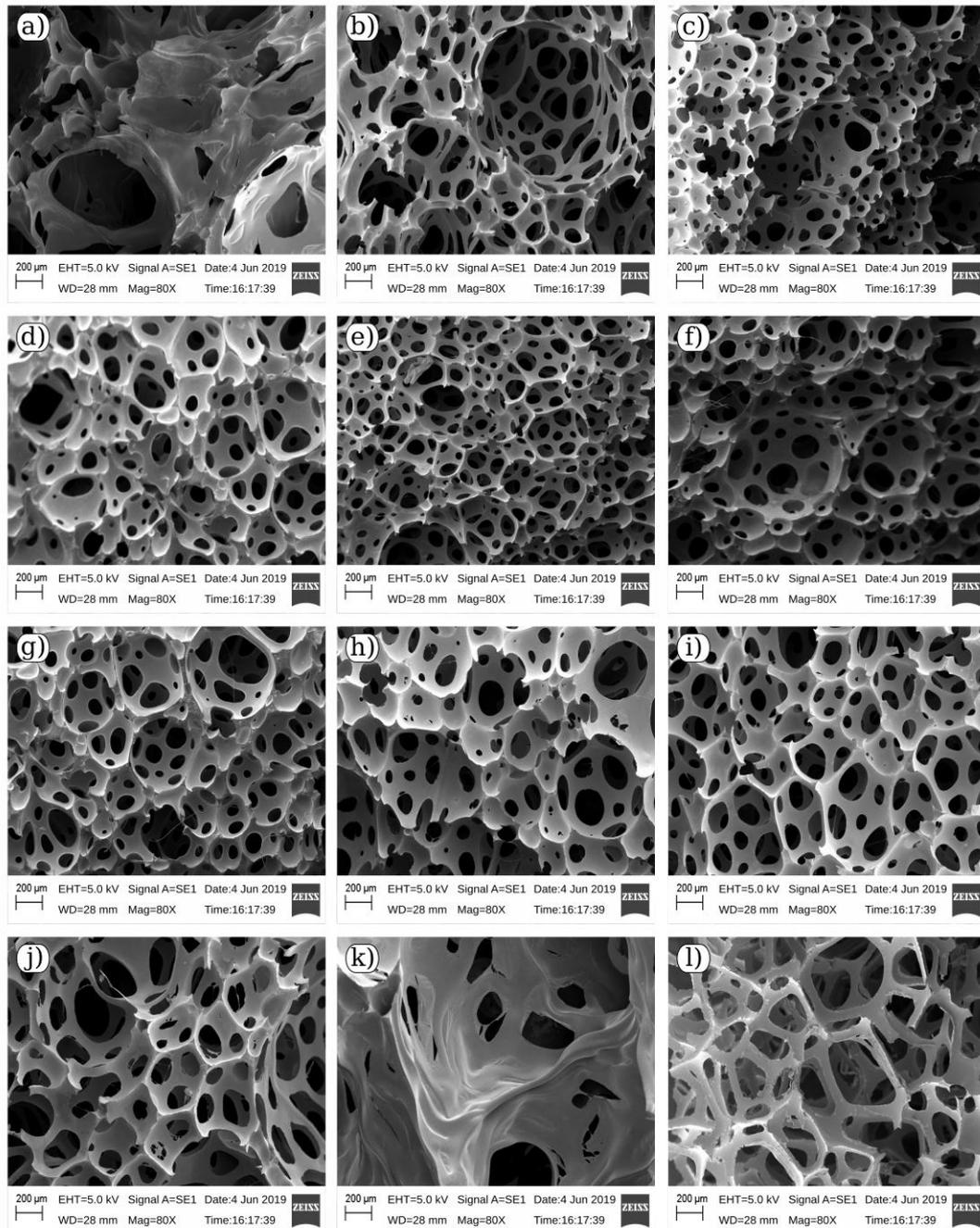


Nota: F<sub>1</sub> à F<sub>11</sub>, representam as amostras de espuma de poliuretano produzidas; F<sub>12</sub>, representa a amostra de espuma de poliuretano comercial

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas das amostras de espuma de poliuretano apresentadas na Tabela 21 são ilustradas na Figura 32. Todas as imagens

foram obtidas considerando uma aproximação de 80 vezes a real, uma referência de escala igual  $200\ \mu\text{m}$  e a área superficial das amostras foram recortadas perpendicularmente à direção axial das amostras estudadas.

Figura 32 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de espuma de poliuretano produzidas e comercial



Nota: a – j, representa as imagens de microscopia eletrônica das amostras  $F_1$  à  $F_{12}$

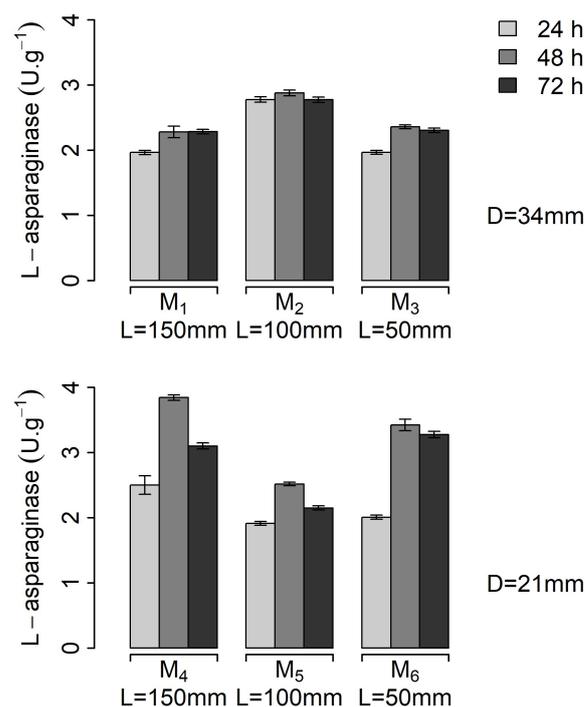
As imagens de MEV mostra que em todas as formulações de espuma produzidas as matrizes de poliuretano resultaram em diferentes estruturas com células mais deformadas ou mais homogêneas dependendo da composição. As superfícies irregulares e mais defeituosas,

como mostra a Figura 32.a e Figura 32.k. apresentaram os piores desempenhos como suporte sólido capaz de imobilizar as células fúngicas. Além disso, pode-se observar que o diâmetro de poro, a porosidade e a estrutura dos poros das amostra sofrem alteração com a variação das composições de MDI e Polióis. Observações semelhantes foram descritas por Khazabi, Gu e Sain (2011), que investigou o impacto das fibras de madeira na morfologia da espuma de poliuretano em *spray* à base de soja e Formela et al. (2017) em investigação conduzida para avaliar as propriedades e o desempenho de espumas compostas de poliuretano e grãos usados nas cervejarias e seu potencial de aplicação na indústria.

#### 4.12.2 Otimização da concentração de nutriente e pH

A Figura 33 mostra os seis diferentes de suportes de células poliméricas (PCH) usados na primeira sequência de experimentos para otimizar a composição nutritiva e a condição de pH para o reator MRPT.

Figura 33 – Diferentes configurações do reator MRPT



Nota: M<sub>1</sub> a M<sub>6</sub> são reatores cilíndricos de espuma de poliuretano PCH produzidos com diferentes valores de diâmetro e comprimento

De acordo com 18 experimentos considerando diâmetro, comprimento e rendimento de L-asparaginase obtidos para 24, 48 e 72h de fermentação, pode-se observar que as dimensões do reator M<sub>4</sub> a 48h de fermentação representam as melhores condições a serem utilizadas em sequência para otimizar a concentração das fontes de carbono (L-asparagina e glicose) e condições de pH. Além disso, a Figura 33 representa a influência das dimensões da

matriz polimérica com células imobilizadas sobre a atividade da L-asparaginase, que está em contato permanente com o meio nutriente no MRPT. Pode-se observar que o tempo de fermentação de 48h representa a melhor produção enzimática em todas as situações. Esse resultado é consistente com os diversos estudos encontrados na literatura. Aruna (2019) gerando produto de valor agregado a partir de cascas de abacaxi usando FES e *Trichoderma viride* a 30 °C, obteve produção máxima de proteína após 96h de fermentação. Zhao et al. (2019) produzindo proteinase e glicosídeo hidrolase em FES com *Aspergillus oryzae*, obteve uma produção enzimática ótima em 33h de fermentação. Canabarro et al. (2017) e colaboradores na produção de etanol por sacarificação no estado sólido e fermentação em biorreator de leito fixo, obtendo o pico de produção nas 24h de fermentação.

Em relação às dimensões do suporte de imobilização de células poliméricas, pode-se observar que o diâmetro e o comprimento influenciam a atividade enzimática, sendo que o diâmetro de 21 mm ( $M_2$ ,  $M_4$  e  $M_6$ ) representa uma maior produção de L-asparaginase em comparação para um diâmetro de 34 mm ( $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$ ), esse fato pode ser explicado pela dificuldade de passagem dos nutrientes pelo meio sólido ao longo da direção radial do reator.

Embora não existam na literatura estudos descrevendo reatores semelhantes ao proposto, a dimensão do diâmetro pode ser comparada com reatores do tipo bandeja sugerindo uma membrana sólida de 5 a 30 mm de altura (ARORA; RANI; GHOSH, 2018), o que representa valores adequados em comparação com os resultados obtidos neste trabalho. Demir e Tari (2016) produzindo poligalacturonase pela soja *Aspergillus soybean* em fermentação em estado sólido com farelo de trigo em reator tipo bandeja, trabalhada com altura de 11 a 14 mm. Mahmoodi, Najafpour e Mohammadi (2019) na bioconversão de resíduos agroindustriais em enzimas pectinase via FES, trabalharam com um biorreator de bandeja com altura sólida próxima a 15 mm. Doriya e Kumar (2018) na produção de L-asparaginase de *Aspergillus sp.* em FES usando um biorreator de bandeja, eles trabalharam com uma altura de massa sólida no reator entre 10 a 18 mm. Em relação ao comprimento variável da matriz do PU, pode-se observar que ele também influencia a atividade da L-asparaginase, conforme demonstrado pela comparação entre os reatores com matrizes  $M_2$  e  $M_4$  com diâmetro de 21 mm e os reatores com matrizes  $M_3$  e  $M_5$  com diâmetro de 34 mm, com maior atividade da L-asparaginase observada em  $M_4$  em 48 h de fermentação.

A Tabela 22 e Figura 34 mostram os resultados experimentais e os resultados estimados com o modelo de RNA. Pode-se observar que a maior atividade de L-asparaginase foi de 7,95 U/g em pH 5, concentração de glicose de 6,5 g/L e concentração de L-asparagina de 6,0 g/L, com erros inferiores a 5,28 %. A Figura 34 mostra o ajuste dos dados experimentais relacionados a otimização das variáveis pH e meio nutritivo (glicose e L-asparagina). A otimização do modelo de RNA usando o método de evolução diferencial (DE) foi satisfatório com  $R^2$  superior a 0,95 e RMSE inferior a 0,03, considerando as etapas de treinamento e teste do modelo RNA com DE (RNA-DE). A RNA otimizada (8 neurônios na camada oculta) obteve

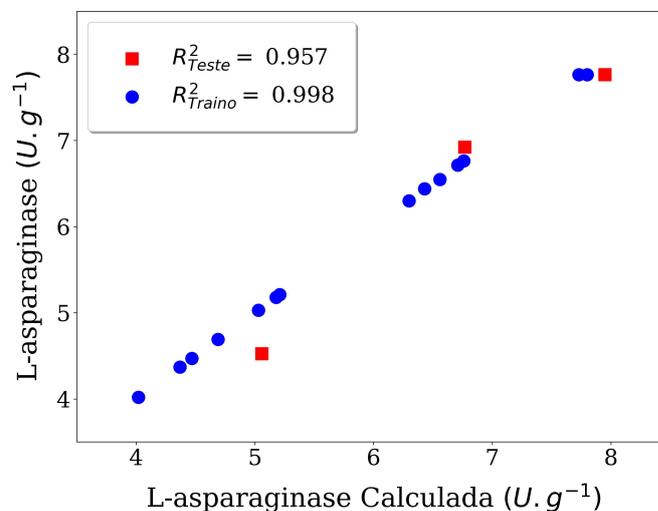
uma atividade de L-asparaginase de 8,5 U/g em condições ótimas de pH 5,0, concentração de glicose 5,4 g/L e concentração de L-asparagina 5,2 g/L em processo batela de FES usando o novo reator MRPT (25°C, 48h).

