UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

SELEÇÃO DE UM SUPORTE SINTÉTICO PARA IMOBILIZAR CÉLULAS DO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* E COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS

LUIZ GUSTAVO COVIZZI

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
2007

LUIZ GUSTAVO COVIZZI

SELEÇÃO DE UM SUPORTE SINTÉTICO PARA IMOBILIZAR CÉLULAS DO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* E COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Campus de São José do Rio Preto, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador:
Prof. Dr. Roberto da Silva

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
2007

LUIZ GUSTAVO COVIZZI

SELEÇÃO DE UM SUPORTE SINTÉTICO PARA IMOBILIZAR CÉLULAS DO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* E COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE POR CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS

Comissão Examinadora:

_____

Prof. Dr. Roberto da Silva

_____

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

_____

Prof.ª Dr.ª Aneli de Melo Barbosa

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2007

DEDICATÓRIA

Aos amigos e professores que passaram longas e proveitosas horas em discussões cientificas, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e amigo Uderlei Coivzzi, pelo incentivo e apoio durante o projeto.

À Ellen Giese, pelo carinho, companheirismo e amizade presentes na vida e na bancada.

Aos técnicos dos departamentos de Engenharia de Alimentos, Física e Química em especial a João Jesuíno Demílio e Antonio Aparecido Barbosa, que tanto contribuíram para a construção de tudo foi preciso para execução desse projeto.

À técnica Rosana Silistino de Souza, a professora Dr[a] Sonia Maria Oliani, que contribuíram na elaboração das imagens e ajudaram na compreensão dos resultados.

Aos colegas de turma do mestrado pelo companheirismo e dedicação em todo tempo que passamos juntos.

Aos amigos de bancada do laboratório de microbiologia que me receberam de abraços abertos, tolerando meus defeitos e me ajudando a crescer.

Aos professores, Eleni Gomes, Crispin Cruz, Romaneli, que me mostraram o sentido da área acadêmica, a dedicação e o amor à profissão.

Ao amigo, professor e orientador Roberto da Silva pela oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos no decorrer deste trabalho.

RESUMO

O uso de células microbianas imobilizadas para aumentar a produção de metabólitos fúngicos em processos fermentativos tem mostrado altos rendimentos. Nesse trabalho foi avaliado pela primeira vez, a imobilização de células do *Botryosphaeria rhodina*, um fungo ligninolitico produtor constitutivo de lacases. Três suportes foram avaliados: Fibra Acrílica Fina (FAF); Espuma de Poliuretano Expandido (EPE); Espuma de Poliuretano Fibroso (EPF). O EPF foi o melhor suporte por ter mostrado uma imobilização mais homogenia das células. Um planejamento fatorial foi desenvolvido para otimizar a produção de lacases por células livres, na presença de álcool veratrílico (AV). A análise da superfície de resposta mostrou que 18mM como a melhor concentração de AV para a produção de lacases, usando-se 3 mL de homogeinato de células como inóculo ($DO_{\lambda 400nm}$ 0.4-0.6) para 25 mL de meio de cultura em frascos de 125mL, a 180 rmp, durante 126 horas a 28ºC. O perfil de crescimento do fungo, associado a produção de lacase foram comparados na presença e na ausência de AV, usando-se células livres e células imobilizadas do *B. rhodina*. A imobilização aumentou aproximadamente 3 vezes a produção de lacases e manteve estável o nível de produção durante 6 reciclos. A imobilização de células do *B. rhodina* mostrou-se útil uma vez que economizou 72horas para atingir a maior produção de lacase, quando comparada com células livres e também aumentou a tolerância do fungo a concentrações mais altas de AV (500mM).

Palavras-chave: Botryosphaeria rhodina; produção de lacase com células imobilizadas, Álcool Veratrílico, Suportes, Espuma de poliuretano, imobilização celular.

