

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MORGANA DE MARCO

**IMOBILIZAÇÃO DE *Penicillium brasilianum* EM ESPUMA DE POLIURETANO
PARA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE**

ERECHIM, RS

2019

MORGANA DE MARCO

**IMOBILIZAÇÃO DE *Penicillium brasilianum* EM ESPUMA DE POLIURETANO
PARA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Dra. Jamile Zeni
Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM, RS

2019

MORGANA DE MARCO

IMOBILIZAÇÃO DE *Penicillium brasilianum* EM ESPUMA DE POLIURETANO PARA
PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Dra. Jamile Zeni
Dr. Rogério Luis Cansian

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Jamile Zeni
URI – Erechim

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
URI – Erechim

Prof. Dra. Geciane Toniazco Backes
URI – Erechim

Prof. Dra. Cindy Elena Bustamante Vargas
Universidad de Córdoba – Colômbia

M321i Marco, Morgana de

Imobilização de *Penicillium brasilianum* em espuma de poliuretano para produção de poligalacturonase Morgana de Marco. - 2019.
67 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2019.

“Orientação: Dra. Jamile Zeni ; Dr. Rogério Cansian”

1. Pectinases 2. Fungos filamentosos 3. Estabilidade celular
I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Gratidão à minha família, especialmente e carinhosamente ao meu pai, por ser o maior exemplo de persistência e força de vontade que conheço.

Ao meu companheiro Júnior, pela paciência, compreensão e apoio no decorrer destes dois anos. Obrigada por me fazer acreditar que conseguiria (e consegui!). Obrigada por aguentar firme a distância, as oscilações de humor e tantos momentos perdidos neste período. Foste imprescindível para mim!!!

À Daiane, minha irmã/amiga que está ao meu lado desde sempre, é minha maior apoiadora e teve papel fundamental nesta jornada. Não vejo minha vida trilhada de outra forma se não junto a ela.

Aos meus orientadores, Jamile Zeni e Rogério Luis Cansian, obrigada pelo conhecimento, compreensão e principalmente pela paciência

Aos colegas de laboratório e minhas queridas bolsistas.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuições.

“Hoje, a luta que enfrento é me aceitar
Hoje, o veneno encontrou seu remédio
Hoje, peço perdão se eu machuquei meu coração
Hoje, não quero o que me faz mal
O escuro do jogo
Hoje é tempo de curar as feridas do tempo
Hoje já tá pra acabar
Entregue-se ao momento
Hoje, pude ver quem sou
Conhecer mais
Hoje, o grito que dou
É silêncio
Hoje, peço perdão se eu machuquei meu coração
Hoje, mais vale acordar que sonhar nesse jogo
Hoje é tempo de curar as feridas do tempo
Hoje é tempo de ser luz
É minha revolução
Encher de amor o peito e se não aguento
Espalho pelo vento o amor que levo dentro
É minha revolução”
(*Minha revolução, Francisco el hombre*)

RESUMO

Os fungos do gênero *Penicillium* spp. são considerados boas fontes produtoras de enzimas pectinolíticas, no entanto, alguns problemas operacionais são associados à produção destes metabólitos, principalmente pela instabilidade celular nas condições do processo. A imobilização microbiana é uma estratégia para melhorar a estabilidade celular e obter rendimentos mais elevados. Neste contexto, o presente trabalho buscou imobilizar o fungo *Penicillium brasilianum* por contato e por síntese simultânea (*in situ*) em suporte de poliuretano para a produção de exopoligalacturonase. Bem como, imobilizar o *P. brasilianum* por contato em esponja multiuso comercial (usada) como suporte alternativo na produção de exo-PG. Os processos de imobilização *in situ* e por contato em poliuretano resultaram em atividades iguais para a exo-PG (2,01 U/mL), valor superior à produção obtida pelo microrganismo livre (1,71 U/mL). Os resultados do reciclo contínuo, tanto para o imobilizado por contato quanto *in situ*, demonstraram a possibilidade de reutilizar o imobilizado por até 4 vezes, considerando 50% da atividade enzimática inicial. A avaliação da estabilidade ao armazenamento demonstrou a possibilidade de preservação do microrganismo imobilizado (*in situ* e por contato) por um período de até 30 dias em geladeira, sem afetar substancialmente sua capacidade produtiva. A velocidade de crescimento microbiano foi dez vezes maior para o *P. brasilianum* livre, enquanto que a velocidade de formação de produto foi a mesma tanto para o microrganismo livre quanto para o imobilizado, por ambas as técnicas. A imobilização diminuiu o fator de conversão em biomassa, demonstrando que a imobilização altera o metabolismo celular em relação ao crescimento das células. O imobilizado por contato em esponja multiuso comercial alcançou um resultado de 1,85 U/mL, constatando a viabilidade de utilização deste suporte como forma de reaproveitamento de materiais.

Palavras-chave: pectinases, fungos filamentosos, estabilidade celular.

ABSTRACT

The fungi of the genus *Penicillium* spp. are considered good sources of pectinolytic enzymes, however, some operational problems are associated to the production of these metabolites, mainly due to cell instability in the process conditions. Microbial immobilization is a strategy to improve cell stability and obtain higher yields. In this context, the present work sought to immobilize the fungus *Penicillium brasiliense* by contact and by simultaneous synthesis (*in situ*) in support of polyurethane for the production of exopoligalacturonase. As well as, immobilize *P. brasiliense* by contact in commercial multipurpose sponge (used) as an alternative support in the production of exo-PG. The processes immobilization *in situ* and contact in polyurethane resulted in equal activities for exo-PG (2.01 U / mL), a value higher than that obtained by the free microorganism (1.71 U / mL). The results of the continuous recycle, both for the immobilized by contact and *in situ*, showed the possibility of reusing the immobilized for up to 4 times, considering 50% of the initial enzymatic activity. The storage stability evaluation showed the possibility of preserving the immobilized microorganism (*in situ* and by contact) for up to 30 days in a refrigerator, without substantially affecting its productive capacity. The microbial growth rate was ten times higher for free *P. brasiliense*, while the rate of product formation was the same for both the free and immobilized microorganisms by both techniques. Immobilization decreased the conversion factor in biomass, demonstrating that immobilization changes cellular metabolism in relation to cell growth. The immobilized by contact in commercial multipurpose sponge reached a result of 1.85 U / mL, evidencing the feasibility of using this support as a way to reuse materials.

Key words: pectinases, filamentous fungi, cell stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura química das substâncias pécticas.....	17
Figura 2: Tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização	24
Figura 3: Métodos de imobilização por confinamento	24
Figura 4: Divisão da espuma para análise de distribuição do imobilizado.....	33
Figura 5: Face de fibra sintética com abrasivo sendo removida da esponja (A) e cubos da esponja comercial com células de <i>P. brasilianum</i> imobilizadas (B)	38
Figura 6: Cinética de produção de exo-PG pelo <i>P. brasilianum</i> livre.....	39
Figura 7: Poliuretano controle (A) e poliuretano contendo esporos imobilizados de <i>P. brasilianum</i> nas concentrações 10^4 (B), 10^6 (C) e 10^8 (D) esporos/mL	44
Figura 8: Produção de exopoligalacturonase de <i>P. brasilianum</i> imobilizado por contato (a) e <i>in situ</i> (b)	47
Figura 9: Aspectos dos cubos de poliuretano com <i>P. brasilianum</i> imobilizado por contato (a) e <i>in situ</i> (b)	49
Figura 10: Comportamento do <i>P. brasilianum</i> imobilizado <i>in situ</i> e por contato em poliuretano submetido a reusos sucessivos para produção de exo-PG (a) e biomassa (b).....	51
Figura 11: Estabilidade de estocagem do <i>P. brasilianum</i> imobilizado <i>in situ</i> e por contato armazenado em geladeira ao longo de 45 dias.....	52
Figura 12: Produção de exopoligalacturonase de <i>P. brasilianum</i> imobilizado em esponja multiuso comercial usada	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das substâncias pécticas	18
Tabela 2: Classificação das enzimas pécticas quanto ao mecanismo de ação	20
Tabela 3: Microrganismos imobilizados em espuma de poliuretano utilizados para diferentes tipos de aplicação	26
Tabela 4: Quantidade de cubos de poliuretano e de meio reacional para produção de exo-PG	30
Tabela 5: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato com diferentes tipos de pré-tratamentos em 48h de produção	41
Tabela 6: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato com diferentes quantidades de cubos e meio reacional.....	42
Tabela 7: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato (PD+PDA) com variação de dias para impregnação do microrganismo no suporte de poliuretano em 48 h de produção	43
Tabela 8: Influência do tipo de lavagem nas espumas de poliuretano com <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato para desprendimento de células não fixadas ao suporte	43
Tabela 9: Influência de diferentes velocidades de agitação na produção de exo-PG de <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato após 48 h de produção	44
Tabela 10: Atividade de exo-PG (U/mL) e valores de biomassa (g/L) obtidos em diferentes concentrações de esporos de <i>P. brasiliatum</i> após 48h de produção	45
Tabela 11: Atividade de exo-PG e valores de biomassa obtidos das diferentes frações do poliuretano com <i>P. brasiliatum</i> imobilizado, após 48 h de produção	46
Tabela 12: Atividade de exo-PG e valores de biomassa obtidos em diferentes velocidades de agitação durante a produção de exo-PG por <i>P. brasiliatum</i> imobilizado <i>in situ</i> após 48 h de produção	47
Tabela 13: Produção de exo-PG e difusão de biomassa a partir do <i>P. brasiliatum</i> livre e imobilizado por contato e <i>in situ</i>	58
Tabela 14: Parâmetros cinéticos do processo de bioprodução de <i>P. brasiliatum</i> livre e imobilizado	60
Tabela 15: Valores de atividade de Exo-PG e biomassa obtidos por <i>P. brasiliatum</i> imobilizado por contato em esponja multiuso comercial durante 96 h de bioprodução.	54

Tabela 16: Atividade de exo-PG e difusão de biomassa a partir do *P. brasilianum* livre e em diferentes tipos de imobilizações em 48 h de bioprodução.....54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	17
3.2 PECTINASES	19
3.3 FUNGOS DO GÊNERO <i>PENICILLIUM</i>	21
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS	22
3.4.1 Suportes de imobilização	25
3.5 ESTADO DA ARTE	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO	28
4.2 PRODUÇÃO DE EXO-PG COM <i>P. brasilianum</i> LIVRE	28
4.3 IMOBILIZAÇÃO DE <i>P. brasilianum</i> EM ESPUMA DE POLIURETANO	29
4.3.1 Imobilização de <i>P. brasilianum</i> por contato em espuma de poliuretano.....	29
4.3.1.1 Preparo do suporte de poliuretano para imobilização	29
4.3.1.2 Avaliação do efeito de pré-tratamentos na imobilização de <i>P. brasilianum</i> por contato em espuma de poliuretano (PU).....	29
4.3.1.3 Avaliação do efeito da quantidade de espuma de poliuretano e de meio reacional para produção de exo-PG.....	30
4.3.1.4 Efeito do tempo de impregnação do <i>P. brasilianum</i> no suporte de poliuretano	31
4.3.1.5 Avaliação de diferentes tipos de lavagens nas espumas de PU com <i>P. brasilianum</i> imobilizado por contato para remoção das células não aderidas ao suporte	31
4.3.2 Imobilização de <i>P. brasilianum in situ</i> em espuma de PU para produção de exo-PG	32
4.3.2.1 Polimerização da espuma de poliuretano com o inóculo em diferentes concentrações de esporos	32
4.3.2.2 Avaliação da distribuição celular no poliuretano.....	32

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EXO-PG DE <i>P. brasilianum</i> IMOBILIZADO.....	33
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR (BIOMASSA).....	34
4.6 ATIVIDADE DA EXOPOLIGARACTURONASE	34
4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE EXO-PG COM <i>P. brasilianum</i> IMOBILIZADO ..	35
4.8 CONSUMO DE SUBSTRATO.....	35
4.9 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE EXO-PG	35
4.10 ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	36
4.11 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM.....	37
4.12 IMOBILIZAÇÃO DE <i>P. brasilianum</i> EM ESPONJA MULTIUSO COMERCIAL PARA BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG.....	37
4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 CINÉTICA DE BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG DO MICRORGANISMO LIVRE... ..	39
5.2 IMOBILIZAÇÃO DE <i>P. brasilianum</i> POR CONTATO EM ESPUMA DE POLIURETANO	40
5.3 IMOBILIZAÇÃO DE <i>P. brasilianum</i> IN SITU EM ESPUMA DE POLIURETANO PARA PRODUÇÃO BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG.....	44
5.4 CINÉTICA DE BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG COM <i>P. brasilianum</i> IMOBILIZADO	46
5.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DA ATIVIDADE DE EXO-PG	49
5.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	50
5.7 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM.....	51
5.8 PRODUÇÃO DE EXO-PG COM <i>P. brasilianum</i> IMOBILIZADO POR CONTATO EM ESPONJA MULTIUSO COMERCIAL.....	53
6 CONCLUSÕES	56
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos, juntamente com o desenvolvimento de novos materiais, tornaram-se um fator econômico que gera rendas anuais significativas. As enzimas são catalisadores ecológicos amplamente utilizados em muitos processos industriais de alimentos, surgindo como uma alternativa para a substituição de processos químicos convencionais, principalmente pela sua especificidade e potencial catalítico. Além disso, processos enzimáticos tendem a gerar um menor impacto ambiental, a reduzir gastos em setores industriais e, melhorar a qualidade dos produtos (CASTRO et al., 2004; MODI et al., 2007; CARVALHO, 2007; WU et al., 2015; SUN et al., 2018).

Neste sentido, a produção de enzimas é considerada como segmento estratégico para a economia verde, com previsão de crescimento anual de 7% ao ano até 2020 (em torno de US\$ 6,2 bilhões entre 2015 e 2020). Assim, vale destacar a importância da obtenção destas enzimas em sua forma mais ativa e a baixo custo (SANDRI, FONTANA, SILVEIRA, 2015; SINGH et al., 2016).

As pectinases foram as primeiras enzimas a serem industrialmente utilizadas e apresentam inúmeras aplicações comerciais, principalmente na indústria de processamento de frutas (GUMMADI e PANDA, 2003; OLIVEIRA, 2005). Elas podem ser sintetizadas por bactérias, leveduras ou fungos filamentosos, sendo este último, amplamente explorado para a produção em larga escala de pectinases. O fungo *Aspergillus niger* é o mais comumente utilizado para produção industrial, no entanto, pesquisas com o gênero *Penicillium* spp. têm demonstrado que alguns isolados são produtores promissores de pectinases (KANT et al., 2013; ZENI, 2011).

Inúmeras cepas microbianas são descritas anualmente por sua capacidade de produzir enzimas de importância industrial, no entanto, poucas encontram sua aplicação no setor comercial, sendo que, o custo da produção de enzimas é um dos principais fatores que limitam essas aplicações. A imobilização microbiana apresenta-se como uma estratégia para obter rendimentos mais elevados com gastos substancialmente reduzidos.