Tabela 22 – Resultados experimentais e calculados de L-asparaginase em FES com MRPT

| Testes | pH ( $x_1$ ) | Glicose ( $x_2$ )<br>(g/L) | L-asparagina ( $x_3$ )<br>(g/L) | L-asparaginase (U/g) |           | Erro <sup>a</sup><br>(%) |
|--------|--------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------|-----------|--------------------------|
|        |              |                            |                                 | Observado            | Calculado |                          |
| 1      | 4,0          | 3,0                        | 4,0                             | 4,02 ± 0,13          | 4,02      | -0,01                    |
| 2      | 6,0          | 3,0                        | 4,0                             | 4,47 ± 0,03          | 4,47      | -0,04                    |
| 3      | 4,0          | 10,0                       | 4,0                             | 6,30 ± 0,01          | 6,30      | -0,04                    |
| 4      | 6,0          | 10,0                       | 4,0                             | 6,71 ± 0,10          | 6,70      | -5,28                    |
| 5      | 4,0          | 3,0                        | 8,0                             | 5,06 ± 0,09          | 4,79      | -0,04                    |
| 6      | 6,0          | 3,0                        | 8,0                             | 5,21 ± 0,11          | 5,21      | 0,02                     |
| 7      | 4,0          | 10,0                       | 8,0                             | 6,43 ± 0,11          | 6,42      | 0,08                     |
| 8      | 6,0          | 10,0                       | 8,0                             | 6,56 ± 0,12          | 6,55      | -5,22                    |
| 9      | 3,32         | 6,50                       | 6,0                             | 5,03 ± 0,05          | 5,03      | -0,01                    |
| 10     | 6,68         | 6,50                       | 6,0                             | 6,77 ± 0,02          | 7,12      | -0,01                    |
| 11     | 5,0          | 0,62                       | 6,0                             | 4,69 ± 0,02          | 4,69      | 0,01                     |
| 12     | 5,0          | 12,38                      | 6,0                             | 5,18 ± 0,01          | 5,18      | 0,02                     |
| 13     | 5,0          | 6,50                       | 2,64                            | 4,37 ± 0,05          | 5,36      | -0,01                    |
| 14     | 5,0          | 6,50                       | 9,36                            | 6,76 ± 0,06          | 6,76      | 0,02                     |
| 15     | 5,0          | 6,50                       | 6,0                             | 7,73 ± 0,01          | 7,76      | 0,20                     |
| 16     | 5,0          | 6,50                       | 6,0                             | 7,95 ± 0,02          | 7,76      | 2,33                     |
| 17     | 5,0          | 6,50                       | 6,0                             | 7,80 ± 0,01          | 7,76      | 0,46                     |

Nota: <sup>a</sup> representa o erro relativo entre a atividade de L-asparaginase observada experimentalmente e calculada com o modelo RNA

Figura 34 – Ajuste dos dados experimentais na otimização do pH e meio nutritivo da FES



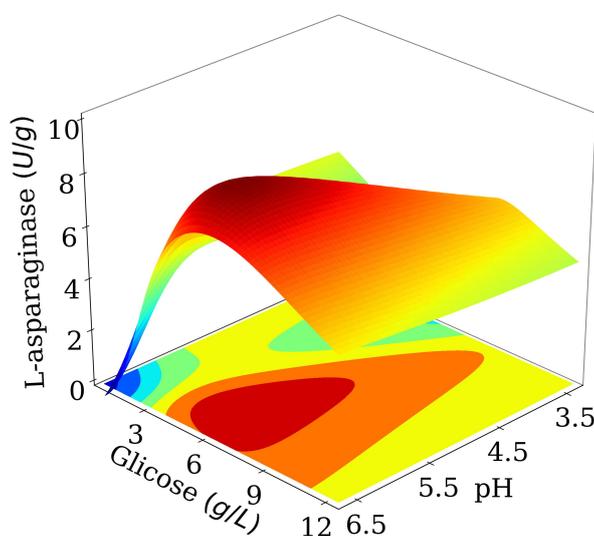
Nota: RMSE treino e teste igual 0,0002 e 0,023 respectivamente

Na etapa de validação experimental do modelo RNA-DE foi observado atividade máxima de L-asparaginase de 8,62 U/g com erro inferior a 1.5%. A atividade de L-asparaginase obtida nesta etapa de otimização do MRPT é compatível com outros trabalhos divulgados na literatura. Meghavarnam e Janakiraman (2017) encontraram atividade da L-asparaginase de 1,3 U/g na biomassa do arroz em FES com *Fusarium culmorum* (ASP-87) e inferior a outras como, Doriya e Kumar (2018) produziu L-asparaginase em FES com o substrato misturado, obtendo a atividade de 20,6 U/g, Cunha et al. (2018) utilizando *Aspergillus niger* em FES com farinha de casca de maracujá, obtida, em condições otimizadas com produção de L-asparaginase de 38,0 U/g. A atividade da L-asparaginase obtida nesta etapa do trabalho comparada com a literatura citada sugere uma melhor otimização do MRPT, e deve ser considerado para a próxima etapa de otimização as condições ótimas obtidas.

Para facilitar a compreensão e visualização das variáveis concentração de L-asparagina, concentração de glicose e os valores de pH, analisadas em FES usando MRPT, foram construídas superfícies tridimensionais na condição otimizada obtida anteriormente (Figuras 35, 36 e 37). Os gráficos tridimensionais foram construídos pelo modelo RNA-DE (O erro RMSE (Root Mean Square Error) nas etapas de treino e teste foram de 0,0002 e 0,023, respectivamente), fixando uma variável na condição ótima e variando as outras duas variáveis nos respectivos intervalos adotados na Tabela 22.

A Figura 35 mostra o gráfico tridimensional que representa a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* em FES usando o novo RMTP em diferentes valores das variáveis concentração de glicose e valores de pH, fixando a outra variável na condição otimizada. Pode-se observar que a faixa central da variável concentração de glicose foi a melhor, já os valores de pH foram de 5,0 até 6,5 na região de maior atividade de L-asparaginase.

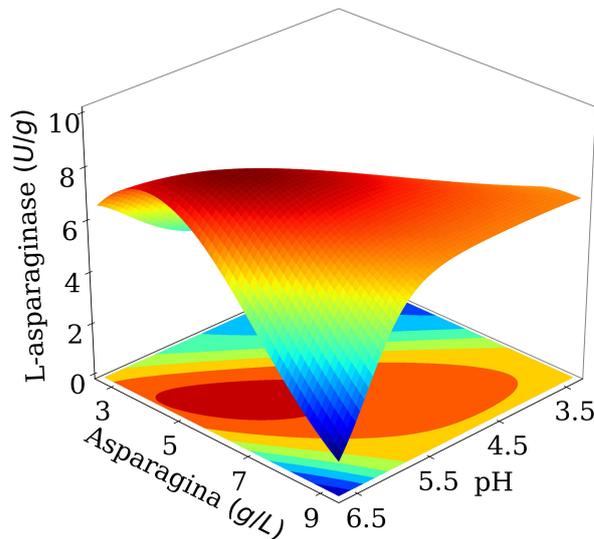
Figura 35 – Análise de pH e concentração de glicose na produção de L- asparaginase



As variáveis concentração de L-asparagina e valores de pH apresentadas na Figura 36

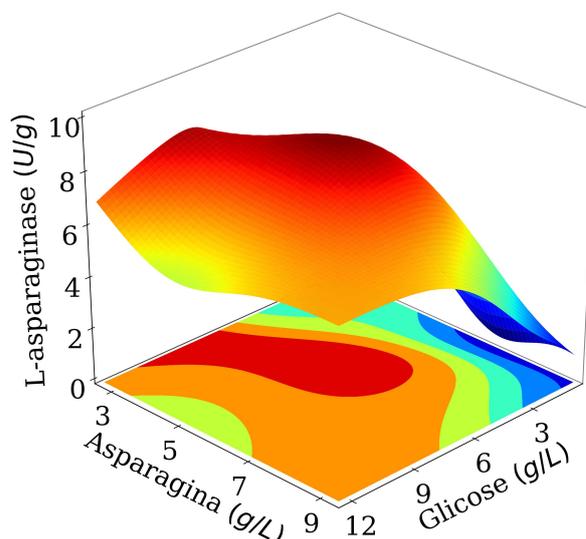
foram avaliadas na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES usando o novo reator MRPT. Pode-se observar que os valores ótimos de pH se concentraram entre 5,5 a 6,5 e a concentração de L-asparagina foi inferior a 7 g/L no ponto ótimo.

Figura 36 – Análise de pH e concentração de L-asparagina na produção de L- asparaginase



A Figura 37 mostra as duas fontes de carbono e nitrogênio (Glicose e L-asparagina) utilizadas na produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES usando o novo MRPT. Considerando as variáveis da Figura 37, pode-se observar que a máxima produção de L-asparaginase foi obtida em valores intermediários de concentração de glicose e concentração de L-asparagina. Além disso, a baixa concentração de glicose aliada a valores de concentração de L-asparagina próximos de 6,5 g/L e pH próximo de 7 e abaixo de 3, dificulta o desempenho do fungo filamentososo na produção de L-asparaginase.

Figura 37 – Análise da concentração de L-asparagina e glicose na produção de L- asparaginase



### 4.12.3 Otimização das dimensões da matriz polimérica usada no MRPT

A Tabela 23 e Figura 38 representam os resultados experimentais e os resultados calculados pelo modelo de RNA associado à atividade de L-asparaginase em função taxas de fluxo de reciclagem de solução (Q), o diâmetro do suporte polimérico usado na imobilização celular (D), comprimento do suporte polimérico usado na imobilização celular (L) e o volume de líquido em contato com um meio de poliuretano sólido (V).

Tabela 23 – Resultados experimentais e calculados de L-asparaginase associados as dimensões da matriz polimérica do MRPT

| Testes | Q<br>(mL/min) | D<br>(mm) | L<br>(mm) | V<br>(mL) | L-asparaginase (U/g) |           | Erro<br>(%) |
|--------|---------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|-----------|-------------|
|        |               |           |           |           | Observado            | Calculado |             |
| 1      | 20,0          | 46,0      | 150,0     | 300,0     | 11,29 ± 0,12         | 10,85     | 5,2         |
| 2      | 20,0          | 46,0      | 100,0     | 300,0     | 10,23 ± 0,13         | 10,23     | 1,3         |
| 3      | 20,0          | 34,0      | 150,0     | 300,0     | 8,53 ± 0,03          | 8,53      | 0,3         |
| 4      | 20,0          | 34,0      | 100,0     | 300,0     | 11,26 ± 0,10         | 11,26     | 0,9         |
| 5      | 15,0          | 46,0      | 150,0     | 300,0     | 11,91 ± 0,11         | 11,91     | 0,9         |
| 6      | 15,0          | 46,0      | 100,0     | 300,0     | 10,64 ± 0,02         | 10,63     | 0,3         |
| 7      | 15,0          | 34,0      | 150,0     | 300,0     | 11,92 ± 0,01         | 11,91     | 0,2         |
| 8      | 15,0          | 34,0      | 100,0     | 300,0     | 9,64 ± 0,11          | 9,63      | 1,2         |
| 9      | 20,0          | 46,0      | 150,0     | 450,0     | 9,24 ± 0,08          | 9,24      | 0,8         |
| 10     | 20,0          | 46,0      | 100,0     | 450,0     | 9,86 ± 0,10          | 10,24     | -2,7        |
| 11     | 20,0          | 34,0      | 150,0     | 450,0     | 10,39 ± 0,04         | 10,38     | 0,5         |
| 12     | 20,0          | 34,0      | 100,0     | 450,0     | 10,24 ± 0,06         | 10,25     | 0,5         |
| 13     | 15,0          | 46,0      | 150,0     | 450,0     | 10,48 ± 0,09         | 10,47     | 1,0         |
| 14     | 15,0          | 46,0      | 100,0     | 450,0     | 10,24 ± 0,11         | 10,22     | 1,3         |
| 15     | 15,0          | 34,0      | 150,0     | 450,0     | 11,22 ± 0,12         | 11,22     | 1,1         |
| 16     | 15,0          | 34,0      | 100,0     | 450,0     | 9,92 ± 0,13          | 9,92      | 1,3         |
| 17     | 5,0           | 40,0      | 125,0     | 375,0     | 14,88 ± 0,04         | 14,88     | 0,2         |
| 18     | 35,0          | 40,0      | 125,0     | 375,0     | 9,93 ± 0,07          | 9,92      | 0,8         |
| 19     | 20,0          | 21,0      | 125,0     | 375,0     | 13,70 ± 0,05         | 13,69     | 0,4         |
| 20     | 20,0          | 54,0      | 125,0     | 375,0     | 11,65 ± 0,10         | 11,65     | 0,8         |
| 21     | 20,0          | 40,0      | 50,0      | 375,0     | 11,23 ± 0,11         | 11,22     | 1,1         |
| 22     | 20,0          | 40,0      | 200,0     | 375,0     | 11,38 ± 0,03         | 11,37     | 0,3         |
| 23     | 20,0          | 40,0      | 125,0     | 150,0     | 12,16 ± 0,11         | 12,15     | 1,0         |
| 24     | 20,0          | 40,0      | 125,0     | 600,0     | 11,92 ± 0,10         | 11,92     | 0,8         |
| 25     | 20,0          | 40,0      | 125,0     | 375,0     | 14,04 ± 0,14         | 14,04     | 1,0         |
| 26     | 20,0          | 40,0      | 125,0     | 375,0     | 14,06 ± 0,11         | 14,04     | 0,9         |
| 27     | 20,0          | 40,0      | 125,0     | 375,0     | 14,14 ± 0,12         | 14,04     | 1,6         |

Nota: Todos os pontos experimentais foram realizados em triplica.

Pode-se perceber que os efeitos associados aos limites de transferência de nutrientes entre o meio líquido e as células imobilizadas no suporte polimérico foram reduzidos com a recirculação dos nutrientes presentes no MRPT, porque mesmo em situações da menor atividade da L-asparaginase observada na Tabela 22 e na condição otimizada anterior (8,5

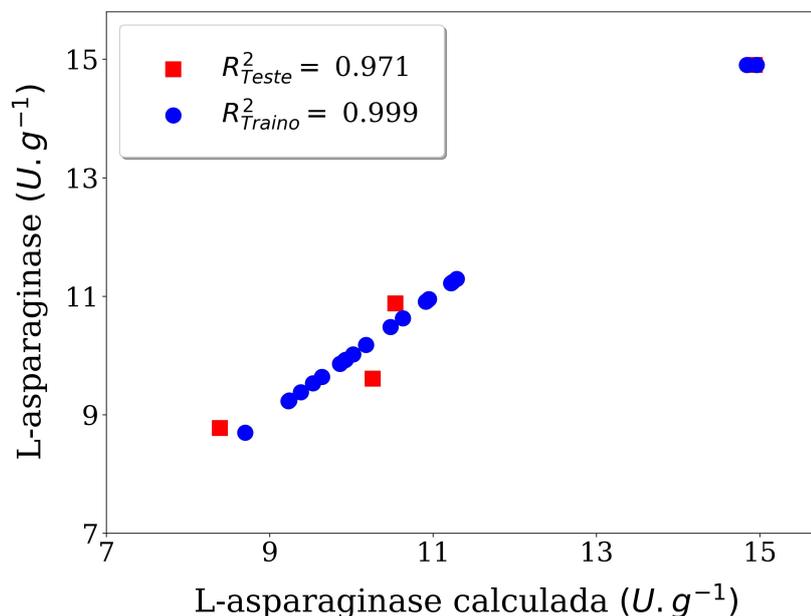
U/g) foi superior às atividades da L-asparaginase apresentada na condição otimizada com diâmetro de 21 mm (Tabela 23). A dificuldade de transferência de massa é um problema de grande importância que afeta diretamente produção em processos de fermentação. Zhang et al. (2017) e colaboradores avaliados como correlações de propriedades relacionadas às dificuldades de transferência de massa e calor no processo de fermentação sólida. Liu et al. (2018) produção no produção de eritritol em meio de casca de trigo okara em fermentação sólida, utilizando diferentes inércias Suportes para melhorar a porosidade e transferência de nutrientes no processo de fermentação.