ABSTRACT

The use of microbial immobilized cells to increase the production of fungal metabolites in fermentation processes has showed higher yields. This work evaluated by the first time, the immobilization of *Botryosphaeria rhodina* cells, a ligninolytic fungus that produces laccase. Three carriers were evaluated: acrylic fine fiber (FAF), expanded polyurethane foam (EPE), and fiber polyurethane foam (EPF). The EPF was the best carrier because showed a homogeneous immobilization cells. A factorial design was developed in order to optimize the laccase production by free cells in the presence of the laccase inducer veratryl alcohol (VA). The analysis by response surface answer showed 18 mM as the best VA concentration to produce laccase using 3 mL of a cell homogenate ($OD_{\lambda 400nm}$ 0.4-0.6) as inoculum, to 25 mL of culture medium in shaked flasks (125 mL) at 180 rpm, during 126 hours at 28 °C. A growth profile for laccase and fungal biomass production were compared with and without VA using free and immobilized cells of *B. rhodina*. The cell immobilization increased approximately 3 folds the laccase production and maintained it stable during 6 consecutive recycles. The cell immobilization of *B. rhodina* showed to be useful once saved 72 hours to achieve the higher laccase production when compared to the one with free cells, and also increased the fungal cell tolerance at higher VA concentrations (500 mM).

Keywords: Botryosphaeria rhodina; laccase production with immobilized cells, veratryl alcohol, carriers, polyurethane foam; cell immobilization.

FIGURAS

Figura 1. Evolução do número de publicações científicas em periódicos internacionais indexados, referentes ao termo "imobilização celular", nos últimos 50 anos (Fonte: Web of Science Data Base "on-line") 23

Figura 2. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos..... 24

Figura 3. Equilíbrio entre células livres e imobilizadas no suporte pelo princício de adsorção 29

Figura 4. Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento. 30

Figura 5. Esquema do procedimento de imobilização microbiana por engaiolamento em Álcool Polivinílico (PVA)..... 33

Figura 6. Ilustração da técnica de imobilização híbrida a partir dos métodos de engaiolamento e encapsulação. 34

Figura 7. Análise fotográfica obtida através de lupa estereoscópica (ampliação de 30 vezes) das matrizes utilizadas. (A), Espuma de Poliuretano Expandido e (B), Espuma de Poliuretano Fibroso. 62

Figura 8. Rendimento do processo de imobilização celular do fungo filamentoso *Botryosphaeria rhodina* nos diferentes suportes avaliados. 63

Figura 9. Fotografia do suporte de fibra acrílica fina antes e depois do crescimento do microrganismo após tratamento com solução aquosa de bromofenol 0,01%. 65

Figura 10. Fotografia do suporte de poliuretano antes e ápós o crescimento do *B. rhodina* seguido do tratamento com solução aquosa de bromofenol 0,01%. 66

Figura 11. Microscopia óptica (ampliação de 60 vezes) do suporte de poliuretano mostrado na Figura 4 onde o fungo foi corrado com azul de metileno. Foi feito um corte

transversal que mostra em (A) a região externa e em (B) a região interna do suporte. A seta indica o limite do biofilme formado. 67

Figura 12. Fotografia dos suportes de poliuretano antes e após o crescimento do *B. rhodina* tratados com solução aquosa de bromofenol 0,01%. (A) Controle do suporte sem fungo, (B) Suporte com o fungo 68

Figura 13. Análise fotográfica obtida através de lupa estereoscópica (ampliação de 30 vezes) da matriz de poliuretano, após o crescimento do *B. rhodina*. Observação à fresco, corado do solução de bromofenol a 0,01 %. 68

Figura 14. Microscopia óptica (ampliação de 60 vezes) do suporte de poliuretano, após o crescimento do B. rhorina. Tratamento com parafina histológica, tratado com solução de azul de metileno 0,05%. 69

Figura 15. Análise de microscopia eletrônica da matriz de poliuretano após o crescimento microbiano. A=Corte transversão da hifa do fungo *B. rhodina*; B=fibra de poliuretano em contato com o microrganismo; C= Camada de EPS produzido pelo fungo *B. rhodina* recobrindo a hifa e a fibra. 70

Figura 16. Perfil do crescimento das células livres do *B. rhodina* cultivado em glucose (10 g/L) durantes 300 horas. 72

Figura 17. Perfil de crescimento do *B. rhodina*, produção de lacases, β-1,3-glucanases e EPS pelas células livres deste fungo cultivado em glucose (10 g/L) durantes 300 horas. 73

Figura 18. Perfil do crescimento do fungo *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase pelas células imobilizadas em espuma de poliuretano fibroso (EPF) cultivado em glucose (5 g/l), durante 300 horas. 75

Figura 19. Comparação da produção de lacases por células livres e imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina*, cultivado em glucose (10 g/l), durante 300 horas..... 77

Figura 20. Comparação da produção de lacases pelo *Botryosphaeria rhodina* utilizando-se dois tipos de inóculo..... 78