A técnica de imobilização microbiana consiste no aprisionamento, adsorção ou ligação de células a uma matriz inerte. Um processo baseado em células imobilizadas pode ser operado de um modo contínuo e proporciona uma melhor consistência do produto, maiores taxas de fermentação e menores perdas. Células

imobilizadas em um reator contínuo podem ser usadas para alcançar uma maior densidade celular que, em última instância, aumenta a produtividade do processo (ALMEIDA et al., 2003; PIETER et al., 2006).

Dentre os diversos suportes que podem ser utilizados para a imobilização microbiana, a espuma de poliuretano oferece características interessantes, como grande resistência à força mecânica, a solventes orgânicos e a ataques microbiológicos, além de ser fácil de manusear (PATIL et al., 2006; NIE et al., 2016; WAN-MOHTAR et al., 2016).

Estudos disponíveis na literatura direcionam a imobilização de microrganismos em espuma de poliuretano com agregação *in situ*. No entanto, esse processo pode levar a inativação do microrganismo ou da enzima, devido principalmente a etapa de polimerização ser exotérmica (SILVA et al., 2013; DALLAGO et al., 2014; NYARI et al., 2016).

Assim, estudos que avaliem diferentes técnicas de imobilização em espumas de poliuretano, são de interesse para o aperfeiçoamento dos processos de imobilização e consequente aumento do rendimento e minimização de custos operacionais.

Neste contexto, inseriu-se a proposta do presente trabalho que foi a produção da pectinase exopoligalacturonase através do fungo *Penicillium brasilianum* imobilizado em suporte de espuma de poliuretano, utilizando-se das técnicas de imobilização por contato e agregação *in situ*. E também, a imobilização por contato deste mesmo fungo em esponja multiuso comercial usada, a fim de, propor uma alternativa de reutilização para este resíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo imobilizar o *Penicillium brasilianum* em espuma de poliuretano para a bioprodução de exopoligalacturonase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- a) Determinar os parâmetros cinéticos de bioprodução da exo-PG a partir do *P. brasilianum* livre.
- b) Avaliar a imobilização por contato do *P. brasilianum* em poliuretano, determinando as melhores condições para bioprodução de exo-PG em relação ao efeito de pré-tratamentos na fixação do microrganismo no suporte de imobilização;
- c) Verificar o efeito de diferentes tipos de lavagens para eliminação das células não fixadas no poliuretano na imobilização por contato;
- d) Avaliar a quantidade de cubos de poliuretano e de meio reacional para bioprodução de exo-PG;
- e) Determinar a melhor concentração de esporos para a máxima bioprodução de exo-PG, bem como a distribuição celular do fungo no suporte;
- f) Comparar o efeito de diferentes velocidades de agitação durante a bioprodução de exo-PG pelo *P. brasilianum* imobilizado *in situ* e por contato;
- g) Realizar o estudo cinético da bioprodução de exo-PG nas condições selecionadas de imobilização;
- h) Avaliar a estabilidade de estocagem e o ciclo operacional do microrganismo imobilizado;
- i) Avaliar a capacidade de produção de exo-PG pelo *P. brasilianum* imobilizado em esponja multiuso comercial usada.

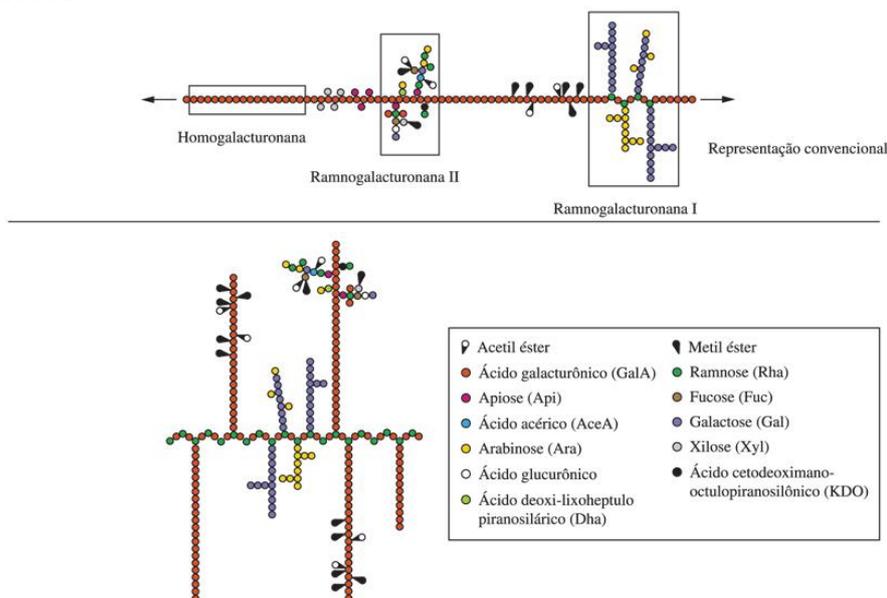
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve revisão da literatura que serviu de suporte para o desenvolvimento da presente pesquisa. Inicialmente, o referencial aborda características das substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas, algumas particularidades dos fungos do gênero *Penicillium* e por fim, a imobilização de microrganismos e os tipos de suportes que são utilizados.

3.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

As substâncias pécticas são estruturas pertencentes à família dos oligossacarídeos e polissacarídeos, formados por monossacarídeos através de diferentes tipos de ligação e agrupados em distintos tipos de cadeias (CANTERI, 2010; CANTERI et al., 2012; SHARMA et al., 2013). Basicamente, as pectinas constituem de dois grupos de polímeros: as homogalacturonanas (HG) e as ramnogalacturonanas (RG), essa estrutura química pode ser visualizada na representação esquemática da Figura 1.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura química das substâncias pécticas.



Fonte: Canteri (2012).

As homogalacturonanas são formadas por homopolímeros lineares formados por ácido D-galacturônico (AGa) unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) que

constituem a região lisa da cadeia de pectina, podendo o AGa ter suas carboxilas parcialmente esterificadas com grupos metílicos e parcialmente ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (JAYANI et al., 2005; BIZ, 2012; PEDROLLI et al., 2009).

As ramnogalacturonanas compõe a região ramificada da pectina e caracterizam-se pela presença de dímeros de AGa e L-ramnose unidos por ligação α -(1,4) e α -(1,2), respectivamente, aos quais se ligam cadeias laterais que contém resíduos de D-galactose e L-arabinose. Outras ramificações são originadas destas cadeias laterais, formadas por monossacarídeos como D-manose, D-glucose, D-xilose e o ácido D-glucurônico (ROJAS, 2009; SIEIRO et al., 2012).

A Sociedade Americana de Química classificou a pectina, em conjunto com a protopectina, ácido péctico e ácido pectínico como as quatro principais moléculas que formam o grupo das substâncias pécticas, suas características estão apresentadas na Tabela 1 (PASHA et al., 2013; TAPRE e JAIN, 2014).

Tabela 1: Características das substâncias pécticas.

Substâncias pécticas	Características
Pectina	Material polimérico, solúvel em água no qual, pelo menos, 75% dos grupos carboxílicos das unidades de galacturonatos são metil esterificados. Sua principal função biológica é de caráter estrutural, com variação do grau de esterificação em função do vegetal do qual a substância péctica é extraída.
Ácido péctico	Composto por ácido poligalacturônico coloidal apresenta grupos carboxílicos essencialmente livres de grupos metoxilados.
Ácido pectínico	Cadeia polimérica solúvel em água é formado por cadeias de poligalacturonanas com parte dos seus ácidos galacturônicos metilados.
Protopectina	Substância insolúvel em água, presente em tecidos intactos. Pode ser hidrolisada a pectina, ácido péctico ou pectínico.

Fonte: Rodriguez e Serrat (2008).

A pectina é produzida comercialmente, sendo extraída principalmente de frutas cítricas. No segmento alimentício, a pectina é amplamente utilizada para o preparo de geleias, doces de frutas, produtos de confeitaria e sucos de frutas, principalmente devido a sua capacidade de formar géis (SANTI, 2005). Por outro lado, sua presença em frutas e vegetais também é responsável por grandes perdas

da indústria, principalmente na extração de sucos, devido ao aumento na viscosidade durante o processo de prensagem, filtração e concentração, fazendo-se necessário a utilização de enzimas pectinolíticas nos processos em que sua ocorrência é indesejada (SANTI, BERGER e SILVA, 2014).

3.2 PECTINASES

As pectinases ou enzimas pectinolíticas configuram um sistema complexo de enzimas responsáveis por degradar ou modificar as substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica (PEDROLLI, 2009).

As enzimas pectinolíticas são amplamente distribuídas em plantas, onde participam da modificação dos materiais pécticos durante o processo natural de maturação de algumas frutas. Os microrganismos representam um recurso atraente e ideal desses biocatalisadores devido à sua biodiversidade disseminada, crescimento mais rápido e menor tempo de vida e suscetibilidade a manipulações genéticas (AMIN et al., 2017b; EL-SHEEKH et al., 2009; JACOB, 2009).

Essas enzimas são originadas principalmente por fungos filamentosos, leveduras e bactérias filamentosas e não filamentosas (JACOB, 2009). Os fungos filamentosos são os mais utilizados para a produção industrial de pectinases, principalmente pela capacidade de se adaptar a uma grande variedade de substratos e pelas suas características de reprodução e crescimento. Ademais, essas pectinases apresentam melhor estabilidade ao pH e à temperatura, características importantes para aplicação em bioprocessos (MARTIN et al., 2004).

As pectinases são classificadas de acordo ao modo de ataque à molécula de pectina, sendo baseada na preferência pelo substrato (desmetoxilante, despolimerizante ou solubilizante), forma de rompimento da ligação glicosídica, lise ou hidrólise e modo de ação (endoenzima ou exoenzima) (TAPRE e JAIN, 2014). Assim, elas podem ser divididas em dois grupos principais, o das pectinases que atuam sobre a estrutura principal da pectina e tem a função de degradá-la até suas unidades monoméricas e o grupo constituído de enzimas acessórias (MARTINEZ, 2009).

As pectinases que atuam sobre a estrutura principal da pectina subdividem-se em três tipos conforme seu modo de ataque à parte galacturonada da molécula de pectina. As esterases, que catalisam a desesterificação da pectina mediante a

remoção dos grupos metílicos da cadeia principal. As despolimerizases, que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4, entre monômeros de ácido D-galacturônico das substâncias pécticas, através de dois mecanismos diferentes: hidrólise (hidrolases) e trans-eliminação (liases). E as protopectinases, que degradam a protopectina insolúvel para formar pectina solúvel altamente polimerizada (PEDROLLI et al., 2009; SIEIRO et al., 2012). A Tabela 2 apresenta esses três grupos de enzimas conforme sua forma de atuação.

Tabela 2: Classificação das enzimas pécticas quanto ao mecanismo de ação.

	Enzima	Reação catalítica
Esterase	PME (Pectina metilesterase)	$\text{Pectina} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pectato} + n \text{ metanol}$
	PAE (Pectina acetilesterase)	$\text{Pectina} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pectato} + n \text{ acetato}$
Despolimerase	Exo-PG (Exopoligalacturonase)	$\text{Ácido péctico} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{monogalacturonatos}$
	Exo-PG (Exopoligalacturonase)	$\text{Ácido péctico} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{digalacturonatos}$
	Endo-PG (Endopoligalacturonase)	$\text{Ácido péctico} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{oligogalacturonatos}$
	PMG (Polimetilgalacturonase)	$\text{Pectina} \rightarrow \text{metil oligogalacturonatos}$
	Exo-PGL (Exo-Pectato liase)	$\text{Ácido péctico} \rightarrow \text{digalacturonatos insaturados}$
	Endo-PGL (Endo-Pectato liase)	$\text{Ácido péctico} \rightarrow \text{oligogalacturonatos insat.}$
	Endo-PMGL (Pectina-liase)	$\text{Pectina} \rightarrow \text{metil oligogalacturonatos insat.}$
Protopectinase	Ppase	$\text{Protopectina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{pectina solúvel}$

Fonte: YADAV et al. (2009), ALIMARDANI-THEUIL et al. (2011), MURAD e AZZAZ (2011).

Dentre as pectinases mais utilizadas na indústria de alimentos, as poligalacturonases (PG) são as que desempenham papel mais importante (ANDRADE et al., 2011), principalmente na redução da viscosidade e na clarificação de sucos (KASHYAP et al., 2001; KANT et al., 2013; BARMAN et al., 2015; AMIN et al., 2017a), na maceração, liquefação e extração de alimentos infantis, facilitando os processos e também na clarificação de vinhos (LANG e DÖRNENBURG, 2000; SILVA et al., 2005; TARI et al., 2007; DÍAZ et al., 2013).

As poligalacturonases foram identificadas em vários fungos filamentosos e estão entre as pectinases mais extensamente estudadas, tendo ação principalmente sobre a região homogalacturonana. Elas podem ser divididas em endopoligalacturonases (endo-PG) ou exopoligalacturonases (exo-PG), de acordo com sua forma de ação sobre o substrato. As Endo-PG agem aleatoriamente sobre os sítios internos da cadeia, enquanto as Exo-PG clivam sequencialmente a cadeia

a partir de uma extremidade não redutora liberando monômeros ou dímeros de ácido galacturônico (LARA-MÁRQUEZ et al., 2011; MARKOVIC e JANECEK, 2001; KASHYAP et al., 2001).

Dentre os principais fungos produtores de PG, espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são comumente utilizadas. O gênero *Aspergillus* spp. é o maior produtor, com destaque para a espécie *Aspergillus niger*, porém, diversos estudos vêm direcionando alta atividade à espécies do gênero *Penicillium* spp. (KANT et al., 2013; REZENDE et al., 2009).

3.3 FUNGOS DO GÊNERO *PENICILLIUM*

O *Penicillium* é um fungo filamentosos do grupo ascomycetes, com 354 espécies que desempenham importante papel em processos tecnológicos e naturais (NIELSEN et al., 2017). Ele está associado com plantas e produtos alimentícios e ocorrem em vários ambientes, como solo, ar e ambientes com condições extremas de temperatura, salinidade, deficiência de água e pH. Apresenta grande potencial em várias aplicações biotecnológicas, industriais e ambientais, podendo ser utilizado como fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, secreção de metabólitos secundários, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros (MORETTI e SARROCCO, 2015).

O gênero *Penicillium* é capaz de sintetizar compostos já conhecidos e novos compostos fisiologicamente ativos com diversas estruturas. Algumas espécies são capazes de produzir micotoxinas prejudiciais ou causar danos pós colheita por conta de sua patogenicidade, enquanto outras são consideradas grandes fontes produtoras de enzimas (KOZLOVSKII et al., 2013; ROPARS et al., 2016; VISAGIE, et al., 2014). Espécies de *Penicillium* são capazes de produzir metabólitos secundários bioativos com capacidade antibacteriana e antifúngica, além de imunossupressores e agentes redutores de colesterol (RANCIC et al., 2006; LUCAS et al., 2007; NICOLETTI et al., 2007; KWON et al., 2002).