Além disso, pode-se observar que a maior atividade de L-asparaginase obtida nesta etapa foi de 14,88 U/g em Q de 5,0 mL/mim, D de 40,0 mm, C de 125,0 mm e V de 375,0 mL, com erros inferiores a 5,2 %, gerando um aumento de 75% na produção de atividade de L-asparaginase em comparação a condição otimizada.

A Figura 38 mostra o ajuste dos dados experimentais relacionados a otimização das variáveis Q, D, L e V na produção de L-asparaginase no novo reator MRPT. A otimização do modelo de RNA usando o método de evolução diferencial (DE) foi satisfatório com  $R^2$  superior a 0,97 e RMSE inferior a 0,03, considerando as etapas de treinamento e teste do modelo RNA com DE (RNA-DE).

A RNA otimizada (7 neurônios na camada oculta) obteve uma atividade de L-asparaginase de 19,36 U/g em condições ótimas de Q de 5,0 mL/min, D de 21 mm, L de 98,7 mm e V de 151,57 mL em processo batelada de FES usando o novo reator MRPT ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ , 48h). Na etapa de validação experimental do modelo RNA-DE foi observado atividade máxima de L-asparaginase de 19,82 U/g com erro inferior a 1.2%.

Figura 38 – Ajuste dos dados experimentais na otimização da dimensões características da matriz polimérica do MRPT

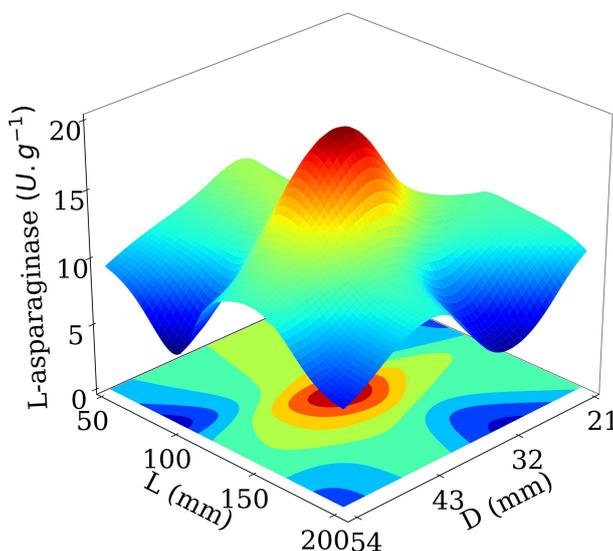


Nesta etapa de otimização as condições operacionais relacionadas a matriz polimérica e vazão de reciclo foram avaliadas na produção de L-asparaginase em FES com MRPT. Para facilitar a compreensão e visualização das variáveis diâmetro da matriz polimérica (D, mm), comprimento da matriz polimérica (L, mm), volume de líquido no MRPT (V, mL) e vazão de reciclo de nutrientes (Q, mL/min), foram construídas superfícies tridimensionais na condição otimizada obtida anteriormente (Figuras 39, 40, 41, 42 e 43 e 44).

Os gráficos tridimensionais foram construídos pelo modelo RNA-DE (O erro RMSE (Root Mean Square Error) nas etapas de treino e teste foram de 0,0001 e 0,04, respectivamente), variando duas variáveis nos respectivos intervalos adotados na Tabela 23 e fixando as outras variáveis na condição ótima.

A Figura 39 mostra o gráfico tridimensional que representa a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* em FES usando o novo MRPT em diferentes valores das variáveis diâmetro e comprimento da matriz polimérica, respectivamente, D e L. Pode-se observar que a atividade de L-asparaginase foi maior para valores de D menores que 35 mm e valores de L entre 60 e 120 mm.

Figura 39 – Efeito das variáveis diâmetro (D) e comprimento (L) da matriz polimérica usada no MRPT para a produção de L-asparaginase



Nota: L, comprimento da parte PCH do MRPT, também pode ser representada pela letra C; D, diâmetro da parte PCH do MRPT.

A Figura 40 mostra o efeito das variáveis volume de líquido nutritivo no MRPT (V) e diâmetro da matriz polimérica (D) na produção de L-asparaginase em FES com MRPT. Quando avaliado V e D, pode-se observar que os maiores valores de atividade de L-asparaginase obtidas foram nos menores valores de V (menor que 200 mL) e D (menor que 35 mm).

A Figura 41 mostra o efeito das variáveis C e V na produção de L-asparaginase em FES

com MRPT. O gráfico indica que o ponto ótimo de atividade de L-asparaginase está localizado em valores intermediários de C e pequenos volumes de líquido no MRPT. Além disso, pode ser observado que o aumento de líquido no MRPT e o tamanho da matriz polimérica diminui a atividade de L-asparaginase em FES de 48h (25°C).

Figura 40 – Efeito das variáveis diâmetro da matriz polimérica (D) e volume de líquido nutritivo (V) no MRPT para a produção de L-asparaginase

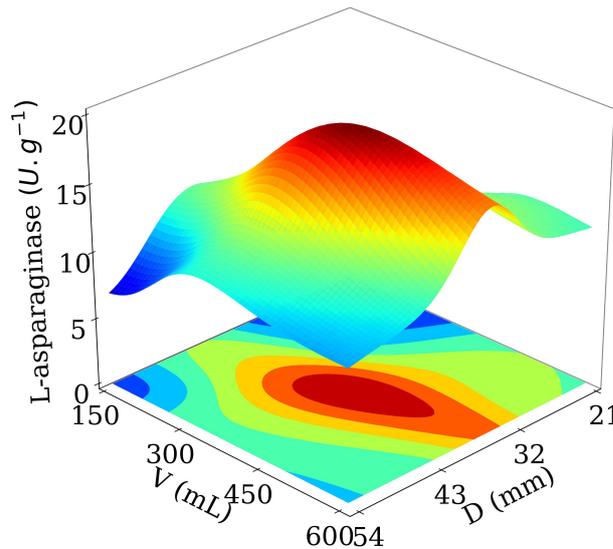
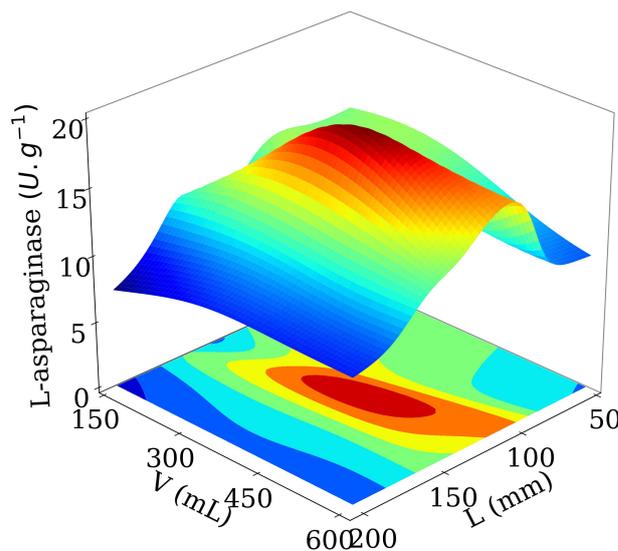


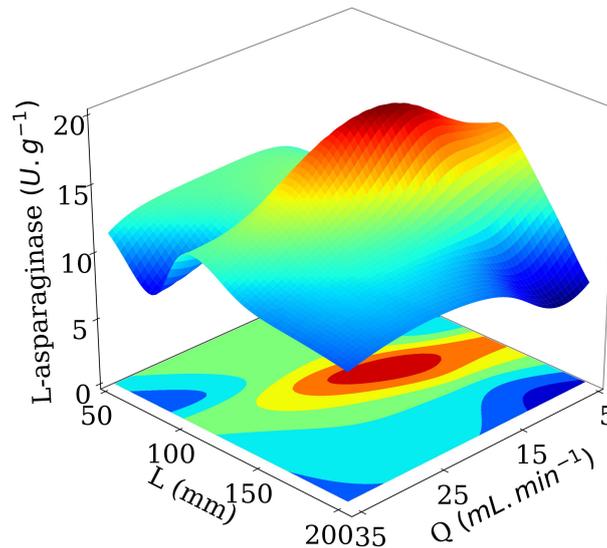
Figura 41 – Efeito das variáveis Comprimento da matriz polimérica (C) e volume de líquido nutritivo (V) no RMTP para a produção de L-asparaginase



Nas Figuras 42 e 43 são ilustradas os gráficos tridimensionais das variáveis vazão de reciclo de nutrientes (Q) com o comprimento da matriz polimérica (L) (Figura 42) e com a variável volume de nutrientes (V) (Figura 43) nas condições ótimas obtidas pelo modelo RNA-DE. Pode-se observar que região ótima de produção de L-asparaginase em FES com MRPT foi

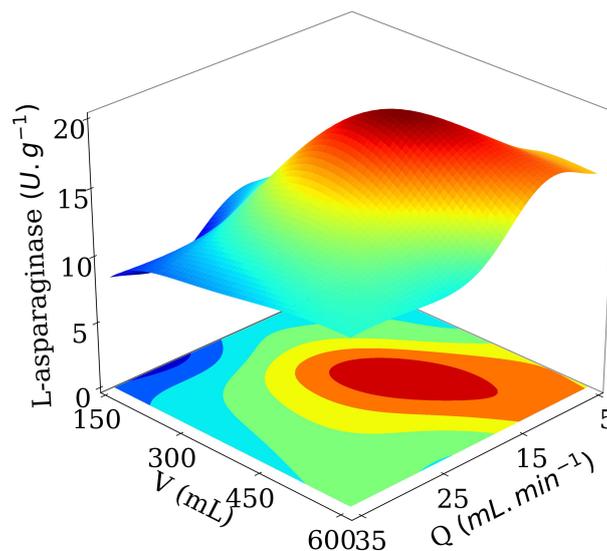
obtida em baixos valores de volume de nutrientes, baixas vazões de reciclo e comprimento da matriz polimérica próximo de 120 mm.

Figura 42 – Efeito das variáveis comprimento da matriz polimérica (L) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase



Nota: L, comprimento da parte PCH do MRPT, também pode ser representada pela letra C; Q, vazão de reciclo de meio nutritivo do MRPT.

Figura 43 – Efeito das variáveis volume de líquido nutritivo (V) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase

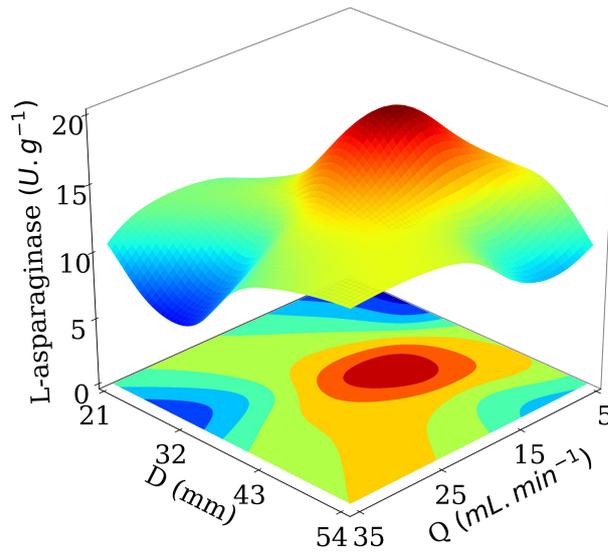


Nota: V, volume da parte PLH do MRPT, também pode ser representada pela letra Vol; Q, vazão de reciclo de meio nutritivo do MRPT.

A Figura 44 mostra o efeito das variáveis vazão de reciclo de nutrientes (Q) e o diâmetro

da matriz polimérica (D) usada na produção de L-asparaginase em FES com MRPT. Pode-se observar neste caso que o aumento da vazão de reciclo de nutrientes interfere negativamente na produção de L-asparaginase e que a melhor vazão localiza-se entre 5 e 20 mL/min.