Figura 21. Gráfico de níveis para a produção de lacases por células livres do *Botryosphaeria rhodina* em função da concentração de AV, quantidade de inóculo e tempo de cultivo..... 82

Figura 22. Perfil de crescimento do *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase e outros parâmetros bioquímicos do cultivo de células livres do fungo, em glucose (10 g/l), durante 300 horas, na presença de 18 mM de AV e 3 ml de solução de inóculo. 83

Figura 23. Comparação da produção de lacase por células do *Botryosphaeria rhodina* imobilizadas em EPF, na presença de glicose (10g/l) e diferentes concentrações de AV (0 a 500 mM), após 120 horas de cultivo. 85

Figura 24. Perfil de crescimento do *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase e outros parâmetros bioquímicos do cultivo de células imobilizadas, cultivado em glicose (5 g/l), durante 300 horas, na presença de 30,4 mM de AV. 88

Figura 25. Cultivos sucessivos para determinar o número de reuso das células imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina* para a produção de lacases, na ausência de AV (A) e na presença de 30,4 mM de AV (B)..... 89

TABELAS

Tabela 1. Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos botecnológicos 21

Tabela 2. Características ideais desejáveis para a matriz ou suporte selecionado para imobilizar células microbianas 26

Tabela 3. Vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres na produção de bebidas 38

Tabela 4. Parâmetros do crescimento celular microbiano que podem ser modificados pela imobilização 39

Tabela 5. Designer experimental 33 para a otimização da produção de lacases por células livres. 58

Tabela 6. Codificação das variáveis utilizadas no designer experimental 3^3. 58

Tabela 7. Características físicas dos diferentes suportes avaliados para imobilizar as células do *Botryosphaeria rhodina*. 60

Tabela 8. Análise dos fatores e suas interações na produção de lacases por céluas livre do *B. rhodina*, na presença de AV 79

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a produção de lacases por células livres do *B. rhodina*, na presença de AV 80

Tabela 10. Valores experimentais da produção de lacases por células livres do *B. rhodina*, na presença de AV. 81

LISTA DE ABREVIATÚRAS

ABTS = 2,2 ácido azino bis (3 - etilbenzotiazoline-6-sulfônico)

AV = Álcool Veratrílico

BDA = Meio de batata-agar-dextrose

CBAG = Coomassie Brilhante Azul G-250

EPE = Espuma de Poliuretano Expandido

EPF = Espuma de Poliuretano Fibroso

EPS = Exopolissacarídeo

FAF = Fibra Acrílica Fina

VGA = Meio de Vogel-glucose-agar

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVOS 17

2.1.Objetivo Geral 17

2.2.Objetivos Específicos 17

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

3.1. Imobilização Celular 18

3.2. Imobilização por Adsorsão em Suportes Sólidos 20

3.3. Encapsulação e Engaiolamento em Matrizes 24

3.4. Imobilização Natural (Auto-Imobilização) 34

3.5. Floculação e Contenção em Membranas 37

3.6. Aplicação de Microrganismos como Biocatalisadores 40

3.7. Produção de lacases fúngicas e suas aplicações 43

3.8. Lacases produzidas por *Botryohphaeria rhodina* 46

4. MATERIAIS E MÉTODOS 49

4.1.Materiais 49

4.1.1.Microrganismo 49

4.1.2.Reagentes 49

4.1.3 Suportes 49

4.2.Métodos Gerais 50

4.2.1.Meios de Cultivo 50

4.2.1.1.Meio de batata-dextrose-agar (BDA) 50

4.2.1.1.Meio mínimo de sais de Vogel 50

4.2.1.2.Meio Vogel-glucose-agar (VGA) 51
4.2.1.3Meio de Vogel-glucose-agar (VGA) 51
4.2.2.Manutenção dos Microrganismos 51
4.2.3 Preparo do inóculo do *Botryosphaeria rhodina* 52
4.2.4 Imobilização das células de *Botryosphaeria rhodina* nos diferentes suportes 52
4.2.5 Preparo do Inoculo usando esferas de Agar 52
4.2.6 Fermentação submersa do *Botryosphaeria rhodina* com células livres e imobilizadas. 53
4.2.7 Análise morfológica através de microscopia ótica 53
4.2.8 Determinação de Atividade Enzimática 54
4.2.8.1 Determinação da atividade de lacase 54
4.2.8.2 Determinação da atividade de β-1,3-glucanase 55
4.2.9 Determinação de Açúcares Redutores 55
4.2.10 Determinação de Açúcares Totais 56
4.2.11 Determinação de Proteínas 56
4.2.12 Determinação da Biomassa Fúngica 56
4.2.13 Determinação do exopolissacarídeo (EPS) 57
4.3 Método Estatístico Adotado 57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 59
5.1 Seleção de um suporte adequado para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* 59
5.1.1 Comparação dos suportes EPE, EPF e FAF para imobilizar o *Botryosphaeria rhodina* 59
5.2 Comparação da imobilização do *B. rhodina* nos suportes EPE, EPF e FAF e seleção do melhor suporte 71
5. 3 Comparação da produção de lacases por *Botryosphaeria rhodina* com células livres e imobilizadas em EPF, na presença de álcool veratrílico 72
6. CONCLUSÕES 90