Diversas estirpes de *Penicillium* são produtoras de enzimas que são utilizadas em produtos alimentares a fim de melhorar sabor, produção de álcool e também clareza em vinhos e cervejas (NIGAM, ASTHANA e KUMAR, 2017).

A espécie *Penicillium brasilianum* (identificação taxonômica 104259) é capaz de produzir monoterpenos, amidas e enzimas de importância biotecnológica, como

enzimas pectinolíticas. O *Penicillium* é um dos gêneros mais utilizados em biotecnologia e o *Penicillium brasilianum* é alvo biotecnológico importante para a produção de enzimas (THYGESEN et al., 2003; ZENI, 2011; ZENI et al., 2014). Thygesen et al. (2003) descreveram uma série de enzimas biotecnológicas produzidas por um isolado de *P. brasilianum* IBT 20888 isolado de algas marinhas na Dinamarca. Zeni et al. (2011) relataram microrganismos produtores de pectinase com atividade de poligalacturonase incluindo o isolado *Penicillium* spp. do chá, posteriormente identificado como *Penicillium brasilianum* por técnicas de biologia molecular (ZENI et al., 2014).

A produção de metabólitos pelo *Penicillium*, bem como outros microrganismos, é influenciada pelo seu estado morfológico durante o processo fermentativo. Os fungos, no geral, apresentam uma morfologia bastante complexa com estruturas celulares diferentes em cada etapa do seu ciclo de vida. A imobilização celular surge como uma alternativa para garantir que a estrutura do microrganismo seja conservada, tanto para aplicação em escala industrial, quanto de laboratório (FENG et al., 2003; PRASAD et al., 2005).

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A imobilização de um microrganismo pode ser definida como o confinamento físico ou químico de células viáveis em uma região definida, com características diferentes do meio a seu redor, que permita que as suas atividades catalíticas sejam mantidas em processos (COVIZZI et al., 2007; MILESSI, 2012; VOS et al., 2010).

A técnica pode ser aplicada tanto em microrganismos como em enzimas, apresentando alta facilidade de recuperação do agente biológico (MALAJOVICH, 2009; MOHAMAD et al., 2015). Via de regra, a imobilização induz diversas alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de fungos, leveduras e bactérias, o que propicia a viabilidade destas células por um longo período de armazenamento, além da facilidade de manuseio, transporte e aplicação (COVIZZI et al., 2007; ELIZEI et al., 2014). Ainda, a imobilização é capaz de proporcionar maior tolerância aos componentes tóxicos gerados, já que a matriz é capaz de proteger as células (GIESE, 2015).

Para Trabelsi et al. (2014), a tecnologia de imobilização aumenta a densidade celular, melhora a resistência à contaminação e é capaz de manter a estabilidade química e física das células.

A utilização de células imobilizadas na indústria de alimentos tem sido reportada, porém não existe um método ou suporte único considerado mais apropriado para a imobilização celular (KOSSEVA, 2011).

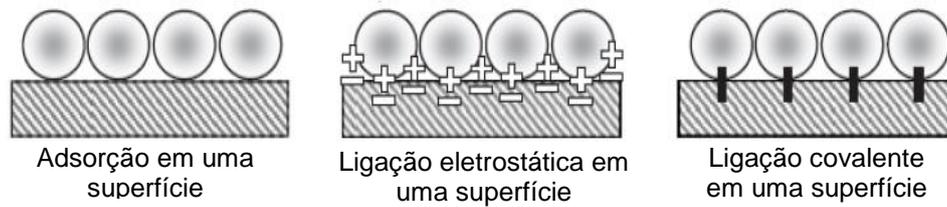
Há dois tipos de leitos que podem ser utilizados para imobilização de células. Aqueles que aderem à superfície, onde as células são fixadas ao suporte de imobilização por ligações químicas (adsorção, ligação iônica e ligação covalente). E aqueles que aprisionam fisicamente, onde as células são aprisionadas em glóbulos ou fibras de polissacarídeo, proteínas ou polímeros sintéticos (ELIZEI, 2009).

A imobilização de microrganismos é baseada nos métodos de imobilização de enzimas. Os métodos mais empregados são adsorção, ligação covalente e aprisionamento/encapsulamento de células (KOSSEVA et al., 2009).

A adsorção ocorre quando a enzima ou célula é ligada a um material inerte por ligações de baixa energia de *Van der Waals* ou hidrofóbicas, iônicas, etc. No caso de enzimas, pode ocorrer um bloqueio do sítio ativo, diminuindo sua atividade (JEGANNATHAN et al., 2008; ASGHER et al., 2014). Essa técnica apresenta facilidade de preparação e baixos custos, além de não envolver nenhum produto químico tóxico, porém há a possibilidade de ocorrer dessorção devido às variações de temperatura, pH e força iônica, o que deixa o material vulnerável podendo ser perdido para o meio reacional (MENDES et al. 2011; KOSSEVA et al., 2009; PEREIRA, 2014).

Na imobilização por meio de ligações covalentes, ocorre uma reação química que resulta na ligação direta entre a célula e o suporte, essa interação célula-suporte é mais forte e estável. É o método mais efetivo, podendo ser feito também uma ligação covalente multiponto, que irá aumentar a estabilidade e a capacidade de reuso da célula ou enzima (ASHER et al., 2014). Materiais inorgânicos como vidro e porcelana e materiais celulósicos, como serragem e madeira são algumas das superfícies utilizadas neste tipo de imobilização (MILESSI, 2012; KOURKOUTAS et al., 2004). A Figura 2 apresenta os tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização.

Figura 2: Tipos de ligação entre a célula e o suporte de imobilização.

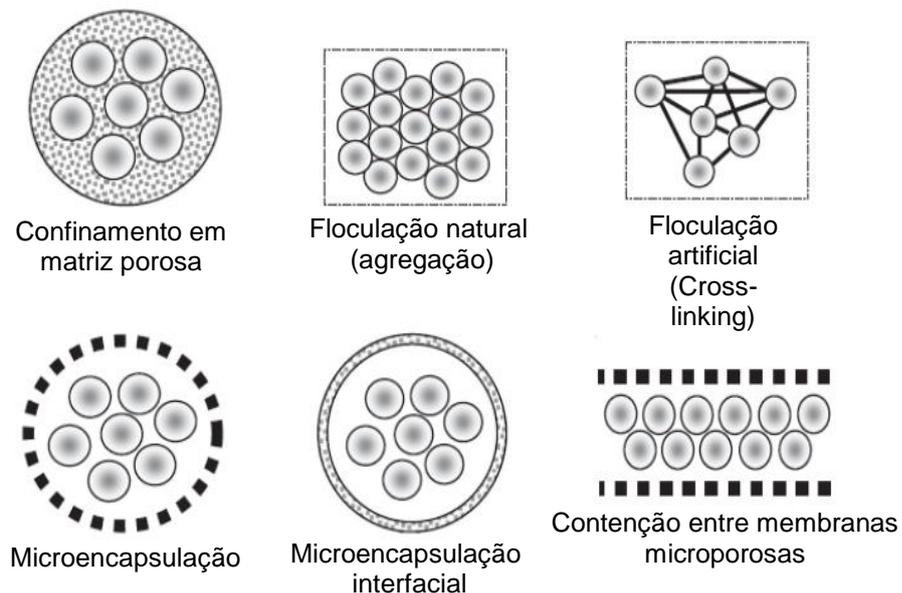


Fonte: Adaptado de Kourkoutas et al. (2004).

A técnica de imobilização por encapsulamento pode ser feita por membranas microporosas, confinamento em microcápsulas ou imobilização em interface de líquidos imiscíveis. Este tipo de imobilização é interessante para a obtenção de produtos sem presença de células (KOURKOUTAS et al., 2004).

A Figura 3 apresenta os métodos de imobilização por confinamento de modo esquematizado para melhor entendimento.

Figura 3: Métodos de imobilização por confinamento.



Fonte: Adaptado de Kourkoutas et al., (2004).

O confinamento das células/enzimas consiste na adsorção das mesmas no suporte através de interações iônicas, forças de *Van der Waal* e pontes de hidrogênio. Este tipo de imobilização pode ser em membrana, onde há a formação de uma membrana em torno das células, seja esta membrana pré-formada ou formada *in*

situ. Ou em matriz, baseado na difusão celular em uma matriz porosa, podendo ser pré-formada ou sintetizada *in situ*. Ambos baseiam-se na inclusão das células em uma malha rígida, impedindo a difusão destas para o meio. Esse método vem sendo extensamente estudado na imobilização de células viáveis, pois preserva a integridade celular, uma vez que, permite o emprego de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suporte de imobilização (KOURKOUTAS et al., 2004; ASGHER et al., 2014; CANILHA, 2006; CORTEZ et al., 2017).

3.4.1 Suportes de imobilização

Diversos materiais são reportados na literatura como suportes para imobilização. Para tanto, é interessante que esses materiais sejam encontrados facilmente e em abundância, tenham baixo custo, fácil operação, não sejam tóxicos para a célula que se pretende aprisionar e tenham alta resistência mecânica (MENDES, 2009).

A escolha do suporte para imobilização deve levar em consideração as suas propriedades físicas e químicas, observando a área superficial, insolubilidade, permeabilidade, capacidade de regeneração, composição, natureza (hidrofílica ou hidrofóbica), resistência e custo (MENDES et al., 2011).

Os suportes comumente utilizados são de origem biológica como o alginato, ágar, carragena entre outros e sintéticos como a policrilamida e polivinil álcool (LIMA, 2011).

Dentre os materiais sintéticos, os poliuretanos (PU's) vêm se destacando como uma matriz promissora para imobilização de enzimas e células microbianas íntegras. Por apresentar uma polimerização controlada e variedade dos grupos constitutivos, permite a adaptação do processo e composição para obter materiais de aplicações diversas, fatores estes que estão intimamente relacionados à sua morfologia (SOARES, 2012; NYARI, 2013; ANTUNES, 2015).

A tecnologia de imobilização de células é bastante ampla, podendo ser utilizada em diversos microrganismos e enzimas, com diferentes técnicas de imobilização. A Tabela 3 apresenta imobilizações em espuma de poliuretano reportadas pela literatura.

Tabela 3: Microrganismos imobilizados em espuma de poliuretano utilizados para diferentes tipos de aplicação.

Microrganismo	Método de imobilização	Aplicação	Referência
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Contato	Biodesulfuração assistida por ultra-som para minimização de gases emitidos por escapamento veicular	BHASARKAR, DIKSHIT e MOHOLKAR (2015)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Contato	Bioconversão de glicerol bruto derivado do biodiesel à di-hidroxiacetona	DIKSHIT e MOHOLKAR (2016)
<i>Bacillus gottheilii</i>	Contato	Produção de tanase	SUBBALAXMI e MURTY (2016)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Contato	Produção de exopolissacarídeo	WAN-MOHTAR et al. (2016)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contato	Remoção de hidrocarbonetos de águas residuais contendo altas concentrações de óleos	NIE et al. (2016)
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>in situ</i>	Produção de goma xantana	MESQUITA (2018)
Consórcio de <i>Brevibacillus laterosporus</i> e <i>Galactomyces geotrichum</i>	Contato	Descoloração de efluente da indústria têxtil	KURADE et al. (2019)

O poliuretano é o resultado da polimerização de um isocianato e um composto hidroxilado, que podem ser di ou polifuncionais, com ou sem a adição de outros reagentes. Essa polimerização ocorre pela dispersão dos reagentes e a nucleação por agitação, que irá introduzir bolhas de ar ao polímero (NYARI, 2013; ANTUNES, 2015).

Conforme Nyari (2013), as células dos microrganismos se ligam ao suporte por meio adesão e retenção nos poros da espuma, o que permite a otimização dos fluxos de substratos e produtos entre as espécies imobilizadas na matriz polimérica.

A utilização de suportes de poliuretano tem se estendido devido às diversas características que apresentam, conforme exploradas neste capítulo. Contudo, o custo deste material ainda é fator limitante para o uso em bioprocessos em escalas maiores. Assim, a utilização de suportes que sejam oriundos de reaproveitamento pode ser considerada promissora para viabilizar o custo do processo.

3.5 ESTADO DA ARTE

Como apresentado na revisão da literatura, a imobilização de células proporciona diversas vantagens ao microrganismo, bem como ao processo, permitindo que o mesmo se mantenha ativo por mais ciclos operacionais além de aumentar sua capacidade produtiva. O trabalho trouxe duas técnicas de imobilização em espuma de poliuretano, a imobilização *in situ* e a imobilização por contato. A primeira é amplamente estudada por outros autores e é utilizada como referência na imobilização com este tipo de suporte. A imobilização por contato, por sua vez, apresenta diversas especificidades, se fazendo necessário um estudo mais aprofundado da técnica.

Além disso, este trabalho traz uma alternativa para o reaproveitamento de esponjas multiuso comercial, uma vez que, estabelecidas as melhores condições de imobilização por contato na espuma de poliuretano, estas são aplicáveis à esponja, que é de mesma composição.

Mediante as características pesquisadas e apresentadas neste capítulo, buscou-se determinar os melhores métodos para realização do presente trabalho, apresentados na sequência desta seção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas as metodologias utilizadas na bioprodução da pectinase exo-PG a partir de *P. brasilianum* livre e imobilizado, assim como o processo de imobilização em poliuretano, ciclos operacionais contínuos, estabilidade de estocagem e imobilização em suporte alternativo de esponja multiuso comercial. Além de parâmetros cinéticos de produção da exo-PG com o micro-organismo livre e imobilizado pelos diferentes métodos e suportes.

4.1 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

O cultivo do fungo *Penicillium brasilianum* foi realizado em Ágar Potato Dextrose (PDA) durante 5 dias em estufa à 25°C. Após, os esporos foram coletados adicionando-se ao frasco 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e cacos de porcelana estéreis. Para contagem dos esporos foi retirado, assepticamente, 1 mL da suspensão, sendo diluída de 10 a 10⁻³ vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1% v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem dos esporos (FREIRE, 1996), fixou-se uma concentração de esporos de 5x10⁶ esporos/mL (ZENI, 2009).

4.2 PRODUÇÃO DE EXO-PG COM *P. brasilianum* LIVRE

A bioprodução de exopoligacturonase foi realizada empregando meio maximizado em frascos agitados, contendo 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, sendo adicionado neste meio de cultura o inóculo de *P. brasilianum* na concentração de 5x10⁶ esporos/mL para 100 mL de meio. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm e pH inicial de 5,5. As amostras foram coletadas periodicamente (a cada 12 horas) até 96 horas de bioprodução, em seguida filtradas e realizada a medida de atividade de exo-PG, o consumo de substratos (carbono orgânico total e nitrogênio), a concentração celular (biomassa) e o pH (ZENI, 2011).

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

4.3 IMOBILIZAÇÃO DE *P. brasilianum* EM ESPUMA DE POLIURETANO

A imobilização do *P. brasilianum* foi realizada em suporte de espuma de poliuretano por diferentes técnicas, a fim de avaliar a eficiência do fungo imobilizado para a produção da exo-PG.