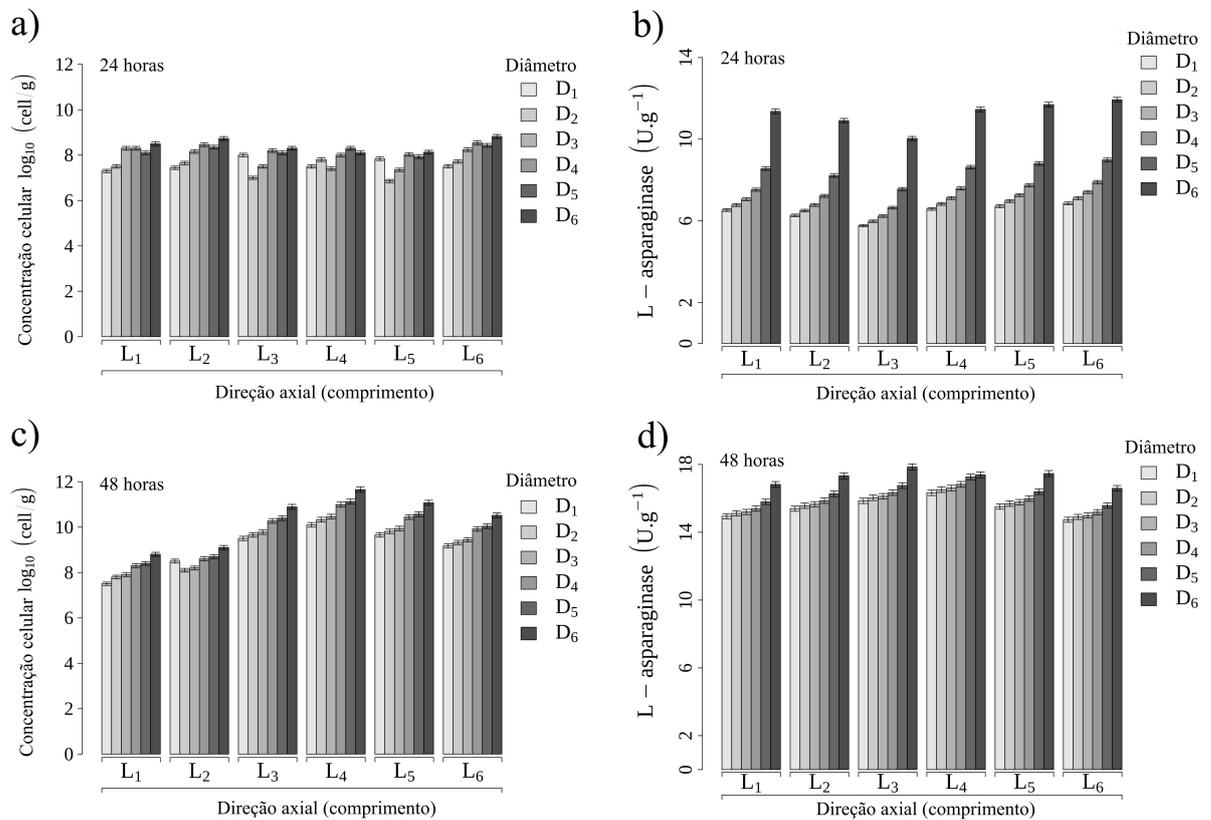
Figura 44 – Efeito das variáveis diâmetro da matriz polimérica (D) e vazão de reciclo de nutrientes (Q) no MRPT para a produção de L-asparaginase



#### 4.12.4 Validação da atividade de L-asparaginase otimizada em MRPT

Nesta etapa foi realizado os ensaios experimentais de validação do modelo de RNA-DE obtido anteriormente, foram realizados testes nas condições otimizadas de produção de L-asparaginase em MRPT, obtendo um rendimento máximo de L-asparaginase de 19,33 U/g encontrado para os valores de D, L, Q e V de, respectivamente, 38,53 mm, 127,02 mm, 15,69 mL/min e 395,91 mL. Um comparativo a análise entre o resultado otimizado encontrado nesta etapa com os demais valores encontrados nas etapas anteriores deste trabalho mostram que o MRPT ótimo possui um diâmetro 1,83 vezes maior que os melhores resultados encontrados no primeiro modelo de MRPT apresentado na Figura 33.

Figura 45 – Regiões selecionadas para análise da atividade da L-asparaginase na direção axial (D<sub>1</sub> a D<sub>6</sub>) e na direção do comprimento (L<sub>1</sub> a L<sub>6</sub>)



Nota: D, representa a direção radial de análise do reator PCH do MRPT; L, representa a direção axial de análise do reator PCH do MRPT.

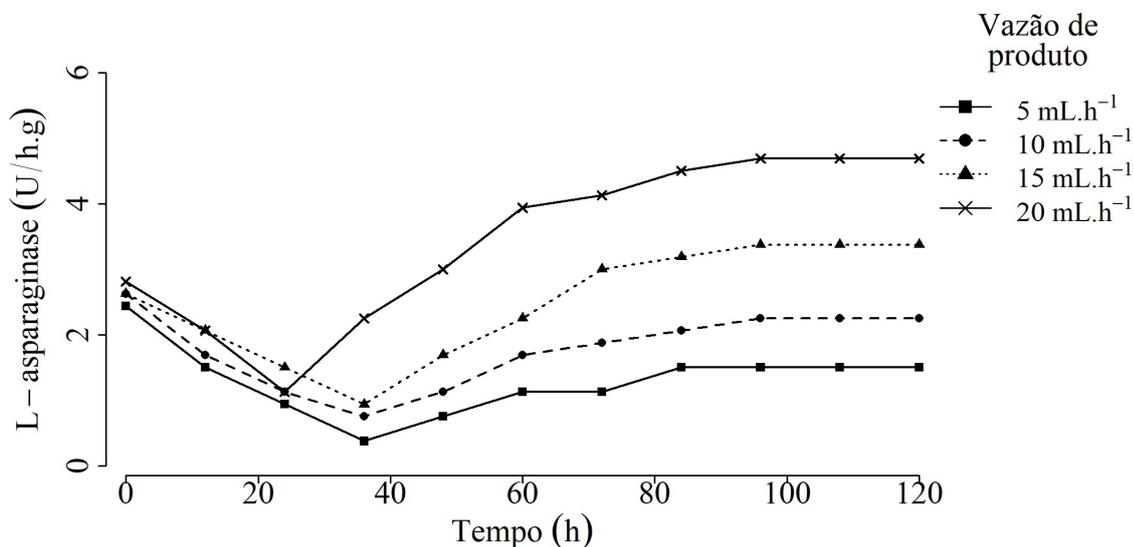
Observa-se também o rendimento de L-asparaginase foi 5,03 vezes maior do que os resultados encontrados no primeiro modelo de MRPT, o que sugere em condições otimizadas a condição favorável de MRPT para o crescimento celular e rendimento de L-asparaginase em todas as partes de PCH como pode ser observado na célula e L- Distribuição especial da asparaginase apresentada na Figura 45. A dificuldade de transferência de massa é um

problema de grande importância que afeta diretamente a produção nos processos de fermentação conforme observado na literatura. Hu et al. (2011) e colaborações consideram os fatores importantes que afetam a transferência de calor e massa na fermentação em estado sólido no estudo da produção de celulase por fermentação em estado sólido com espuma de poliuretano como suporte inerte. Zhang et al. (2017) estudando a transferência de nutrientes no processo de fermentação na produção de eritritol em meio de casca de trigo okara em fermentação em estado sólido para diferentes suportes inertes visando melhorar a porosidade do sistema. Finkler et al. (2017) avaliaram e calcularam os coeficientes de transferência de calor e massa em um biorreator piloto de fermentação em estado sólido de leito fixo usando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar para a produção de pectinase por *Aspergillus niger*.

#### 4.12.5 Operação contínua do MRPT

A Figura 46 mostra os efeitos da conversão do processo de produção de L-asparaginase em FES batela com reciclagem de nutrientes para o processo contínuo de FES. Inicialmente usando as vazões de 5, 10, 15 e 20 mL/h (RMTP otimizado) o processo contínuo de FES em MRPT foi avaliado em 120h.

Figura 46 – Início do processo contínuo de produção de L-asparaginase em FES com MRPT

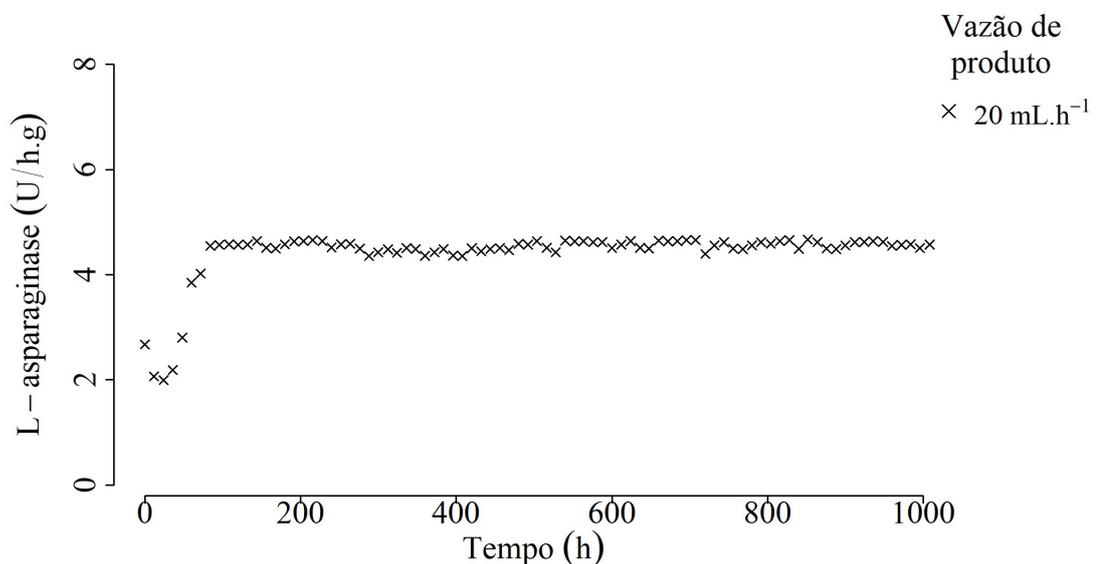


Pode-se observar que o processo contínuo torna-se estável após 96h de operação em todas as vazões avaliadas, com vazões entre 5 e 10 mL/h, observou-se que a condição de estabilização representa uma produção enzimática inferior à condição operacional inicial do reator, já as vazões entre 15 e 20 mL/h, o estado de equilíbrio representa uma produção de L-asparaginase superior à condição inicial de operação do processo. O tempo de 96h necessário para estabilização do processo contínuo é consistente com o observado por outros

autores em diferentes fermentações. Guo et al. (2018) produzindo ácido docosahexaenóico em um processo de fermentação contínua em duas etapas, observado o estado estacionário após 96 horas de operação. Veeravalli e Mathews (2018) realizaram a produção contínua de ácidos graxos de cadeia curta a partir da xilose em fermentação submersa com *Lactobacillus buchneri*, observando um estado estacionário em 160 horas de operação. Rahimi et al. (2019) na produção recombinante de antígeno de superfície da hepatite B em *Pichia pastoris* empregando fermentação contínua observaram um estado estacionário em 162h de operação. Considerando os resultados obtidos, foi selecionada a vazão de 20 mL/h para a próxima etapa de operação contínua do reator modular com tecnologia polimérica.

A Figura 47 mostra a produção contínua de L-asparaginase em FES com MRPT utilizando a vazão de 20 mL/h na saída e entrada de líquido do reator. Nesta etapa foi avaliado a produção contínua de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES com o reator MRPT durante um longo período de operação (948 h). Após o início do processo contínuo de produção de L-asparaginase, pode-se observar primeiro um período de oscilação da atividade da L-asparaginase até atingir uma região de maior estabilidade da atividade da L-asparaginase, obtendo-se uma produção média de L-asparaginase de 4,7 U/h.g.

Figura 47 – Análise do reator RMTPT em 900 h de FES com vazão constante

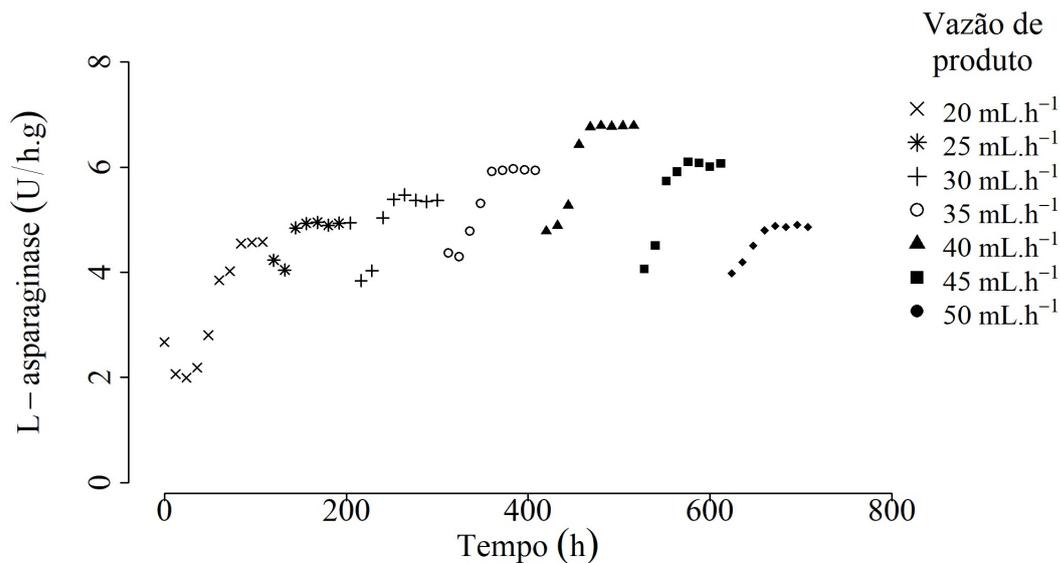


O processo contínuo de produção de L-asparaginase em FES com MRPT foi submetido a alterações na vazão de entrada e saída de líquido do reator MRPT, sendo mantido em operação durante 840 h de operação. A Figura 48 mostra as vazões e os resultados de L-asparaginase obtidos durante o tempo de operação do reator MRPT.

Pose-se observar que inicialmente a um período de adaptação do microrganismo até atingir a estabilidade de produção de L-asparaginase, como também foi observado na Figura

46. Além disso, pode-se observar que a máxima atividade de L-asparaginase obtida foi de 3,8 (U/g.h) com uma vazão de entrada e saída igual a 40 mL/h e o processo atingiu a estabilidade na produção de L-asparaginase em todas as vazões testadas no reator MRPT.