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91

8. ANEXOS 98

ANEXO A – Artigo: IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS 99

1 INTRODUÇÃO

A bioconversão a partir de processos fermentativos vem sendo empregada industrialmente para obtenção de uma grande diversidade de produtos de alto valor agregado. O desenvolvimento de técnicas de imobilização celular tem propiciado o aumento da produtividade destes processos, assim, o uso de células imobilizadas para a produção de metabólitos fúngicos como, enzimas, exopolissacarídeos, pigmentos, inoculantes agrícolas entre outros, vêm sendo avaliados.

O emprego de microrganismos imobilizados em biorreatores apresenta vantagens em relação ao uso de células livres, tais como a facilidade da extração dos metabólitos de interesse do meio de cultivo, a utilização de altas concentrações celulares e proteção das células, contra substâncias tóxicas, facilidade no controle do processo fermentativo, redução do custo operacional e possibilidade de processos contínuos.

A imobilização das células microbianas consiste na interação física ou química entre estas e um suporte, natural ou sintético. Os métodos mais utilizados para imobilização celular são de engaiolamento em géis, contenção entre membranas e adsorção. A principal limitação apresentada por ambos os métodos é a dificuldade de transferência de massa, troca gasosa.

A metodologia de adsorção vem sendo empregada com sucesso em processos de imobilização de células de fungos filamentosos. Destacando-se principalmente o uso de espumas de poliuretano, as quais apresentam porosidade e leveza adequadas para o crescimento destes microrganismos.

O fungo filamentoso *Botryosphaeria rhodina* é um produtor constitutivo de lacase, uma polifenol oxidase (p-difenol: oxigênio oxidoredutase, EC 1.10.3.2) que catalisa a oxidação de vários compostos fenólicos em concomitância com a redução do oxigênio molecular à água. Estas

enzimas podem ser aplicadas na biorremediação de efluentes, em processos de biobranqueamento de polpa de papel e na construção de biossensores, entre outros.

O álcool veratrílico (AV) (3,4-dimetoxibenzílico) induziu a produção de lacases pelo *B. rhodina*. Trabalhos anteriores realizado pelo grupo de Barbosa e Dekker, sugeriram também um possível regulador do AV na síntese de enzimas hidrolíticas como as xilanases e celulases secretadas pelo *B. rhodina*.

Assim considerando a crescente importância do emprego de céulas imobilizadas nos processor fermentativos, considerando a importância da lacase em processos biotecnológicos e considerando também a experiência adquirida nos estudos de produção de lacases por células livres de *B. rhodina*. Tornou-se interessante um estudo de imobilização deste microrganismo visando à produção de lacase.

Neste trabalho, estão descritos os resultados da seleção do suporte e a imobilização das células do *B. rhodina* bem como os resultados da produção de lacases neste sistema.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Selecionar um suporte sintético adequado para imobilizar as células do fungo Botryosphaeria rhodina e comparar a produção de lacases pelas células livres e imobilizadas.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterizar os suportes sintéticos: Fibra Acrílica Fina (FAF), produzida pela SINGER-LDTA; e duas Espumas de Poliuretano, nas formas de Expandido e Fibroso, aqui denominadas de EPE e EPF, produzidos pela 3M Brasil, quanto a capacidade de serem utilizados como matrizes para imobilização e resistência ao processo de imobilização

2.2.2 Avaliar o crescimento e determinar a morfologia predominante do fungo *Botryosphaeria rhodina* imobilizado nas diferentes matrizes através de análise de microscopia ótica e eletrônica;

2.2.3 Selecionar o melhor suporte para imobilizar as células do *Botryosphaeria rhodina* através da avaliação da homogeneidade da distribuição da biomassa;