4.3.1 Imobilização de *P. brasilianum* por contato em espuma de poliuretano

4.3.1.1 Preparo do suporte de poliuretano para imobilização

Para preparo do suporte de poliuretano, 7000 µL de polioli foram adicionados em copo plástico descartável, sendo acrescidos de 3000 µL isocianato sob agitação constante com auxílio de bastão de vidro. A polimerização foi realizada a temperatura ambiente e, após 24 h de secagem também a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), a espuma resultante foi cortada em cubos de 1 cm³ (MESQUITA, 2018). As espumas cortadas foram submetidas à esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.3.1.2 Avaliação do efeito de pré-tratamentos na imobilização de *P. brasilianum* por contato em espuma de poliuretano (PU)

Foram realizados quatro diferentes tipos de pré-tratamentos para avaliar a impregnação do fungo no suporte de imobilização. Cada uma das condições citadas a seguir, foi submetida à incubação durante 5 dias em estufa na temperatura de 30°C.

1) TWEEN - Adição de 3 cubos de poliuretano em 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) com esporos do *P. brasilianum* na concentração de 5×10^6 esporos/mL em tubos de falcon. Os tubos foram mantidos por 1 hora em agitador rotativo (TECNAL, Modelo TE-164). Após período, as espumas foram adicionadas em superfície de meio Potato Dextrose Ágar (PDA) e incubados.

2) PD - Adição de 3 cubos de poliuretano em 100 mL de caldo Potato Dextrose Broth (PD) com esporos do *P. brasilianum* (concentração 5×10^6 esporos/mL).

3) PDA - Adição de 3 cubos de poliuretano em superfície de meio PDA com esporos do *P. brasiliense* (concentração 5×10^6 esporos/mL).

4) PD + PDA - Adição de 3 cubos de poliuretano em 100 mL caldo PD, sendo deixados imersos pelo período de 1 minuto e depois adicionados em superfície de meio PDA com esporos do *P. brasiliense* (concentração 5×10^6 esporos/mL).

Após o período em estufa, os cubos de PU contendo as células de *P. brasiliense* foram lavados com 20 mL de água destilada com o auxílio de pisseta e, após, foram inoculados em meio de produção (32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, 30°C, 180 rpm, pH inicial 5,5 (ZENI, 2011) e 48 h). O tempo de 48 h foi fixado, por apresentar melhores resultados nos testes realizados com o microrganismo livre. A bioprodução de exo-PG foi realizada na proporção de 1 cubo para 9 mL de meio (MESQUITA, 2018). Após o tempo de fermentação, foram feitas análises de desprendimento de biomassa e produção de exo-PG.

4.3.1.3 Avaliação do efeito da quantidade de espuma de poliuretano e de meio reacional para produção de exo-PG

A fim de maximizar a bioprodução pelo microrganismo imobilizado, foram realizadas fermentações com variação na quantidade de cubos de poliuretano no meio reacional, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Quantidade de cubos de poliuretano e de meio reacional para produção de exo-PG.

Capacidade do Erlenmeyer (mL)	Quantidade de cubos (unidade)	Quantidade de meio reacional (mL)
50	1	9
50	1	15
50	1	21
100	3	27
100	3	45
100	3	63

Ao aumentar a quantidade de cubos e o meio de cultura presentes no início da fermentação, o tamanho do Erlenmeyer utilizado também foi aumentado.

Os cubos de espuma contendo as células de *P. brasilianum* da melhor condição de pré-tratamento, foram lavados com 20 mL de água destilada com auxílio de pisseta e, após, utilizados para a bioprodução de Exo-PG como descrito anteriormente.

4.3.1.4 Efeito do tempo de impregnação do *P. brasilianum* no suporte de poliuretano

Para avaliação do tempo de impregnação necessário para imobilização do microrganismo no suporte, as espumas de poliuretano foram imersas em caldo PD durante 1 minuto e acomodadas em meio PDA, na sequência realizou-se a inoculação dos esporos do microrganismo. O suporte de poliuretano com o microrganismo em meio PDA foi mantido em estufa à 30°C durante 5, 7 e 9 dias.

Após período de impregnação, os cubos de espuma contendo as células de *P. brasilianum* foram lavados com 20 mL de água destilada com auxílio de pisseta e, após, realizada a bioprodução de exo-PG na melhor relação de quantidade de cubos e de mL de meio. Após o tempo de fermentação, foram realizadas análises de desprendimento de biomassa e produção de exo-PG.

4.3.1.5 Avaliação de diferentes tipos de lavagens nas espumas de PU com *P. brasilianum* imobilizado por contato para remoção das células não aderidas ao suporte

Para remoção de células de *P. brasilianum* não aderidas ao suporte de poliuretano foram realizados diferentes tipos de lavagens, a saber:

- 1) Lavagem das espumas de poliuretano com água destilada esterilizada com auxílio de pisseta, utilizando aproximadamente 20 mL de água.
- 2) Lavagem através da agitação das espumas de poliuretano em tubos de falcon com 20 mL de água destilada esterilizada, em vórtex com agitação de 3000 rpm (IKA, Modelo MS 3) durante 1 minuto.

3) Lavagem através da agitação das espumas de poliuretano colocadas em erlenmeyers de 125 mL com 20 mL de água destilada esterilizada, em shaker (New Brunswick, Modelo Excella E 25) à 180 rpm durante 1 minuto.

Os cubos de espuma contendo as células de *P. brasilianum*, após as diferentes lavagens, foram utilizados para a produção de exo-PG, sendo quantificado o desprendimento de biomassa e atividade de exo-PG em função do tempo de produção.

4.3.2 Imobilização de *P. brasilianum in situ* em espuma de PU para produção de exo-PG

4.3.2.1 Polimerização da espuma de poliuretano com o inóculo em diferentes concentrações de esporos

A imobilização em poliuretano (PU) foi desenvolvida adaptando as condições descritas por Nyari et al. (2016). Realizou-se a contagem de esporos, conforme descrito no item 4.1, fixada nas concentrações de 5×10^4 , 5×10^6 e 5×10^8 esporos/mL, para cada concentração, foram retirados 1000 μ L da suspensão e este adicionado a 7000 μ L de polioli em copo plástico descartável. Então, 3000 μ L isocianato foram acrescentados à mistura sob agitação constante. Tal procedimento foi realizado com auxílio de banho de gelo, uma vez que, ao adicionar os componentes para formação da espuma, ocorria um aquecimento na mistura que, por consequência, poderia causar a morte do inóculo. A polimerização foi realizada a temperatura ambiente, e após 24h de secagem a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), a espuma resultante foi cortada em cubos de 1 cm^3 (MESQUITA, 2018).

Uma amostra controle foi desenvolvida conforme item 4.2.1.1, afim de, avaliar comparativamente a conformação estrutural da espuma de poliuretano.

4.3.2.2 Avaliação da distribuição celular no poliuretano

A imobilização foi analisada em relação à distribuição espacial das células microbianas nos cubos de poliuretano. Para isso, o poliuretano foi dividido em 3 partes iniciais representando a parte superior (A), do meio (B) e inferior (C) do

formato e, em seguida, cada segmento foi dividido em 4 partes (Figura 4), com o auxílio de bisturi. Cada fração resultante foi cortada em cubos de aproximadamente 1 cm³ e utilizados separadamente para a produção de exo-PG de acordo com as frações 1, 2, 3 e 4 e A, B e C por 48 h. Após o tempo de bioprodução, foram realizadas as análises de desprendimento de biomassa e produção de exo-PG.

Figura 4: Divisão da espuma para análise de distribuição do imobilizado.



Fonte: a autora.

4.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EXO-PG DE *P. brasilianum* IMOBILIZADO

A bioprodução de exo-PG pelo microrganismo imobilizado por contato e *in situ* foi avaliada quando a influência de três diferentes velocidades de agitação (0, 90 e 180 rpm). Para tanto, os cubos com o microrganismo imobilizado foram adicionados ao meio de bioprodução contendo 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, nas condições de 30 °C, 180 rpm, pH inicial 5,5 (ZENI, 2011) e 48 h. Foi fixado o tempo de 48 h por apresentar melhores resultados nos testes realizados com o microrganismo livre. Após o tempo de bioprodução, foram feitas análises de desprendimento de biomassa e produção de exo-PG.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR (BIOMASSA)

A determinação da concentração celular foi realizada por medida de peso seco utilizando amostras de volumes conhecidos para representar o todo. No caso de uma cultura micelial, ou crescimento com formação de *pellets*, a distribuição da biomassa impede que sejam retiradas amostras de partes do volume, fazendo-se necessário a utilização de amostras destrutivas. Assim, para se determinar a curva de crescimento deste estudo, após cada tempo de bioprodução (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h) o líquido era filtrado a vácuo (MARCONI Modelo MA 058) e a biomassa retida no papel de filtro previamente tarado, foi dessecada em estufa (ODONTO BRÁS MODEL-1.3) a 105°C por aproximadamente 24 horas. A curva de crescimento microbiano foi construída a partir dos dados de biomassa obtidos pelo peso seco das amostras.

Para determinação do desprendimento de biomassa dos cubos de PU, a amostra toda era filtrada à vácuo e, a biomassa aderida ao cubo era removida com auxílio de pinça, sendo adicionada ao papel filtro para posterior dessecação em estufa conforme condições descritas acima.

4.6 ATIVIDADE DA EXOPOLIGARACTURONASE

A determinação da atividade pectinolítica da exopoligacturonase foi feita através da medida da liberação de grupos redutores pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico), proposto inicialmente por MILLER (1959), com modificações. Foram preparados 500 µL de substrato com 0,5% de pectina cítrica em tampão acetato de sódio pH 5,5 e incubados a 37°C por 15 minutos para estabilização da temperatura. A seguir, 500 µL de extrato enzimático foram adicionados ao substrato e a reação incubada a 37°C por 5 minutos, para o branco, foram adicionados 500 µL de água destilada. Após, adicionou-se 1000 µL de solução de DNS e a mistura foi mantida por 6 minuto em ebulição para formação de cor, resfriada em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman Coutler, modelo DU640), a 540 nm, contra o branco. Uma unidade de atividade pectinolítica foi definida como a quantidade de ácido galacturônico liberada por mL de extrato enzimático por minuto ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) sob as condições estudadas

segundo uma curva padrão estabelecida com ácido α -D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor. A atividade da exo-PG foi expressa em unidade de atividade por mL (U/mL).

4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE EXO-PG COM *P. brasilianum* IMOBILIZADO

Verificadas as melhores condições para bioprodução de exo-PG pelo *P. brasilianum* imobilizado por contato e *in situ*, os cubos de espuma contendo as células imobilizadas foram imersos em meio de cultura contendo 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, a 30 °C, 180 rpm por 96 h (ZENI, 2011), na proporção de 3 cubos para 63 mL de meio. Amostras foram coletadas periodicamente para quantificação da exo-PG, biomassa, consumo de substrato (Nitrogênio total e Carbono orgânico total).

4.8 CONSUMO DE SUBSTRATO

O consumo de fontes de nitrogênio e de carbono foi feito através das técnicas de Nitrogênio Total e Carbono Orgânico Total (TOC-V SHIMADZU) (GENG et al., 2017).

4.9 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE EXO-PG

A partir dos valores globais de biomassa, substrato e produto, em relação ao tempo, é possível determinar as velocidades de crescimento microbiano (r_x), consumo de substrato (r_s , carbono) e formação de produto (r_p), utilizando as equações 1 a 3 (BAILEY e OLLIS, 1986), tanto para o microrganismo livre, quanto para *P. brasilianum* imobilizado.

$$r_x = dX/dt \quad (1)$$

$$r_s = -dS/dt \quad (2)$$

$$r_p = dP/dt \quad (3)$$

Onde: $dX = X_f - X_0$, sendo X_f a concentração de biomassa no tempo final e X_0 a concentração de biomassa no tempo zero.

Em relação ao consumo de substrato: $dS = S_f - S_0$, onde S_f representa o substrato medido no tempo final e S_0 a medida de substrato no tempo zero.

Quanto à formação de produto: $dP = P_f - P_0$, sendo P_f a quantidade de produto no tempo final e P_0 a quantidade de produto no tempo zero.

Em relação ao tempo, $dt = t_f - t_0$, onde t_f representa 48 h e t_0 o tempo inicial.

Para o cálculo da velocidade de crescimento microbiano (r_x) do microrganismo imobilizado, considerou-se que:

(a) as células resultantes da duplicação celular não possuem a capacidade de ficar aderidas à matriz polimérica, e

(b) as células confinadas ao poliuretano têm velocidade de crescimento (r_x) similar à que se difundiram da matriz de poliuretano para o meio.

Partindo dos resultados obtidos nas equações 1 a 3, determinou-se os valores dos fatores de conversão de substrato (carbono) em células ($Y_{X/S}$) e de substrato ($Y_{P/S}$), conforme as equações 4 e 5 (BAILEY e OLLIS, 1986).

$$Y_{X/S} = r_x / r_s \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = r_p / r_s \quad (5)$$

4.10 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A estabilidade operacional da imobilização foi avaliada através de ciclos operacionais contínuos. Após cada bioprodução de exo-PG de 48 h, utilizando a proporção de 3 cubos para 63 mL de meio de cultura, os cubos contendo o microrganismo imobilizado em poliuretano foram lavados com água destilada estéril (20 mL) e utilizados em uma nova bioprodução nas condições de 30 °C, 180 rpm por 48 h. Em cada bioprodução foram realizadas análises de desprendimento de biomassa e de produção de exo-PG. Os ciclos foram realizados até se obter um rendimento menor que 50% do valor inicial.

4.11 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

A fim de avaliar a estabilidade de estocagem do fungo imobilizado, os cubos, após imobilização do microrganismo por contato e *in situ*, foram imediatamente armazenados em geladeira (4°C), acondicionadas em frascos de vidro estéreis por 45 dias. Decorridos os tempos de armazenamento, os cubos de espuma contendo as células de *P. brasilianum* imobilizadas foram utilizados para a bioprodução de exo-PG em meio de cultura contendo 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, a 30°C, 180 rpm e 48h. Foram realizadas análises de desprendimento de biomassa e de produção de exo-PG.