Figura 48 – Interferência da vazão de saída e entrada de líquido na produção contínua de L-asparaginase em FES



### 4.13 Conclusão

Um novo reator modular com tecnologia polimérica (MRPT) foi desenvolvido e a produção de L-asparaginase a partir de *Penicillium sp.* LAMAI 505 foi conduzido com sucesso. Além disso, o MRPT provou ser útil para a produção contínua de L-asparaginase a partir de diferentes fluxos de entrada e saída. A produção contínua de L-asparaginase na fermentação em estado sólido e a característica modular do MRPT indicam um grande potencial para o novo sistema de biorreator estabelecido.

# 5 Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

## 5.1 Conclusão

O principal objetivo deste trabalho foi apresentar dois novos reatores biológicos capazes de produzir a enzima L-asparaginase fúngica por fermentação em estado sólido (FES) e operar em processo contínuo por longos períodos. Um detalhado estudo foi realizado em ambos os reatores biológicos, modelando os dados experimentais e otimizando as variáveis de projeto. Como pode ser observado nos capítulos anteriores deste trabalho, os reatores biológicos propostos apresentaram resultados satisfatórios na produção de L-asparaginase fúngica em FES com erros menores a 2,4%.

Além disso, o reator múltiplo com células imobilizadas (MRIC) e o reator modular com tecnologia polimérica (MRPT) demonstraram que o reciclo que meio nutritivo aumenta a produção enzimática de L-asparaginase, devido a melhora nas condições de controle de transferência de massa e calor do sistema fermentativo. Em geral, ambos os reatores biológicos propostos usaram matrizes poliméricas como suporte sólido inerte, o que possibilitou o reuso da matriz por vários ciclos de produção de L-asparaginase, aumentando o rendimento e gerando novas possibilidades de aplicação para os biorreatores MRIC e MRPT.

Outro aspecto importante observado foi o uso de materiais polimérico de baixo custo no desenvolvimento e operação dos reatores MRIC e MRPT na produção de L-asparaginase fúngica. O uso destes materiais além de reduzir o custo de construção dos reatores possibilitam o reuso da matriz polimérica por longos períodos de operação aumentando o rendimento de L-asparaginase em FES.

## 5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Avaliando os dois novos reatores biológicos propostos para a produção de L-asparaginase fúngica em FES são apresentadas sugestões para trabalhos futuros a seguir:

- Realizar o estudo dinâmico nos reatores MRIC e MRPT avaliando o aumento de escala de produção de L-asparaginase em FES;
- Incorporação de novas tecnologia para aumentar o controle de produção e da eficiência dos materiais poliméricos utilizados nos reatores;
- Avaliar a produção contínua de outros produtos em processos fermentativos ;

- Avaliar novas estratégias de produção de L-asparaginase ou outro produto desejado e novas configurações estruturais para os reatores biológicos;
- Desenvolver o modelo dinâmico dos reatores MRIC e MRPT, incluindo as interações térmicas entre as fases líquida e sólida dos reatores.

## Referências

Abd El Baky, H. H.; El Baroty, G. S. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, v. 2016, p. 1785938, 2016. ISSN 1741-427X (Print). Disponível em: <<https://10.1155/2016/1785938>>. Citado na página 36.

ABDELRAZEK, N. A. et al. Experimental and bioinformatics study for production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. *AMB Express*, v. 9, n. 1, p. 39, mar 2019. ISSN 2191-0855 (Print). Disponível em: <<https://10.1186/s13568-019-0751-3>>. Citado na página 79.

ABEDI, E.; POURMOHAMMADI, K.; SAYADI, M. Synergic effect of phytase, amylase, galactosidase, and asparaginase activity on the mitigation of acrylamide and hydroxymethylfurfural in roll bread by co-culture fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 106, p. 104355, 2022. ISSN 0889-1575. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104355>>. Citado na página 27.

ABERKANE, A. et al. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 50, n. 5, p. 719–722, nov 2002. ISSN 0305-7453 (Print). Disponível em: <<https://10.1093/jac/dkf187>>. Citado 2 vezes nas páginas 60 e 83.

ABOYEJI, O. O. et al. Optimization of media components and fermentation conditions for citric acid production from sweet potato peel starch hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Scientific African*, v. 10, p. e00554, 2020. ISSN 2468-2276. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00554>>. Citado na página 32.

ACHAPPA, S. Enzymes: Sustainable Product Development by Solid State Fermentation- A Review. feb 2019. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/331249050\\_Enzymes\\_Sustainable\\_Product\\_Development\\_by\\_Solid\\_State\\_Fermentation-\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/331249050_Enzymes_Sustainable_Product_Development_by_Solid_State_Fermentation-_A_Review)>. Citado na página 27.

AKINDOYO, J. O. et al. Polyurethane types, synthesis and applications-a review. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 115, p. 114453–114482, 2016. ISSN 20462069. Disponível em: <<https://10.1039/c6ra14525f>>. Citado 3 vezes nas páginas 52, 53 e 81.

ALAM, S. et al. Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system. *Bioresource Technology*, Elsevier, v. 269, p. 121–126, dec 2018. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<https://10.1016/J.BIORTECH.2018.08.095>>. Citado na página 27.

ALBERTI, F.; FOSTER, G. D.; BAILEY, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Applied Microbiology and Biotechnology, v. 101, n. 2, p. 493–500, 2017. ISSN 14320614. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8034-2>>. Citado na página 31.

ALESSANDRELLO, M. J. et al. Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam under different temperature conditions. *Marine Pollution Bulletin*, Pergamon,

v. 122, n. 1-2, p. 156–160, sep 2017. ISSN 0025-326X. Disponível em: <<https://10.1016/J.MARPOLBUL.2017.06.040>>. Citado na página 48.

ALLAN, S. J.; De Bank, P. A.; ELLIS, M. J. *Bioprocess Design Considerations for Cultured Meat Production With a Focus on the Expansion Bioreactor*. 2019. 44 p. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2019.00044>>. Citado na página 28.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, Elsevier, v. 269, p. 16–34, mar 2018. ISSN 0168-1656. Disponível em: <<https://10.1016/J.JBIOTEC.2018.01.010>>. Citado 9 vezes nas páginas 28, 39, 43, 44, 45, 46, 59, 78 e 99.

ARUNA, T. E. Production of value-added product from pineapple peels using solid state fermentation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 57, p. 102193, 2019. ISSN 1466-8564. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102193>>. Citado na página 99.

ASADPOUR, S. et al. Polyurethane-Polycaprolactone Blend Patches: Scaffold Characterization and Cardiomyoblast Adhesion, Proliferation, and Function. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, American Chemical Society, v. 4, n. 12, p. 4299–4310, dec 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00848>>. Citado na página 82.

ASHOK, A. et al. Microbes Producing L-Asparaginase free of Glutaminase and Urease isolated from Extreme Locations of Antarctic Soil and Moss. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1423, 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://10.1038/s41598-018-38094-1>>. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 38.

ASHTEKAR, N. et al. Chapter 14 - Genus Penicillium: Advances and application in the modern era. In: SINGH, J. et al. (Ed.). Elsevier, 2021. p. 201–213. ISBN 978-0-12-821005-5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821005-5.00014-4>>. Citado na página 33.

ÁVILA, S. N. et al. Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 144, p. 1–7, apr 2019. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://10.1016/J.BEJ.2018.12.024>>. Citado na página 43.

B B, K.; R, H. L-Asparaginase-an Anti Tumor Agent Production By Fusarium Equiseti Using Solid State Fermentation. *International Journal of Drug Discovery*, v. 3, n. 2, p. 88–99, 2011. ISSN 09754423. Disponível em: <<https://10.9735/0975-4423.3.2.88-99>>. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 79.

BADHWAR, P. et al. Improved Pullulan Production and Process Optimization Using Novel GA-ANN and GA-ANFIS Hybrid Statistical Tools. *Biomolecules*, v. 10, n. 1, 2020. ISSN 2218-273X. Disponível em: <<https://10.3390/biom10010124>>. Citado na página 54.

BAÑOS, J. G. et al. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Elsevier, v. 108, n. 2, p. 105–110, aug 2009. ISSN 1389-1723. Disponível em: <<https://10.1016/J.JBIOSEC.2009.03.006>>. Citado 2 vezes nas páginas 49 e 81.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, Elsevier, v. 479, p. 110607, dec 2019. ISSN 2468-8231. Disponível em: <<https://10.1016/J.MCAT.2019.110607>>. Citado na página 48.

BATOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016. Disponível em: <<https://10.1007/s12010-015-1917-3>>. Citado na página 38.

BELÉN, L. H. et al. A structural in silico analysis of the immunogenicity of L-asparaginase from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. *Biologicals*, v. 59, p. 47–55, 2019. ISSN 1045-1056. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.03.003>>. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 37.

BETHKE, P. C.; BUSSAN, A. J. Acrylamide in Processed Potato Products. *American Journal of Potato Research*, v. 90, n. 5, p. 403–424, 2013. ISSN 1874-9380. Disponível em: <<https://10.1007/s12230-013-9321-4>>. Citado na página 39.

BINOD, P. et al. Recent developments in L-glutaminase production and applications – An overview. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1766–1774, 2017. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.059>>. Citado na página 32.

BRIGITHA, L. J.; PIETERS, R.; van der Sluis, I. M. How much asparaginase is needed for optimal outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia? a systematic review. *European Journal of Cancer*, v. 157, p. 238–249, 2021. ISSN 0959-8049. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.08.025>>. Citado na página 27.

BROOME, J. D. 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. *J. Exp. Med.*, v. 127, p. 1055–1072, 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2138499/>>. Citado na página 37.

BRUMANO, L. P. et al. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, Frontiers Media S.A., v. 6, p. 212, jan 2019. ISSN 2296-4185. Disponível em: <<https://10.3389/fbioe.2018.00212>>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 38.

CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 47, p. 77–85, 2016. ISSN 16784405. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>>. Citado 4 vezes nas páginas 27, 35, 37 e 38.

CANABARRO, N. I. et al. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. *Renewable Energy*, v. 102, p. 9–14, 2017. ISSN 0960-1481. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.10.026>>. Citado na página 99.

CARAVACA, A. et al. Towards a sustainable technology for H<sub>2</sub> production: Direct lignin electrolysis in a continuous-flow Polymer Electrolyte Membrane reactor. *Electrochemistry Communications*, v. 100, p. 43–47, 2019. ISSN 1388-2481. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.01.016>>. Citado na página 81.

CASTRO, T. M. de et al. Anaerobic co-digestion of industrial waste landfill leachate and glycerin in a continuous anaerobic bioreactor with a fixed-structured bed (ABFSB): Effects of volumetric organic loading rate and alkaline supplementation. *Renewable Energy*, v. 164, p. 1436–1446, 2021. ISSN 0960-1481. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.100>>. Citado na página 82.

- CHAKRABORTY, S.; BISWAS, M. C. 3D printing technology of polymer-fiber composites in textile and fashion industry: A potential roadmap of concept to consumer. *Composite Structures*, v. 248, p. 112562, 2020. ISSN 0263-8223. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2020.112562>>. Citado na página 81.
- CHATTOPADHYAY, D. K.; RAJU, K. Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 3, p. 352–418, 2007. ISSN 0079-6700. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.05.003>>. Citado na página 52.
- CHEN, M. et al. Promotion of extracellular lignocellulolytic enzymes production by restraining the intracellular  $\beta$ -glucosidase in *Penicillium decumbens*. *Bioresource technology*, v. 137C, p. 33–40, mar 2013. Disponível em: <<https://10.1016/j.biortech.2013.03.099>>. Citado na página 44.
- CHEOK, M. H. et al. Pharmacogenetics in acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology*, v. 46, n. 1, p. 39–51, jan 2009. ISSN 0037-1963 (Print). Disponível em: <<https://10.1053/j.seminhematol.2008.09.002>>. Citado na página 38.
- CHI, H. et al. Characterization of a novel l-asparaginase from mycobacterium gordonae with acrylamide mitigation potential. *Foods*, v. 10, n. 11, 2021. ISSN 2304-8158. Disponível em: <<https://10.3390/foods10112819>>. Citado na página 27.
- CHROUMPI, T.; MÄKELÄ, M. R.; VRIES, R. P. de. Engineering of primary carbon metabolism in filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, v. 43, p. 107551, 2020. ISSN 0734-9750. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107551>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 33.
- COLHERINHAS, G. B. *Ferramenta De Otimização Via Algoritmos Genéticos Com Aplicações Em Engenharia*. Colherinhas2015: [s.n.], 2015. 84 p. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/18579/3/2015\\_EltonCarlosGrossi.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/18579/3/2015_EltonCarlosGrossi.pdf)>. Citado na página 55.
- CORREA, H. et al. L-asparaginase and Biosurfactants Produced by Extremophile Yeasts from Antarctic Environments. *Industrial Biotechnology*, v. 16, n. 2, 2020. ISSN 15509087. Disponível em: <<https://10.1089/ind.2019.0037>>. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 44.
- COSTA, J. A. V. et al. Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 357–372, 2018. Disponível em: <<https://10.1016/b978-0-444-63990-5.00016-5>>. Citado na página 32.
- COVIZZI, L. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 28, dec 2007. Disponível em: <<https://10.5433/1679-0375.2007v28n2p143>>. Citado na página 48.
- CUNHA, M. C. et al. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, v. 16, p. 31–36, oct 2018. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://10.1016/J.BCAB.2018.07.018>>. Citado 4 vezes nas páginas 27, 36, 41 e 101.
- CUNHA, M. C. da et al. L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: effects of production process and biochemical parameters. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Taylor and Francis, p. 1–11, jun 2021. ISSN 1082-6068. Disponível em: <<https://10.1080/10826068.2021.1931881>>. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 82.

CUNHA, M. C. da et al. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, v. 126, p. 108658, dec 2019. ISSN 1873-7145 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1016/j.foodres.2019.108658>>. Citado na página 27.

da Silva Nunes, N. et al. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. *BioEnergy Research*, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. ISSN 1939-1242. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>>. Citado na página 54.