2.2.4 Avaliar o crescimento e a produção de lacases pelo *Botryosphaeria rhodina* no suporte selecionado através da comparação do perfil de crescimento do mesmo por células livres e imobilizadas na presença e na ausência do indutor álcool veratrílico;

2.2.5 Avaliar a viabilidade celular após o processo de imobilização através do reuso do inoculo em sucessivas fermentações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Imobilização Celular

O estado morfológico do microrganismo durante o processo fermentativo influencia diretamente na obtenção dos produtos microbianos de interesse, diminuindo o tempo de cultivo e aumentando o rendimento do processo (FENG et al., 2003). Os fungos, por exemplo, apresentam uma morfologia bastante complexa com estruturas celulares diferentes em cada etapa do seu ciclo de vida (PRASAD et al., 2005).

Uma das alternativas encontradas para "engenheirar" a estrutura morfológica destes microrganismos é a imobilização celular (IC), de maneira a preservar a atividade catalítica desejada, para aplicação tanto em escala de laboratório quanto industrial. A tecnologia da IC se restringe à produção do metabólitos extracelulares ou a utilização de microrganismos como biocatalizadores (KOURKOUTAS et al., 2004), (PRASAD et al., 2005), conforme mostra a Tabela 1.

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

A maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Além disso, facilita a recuperação dos produtos do metabolismo de interesse na fase de "downstream" e ajuda na manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos (MOREIRA et al., 1998) (KOURKOUTAS et al., 2004), (BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005).

Tabela 1. Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.

Processo	Microrganismo	Suporte utilizado	Referência
Produção de pigmentos	*M. purpureus*	alginato, PUF, carvão, perlita	FENICE et al., 2000
	G. fujikuroi	alginato	GARBAYO et al., 2003
Produção de proteínas	*S. cerevisiae*	PVA	PARASCANDOLA; BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006
Produção de EPS	*L. rhamnosus*	silicone	BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005
	Beijerinckia sp.	maltodextrina	BOZA; COSTA; SCAMPARINI, 2004
	A. pullulans	agar, alginato	WEST; STROHFUS, 2001
Produção de enzimas	*N. frowardii*	PUF	ROGALSKI et al., 2006
	H. lutea	PVA-MAA/PEG; PVA-MAA/alginato de cálcio	ALEKSIEVA; PETRICHEVA; KONSTANTINOV, 1998; SLOKOSKA et al., 1999
	Aspergillus sp.	CrioPAG®	LUSTA ET AL., 2000
	P. chrysosporium	PUF, aço inoxidável, cerâmica, náilon, poliestireno	GERIN; ASTHER; ROUXHET, 1997; COUTO ET AL., 2000; SHIM; KAWAMOTO, 2002
	Agaricus sp.	PUF	KALUSKAR et al,. 1999
	A. niger	alginato	ANGELOVA; SHEREMETSKA; LEKOV, 1998
	P. ostreatus	PUF	PRASAD et al., 2005
	T. turnirae	alginato	BESHAY, 2003
Biotransformação	*R. minuta*	agar, clara de ovo, lã de vidro/PEI	VELANKAR; HEBLE, 2003
	T. versicolor	náilon	SEDARATI et al., 2003
	Rhodococcus sp.	alginato	GUO et al., 2006
Biodegradação	*Bacillus sp.*	alginato, PUF	PATIL et al., 2006
	F. trogii	alginato	PARK et al., 2006
	P. stutzeri	alginato, areia, carvão	VIGGIANI et al., 2006
	E. coli e B. subtilis	auto-imobilização	YASUDA et al., 2003
	P. chrysosporium	PUF, cerâmica, serragem	SHIM; KAWAMOTO, 2002
	Rhodococcus sp.	alginato, carvão	PAI et al., 1995
Redução de sulfatos	*Bactérias*	PUF, PE, Al_2O_3	SILVA et al., 2006
Fermentação demostos de uvas	*S. cerevisiae*	maçã	KOURKOUTAS et al., 2004