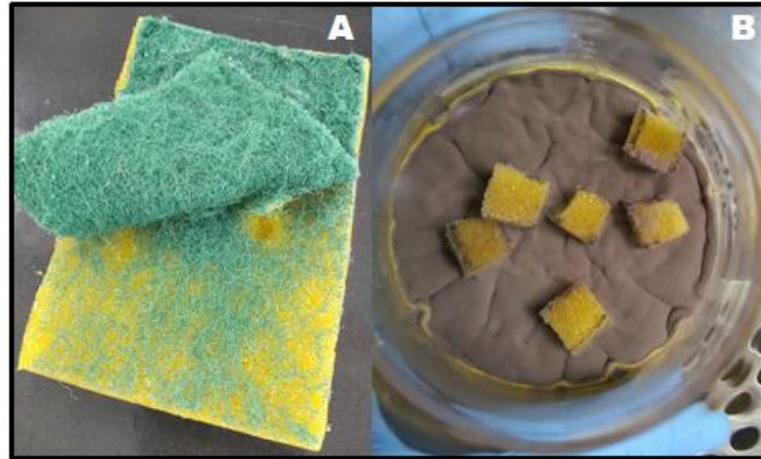
4.12 IMOBILIZAÇÃO DE *P. brasilianum* EM ESPONJA MULTIUSO COMERCIAL PARA BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG

A esponja multiuso dupla face comercial, composta por poliuretano e outra face por fibra sintética com abrasivo, foi utilizada como suporte alternativo para imobilização do *P. brasilianum*. Cabe salientar, que a esponja utilizada para o experimento era uma esponja já usada e seria destinada ao descarte.

Inicialmente, retirou-se a face abrasiva da esponja, conforme Figura 5 A, na sequência a mesma foi lavada com 100 mL de água destilada até que todo o resíduo visível fosse eliminado. Logo após, a espuma foi cortada em cubos de 1 cm³ e os cubos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, foram imersos em caldo PD por 1 minuto e depois adicionados em meio PDA com esporos do *P. brasilianum* (Figura 5 B), sendo incubados durante 5 dias em estufa na temperatura de 30°C.

Os cubos de espuma contendo as células de *P. brasilianum* imobilizadas foram utilizados para a bioprodução de exo-PG em meio de cultura contendo 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,5 g/L sulfato de magnésio, a 30°C, 180 rpm por 96 h (ZENI, 2011), na proporção de 3 cubos para 63 mL de meio. Amostras foram coletadas a 24 h para quantificação da exo-PG e biomassa.

Figura 5: Face de fibra sintética com abrasivo sendo removida da esponja (A) e cubos da esponja comercial com células de *P. brasilianum* imobilizadas (B).



Fonte: a autora.

4.13 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram tratados estatisticamente mediante análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey a nível de 95% de confiança com software Statistica versão 8.0. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

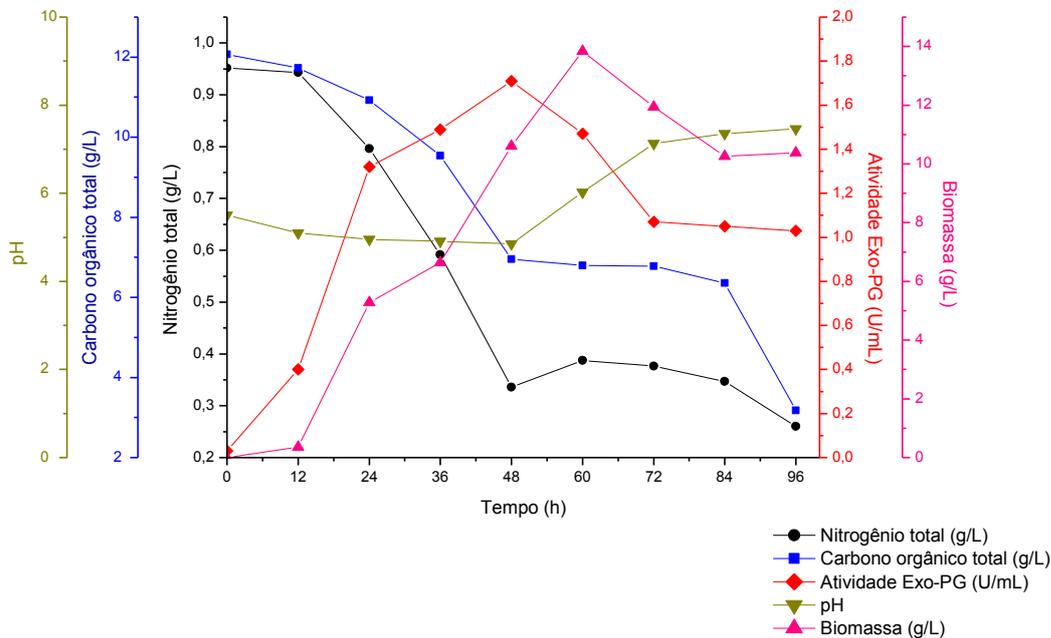
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao estudo do processo de imobilização do *P. brasilianum* e produção de exopoligalacturonase utilizando o fungo livre e imobilizado.

5.1 CINÉTICA DE BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG DO MICRORGANISMO LIVRE

Na Figura 6 encontram-se os resultados da produção de exopoligalacturonase ao longo de 96 h de cultivo, a partir do *P. brasilianum* livre. Observa-se que a máxima de atividade de exo-PG foi obtida em 48 h de produção (1,71 U/mL).

Figura 6: Cinética de produção de exo-PG pelo *P. brasilianum* livre.



A biomassa atingiu seu valor máximo de 13,84 g/L após 60 h de cultivo. A curva apresentou comportamento de perfil clássico, com uma fase de adaptação nas primeiras 12 h, multiplicação exponencial na faixa de 12 a 60 h e fase estacionária após as 84 h.

O pH apresentou-se em declínio até as 48 h, comportamento este que pode ser atribuído à liberação de ácido galacturônico no meio pela ação das enzimas pectinolíticas (UENOJO e PASTORE, 2007) produzidas pelo fungo. Após este período, o pH volta aumentar principalmente pelo consumo da fonte de nitrogênio disponível no meio.

Nas primeiras 48 h, 42,37% do carbono disponível foi consumido, enquanto que para o nitrogênio, um total de 64,73% foi utilizado, linearizando seu consumo no decorrer das 96 h de fermentação.

A produção de exo-PG por *P. brasilianum* é escassa na literatura. Comparando aos resultados encontrados na literatura para produção de exo-PG por diferentes tipos de microrganismos, pode-se observar que as atividades pectinolíticas foram semelhantes. Silva et al. (2016) obtiveram 1,77 U/mL de PG por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 em fermentação submersa utilizando o substrato farinha da casca do maracujá. Soares et al. (2001), por meio de fermentação em estado sólido de farelo de trigo do *Bacillus* sp., atingiram cerca de 2,0 U/mL de PG.

Tari et al. (2008), relatam que a maior produção de poligalacturonase encontra-se entre os valores de pH entre 3,5 e 5,5, dependendo da fonte microbiana.

5.2 IMOBILIZAÇÃO DE *P. brasilianum* POR CONTATO EM ESPUMA DE POLIURETANO

A Tabela 5 apresenta os resultados de bioprodução de exo-PG e difusão celular para os diferentes pré-tratamentos, onde observa-se que o pré-tratamento “PD + PDA” (cubos adicionados em caldo PD, deixados imersos por 1 minuto e depois adicionados em meio PDA com esporos do *P. brasilianum*) apresentou maior atividade de Exo-PG, diferindo estatisticamente dos demais pré-tratamentos. Esse procedimento de imersão das espumas de poliuretano em caldo PD e posterior incubação em meio PDA com os esporos possibilitou a oferta de uma fonte de nutrientes, o que torna o suporte mais atraente para o fungo, melhorando sua impregnação no mesmo.

Em relação ao desprendimento de biomassa, não houve diferença significativa entre as amostras, demonstrando que o fungo imobilizou-se de forma eficiente ao suporte em todas as condições de pré-tratamento.

Tabela 5: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de *P. brasilianum* imobilizado por contato com diferentes tipos de pré-tratamentos em 48 h de produção.

Pré-tratamento	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
Tween	1,63 ± 0,01 ^b	1,04 ± 0,75 ^a
PD + PDA	1,78 ± 0,03 ^a	1,30 ± 0,26 ^a
PD	1,69 ± 0,03 ^b	1,53 ± 0,45 ^a
PDA	1,68 ± 0,06 ^b	1,35 ± 0,35 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

A imobilização do *P. brasilianum* para produção de exo-PG não é reportada na literatura. Autores que imobilizaram diferentes microrganismos por contato em espuma de poliuretano, comumente utilizam meio de cultura líquido com o inóculo. Wan-Mohtar et al. (2016) imobilizaram *Ganoderma lucidum* BCCM 31549 para produção de exopolissacarídeo (EPS) em PU cortado em cubos de 5 mm³, utilizando concentrações variadas de inóculo em diferentes níveis de solução de glicose. Soares (2012), ao avaliar a imobilização de células íntegras em espumas de poliuretano e aplicação na síntese de biodiesel, incubou uma concentração de esporos de 5x10⁶ esporos/mL, suspensos em água destilada juntamente com as espumas cortadas em cubos de 6 mm de aresta, por 72 h a 30°C com agitação de 170 rpm.

A partir da melhor condição de pré-tratamento para a produção de exo-PG, quantidades variadas de espumas de poliuretano, contendo o *P. Brasilianum*, e meio reacional foram incubados a 30 °C e 180 rpm por 48 h. A Tabela 6 apresenta a produção de exo-PG e difusão de biomassa a partir de quantidades de cubos e meio reacional variados.

Os experimentos utilizando a relação de 1 cubo em 21 mL de meio reacional e 3 cubos em 63 mL de meio reacional, apresentaram maiores atividades de exo-PG, não diferindo significativamente entre si. A proporção de 1 cubo x 21 mL de meio apresentou atividade significativamente igual as demais condições de fermentações, enquanto que a relação 3 cubos para 63 mL de meio diferiu das demais, o que indica que a melhor condição para produção de exo-PG seja de 3 cubos para 63 mL de meio reacional.

Tabela 6: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de *P. brasilianum* imobilizado por contato com diferentes quantidades de cubos e meio reacional.

Quantidade de cubos (unidade)	Quantidade de meio reacional (mL)	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
1	9	1,78 ± 0,03 ^b	1,46 ± 0,01 ^a
1	15	1,72 ± 0,02 ^b	1,54 ± 0,24 ^a
1	21	1,94 ± 0,07 ^{ab}	1,61 ± 0,04 ^a
3	27	1,71 ± 0,05 ^b	1,65 ± 0,04 ^a
3	45	1,70 ± 0,11 ^b	1,51 ± 0,22 ^a
3	63	2,03 ± 0,02 ^a	1,55 ± 0,17 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

Ao aumentar o tamanho do Erlenmeyer, é possível que a aeração dentro do frasco tenha sido aumentada, o que melhorou as condições para a bioprodução da exo-PG, justificando os melhores resultados na proporção. A difusão da biomassa não diferiu entre as condições.

Para avaliar o tempo necessário para que fungo obtenha máxima impregnação no suporte de poliuretano, as espumas banhadas em caldo PD por 1 minuto e depois adicionadas em meio PDA com os esporos do *P. brasilianum* foram deixadas durante 5, 7 e 9 dias em estufa na temperatura de 30°C. Após, foram avaliadas na proporção de 3 cubos em 63 mL meio reacional por 48 horas a 30°C e 180 rpm. Foi realizada análise estatística da produção de exo-PG e difusão de biomassa, cujos resultados podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Produção de exo-PG e difusão de biomassa de *P. brasilianum* imobilizado por contato (PD+PDA) com variação de dias para impregnação do microrganismo no suporte de poliuretano em 48 h de produção.

Tempo (dias)	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
5	1,90 ± 0,07 ^a	1,48 ± 0,24 ^a
7	1,89 ± 0,05 ^a	1,32 ± 0,32 ^a
9	1,93 ± 0,13 ^a	1,41 ± 0,35 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

Verifica-se que não há diferença significativa entre os tempos de impregnação do microrganismo no suporte, tanto para a produção de exo-PG quanto para a difusão de biomassa. Sendo assim, o menor tempo foi considerado o ideal para maior obtenção de atividades de exo-PG.

A imobilização de células apresenta como uma de suas vantagens o controle do crescimento de biomassa, que minimiza etapas posteriores como a centrifugação (BATISTA, 2005). Na imobilização por contato em espuma de PU, é necessário realizar lavagens na espuma antes de utilizá-la na fermentação, assim, células que não estão impregnadas ao suporte desprendem-se, evitando altos valores de biomassa difundidos no meio. Para tanto, realizou-se três tipos de lavagens nas espumas contendo células imobilizadas de *P. brasilianum*. Na Tabela 8 encontram-se os resultados de biomassa e atividade de exo-PG obtidos após fermentação das espumas lavadas.

Tabela 8: Influência do tipo de lavagem nas espumas de poliuretano com *P. brasilianum* imobilizado por contato para desprendimento de células não fixadas ao suporte.

Tipo de lavagem	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
Pisseta	1,90 ± 0,04 ^a	1,56 ± 0,03 ^a
Vórtex	1,91 ± 0,09 ^a	1,51 ± 0,14 ^a
Shaker	1,90 ± 0,05 ^a	1,58 ± 0,08 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

Não houve diferença significativa para os valores de biomassa e atividade de exo-PG. Os valores de biomassa são inferiores quando comparados com a produção com células livres (10,6 g/L em 48 h de produção), mostrando que a imobilização é eficiente para reduzir a biomassa difundida no meio.

Considerando as condições de pré-tratamento “PD + PDA”, tempo de impregnação do fungo na espuma de 5 dias, relação de 3 espumas em 63 mL de meio reacional para fermentação e lavagem das espumas para desprendimento de células com auxílio de pisseta, como ideias para a produção de exo-PG por *P. brasilianum* imobilizado por contato, avaliou-se a influência de diferentes velocidades de agitação durante a bioprodução de exo-PG com o fungo imobilizado. As velocidades foram de 0, 90 e 180 rpm, na temperatura de 30°C durante 48 h.

Tabela 9: Influência de diferentes velocidades de agitação na produção de exo-PG de *P. brasilianum* imobilizado por contato após 48 h de produção.

Agitação	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
0 rpm	0,95 ± 0,03 ^c	1,01 ± 0,01 ^b
90 rpm	1,14 ± 0,07 ^b	1,21 ± 0,14 ^a
180 rpm	2,03 ± 0,03 ^a	1,19 ± 0,54 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

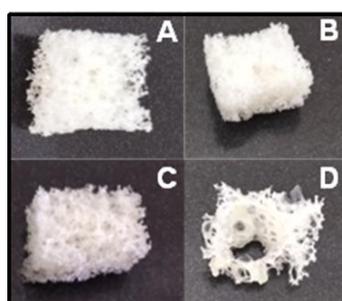
A velocidade de agitação de 180 rpm apresentou maior atividade de exo-PG, diferindo significativamente das demais velocidades. Tal resultado é atribuído a maior aeração proporcionada durante a agitação, bem como pelo maior contato que o microrganismo tem ao substrato.

A velocidade de agitação influenciou diretamente no desprendimento de biomassa, sendo que na velocidade 0 rpm (sem agitação) houve menor desprendimento, diferindo significativamente das demais.

5.3 IMOBILIZAÇÃO DE *P. brasilianum* IN SITU EM ESPUMA DE POLIURETANO PARA BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG

Na Figura 7 é possível observar o poliuretano controle (sem microrganismo) e o poliuretano contendo células imobilizadas de *P. brasilianum* nas concentrações de esporos 5×10^4 , 5×10^6 e 5×10^8 esporos/mL. A adição de células não provocou alteração na estrutura do poliuretano nas concentrações 5×10^4 e 5×10^6 esporos/mL. Na concentração 5×10^8 esporos/mL, a espuma apresentou aspecto quebradiço, além de poros grandes e desuniformes.