DASH, K. K.; DAS, S. K. Modeling and optimization of microwave puffing of rice using artificial neural network and genetic algorithm. *Journal of Food Process Engineering*, v. 44, n. 1, p. e13577, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfpe.13577>>. Citado na página 55.

DAYALAN, S. A. J.; DARWIN, P.; PRAKASH, S. Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 1, p. 15–19, 2011. ISSN 2221-1691. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60061-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60061-0)>. Citado na página 32.

De Luca Bossa, F. et al. Greener Nanocomposite Polyurethane Foam Based on Sustainable Polyol and Natural Fillers: Investigation of Chemico-Physical and Mechanical Properties. *Materials (Basel, Switzerland)*, v. 13, 2020. Disponível em: <<https://10.3390/ma13010211>>. Citado na página 88.

DEMIR, H.; TARI, C. Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier, v. 106, p. 60–66, jan 2016. ISSN 0964-8305. Disponível em: <<https://10.1016/J.IBIOD.2015.10.011>>. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 99.

DENG, M. et al. Role of polyurethane-modified layered double hydroxides on SCFAs extraction from waste activated sludge fermentation liquid for elevating denitrification: Kinetics and mechanism. *Environmental Research*, v. 187, p. 109696, 2020. ISSN 0013-9351. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109696>>. Citado na página 81.

DIAS, F. et al. Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 73, 2016. Disponível em: <<https://10.1016/j.lwt.2016.04.017>>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 43.

DIAS, F. F. G. et al. Simplex centroid mixture design to improve l-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 528–534, 2015. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.011>>. Citado na página 41.

DORIYA, K. et al. Chapter Six - Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of l-Asparaginase. In: KIM, S.-K.; TOLDRÁ, F. B. T. A. i. F.; RESEARCH, N. (Ed.). *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part I - Production of Enzymes*. Academic Press, 2016. v. 78, p. 115–135. ISBN 1043-4526. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>>. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 60.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate for l-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 138, p. 188–196, oct 2018. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://10.1016/J.BEJ.2018.07.024>>. Citado 6 vezes nas páginas 36, 41, 70, 79, 99 e 101.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977. ISSN 00221287. Disponível em: <<https://10.1099/00221287-98-2-493>>. Citado 2 vezes nas páginas 67 e 93.

EAKER, S. et al. Bioreactors for cell therapies: Current status and future advances. *Cytotherapy*, Elsevier, v. 19, n. 1, p. 9–18, jan 2017. ISSN 1465-3249. Disponível em: <<https://10.1016/J.JCYT.2016.09.011>>. Citado na página 43.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for l-asparaginase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 214–217, 2014. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.005>>. Citado na página 36.

EBRAHIMPOUR, M.; YU, W.; YOUNG, B. Artificial neural network modelling for cream cheese fermentation pH prediction at lab and industrial scales. *Food and Bioprocess Processing*, v. 126, p. 81–89, 2021. ISSN 0960-3085. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.12.006>>. Citado na página 54.

EGLER, R.; AHUJA, S.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, v. 7, p. 62, apr 2016. Disponível em: <<https://10.4103/0976-500X.184769>>. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 38.

EKPENYONG, M. et al. Bioprocess Optimization of Nutritional Parameters for Enhanced Anti-leukemic L-Asparaginase Production by *Aspergillus candidus* UCCM 00117: A Sequential Statistical Approach. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 27, n. 2, p. 1501–1527, 2021. ISSN 1573-3904. Disponível em: <<https://10.1007/s10989-021-10188-x>>. Citado na página 35.

EL-GENDY, M. M. A. A. et al. Production, purification, characterization, antioxidant and anti-proliferative activities of extracellular l-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* ahmf4. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 28, n. 4, p. 2540–2548, 2021. ISSN 1319-562X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.058>>. Citado na página 27.

EL-GENDY, M. M. A. A. et al. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. *Saudi Journal of Biological Sciences*, The Authors, v. 28, n. 4, p. 2540–2548, 2021. ISSN 1319562X. Disponível em: <<https://10.1016/j.sjbs.2021.01.058>>. Citado na página 34.

EL-HADI, A. et al. Statistical optimization of L-asparaginase production by using *Fusarium solani*. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, v. 16, n. 1, p. 16–23, jan 2017. Disponível em: <<https://10.4103/1687-4315.205825>>. Citado na página 36.

EL-NAGGAR, N. E.-A. et al. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brolosae* NEAE-115. *BMC pharmacology and toxicology*, v. 19, n. 1, p. 51, aug 2018. ISSN 2050-6511 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1186/s40360-018-0242-1>>. Citado na página 27.

ELSHAFEI, A. et al. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. *British Microbiology Research Journal*, v. 2, p. 158–174, 2012. Disponível em: <<https://10.9734/BMRJ/2012/1735>>. Citado na página 79.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of clinical microbiology*, v. 29, n. 2, p. 393–394, 1991. ISSN 0095-1137 (Print). Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.393-394.1991>>. Citado 2 vezes nas páginas 60 e 83.

EVLI, S. et al. Asparaginase immobilized, magnetically guided, and bubble-propelled micromotors. *Process Biochemistry*, v. 108, p. 103–109, 2021. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.009>>. Citado na página 82.

FANG, C. et al. Synthesis and characterization of low crystalline waterborne polyurethane for potential application in water-based ink binder. *Progress in Organic Coatings*, v. 77, n. 1, p. 61–71, 2014. ISSN 0300-9440. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2013.08.004>>. Citado na página 52.

FARINAS, C. et al. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, p. 17–26, mar 2011. Disponível em: <<https://10.1590/S0104-66322011000100003>>. Citado na página 44.

FATIMA, N.; KHAN, M. M.; KHAN, I. A. L-asparaginase produced from soil isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows potent anti-cancer activity on HeLa cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 26, n. 6, p. 1146–1153, 2019. ISSN 1319-562X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.001>>. Citado na página 36.

FAZELI, N.; ALIMADADI, N.; NASR, S. Screening and Optimization of Process Parameters for the Production of L -asparaginase by Indigenous Fungal-Type Strains. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, Springer International Publishing, v. 45, n. 2, p. 409–416, 2021. ISSN 2364-1819. Disponível em: <<https://10.1007/s40995-020-01056-2>>. Citado na página 82.

FINKLER, A. T. J. et al. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 121, p. 1–12, 2017. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.011>>. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 110.

FORMELA, K. et al. Structural, thermal and physico-mechanical properties of polyurethane/brewers' spent grain composite foams modified with ground tire rubber. *Industrial Crops and Products*, v. 108, p. 844–852, 2017. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.047>>. Citado na página 98.

FREITAS, M. et al. Filamentous fungi producing l-asparaginase with low glutaminase activity isolated from brazilian savanna soil. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 8, p. 1–20, 2021. ISSN 19994923. Disponível em: <<https://10.3390/pharmaceutics13081268>>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 34.

FU, C. et al. Effect of structure on the properties of polyurethanes based on aromatic cardanol-based polyols prepared by thiol-ene coupling. *Progress in Organic Coatings*, v. 83, p. 19–25, 2015. ISSN 0300-9440. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2015.01.020>>. Citado na página 95.

FUJITA, M. et al. Decolorization of heat-treatment liquor of waste sludge by a bioreactor using polyurethane foam-immobilized white rot fungus equipped with an ultramembrane filtration unit. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Elsevier, v. 90, n. 4, p. 387–394, jan 2000. ISSN 1389-1723. Disponível em: <[https://10.1016/S1389-1723\(01\)80006-2](https://10.1016/S1389-1723(01)80006-2)>. Citado na página 28.

GAMA, N. V.; FERREIRA, A.; BARROS-TIMMONS, A. Polyurethane Foams: Past, Present, and Future. *Materials (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 10, 2018. ISSN 1996-1944 (Print). Disponível em: <<https://10.3390/ma11101841>>. Citado na página 50.

GEORGIODAKIS, M.; PLEVRIS, V. A Comparative Study of Differential Evolution Variants in Constrained Structural Optimization. *Frontiers in Built Environment*, v. 6, p. 102, 2020. ISSN 2297-3362. Disponível em: <<https://10.3389/fbuil.2020.00102>>. Citado na página 56.

GOSWAMI, R.; VEERANKI, V. D.; MISHRA, V. K. Optimization of process conditions and evaluation of pH and thermal stability of recombinant L-Asparaginase II of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI 1043 in *E. coli*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101377, 2019. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101377>>. Citado na página 36.

G.S. Isaac and M.A. Abu-Tahon Biological and Geological Sciences Department, Faculty of Education, Ain Shams University, Roxy, Heliopolis, P.C.11757, Cairo, Egypt . 1,3,5,ammonia,c,catalyzes the hydrolysis of,fusarium,immobilization,is an enzyme that,l-asparaginase,l-asparagine amidohydrolase e,l-asparagine to l-aspartate and,purification,solani,solid-state fermentation,theantana. v. 816, n. 3, p. 799–816, 2016. Disponível em: <[https://ejbo.journals.ekb.eg/article\\_3776\\_710df28b5be97f8a55fe777b496da5ae.pdf](https://ejbo.journals.ekb.eg/article_3776_710df28b5be97f8a55fe777b496da5ae.pdf)>. Citado na página 36.

GUO, D.-S. et al. Development of a multi-stage continuous fermentation strategy for docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Bioresource technology*, v. 269, p. 32–39, dec 2018. ISSN 1873-2976 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1016/j.biortech.2018.08.066>>. Citado na página 111.

GURUNATHAN, D. B.; SAHADEVAN, R. Optimization of Culture Conditions and Bench-Scale Production of L-Asparaginase by Submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 22, p. 923–929, jul 2012. Disponível em: <<https://10.4014/jmb.1112.12002>>. Citado na página 27.

Gurusamy Thangavelu, S. et al. Biodegradable polyurethanes foam and foam fullerenes nanocomposite strips by one-shot moulding: Physicochemical and mechanical properties. *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 112, p. 105018, 2020. Disponível em: <<https://10.1016/j.mssp.2020.105018>>. Citado na página 95.

GUZMÁN-CHÁVEZ, F. et al. Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2768, 2018. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://10.3389/fmicb.2018.02768>>. Citado na página 79.

HAYKIN, S. S. *Neural Networks and Learning Machines*. 3° edição. ed. Haykin2009: [s.n.], 2009. 936 p. ISBN 978-0131471399. Disponível em: <<https://www.pearson.com/us/higher-education/program/Haykin-Neural-Networks-and-Learning-Machines-3rd-Edition/PGM320370>>. Citado 2 vezes nas páginas 53 e 64.

- HEJNA, A. et al. The influence of crude glycerol and castor oil-based polyol on the structure and performance of rigid polyurethane-polyisocyanurate foams. *Industrial Crops and Products*, v. 95, p. 113–125, 2017. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.023>>. Citado na página 95.
- HEO, Y.-A.; SYED, Y. Y.; KEAM, S. J. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs*, v. 79, n. 7, p. 767–777, may 2019. ISSN 1179-1950 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1007/s40265-019-01120-1>>. Citado na página 38.
- HINZE, L. et al. Synthetic Lethality of Wnt Pathway Activation and Asparaginase in Drug-Resistant Acute Leukemias. *Cancer Cell*, v. 35, n. 4, p. 664–676.e7, 2019. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.004>>. Citado na página 35.
- HU, T. et al. Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. *Procedia Engineering*, Elsevier, v. 18, p. 335–340, jan 2011. ISSN 1877-7058. Disponível em: <<https://10.1016/J.PROENG.2011.11.053>>. Citado 3 vezes nas páginas 49, 81 e 110.
- HU, Y.; ZHU, B. Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 143–149, 2016. ISSN 2405-805X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.002>>. Citado na página 32.
- IAMANAKA, B. T. et al. *Aspergillus* section *Flavi* diversity and the role of *A. novoparasiticus* in aflatoxin contamination in the sugarcane production chain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 293, p. 17–23, 2019. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.024>>. Citado na página 35.
- JIANG, Q. et al. Flexible thermoplastic polyurethane/reduced graphene oxide composite foams for electromagnetic interference shielding with high absorption characteristic. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 123, p. 310–319, 2019. ISSN 1359-835X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2019.05.017>>. Citado na página 95.
- K. NAKAHAMA, A. IMADA, S. I. Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species *Fabro* (1968) and *Wriston* (1971). With respect to the occurrence of L-asparaginase in fungi, p. 269–273, 1973. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00221287-75-2-269>>. Citado na página 34.
- KARIMI, M.; DROGHETTI, H.; MARCHISIO, D. L. PU Foam: A novel open-source CFD solver for the simulation of polyurethane foams. *Computer Physics Communications*, v. 217, p. 138–148, 2017. ISSN 0010-4655. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2017.03.010>>. Citado na página 50.
- KENARI, S. L. D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, Elsevier, v. 89, n. 4, p. 315–321, oct 2011. ISSN 0960-3085. Disponível em: <<https://10.1016/J.FBP.2010.11.002>>. Citado na página 36.
- KHALIL, N. M. et al. Characterization of *Penicillium crustosum* l - asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non - cytotoxic levels. *Archives of Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, v. 203, n. 5, p. 2625–2637, 2021. ISSN 1432-072X. Disponível em: <<https://10.1007/s00203-021-02198-6>>. Citado na página 82.

- KHAMCHATRA, N.-M. et al. Using in situ seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (Orchidaceae). *Agriculture and Natural Resources*, v. 50, 2016. Disponível em: <<https://10.1016/j.anres.2016.01.002>>. Citado na página 34.
- KHARBAS, H.; ELLINGHAM, T.; TURNG, L.-S. Applications of Core Retraction in Manufacturing Low-Density Polypropylene Foams with Microcellular Injection Molding. *Cellular Polymers*, SAGE Publications, v. 37, n. 1, p. 1–20, jan 2018. ISSN 0262-4893. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/026248931803700101>>. Citado na página 52.
- KHAZABI, M.; GU, R.; SAIN, M. Fiber Reinforced Soy-Based Polyurethane Spray Foam Insulation. Part 1: Cell Morphologies. *Bioresources*, v. 6, p. 3757–3774, aug 2011. Disponível em: <<https://10.15376/biores.6.4.3757-3774>>. Citado na página 98.
- KHVEDELIDZE, R. M. et al. Amilase-producing mikromycetes isolated from soils of South Caucasus. *Annals of Agrarian Science*, v. 15, n. 3, p. 318–321, 2017. ISSN 1512-1887. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.07.005>>. Citado na página 32.
- KIM, S.; KIM, C. H. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 1, p. 61–67, 2012. ISSN 1615-7605. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-011-0595-y>>. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 47.
- KIM, T.-R. et al. Modeling of elasto-viscoplastic behavior for polyurethane foam under various strain rates and temperatures. *Composite Structures*, v. 180, p. 686–695, 2017. ISSN 0263-8223. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2017.08.032>>. Citado na página 50.
- KORNBRUST, B. et al. Asparaginase – An Enzyme for Acrylamide Reduction in Food Products. In: . [s.n.], 2009. p. 59–87. ISBN 9781444309935. Disponível em: <<https://10.1002/9781444309935.ch4>>. Citado na página 39.
- KRISHANIA, M. et al. Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. [s.n.], 2017. Disponível em: <<https://10.1016/B978-0-444-63990-5.00005-0>>. Citado na página 28.
- KUMAR, S.; INNASIMUTHU, A. L.; MARMUR, J. D. The nature and pattern of coronary stent recalls. *Journal of Invasive Cardiology*, v. 26, n. 9, p. 433–436, 2014. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84907046893&partnerID=40&md5=340149751df4ae3ad0848ccf5f10ebfc>>. Citado 3 vezes nas páginas 40, 42 e 79.
- LAN, T.-Q. et al. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 175–182, 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.088>>. Citado na página 32.
- LEE, J.-H. et al. Unified constitutive model with consideration for effects of porosity and its application to polyurethane foam. *Composites Part B: Engineering*, v. 138, p. 87–100, 2018. ISSN 1359-8368. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2017.11.030>>. Citado 4 vezes nas páginas 50, 51, 86 e 94.
- LEE, S. et al. Electrically conducting polymers for bio-interfacing electronics: From neural and cardiac interfaces to bone and artificial tissue biomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 170, p. 112620, 2020. ISSN 0956-5663. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112620>>. Citado 2 vezes nas páginas 81 e 94.

- LEMONS, J. E.; ZHANG, G. Properties of Materials — the Palette of the Biomaterials Engineer. In: WAGNER, W. R. et al. (Ed.). *Biomaterials Science (Fourth Edition)*. Fourth edi. Academic Press, 2020. p. 35–36. ISBN 978-0-12-816137-1. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.00003-9>>. Citado na página 51.
- LI, L. et al. Creating in-situ polymeric layer based on photocuring for various construction applications. *Construction and Building Materials*, v. 273, p. 121732, 2021. ISSN 0950-0618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121732>>. Citado na página 81.
- LI, Q. et al. Aspergillus niger production of pectinase and  $\alpha$ -galactosidase for enzymatic soy processing. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 134, p. 109476, 2020. ISSN 0141-0229. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109476>>. Citado na página 32.
- LI, Y. et al. Towards a comprehensive optimization of engine efficiency and emissions by coupling artificial neural network (ANN) with genetic algorithm (GA). *Energy*, v. 225, p. 120331, 2021. ISSN 0360-5442. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120331>>. Citado na página 55.
- LI, Y. et al. Asparagine synthetase expression and its potential prognostic value in patients with NK/T cell lymphoma. *Oncology reports*, v. 32, n. 2, p. 853–859, aug 2014. ISSN 1791-2431 (Electronic). Disponível em: <<https://10.3892/or.2014.3237>>. Citado na página 27.
- LIU, X. et al. Mechanical properties of a STF capsule filled flexible polyurethane composite foam. *Materials Letters*, v. 269, p. 127580, 2020. ISSN 0167-577X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.127580>>. Citado na página 81.
- LIU, X. et al. Novel two-stage solid-state fermentation for erythritol production on okara–buckwheat husk medium. *Bioresource Technology*, v. 266, jul 2018. Disponível em: <<https://10.1016/j.biortech.2018.07.009>>. Citado 3 vezes nas páginas 94, 95 e 104.
- LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, p. 44, may 2017. ISSN 2190-572X (Print). Disponível em: <<https://10.1007/s13205-017-0692-y>>. Citado na página 28.
- LOPEZ-RAMIREZ, N. et al. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 265, p. 291–298, 2018. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015>>. Citado na página 42.
- LU, F. et al. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 9, p. 1342–1348, 2015. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.010>>. Citado na página 32.
- LYNGGAARD, L. S. et al. Asparaginase enzyme activity levels and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a nopho all2008 study. *Blood Advances*, 2021. ISSN 2473-9529. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005631>>. Citado na página 27.
- MAHMOODI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101280, 2019. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>>. Citado na página 99.

- MALDONADO, S. et al. Multiphase microreactors with intensification of oxygen mass transfer rate and mixing performance for bioprocess development. *Biochemical Engineering Journal*, v. 139, p. 57–67, 2018. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.023>>. Citado 2 vezes nas páginas 94 e 95.
- MALHOTRA, N. Bioreactors Design, Types, Influencing Factors and Potential Application in Dentistry. A Literature Review. *Current stem cell research and therapy*, v. 14, n. 4, p. 351–366, 2019. ISSN 22123946. Disponível em: <<https://10.2174/1574888X14666190111105504>>. Citado 2 vezes nas páginas 46 e 47.
- MEENA, P. et al. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, p. 210–216, 2013. Disponível em: <<https://10.1016/j.bcab.2013.05.003>>. Citado na página 79.
- MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, v. 11, p. 124–130, jul 2017. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://10.1016/J.BCAB.2017.06.001>>. Citado 7 vezes nas páginas 27, 41, 43, 60, 68, 79 e 101.
- MIGUEL, Â. et al. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In: . [s.n.], 2013. p. 287–321. Disponível em: <<https://10.5772/53168>>. Citado na página 39.
- MISHRA, A. Production of L-Asparaginase, an Anticancer Agent, From *Aspergillus niger* Using Agricultural Waste in Solid State Fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 135, p. 33–42, nov 2006. Disponível em: <<https://10.1385/ABAB:135:1:33>>. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 48.
- MITCHELL, D. A. et al. Group II bioreactors: Forcefully-aerated bioreactors without mixing. *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*, p. 77–94, 2006. Disponível em: <[https://10.1007/3-540-31286-2\\_7](https://10.1007/3-540-31286-2_7)>. Citado 3 vezes nas páginas 43, 45 e 47.
- Mohan Kumar, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013. ISSN 1573-0972. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1213-0>>. Citado 3 vezes nas páginas 36, 41 e 68.
- MONDAL, P. et al. Optimization of process parameters for bio-enzymatic and enzymatic saccharification of waste broken rice for ethanol production using response surface methodology and artificial neural network–genetic algorithm. *3 Biotech*, v. 11, n. 1, p. 28, 2021. ISSN 2190-5738. Disponível em: <<https://10.1007/s13205-020-02553-2>>. Citado na página 54.
- MOOLA, Z. B. et al. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *The Biochemical journal*, v. 302 ( Pt 3, p. 921–927, sep 1994. ISSN 0264-6021 (Print). Disponível em: <<https://10.1042/bj3020921>>. Citado na página 38.
- MUNIR, N. et al. L-Asparaginase potential in acrylamide mitigation from foodstuff: a mini-review. *Progress in Nutrition*, v. 21, p. 1–10, may 2019. Disponível em: <<https://10.23751/pn.v21i3.6771>>. Citado na página 39.

MUSO CACHUMBA, J. J. et al. Extracellular L-asparaginase production in solid-state fermentation by using sugarcane bagasse as support material. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Taylor and Francis, v. 49, n. 4, p. 328–333, apr 2019. ISSN 1082-6068. Disponível em: <<https://10.1080/10826068.2019.1566152>>. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 59.

NASCIMENTO, F. V. do et al. Insights into media supplementation in solid-state fermentation of soybean hulls by *Yarrowia lipolytica*: Impact on lipase production in tray and insulated packed-bed bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, v. 166, p. 107866, 2021. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107866>>. Citado 2 vezes nas páginas 94 e 95.

NASER, S. et al. Fungal assembly of L-asparaginase using solid-state fermentation: a review. *Biocell*, Tech Science Press, Mendoza, v. 44, n. 2, p. 147–155, 2020. ISSN 03279545. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.32604/biocell.2020.09522>>. Citado na página 41.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Structural Insight into Substrate Selectivity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*, v. 55, n. 8, p. 1246–1253, mar 2016. ISSN 1520-4995 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1021/acs.biochem.5b01351>>. Citado na página 35.

NORATIQA, K. et al. Statistical optimization of enzymatic degradation process for oil palm empty fruit bunch (OPEFB) in rotary drum bioreactor using crude cellulase produced from *Aspergillus niger* EFB1. *Biochemical Engineering Journal*, v. 75, p. 8–20, 2013. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.007>>. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 46.

NORONKOSKI, T. et al. Recombinant human glycosylasparaginase catalyzes hydrolysis of l-asparagine. *FEBS Letters*, No longer published by Elsevier, v. 412, n. 1, p. 149–152, jul 1997. ISSN 0014-5793. Disponível em: <[https://10.1016/S0014-5793\(97\)00761-8](https://10.1016/S0014-5793(97)00761-8)>. Citado na página 27.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, v. 198, p. 119–124, 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>>. Citado na página 79.

NYARI, N. L. D. et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 124, p. 52–61, 2016. ISSN 1381-1177. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.12.003>>. Citado na página 49.

OSADOLOR, O.; LENNARTSSON, P.; TAHERZADEH, M. Introducing Textiles as Material of Construction of Ethanol Bioreactors. *Energies*, v. 7, p. 7555–7567, nov 2014. Disponível em: <<https://10.3390/en7117555>>. Citado na página 49.

PANDEY, A. et al. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Current Science*, v. 77, p. 149–162, jul 1999. Disponível em: <<https://www.sciencebase.gov/catalog/item/5053ed9ce4b097cd4fcf6cfb>>. Citado na página 40.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000. ISSN 1359-5113. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7)>. Citado na página 42.

PARK, K.-B. et al. Variation of Mechanical Characteristics of Polyurethane Foam: Effect of Test Method. *Materials*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 12, n. 17, p. 2672, aug 2019. ISSN 1996-1944. Disponível em: <<https://10.3390/ma12172672>>. Citado na página 88.

PARMAR, A. B. et al. A solid state fermentation , its role in animal nutrition : A review. *International Journal of Chemical Studies*, v. 7, n. 3, p. 4626–4633, 2019. Disponível em: <<https://www.chemijournal.com/archives/2019/vol7issue3/PartBX/7-3-596-589.pdf>>. Citado na página 27.

PATEL, G. et al. Bioreactor studies of production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 140, p. 77–84, 2018. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.007>>. Citado na página 32.

PATEL, R.; SHAH, M.; PATEL, H. Synthesis and Characterization of Structurally Modified Polyurethanes Based on Castor Oil and Phosphorus-Containing Polyol for Flame-Retardant Coatings. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, v. 16, feb 2011. Disponível em: <<https://10.1080/1023666X.2011.541108>>. Citado na página 52.

PATRO, K. R.; 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/IJBMBR11.066>>. Citado na página 79.

PAUL, J. H.; COOKSEY, K. E. Asparagine metabolism and asparaginase activity in a euryhaline *Chlamydomonas* species. *Canadian journal of microbiology*, v. 25, n. 12, p. 1443–1451, dec 1979. ISSN 0008-4166 (Print). Disponível em: <<https://10.1139/m79-224>>. Citado na página 36.

PEYRTON, J.; AVÉROUS, L. Structure-properties relationships of cellular materials from bio-based polyurethane foams. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 145, p. 100608, 2021. ISSN 0927-796X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100608>>. Citado na página 81.

POKROVSKAYA, M. V. et al. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Protein expression and purification*, v. 82, n. 1, p. 150–154, mar 2012. ISSN 1096-0279 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1016/j.pep.2011.12.005>>. Citado na página 36.

POKROVSKY, V. S. et al. Amino Acid Degrading Enzymes and their Application in Cancer Therapy. *Current medicinal chemistry*, v. 26, n. 3, p. 446–464, 2019. ISSN 1875-533X (Electronic). Disponível em: <<https://10.2174/0929867324666171006132729>>. Citado na página 82.

POKROVSKY, V. S. et al. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases. *BMC cancer*, v. 16, p. 89, feb 2016. ISSN 1471-2407 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1186/s12885-016-2125-4>>. Citado na página 37.

PRABANINGTYAS, R. K. et al. Production of immobilized extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method using palm kernel cake, soybean meal, and coir pith as the substrate. *Energy Procedia*, v. 153, p. 242–247, 2018. ISSN 1876-6102. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.010>>. Citado na página 42.

QESHMI, I. F. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research*, v. 208, p. 99–112, 2018. ISSN 0944-5013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.011>>. Citado 3 vezes nas páginas 27, 36 e 37.

RAHIMI, A. et al. Continuous fermentation of recombinant *Pichia pastoris* Mut+ producing HBsAg: Optimizing dilution rate and determining strain-specific parameters. *Food and Bio-products Processing*, v. 118, 2019. Disponível em: <<https://10.1016/j.fbp.2019.09.011>>. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 111.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2, p. 197–203, 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00132-8)>. Citado 3 vezes nas páginas 45, 46 e 47.

ROTH, G. et al. L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN *Escherichia coli* FED-BATCH CULTURES. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 02, p. 245–256, 2013. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjce/a/TC4vcz5QcgRxHmpSMnd7MMk/?format=pdf&lang=en>>. Citado na página 37.