Figura 7: Poliuretano controle (A) e poliuretano contendo esporos imobilizados de *P. brasilianum* nas concentrações 10^4 (B), 10^6 (C) e 10^8 (D) esporos/mL.



Fonte: a autora.

A alteração visualizada na espuma de poliuretano contendo células na concentração 5×10^8 esporos/mL está relacionada com a velocidade da reação de polimerização. Observou-se que com o aumento da concentração de células, a reação ocorre mais rapidamente fazendo com que a espuma forme bolhas maiores e desuniformes, o que influencia diretamente a produção da exo-PG.

Com relação à concentração de esporos, observou-se a maior bioprodução de exo-PG na concentração 5×10^6 esporos/mL, na Tabela 10 é possível observar que essa concentração diferiu significativamente das demais.

Tabela 10: Atividade de exo-PG (U/mL) e valores de biomassa (g/L) obtidos em diferentes concentrações de esporos de *P. brasilianum* após 48 h de produção.

Concentração de esporos/mL	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
5×10^4	$1,68 \pm 0,05^b$	$1,19 \pm 0,09^{ab}$
5×10^6	$2,01 \pm 0,01^a$	$1,12 \pm 0,11^b$
5×10^8	$1,66 \pm 0,12^b$	$1,49 \pm 0,06^a$

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

As concentrações de esporos de 5×10^4 e 5×10^8 esporos/mL apresentaram resultados significativamente iguais. As espumas com a concentração de 5×10^8 esporos/mL apresentaram aspecto quebradiço e poros grandes e desuniformes, o que pode ter influenciado no baixo resultado de exo-PG, uma vez que, ao formar a espuma, ocorria uma reação de aquecimento bastante rápida o que possivelmente resultou na morte de esporos.

A Tabela 11 mostra os valores de atividade da exo-PG e biomassa obtidos na fermentação do *P. brasilianum* imobilizado *in situ* com uma concentração de 5×10^6 esporos/mL em diferentes frações do poliuretano.

Tabela 11: Atividade de exo-PG e valores de biomassa obtidos das diferentes frações do poliuretano com *P. brasilianum* imobilizado, após 48 h de produção.

Fração	Atividade Exo-PG (U/mL)			Biomassa (g/L)		
	A	B	C	A	B	C
1	$1,97 \pm 0,05^{Aa}$	$1,95 \pm 0,18^{Aa}$	$2,00 \pm 0,21^{Aa}$	$1,16 \pm 0,07^{Aa}$	$1,22 \pm 0,21^{Aa}$	$1,18 \pm 0,18^{Aa}$
2	$1,94 \pm 0,11^{Aa}$	$1,96 \pm 0,07^{Aa}$	$1,98 \pm 0,10^{Aa}$	$1,17 \pm 0,06^{Aa}$	$1,23 \pm 0,16^{Aa}$	$1,20 \pm 0,03^{Aa}$
3	$1,94 \pm 0,09^{Aa}$	$1,97 \pm 0,14^{Aa}$	$1,96 \pm 0,17^{Aa}$	$1,21 \pm 0,16^{Aa}$	$1,19 \pm 0,32^{Aa}$	$1,22 \pm 0,02^{Aa}$
4	$2,01 \pm 0,32^{Aa}$	$1,98 \pm 0,21^{Aa}$	$1,95 \pm 0,04^{Aa}$	$1,18 \pm 0,09^{Aa}$	$1,24 \pm 0,12^{Aa}$	$1,21 \pm 0,11^{Aa}$

Médias seguidas de mesma letra maiúsculas na coluna e minúsculas na linha para cada variável, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa para atividade de exo-PG, bem como de biomassa nas diferentes frações do poliuretano. Assim, a distribuição do microrganismo no poliuretano se deu de forma homogênea, possibilitando o uso de todas as frações para fermentação com o imobilizado. Comportamento semelhante foi observado por Bustamante-Vargas (2017) que, ao avaliar a distribuição da pectinase comercial (Rohapect® DA6L) de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma rígida de poliuretano, não verificou diferença entre cortes longitudinais (1, 2, 3, 4), porém ao avaliar os cortes transversais verificou que o segmento inferior apresentou maior atividade pectinolítica, sugerindo que a pectinase tenha maior densidade que o material utilizado para a síntese da espuma, depositando-se no fundo do copo.

A Tabela 12 apresenta os valores de atividade de exo-PG e biomassa produzidas pelo fungo imobilizado *in situ*, utilizando três velocidades de agitação durante a bioprodução (0, 90 e 180 rpm, na temperatura de 30°C durante 48 h.

Tabela 12: Atividade de exo-PG e biomassa obtidos em diferentes velocidades de agitação durante a produção de exo-PG por *P. brasilianum* imobilizado *in situ* após 48 h de produção.

Agitação	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
0 rpm	0,91 ± 0,04 ^c	0,90 ± 0,09 ^a
90 rpm	1,13 ± 0,02 ^b	1,12 ± 0,11 ^a
180 rpm	2,01 ± 0,01 ^a	1,12 ± 0,11 ^a

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

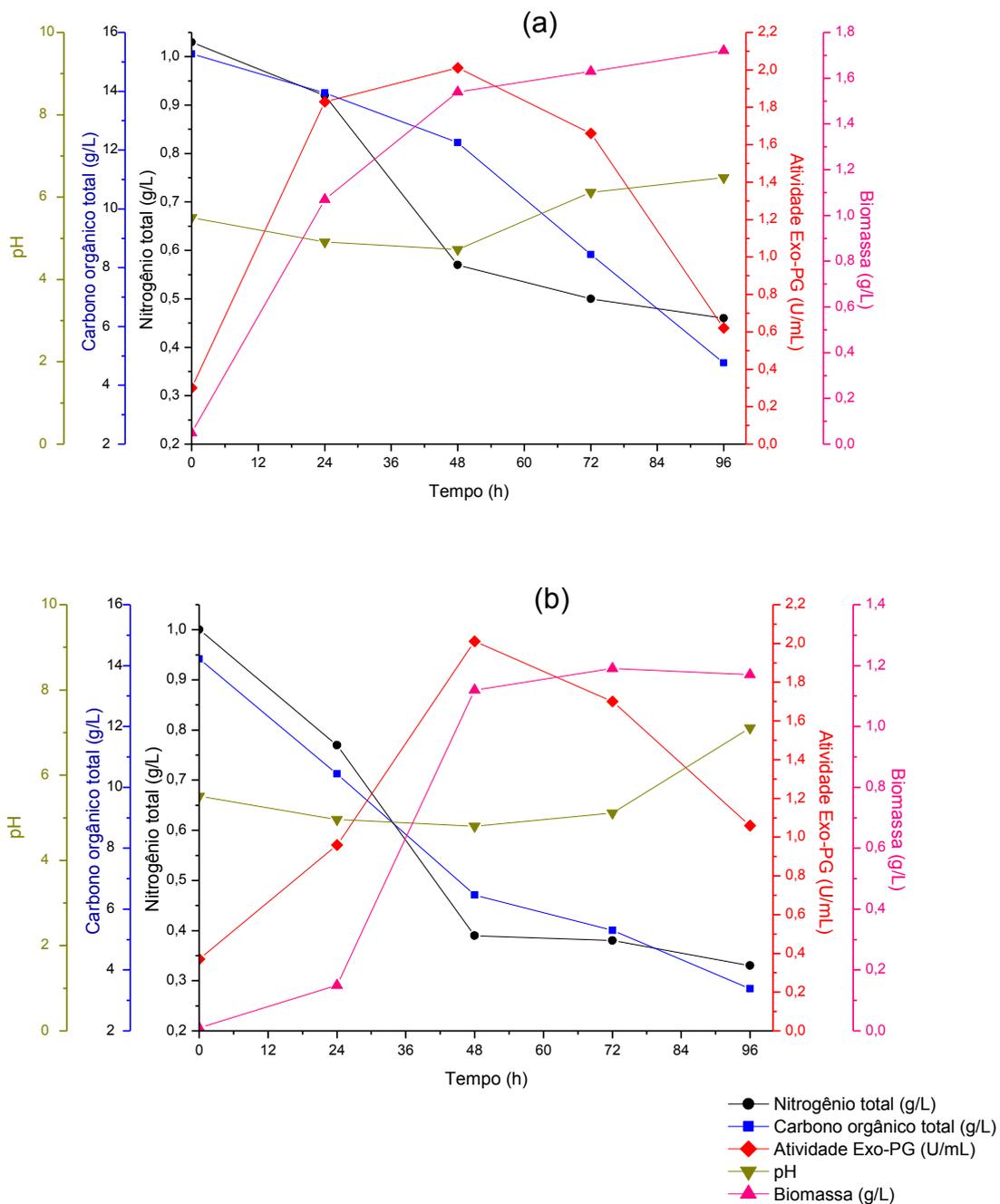
Bem como no estudo realizado com o fungo imobilizado por contato, a agitação de 180 rpm apresentou melhor influencia na produção de exo-PG, além disso, o desprendimento de biomassa não diferiu significativamente na velocidade 0 rpm, ou seja, sem agitação, demonstrando que com a imobilização *in situ* se obtêm uma menor difusão de biomassa para o meio.

5.4 CINÉTICA DE BIOPRODUÇÃO DE EXO-PG COM *P. brasilianum* IMOBILIZADO

A cinética de produção foi realizada a partir da bioprodução de exo-PG nas condições que apresentaram melhores resultados para o microrganismo imobilizado por contato e *in situ* na espuma de poliuretano e podem ser observados na Figura 8.

A produção máxima de exo-PG foi atingida em 48 h para ambos os métodos de imobilização. Tanto a técnica *in situ*, quanto por contato possibilitaram uma atividade máxima de 2,01 U/mL, valor superior ao encontrado para a produção pelo microrganismo livre (1,71 U/mL), como apresentado na Tabela 13. Esse aumento na produção da exo-PG pelo microrganismo imobilizado possivelmente ocorre devido à elevada concentração de células que a imobilização proporciona, bem como às características favoráveis do poliuretano como um suporte, como suas propriedades mecânicas, porosidade e grande área exposta.

Figura 8: Produção de exopoligalacturonase de *P. brasilianum* imobilizado por contato (a) e *in situ* (b).



O pH apresentou o mesmo comportamento do fungo livre, com queda até as 48 h devido a liberação de ácido galacturônico e posterior aumento devido ao consumo da fonte de nitrogênio disponível no meio.

Em relação ao consumo de substrato (Figura 8), observa-se que o carbono orgânico total, apresentou decréscimo progressivo até o final das 96 h de bioprodução, tanto para o microrganismo imobilizado por contato (consumo de 68,8%), quanto *in situ* (consumo de 76,2%), comportamento similar ao *P. brasilianum* livre. Em 48 h, quando ocorre a máxima produção de exo-PG, o consumo de carbono chega a 54,6% para o imobilizado *in situ* e 40,08% para o imobilizado por contato. O consumo de nitrogênio total para o imobilizado por contato e imobilizado *in situ* atingiu consumo de 44,7% e 61% (respectivamente) após 48 h de fermentação.

Efeitos positivos na imobilização de microrganismos também foram visualizados por Mesquita (2018), que ao imobilizar *Xanthomonas campestris* com síntese simultânea de poliuretano (imobilização *in situ*), obteve um aumento de 274% na produção de goma xantana. Wan-Mohtar et al. (2016), na imobilização por contato de *Ganoderma lucidum* em poliuretano visando produção de exopolissacarídeos, obtiveram elevada produção principalmente pela redução das limitações de transferência de massa, que possibilitaram maior acesso ao substrato por parte das células. Nie et al. (2016) imobilizaram *Pseudomonas aeruginosa* NY3 em poliuretano, obtendo altos índices de remoção de hidrocarbonetos de efluente com alta concentração de óleo

Na Tabela 13, nota-se que a produção de exo-PG pelo microrganismo imobilizado por contato não diferiu significativamente do microrganismo imobilizado *in situ*.

Tabela 13: Produção de exo-PG e difusão de biomassa a partir do *P. brasilianum* livre e imobilizado por contato e *in situ*.

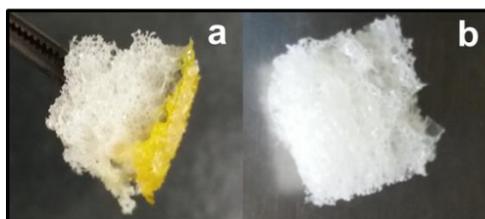
Microrganismo	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
Livre	1,71 ± 0,02 ^b	10,60 ± 0,23 ^a
Imobilizado <i>in situ</i>	2,01 ± 0,01 ^a	1,12 ± 0,11 ^c
Imobilizado por contato	2,01 ± 0,03 ^a	1,54 ± 0,19 ^b

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

Para difusão de biomassa, o imobilizado *in situ* foi o que apresentou menor quantidade difundida, diferindo estatisticamente do imobilizado por contato e do microrganismo livre. Pode-se atribuir este comportamento a técnica de imobilização utilizada, uma vez que, o imobilizado por contato apresenta células visíveis aderidas as superfícies enquanto que o imobilizado *in situ* não (Figura 9), sendo que estas podem mais facilmente se soltar para o meio.

O sucesso na imobilização de células em poliuretano é atribuído às suas excelentes características como suporte, principalmente pelas propriedades mecânicas, porosidade, resistência a solventes orgânicos e grande área exposta (NIE et al., 2016).

Figura 9: Aspectos dos cubos de poliuretano com *P. brasilianum* imobilizado por contato (a) e *in situ* (b).



Fonte: a autora

Assim, a bioprodução da pectinase pelo *P. brasilianum* imobilizado confere resultados superiores à produção pelo microrganismo livre, destacando a redução de biomassa produzida pelo fungo imobilizado em comparação com o fungo na sua forma livre.

5.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DA ATIVIDADE DE EXO-PG

A partir dos resultados obtidos da bioprodução do *P. brasilianum* livre e imobilizado por contato e *in situ*, foram calculados os parâmetros cinéticos do processo, apresentados na Tabela 14.

A formação do produto (rp) foi a mesma para o microrganismo livre e imobilizado por ambas as técnicas.

Tabela 14: Parâmetros cinéticos do processo de bioprodução de *P. brasilianum* livre e imobilizado.

Microrganismo	rx (g.L⁻¹.h⁻¹)	rs (g.L⁻¹.h⁻¹)	rp (g.L⁻¹.h⁻¹)	Y_{X/S}	Y_{P/S}
Livre	0,22	0,11	0,04	2,07	0,33
Imobilizado <i>in situ</i>	0,02	0,16	0,04	0,15	0,24
Imobilizado contato	0,03	0,06	0,04	0,49	0,57

A velocidade de crescimento microbiano (rx) de *P. brasilianum* livre é dez vezes maior que a velocidade de crescimento das células imobilizadas. Mesquita (2018) verificou o mesmo comportamento na imobilização de *X. campestris* pressupondo que a imobilização reduz a duplicação celular ou esta passa a ocorrer mais lentamente, possivelmente devida à restrição física do suporte. A velocidade de

O fator de conversão de substrato em produto (Y_{P/S}) teve maior valor para a produção pelo fungo imobilizado por contato e menor valor para o imobilizado *in situ*, enquanto que para velocidade de consumo de substrato o imobilizado por contato apresentou menor valor e o *in situ* apresentou maior valor.

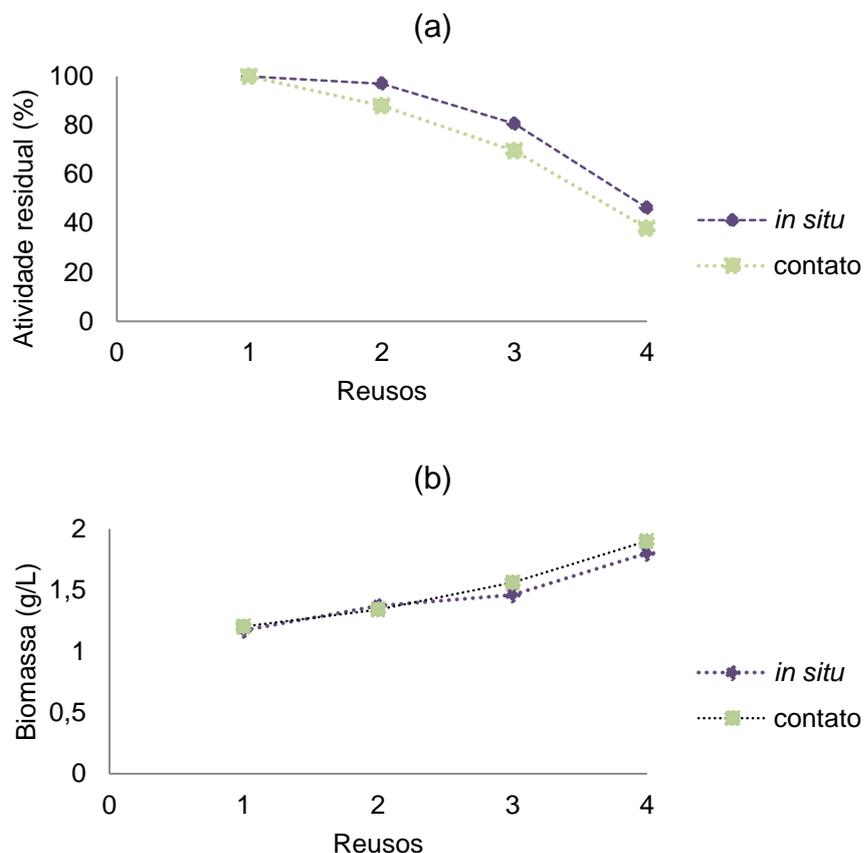
O fator de conversão em biomassa (Y_{X/S}) diminui com a imobilização, o que sugere que a imobilização altere o metabolismo celular em relação ao crescimento das células. A imobilização, principalmente em matrizes porosas, faz com que o acesso ao substrato seja facilitado (MESQUITA, 2018).

5.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL

Na Figura 10 estão os resultados de bioprodução de exo-PG pelo fungo imobilizado por contato e *in situ* e a difusão de biomassa do poliuretano para o meio após reciclos contínuos até obtenção de rendimento menor que 50% do inicial.

Observa-se que a atividade exo-PG produzida pelo microrganismo diminui para valores inferiores a 50% de sua produção inicial após 4 reciclos de bioprodução. Os valores de biomassa aumentam a cada reciclo, possivelmente porque parte das células oriundas da reprodução não ficam aderidas à matriz (MESQUITA, 2018).

Figura 10: Comportamento do *P. brasilianum* imobilizado *in situ* e por contato em poliuretano submetido a reusos sucessivos para produção de exo-PG (a) e biomassa (b).

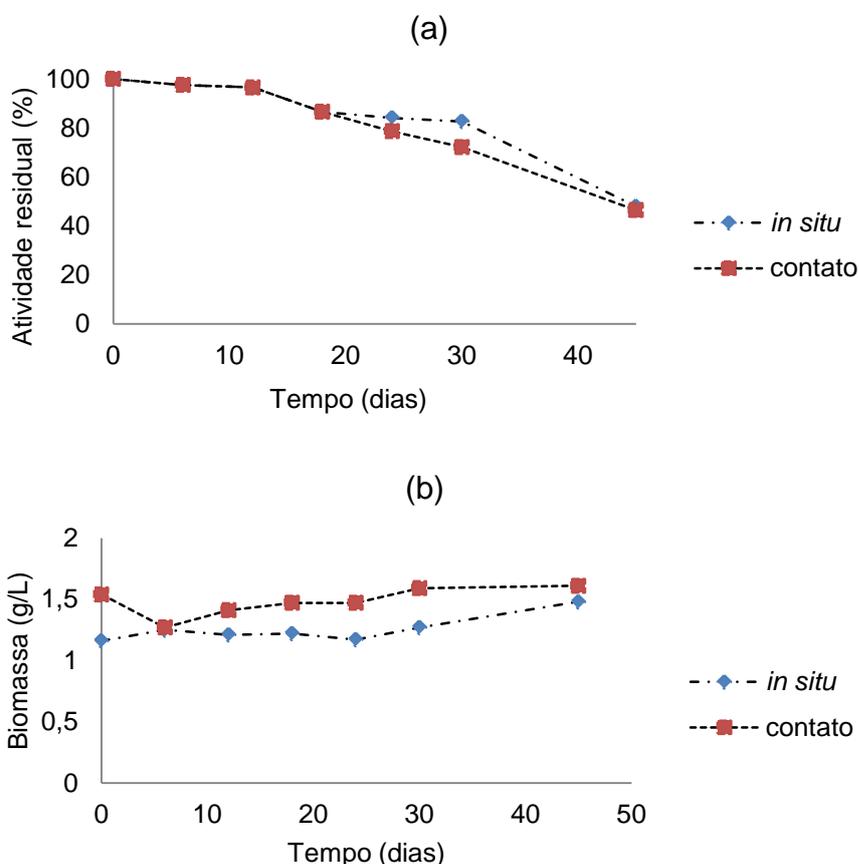


As constantes fermentações demonstram que, conforme se desenvolvem os ciclos, a capacidade do microrganismo de produzir a enzima exo-PG é reduzida e a concentração de células livres aumenta.

5.7 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

A estabilidade de armazenamento é um fator essencial para aplicações práticas de células imobilizadas. A viabilidade do microrganismo imobilizado por contato e *in situ* foi analisada durante o armazenamento em geladeira (4°C) por 45 dias. Ao longo do período de armazenamento, os cubos de poliuretano foram submetidos a bioprodução de exo-PG até 48 h e avaliados quanto à produção de exo-PG e de biomassa difundida dos cubos para o meio. Na Figura 11 encontram-se os resultados de atividade residual de exo-PG até 45 dias de armazenamento do microrganismo imobilizado *in situ* e por contato.

Figura 11: Estabilidade de estocagem do *P. brasilianum* imobilizado *in situ* e por contato armazenado em geladeira durante de 45 dias.



Após 30 dias de armazenamento em geladeira, o imobilizado *in situ* teve redução de 19,4% de sua capacidade produtiva e o imobilizado por contato 30,4% (Figura 11). A redução gradativa da capacidade produtiva observada nos imobilizados está relacionada ao aumento de células liberadas (biomassa) para o meio de produção (Figura 11b), que, ao passar do tempo, tornam-se fracamente aderidas ao suporte. Além disso, como mencionado anteriormente, o imobilizado por contato apresenta células visíveis aderidas em sua superfície, que no decorrer do armazenamento facilmente se soltam para o meio. Essa redução também foi observada por Mesquita (2018), que ao armazenar células de *X. campestris* imobilizadas *in situ* em espuma poliuretano durante 30 dias em geladeira (4°C) notou uma redução de 20,5% de sua capacidade de produzir goma xantana. Decorridos 45 dias de armazenamento em geladeira, foi visualizado uma redução de 53,7% para o imobilizado *in situ* e 55,2% para o imobilizado por contato. Demonstrando que o armazenamento do fungo imobilizado é viável para produção

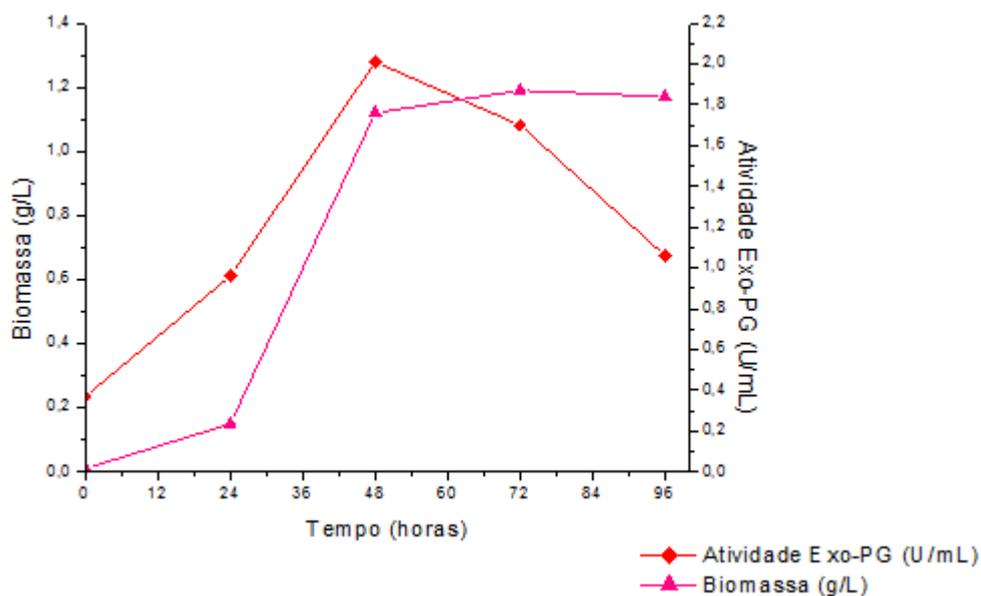
de exo-PG até 30 dias em geladeira, após este período, o mesmo perde mais de 50% de sua capacidade produtiva. O comportamento de produção para ambas as técnicas ocorre de maneira similar ao longo do período de armazenamento.

5.8 PRODUÇÃO DE EXO-PG COM *P. brasilianum* IMOBILIZADO POR CONTATO EM ESPONJA MULTIUSO COMERCIAL

A fim de avaliar a utilização de suportes alternativos, realizou-se a imobilização do *P. brasilianum* em esponja multiuso comercial usada, composta por poliuretano.

Na Figura 12 estão apresentados os resultados da atividade de exo-PG e difusão de biomassa a partir do fungo imobilizado em suporte alternativo ao longo de 96 h, sob condições de cultivo de 30°C e 180 rpm.

Figura 12: Produção de exopoligalacturonase de *P. brasilianum* imobilizado em esponja multiuso comercial usada.



Em 48 h de produção, ocorreu a maior atividade de exo-PG (1,85 U/mL), valor superior ao encontrado pela produção do microrganismo livre. Esse resultado sugere que a esponja comercial pode ser considerada com um suporte alternativo para imobilização celular, permitindo o reaproveitamento de materiais e possibilitando uma matriz de baixo custo.

Os resultados encontrados ao longo das 96 h de fermentação podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15: Atividade de Exo-PG e biomassa obtidos por *P. brasilianum* imobilizado por contato em esponja multiuso comercial durante 96 h de bioprodução.

Tempo (horas)	Atividade exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
0	0,26 ± 0,36	0,02 ± 0,01
24	1,28 ± 0,17	1,03 ± 0,01
48	1,85 ± 0,05	1,43 ± 0,10
72	1,28 ± 0,05	1,45 ± 0,21
96	0,68 ± 0,08	1,49 ± 0,12

Alguns autores relatam a utilização de suportes alternativos e de baixo custo para a imobilização de microrganismos. Ejaz, Ahmed e Sohaial (2018) imobilizaram *Geotrichum candidum* AA15 em sabugo de milho para a produção de pectinases, obtendo quantidades de pectinases muito maiores do que obtido das células livres. Kurade et al. (2019) utilizaram esponja de aço inoxidável, entre outras matrizes, para imobilizar a bactéria *Brevibacillus laterosporus* e a levedura *Galactomyces geotrichum* a fim de investigar a descoloração de um corante modelo em efluente da indústria têxtil. Seus resultados demonstraram o suporte como uma ferramenta eficaz para aplicação potencial na remoção de corantes têxteis com 90% de eficiência de descoloração.

Ao comparar a capacidade do *P. brasilianum* imobilizado por contato em esponja multiuso comercial em produzir exo-PG, nota-se que seus resultados foram superiores ao microrganismo livre nas 48 h de produção, diferindo significativamente ao nível de 5% (Tabela 16).

Tabela 16: Atividade de exo-PG e difusão de biomassa a partir do *P. brasilianum* livre e em diferentes tipos de imobilizações em 48 h de bioprodução.

Microrganismo	Atividade Exo-PG (U/mL)	Biomassa (g/L)
Livre	1,70 ± 0,02 ^c	10,63 ± 0,23 ^a
<i>In situ</i> – PU	2,01 ± 0,01 ^a	1,12 ± 0,11 ^d
Contato – PU	2,01 ± 0,03 ^a	2,04 ± 0,19 ^b
Contato - esponja multiuso comercial	1,85 ± 0,05 ^b	1,43 ± 0,10 ^c

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 5% na coluna.

Em relação aos outros tipos de imobilização, houve produção significativamente menor, o que sugere que mais estudos devem ser realizados para obtenção de uma produção maior da pectinase.

De modo geral, a imobilização de células constitui uma técnica útil e promissora para aumentar a produção de metabólitos microbianos.

6 CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a imobilização de *P. brasilianum* para a produção de Exo-PG é efetiva, uma vez que se constatou maior produção de exo-PG comparado com o microrganismo livre (1,71 U/mL em 48 h), tanto para a imobilização por contato (2,01 U/mL em 48 h), quanto para a imobilização *in situ* (2,01 U/mL em 48 h).

Ao comparar os parâmetros de avaliação da imobilização por contato e imobilização *in situ*, a técnica *in situ* apresentou menor quantidade de biomassa difundida para o meio. A imobilização por contato apresentou uma difusão de biomassa para o meio 85% menor que o microrganismo livre, enquanto que o imobilizado *in situ*, apresentou uma redução de 90%.

A estabilidade operacional das células imobilizadas foi analisada através da sua capacidade de reuso até se obter uma redução de 50% na capacidade do *P. Brasilianum* de produzir exo-PG, quando comparado com o valor inicial. Foi possível a realização de quatro ciclos contínuos.