RUIZ, H. A. et al. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 65, p. 90–95, 2012. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.007>>. Citado na página 44.

SAADATI, A.; HASANZADEH, M.; SEIDI, F. Biomedical application of hyperbranched polymers: Recent Advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 116308, 2021. ISSN 0165-9936. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116308>>. Citado na página 81.

SABERI, A. et al. Monitoring of *Aspergillus terreus* morphology for the lovastatin production in submerge culture by impedimetry. *Biochemical Engineering Journal*, v. 159, p. 107615, 2020. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107615>>. Citado na página 32.

SAFARY, A. et al. Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. *BioImpacts : BI*, v. 9, n. 1, p. 15–23, 2019. ISSN 2228-5652 (Print). Disponível em: <<https://10.15171/bi.2019.03>>. Citado na página 37.

SAITHI, S.; TONGTA, A. Phytase Production of *Aspergillus Niger* on Soybean Meal by Solid-State Fermentation Using a Rotating Drum Bioreactor. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 11, p. 25–30, 2016. ISSN 2210-7843. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.12.005>>. Citado na página 44.

Sales de Menezes, L. H. et al. Artificial neural network hybridized with a genetic algorithm for optimization of lipase production from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 31, p. 101885, 2021. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101885>>. Citado na página 55.

SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. *International Journal of Biological*

*Macromolecules*, v. 94, p. 827–835, 2017. ISSN 0141-8130. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.06.023>>. Citado na página 32.

SANO, M. et al. A high-throughput screening method based on the Mizoroki-Heck reaction for isolating itaconic acid-producing fungi from soils. *Heliyon*, v. 5, n. 7, p. e02048, 2019. ISSN 2405-8440. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02048>>. Citado na página 32.

SARMIENTO, F.; PERALTA, R.; BLAMEY, J. M. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 3, p. 148, 2015. ISSN 2296-4185 (Print). Disponível em: <<https://10.3389/fbioe.2015.00148>>. Citado na página 39.

SEGURA, D. M. et al. Chapter 3 Chemistry of polyurethane adhesives and sealants. In: COGNARD, P. B. T. H. o. A.; SEALANTS (Ed.). *Adhesives and Sealants*. Elsevier Science Ltd, 2005. v. 1, p. 101–162. ISBN 1874-5695. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1874-5695\(02\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S1874-5695(02)80004-5)>. Citado na página 52.

ŠELO, G. et al. A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. *Foods*, v. 10, n. 5, 2021. ISSN 2304-8158. Disponível em: <<https://10.3390/foods10050927>>. Citado 2 vezes nas páginas 94 e 95.

SHAFEI, M. S. et al. Purification, characterization and kinetic properties of penicillium cyclopium L-asparaginase: Impact of lasparaginase on acrylamide content in potato products and its cytotoxic activity. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v. 9, p. 132–140, 2015. Disponível em: <<https://10.1007/s11274-012-1213-0>>. Citado na página 79.

SHAKAMBARI, G.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. L-asparaginase – A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, v. 17, p. 213–224, jan 2019. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://10.1016/J.BCAB.2018.11.018>>. Citado na página 27.

SHALINI, Y.; PYDI, S. Multistage fluidized bed bioreactor for dye decolorization using immobilized polyurethane foam: A novel approach. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 152, p. 107368, dec 2019. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<https://10.1016/J.BEJ.2019.107368>>. Citado na página 49.

SHARMA, D.; MISHRA, A. L-asparaginase production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*: process modeling by artificial neural network approach. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, Taylor and Francis, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://10.1080/10826068.2021.1972426>>. Citado na página 35.

SHARMA, S. et al. A comprehensive review of current developments on the waste-reinforced polymer-matrix composites for automotive, sports goods and construction applications: Materials, processes and properties. *Materials Today: Proceedings*, v. 33, p. 1671–1679, 2020. ISSN 2214-7853. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.523>>. Citado na página 81.

SHEIKHY, H. et al. Studying the effects of chain extenders chemical structures on the adhesion and mechanical properties of a polyurethane adhesive. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 19, n. 6, p. 1949–1955, 2013. ISSN 1226-086X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.03.008>>. Citado na página 52.

SHIROMIZU, S. et al. Optimizing the dosing schedule of l-asparaginase improves its anti-tumor activity in breast tumor-bearing mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, Elsevier, v. 136, n. 4, p. 228–233, apr 2018. ISSN 1347-8613. Disponível em: <<https://10.1016/J.JPHS.2018.01.008>>. Citado na página 27.

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. ISSN 1040-8428. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002>>. Citado na página 37.

SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Preparative biochemistry and biotechnology*, v. 42, n. 6, p. 574–581, 2012. ISSN 1532-2297 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1080/10826068.2012.672943>>. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 79.

SINGH, T.; KUSHWAH, A. Acrylamide: A possible risk factor for cardiac health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 11, p. 2018, oct 2018. Disponível em: <<https://10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27073>>. Citado na página 39.

SINGHAL, P. et al. Low density biodegradable shape memory polyurethane foams for embolic biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 1, p. 67–76, 2014. ISSN 1742-7061. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.027>>. Citado na página 53.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009. Disponível em: <<https://10.1016/j.bej.2008.10.019>>. Citado na página 43.

SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, Elsevier, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan 2017. ISSN 2452-0721. Disponível em: <<https://10.1016/J.BIORI.2017.01.002>>. Citado na página 27.

SOMARATHNA, H. et al. The use of polyurethane for structural and infrastructural engineering applications: A state-of-the-art review. *Construction and Building Materials*, v. 190, p. 995–1014, 2018. ISSN 0950-0618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.09.166>>. Citado na página 50.

SPIER, M. et al. Application of different types of bioreactors in bioprocesses. *Bioreactors: Design, Properties and Applications*, p. 53–87, jan 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/287302702\\_Application\\_of\\_different\\_types\\_of\\_bioreactors\\_in\\_bioprocesses](https://www.researchgate.net/publication/287302702_Application_of_different_types_of_bioreactors_in_bioprocesses)>. Citado na página 28.

SUBBALAXMI, S.; MURTY, V. R. Process optimization for tannase production by *Bacillus gottheilii* M2S2 on inert polyurethane foam support. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 48–55, 2016. ISSN 1878-8181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.004>>. Citado na página 49.

SUDHIR, A. P. et al. Characterization of a recombinant glutaminase-free L-asparaginase (ansA3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 174, n. 7, p. 2504–2515, dec 2014. ISSN 1559-0291 (Electronic). Disponível em: <<https://10.1007/s12010-014-1200-z>>. Citado na página 36.

SURYAWANSHI, N. et al. Optimization of process parameters for improved chitinase activity from *Thermomyces* sp. by using artificial neural network and genetic algorithm. *Preparative*

*Biochemistry & Biotechnology*, Taylor and Francis, v. 50, n. 10, p. 1031–1041, 2020. Disponível em: <<https://10.1080/10826068.2020.1780612>>. Citado na página 54.

TAHERI, N.; SAYYAH, S. Effect of clay loading on the structural and mechanical properties of organoclay/HDI-based thermoplastic polyurethane nanocomposites. *E-Polymers*, v. 16, n. 1, p. 65–73, 2016. ISSN 16187229. Disponível em: <<https://10.1515/epoly-2015-0130>>. Citado na página 52.

Tibério Cardoso, G.; Claro Neto, S.; VECCHIA, F. Rigid foam polyurethane (PU) derived from castor oil (*Ricinus communis*) for thermal insulation in roof systems. *Frontiers of Architectural Research*, v. 1, n. 4, p. 348–356, 2012. ISSN 2095-2635. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foar.2012.09.005>>. Citado na página 52.

TIPPANI, R. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, v. 11, 2012. Disponível em: <<https://10.5897/AJB10.2355>>. Citado na página 80.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier Ltd, v. 117, n. February 2019, p. 109472, 2020. ISSN 18790690. Disponível em: <<https://10.1016/j.rser.2019.109472>>. Citado na página 31.

UPPULURI, K.; REDDY, D. S. Optimization of L-Asparaginase Production by Isolated *Aspergillus niger* using Sesame Cake in a Column Bioreactor. *JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY*, v. 3, p. 83–90, apr 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/ijcre-2012-0064>>. Citado na página 41.

VARALAKSHMI, V.; KAROTHI, J. R. Optimization of l-asparaginase production by *aspergillus terreus* mtcc 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, v. 02, p. 2321–7308, 09 2013. Disponível em: <<https://10.15623/ijret.2013.0209020>>. Citado na página 41.

VEERAVALLI, S. S.; MATHEWS, A. P. Continuous fermentation of xylose to short chain fatty acids by *Lactobacillus buchneri* under low pH conditions. *Chemical Engineering Journal*, v. 337, p. 764–771, 2018. ISSN 1385-8947. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.100>>. Citado na página 111.

VELAYUTHAM, T. S. et al. Synthesis and characterization of polyurethane coatings derived from polyols synthesized with glycerol, phthalic anhydride and oleic acid. *Progress in Organic Coatings*, v. 66, n. 4, p. 367–371, 2009. ISSN 0300-9440. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2009.08.013>>. Citado na página 50.

VEMURI, P. et al. L-Asparaginase a Biotherapeutic for Acute Lymphoblastic Leukemia – A Molecular Perspective. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v. 11, p. 424–443, oct 2017. Disponível em: <<https://10.6084/m9.figshare.13297637>>. Citado na página 38.

VIEIRA, W. et al. A novel multiple reactor system for the long-term production of L-asparaginase by *Penicillium* sp. LAMAI 505. *Process Biochemistry*, v. 90, 2020. ISSN 13595113. Disponível em: <<https://10.1016/j.procbio.2019.11.012>>. Citado 9 vezes nas páginas 31, 32, 33, 36, 41, 44, 49, 54 e 82.

- VIVEKANANDHA, S.; SANKARESWARAN, M.; PRABHAVATHI, P. A novel role of L-Asparaginase enzyme production from fungal species. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars*, v. 3, n. 6, p. 7–14, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/313474535\\_A\\_novel\\_role\\_of\\_l-asparaginase\\_enzyme\\_production\\_from\\_fungal\\_species](https://www.researchgate.net/publication/313474535_A_novel_role_of_l-asparaginase_enzyme_production_from_fungal_species)>. Citado na página 41.
- VONGSANGNAK, W.; NIELSEN, J. 2 - Systems biology methods and developments of filamentous fungi in relation to the production of food ingredients. In: MCNEIL, B. et al. (Ed.). *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. Woodhead Publishing, 2013. p. 19–41. ISBN 978-0-85709-343-1. Disponível em: <<https://doi.org/10.1533/9780857093547.1.19>>. Citado na página 31.
- WANDERLEY, M. C. d. A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001>>. Citado na página 32.
- WANG, Y. et al. Optimization of dark fermentation for biohydrogen production using a hybrid artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) approach. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, v. 40, n. 1, p. e13485, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ep.13485>>. Citado na página 54.
- WLODARCZYK, S. R. et al. Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*. *Process Biochemistry*, v. 81, p. 123–131, 2019. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.009>>. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.
- WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 59, p. 65–70, 2019. ISSN 18790429. Disponível em: <<https://10.1016/j.copbio.2019.02.010>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.
- WU, J.; GONG, W.; WANG, L. A clustering-based differential evolution with different crowding factors for nonlinear equations system. *Applied Soft Computing*, v. 98, p. 106733, 2021. ISSN 1568-4946. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.asoc.2020.106733>>. Citado na página 56.
- XU, F.; ORUNA-CONCHA, M.-J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, v. 210, p. 163–171, 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.105>>. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 39.
- YADAV, A. N. et al. Chapter 1 - Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. In: GUPTA, V. K.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 3–18. ISBN 978-0-444-63501-3. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>>. Citado na página 33.
- YANG, G.; HOU, L.; ZHANG, F. Study on the Solid-State Fermentation Conditions for Producing Thermostable Xylanase Feed in a Pressure Pulsation Bioreactor. *Advanced Materials Research*, v. 236-238, p. 72–76, may 2011. Disponível em: <<https://10.4028/www.scientific.net/AMR.236-238.72>>. Citado na página 44.
- YE, H. et al. Automatic and Intelligent Technologies of Solid-State Fermentation Process of Baijiu Production: Applications, Challenges, and Prospects. *Foods*, v. 10, n. 3, 2021. ISSN

2304-8158. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/680>>. Citado 2 vezes nas páginas 94 e 95.

ZHANG, C. et al. Correlation between the acoustic and porous cell morphology of polyurethane foam: Effect of interconnected porosity. *Materials and Design*, v. 41, p. 319–325, 2012. ISSN 0261-3069. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2012.04.031>>. Citado na página 88.

ZHANG, M. et al. Solid-state fermentation of Moringa oleifera leaf meal using *Bacillus pumilus* CICC 10440. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, John Wiley and Sons, Ltd, v. 92, n. 8, p. 2083–2089, aug 2017. ISSN 0268-2575. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jctb.5203>>. Citado 3 vezes nas páginas 51, 104 e 110.

ZHANG, M. et al. Effects of a novel phosphorus–nitrogen flame retardant on rosin-based rigid polyurethane foams. *Polymer Degradation and Stability*, v. 120, p. 427–434, 2015. ISSN 0141-3910. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.08.001>>. Citado na página 52.

ZHANG, Y.-Q. et al. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L- asparaginase bioconjugates. *Journal of biotechnology*, v. 120, p. 315–326, dec 2005. Disponível em: <<https://10.1016/j.jbiotec.2005.06.027>>. Citado na página 37.

ZHAO, G. et al. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, v. 271, p. 606–613, 2019. ISSN 18737072. Disponível em: <<https://10.1016/j.foodchem.2018.07.199>>. Citado na página 99.

ZYZAK, D. et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, p. 4782–4787, aug 2003. Disponível em: <<https://10.1021/jf034180i>>. Citado na página 39.