Os imobilizados mostraram baixa redução de sua capacidade produtiva após 30 dias de armazenamento em geladeira, com 19,4% redução da atividade pectinolítica para o imobilizado *in situ* e 30,4% para o imobilizado por contato. Após 45 dias de armazenamento, foi visualizada uma redução de 53,7% para o imobilizado *in situ* e 55,2% para o imobilizado por contato.

A esponja comercial pode ser considerada com um suporte alternativo para imobilização celular, permitindo o reaproveitamento de materiais e possibilitando uma matriz de baixo custo, uma vez que ao imobilizar o *P. brasilianum*, obteve-se uma atividade de 1,85 U/mL, valor superior ao encontrado pela produção do microrganismo livre.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados alcançados, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- ✓ Modelagem matemática dos dados de cinética;
- ✓ Caracterização do poliuretano;
- ✓ Uso de fontes alternativas de carbono, tais como resíduos industriais;
- ✓ Imobilização em poliuretanos de diferentes densidades;
- ✓ Produzir outros tipos de pectinases com o *P. brasilianum* imobilizado;
- ✓ Realizar mais estudos para imobilização em suporte de esponja comercial, a fim de melhorar a produção de metabólitos;
- ✓ Imobilizar diferentes tipos de microrganismos em suporte de esponja comercial usado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRO, F. Yeasts: an attractive source of pectinases - from gene expression to potential applications: a review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1525–1537, 2011.

ALMEIDA, C.; BRÁNYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 513-518, 2003.

ANDRADE, M. et al. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor, **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 204-208, 2011.

ANTUNES, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CALB) in situ em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2015.

AMIN, F; BHATTI, H. N.; BILAL M.; ASGHER, M. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exopolygalacturonase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 974-984, 2017a.

AMIN, F; BHATTI, H. N.; BILAL M.; ASGHER, M. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exopolygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification, **International Journal Food Engineering**, v. 13, 2017b.

AMIN, F; BHATTI, H. N.; BILAL M.; ASGHER, M. Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exopolygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, p. 426–443, 2017.

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.

BARMAN S., SIT, N.; BADWAIK, L. S.; DEKA, S. C. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. **Journal of Food Science na Technology**, v. 52, p. 3579-3589, 2015.

BHASARKAR, J. B.; DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Ultrasound assisted biodesulfurization of liquid fuel using free and immobilized cells of *Rhodococcus*

rhodochrous MTCC 3552: A mechanistic investigation. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 369–378, 2015.

BORSZCZ, V. **Produção de pectinases por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em cultivo estado sólido e aplicação na remoção de biofilmes microbianos**. Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2015.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; DE OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35–43, 2015.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, A. J. B. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.36, n.6, p.48-57. 2006.

CANTERI, M. H. G.; WOSIACKI, L. M. G; SCHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CARVALHO, E. A. **Caracterização de pectinases obtidas a partir dos resíduos industriais da polpa do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A; dos SANTOS, J.C.; de AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CORTEZ, D. V.; CASTRO H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, N. 1, p. 85-96, 2017.

COVIZZI, L. G.; GIESSE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, p. 143-160, 2007.

BIZ, A. **Produção de pectinases por fermentação no estado sólido para a obtenção de ácido D-galacturônico em biorrefinarias**. 2012. Dissertação (Mestrado Ciências Bioquímicas) - Universidade Federal de Paraná, Brasil, 2012.

DALLAGO, R.M.; SANTIN, C.M.T.; SCHERER, R.O.; NYARI, N.L.D.; DALLA ROSA, C.; de OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Batch esterification of fatty acids charges under ultrasound irradiation using *Candida antarctica* B immobilized in polyurethane foam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 90-94, 2014.

DÌAZ, A. B.; ALVARADO, O.; ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorization of grape pomace and orange peels: improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. **Food and bioproducts processing**, v. 91, n. 4, p. 580-586, 2013.

DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 948–957, 2016.

EJAZ, U.; AHMED, A.; SOHAIL, M. Statistical optimization of immobilization of yeast cells on corncob for pectinase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 450-456, 2018.

ELIZEI, Virginia G. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas**. 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ELIZEI, V. G.; CHALFOUN, S. M.; BOTELHO, D. M. S.; REBELLES, P. P. R. Imobilização de fungos filamentosos com potencial para uso agroindustrial. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 165-172, 2014.

EL-SHEEKH, M. M.; ISMAIL, A.-m.S.; EL-ABD, M. A.; HEGAZY, E. M.; EL-DIWANY, A. I. Effective technological pectinases by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the Egyptian Orange juice industry scraps, **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. v12–18, 2009.

FACIN, B. R. **Imobilização de lipase em suporte polimérico e aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

FENG, K. C.; ROU, T. M.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M.; CHANG, Y. N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 1, p. 22-25, 2003.

GIESE, E. C. Biocatalisadores imobilizados: prospecção de inovações tecnológicas na última década. **Innovation, Technology and Management Journal**, v. 5, p. 2296–2307, 2015. S.N.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-A review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987-996, 2003.

JACOB, N. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**, Part IV: Enzymes Degrading Agro-industrial Residues and Their Production, Chapter 21: Pectinolytic Enzymes, Springer, India, p. 383–396, 2009.

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931–2944, 2005.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase-A Critical Review. **Biotechnology**, v. 28, p. 253-264, 2008.

KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. **Protein Expression and Purification**, v. 87, p. 11-16, 2013.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, R.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1089–1118, 2011.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 437-447, 2009.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 377–97, 2004.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review). **Prikl. Biokhim. Microbiology**, v. 49, p. 5–16, 2013

KURADE, M. B.; WAGHMODE T. R.; XIONGA, J-Q.; GOVINDWARA, S. P.; JEON, B-H. Decolorization of textile industry effluent using immobilized consortium cells in upflow fixed bed reactor, **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 884-891, 2019.

KWON, O. E.; RHO, M. C.; SONG, H. Y.; LEE, S. W.; CHUNG, M. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. Phenylpyropene a and b, new inhibitors of acyl-coa: Cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* f1959. **The Journoul of Antibiotics**, Tokyo, v. 55, p. 1004–1008, 2002.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LARA-MÁRQUEZ, A.; ZAVALA-PÁRAMO, M.G. LÓPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H.C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 859-868, 2011.

LIMA, D. T. **Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone vi and pencolide, metabolites from a brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van beyma. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 38, p. 785–789, 2007.

MALAJOVICH, M. A. Imobilização de células em alginato. **Biotecnologia: ensino e divulgação**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2009.

MARKOVIC, O; JANECEK, S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. **Protein Engineering**, v.14, n. 9, p. 615-631, 2001.

MARTIN. N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid state fermentation using agro-industrial bioproduct, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 813-819, 2004.

MARTÍNEZ, M. **Estudio cinético de la producción secuenciada de pectinasas en *Aspergillus flavipes* FP-500**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência em Bioprocessos) - Instituto Politécnico Nacional – México, México D.F., 2009.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p.831-840, 2011.

MESQUITA, R. A.; **Imobilização de *Xanthomonas campestris* com síntese simultânea de poliuretano para produção de goma xantana**. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2018.

MILESSI, T. S. S. **Imobilização de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta.** 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2012.

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**, n. 98, p. 1260–1264, 2007.

MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H. C.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. Na overview of technologies for immobilization of enzymes and surfasse analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, p. 205-220, 2015.

MORETTI, A.; SARROCCO, S. Fungi. **Encyclopedia of Food and Health**, Kidlington: Oxford p. 162-168, 2015.

MURAD, H.; AZZAZ, H. Microbial pectinases and Rumiant Nutrition. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 246-269, 2011.

NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M. P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M. L. Production and fungitoxic activity of sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, v. 163, p. 295–301, 2007.

NIE, M.; NIE, H.; HE, M.; LIN, Y.; WANG, L.; JIN, P.; ZHANG, S. Y. Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. **Journal of Environmental Management**, v. 173, p. 34–40, 2016.

NIELSEN, J. C.; GRIJSEELS, S.; PRIGENT, S.; JI, B.; DAINAT, J.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; WORKMAN, M.; NIELSEN, J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. **Nature microbiology**, v. 2, n. 6, p. 17044, 2017.

NIGAM, Darshika; ASTHANA, Monika; KUMAR, Avnish. *Penicillium*: A Fungus in the Wine and Beer Industries. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.**, p. 187-200, 2017.

NYARI, N. L. D. **Estudo da imobilização de Lipase *Candida antarctica* B em poliuretano.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2013.

NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; DE OLIVEIRA, D.; ZENI, J.; RIGO, E.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52–61, 2016.

OLIVEIRA, F. E. R.; ASMAR, S. A.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. Firmeza de pêssegos 'Diamante' tratados com 1-MCP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 366-368, 2005.

PASHA, K.; ANURADHA, P.; SUBBARAO, D. Applications of Pectinases in Industrial Sector, **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v. 16, n. 1, p. 89-95, 2013.

PATIL, S.R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v.97, p. 2054–2058, 2006.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMORA, E. G. Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **Biotechnology Journal**, v.3, p.9 - 18, 2009.

PEREIRA, Rafael M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. 30 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia na Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

PIETER, J.; VERBELEN, D. P.; SCHUTTER, F. D.; KEVIN, J. V.; FREDDY, R. D. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, vol. 28, p.1515-1525, 2006.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.

RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKAL TSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environment Toxicology Pharmacology**, v. 22, p. 80–84, 2006.

REZENDE, E. F.; COUTO F. A.; SILVA, D. M.; BATISTA, L. R. Atividade pectinolítica de fungos filamentosos isolados de grãos de café. In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. n. 4, 2009, Espírito Santo. Vitória. **Anais...** Núcleo: Agregação de Qualidade ao Produto. Disponível em: <<http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/consorcio/separador2/simpósio->

de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/547-anais-do-vi-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil>. Acesso em 25 mar 2019.

RODRÍGUEZ, O.; SERRAT, M. Poligalacturonasas de levaduras: Un producto biotecnológico de grandes potencialidades, **Tecnología Química**, v. 28, n. 1, p. 80-90, 2008.

ROJAS, N. **Enzimas fúngicas extremófilas de aplicación Biotecnológica: Producción y Caracterización de Ramnosidasas alcalofílicas de *Acremonium murorum* y *Acrostalagmus luteo-albus* y Poligalacturonasa acidofílica de *Aspergillus kawachii***, (Tese de Doutorado) – Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 2009.

ROMASKEVIC, T. et al. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: **A review**, **Chemija**, v. 17, n. 4, p. 74–89, 2006.

ROPARS, J.; DE LA VEGA, R. R.; VILLAVICENCIO, M. L.; BRANCA, A. Diversity and mechanisms of genomic adaptation in penicillium. In ***Aspergillus and Penicillium in the Post-Genomic Era***; DeVRIES, R. G., ANDERSEN, M. R., Eds.; Caister Academic Press: Lyngby, Denmark, p. 27-42, 2016.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. D. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 430-436, 2015.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinase and pectin: commercial application and biotechnological potential. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. Reviews in **Environmental Science and Bio/Technology**, v.60, p.12-45, 2013.

SHUKLA, S. et al. Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* onto glutaraldehyde activated nylon-6 and its application in apple juice clarification. **Acta Alimentaria**, v. 39, n. 3, p. 277–292, 2010.

SIEIRO, C. et al. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry, In: VALDEZ, B. **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes>>

methods-and-equipment/microbial-pectic-enzymes-in-the-food-and-wine-industry>Acesso em: 8 mar. 2019.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859-865, 2005.

SILVA, J. C.; FRANÇA, P. R. L.; MELO, A. H. F.; NEVES-PETERSON, T.; CONVERTI, A.; SOUZA, T. P. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM 4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. **Process Biochemistry**. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318316192>>. Acesso em 16 mar 2018.

SILVA, J. C.; MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. **Produção de poligalacturonase por *Aspergillus aculeatus* URM 4953 em fermentação submersa utilizando planejamento fatorial**. In: ENBEQ, XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza/CE. 2016. Disponível em: <https://proceedings.science/proceedings/44/_papers/38799/download/fulltext_file1>. Acesso em 14 set 2018.

SILVA, M. F.; RIGO, D.; MOSSI, V.; DALLAGO, R. M.; HENRICK, P.; KUHN, G. de O.; ROSA, C. D.; OLIVEIRA, D.; O. V.; TREICHEL, H. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 54-59, 2013.

SINGH, R.; ANSHUMALI, M.; PRAVEERN-KUMAR, M. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 **Biotech**, v. 6, n. 174, p. 1-15, 2016.

SOARES, M. M. C. N.; DA SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus species* and their potential application on juice extraction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 17, 79-82, 2001.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**, Lorena: Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012. 119p. (Dissertação, Mestrado em Ciências), 2012.

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.

SUN, S.; WANG, G.; WANG, P. A cleaner approach for biodegradable lubricants production by enzymatic glycerolysis of castor oil and kinetic analysis. **Journal of Cleaner Production**, n. 188, p. 530–535, 2018.

TARI, C.; DOGAN, N.; GOGUS, N. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 824-829, 2008.

TARI, C.; GÖGUS, N.; TOKATLI, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1108-1116, 2007.

TAPRE, A.; JAIN, R. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry, **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 447-453, 2014.

THYGESEN, A.; THOMSENA, A. B.; SCHMIDTA, A. S.; JØRGENSEN, H.; AHRING B. K.; OLSSON L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. **Enzyme and Microbiology**, Technol, v. 32, 2003.

TRABELSI, Imen et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 84–89, 2014.

UENOJO, M.; PASTORE, Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives; **Química Nova**. v.30, n.2 São Paulo, 2007.

VARGAS, C. E. B. **Imobilização *in situ* da pectinase comercial (Rohaspect® DA6L) de *Aspergillus niger* em espuma rígida de poliuretano e aplicação na clarificação de suco de goiaba**. Tese (Doutorado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2017.

VISAGIE, C.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343–371, 2014.

VOS, P.; FAAS, M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioreactive food components. **International Dairy Journal**. v. 20, p. 292-302, 2010.

WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I.; MALEK, R. A.; HARVEY, L. M.; McNeil, B. Exopolysaccharide production by *Ganoderma lucidum* immobilised on polyurethane foam in a repeated-batch fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 8, p. 24-34, 2016.

WU, J. C. Y.; HUTCHINGS, C. H.; LINDSAY, M. J.; WERNER, C. J.; BUNDY, B. C. Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization. **Journal of Biotechnology**, n. 193, p. 83–90, 2015.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: a review. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1-10, 2009.

ZENI, J. **Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa**. Tese de Doutorado. Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões. URI - Campus Erechim. Departamento de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. 2011.

ZENI, J.; CENCE, K.; GRANDO, C. E.; VALDUGA, E. Screening of pectinase-producing microorganisms with polygalacturonase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 383–392, 2011.

ZENI, J.; GOMES, J.; AMBROSZINI, É.; BASSO, A. P.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E. Experimental design applied to the optimization and partial characterization of pectin liase from a newly isolated *Penicillium brasilianum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57 p. 908–915, 2014.