Produção de vinhos doces	*K. marxianus*	maçã	KOURKOUTAS et al., 2004
Produção de leite fermentado	*L. casei*	alginato, maçã	KOURKOUTAS et al., 2004
Produção de ácido lático	*L. casei*	bucha vegetal	KOURKOUTAS et al., 2004;
Produção de sorbitol	*Z. mobilis*	bucha vegetal	VIGNOLI; CELLIGOI; SILVA, 2006
Produção de etanol	*S. cerevisiae*	bucha vegetal	OGBONNA; MASHIMA, TANAKA, 2001
Produção de antibióticos	*S. clavuligerus*	alginato, náilon	DEVI; SRIDHAR, 2000
Descoloração de melanoidinas	*C. hirsutus,* *G. candidum*	PUF PUF	FUJITA et al., 2000 KIM; SHODA, 1999
Solubilização de fosfatos	*A. niger* *Chlorella spp. , e A. brasilense*	PUF co-imobilização	VASSILEV; VASSILEVA; AZCON, 1997 HERNANDEZ; DE-BASHAN; BASHAN, 2006
Produção de peptídeos para controle de pragas	*M. anisopliae*	auto-imobilização	FENG et al., 2003
Produção de auxina e ácido abscísico	*P. chrysosporium*	PUF	ÜNYAYAR; ÜNYAYAR; ÜNAL, 2000

*PVA: álcool polivinílico; PUF: fibra de poliuretano; MAA: N-metileno acrilamida; PEG: polietilenoglicol; CrioPAG®:espuma de poliestireno não-trançada; PEI: polietilenoimina; PE: polietileno

A reutilização das células imobilizadas é considerado uma das grandes vantagens da IC, principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica, como na produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*, imobilizado em esponja de náilon e na produção de enzimas por *Phanerochaete chrysosporium*, imobilizado em espuma de poliuretano (COUTO et al., 2000), (DEVI; SRIDHAR, 2000).

O aprimoramento e o desenvolvimento de novas técnicas de IC, associadas ao uso de novos materiais como suporte têm permitido que os processos fermentativos com células imobilizadas sejam realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação. O emprego de células livres não seria possível, em meios de cultivo mais tóxicos, como por exemplo, no tratamento de águas residuais contaminadas com fenóis e derivados (JUNTER; JOUENNE, 2004), (WANG et al., 2005).

A IC surgiu como alternativa à imobilização de enzimas, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação. Desde então, o processo de imobilização tem conseguido vários avanços, principalmente na área da biotecnologia, permitindo a obtenção de metabólitos microbianos de maneira mais eficiente. O interesse por esta técnica pode ser avaliado pelo crescente número de artigos e resenhas publicados, citando-se a palavra-chave "imobilização celular", como mostra a Figura 1.

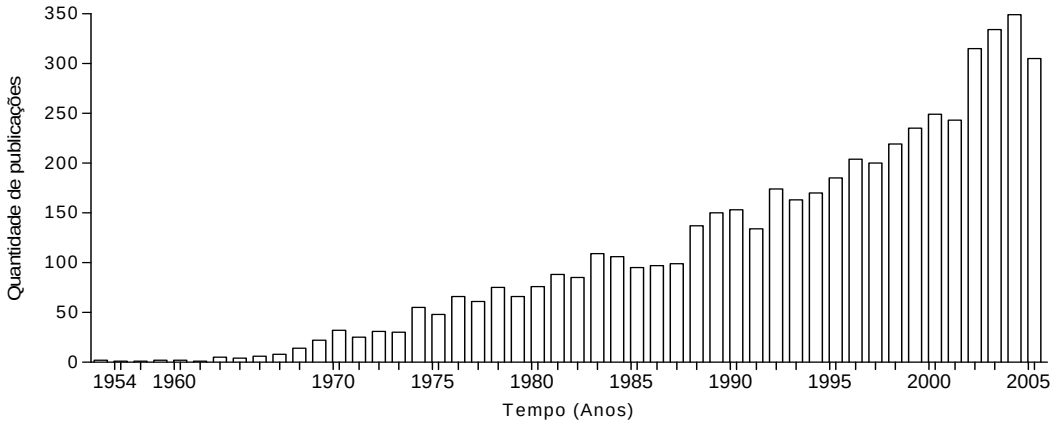


Figura 1. Evolução do número de publicações científicas em periódicos internacionais indexados, referentes ao termo "imobilização celular", nos últimos 50 anos (Fonte: Web of Science Data Base "on-line").

As técnicas clássicas de IC podem ser classificadas em: a) naturais, as quais incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, e b) artificiais as quais incluem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes.

A imobilização natural ocorre espontaneamente por meio de interações eletrostáticas. Já no caso da imobilização artificial, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida. As células permanecem viáveis independentemente dos danos causados pelo procedimento. A Figura 2 ilustra os diferentes tipos de IC utilizadas em pesquisas e em plantas industriais.

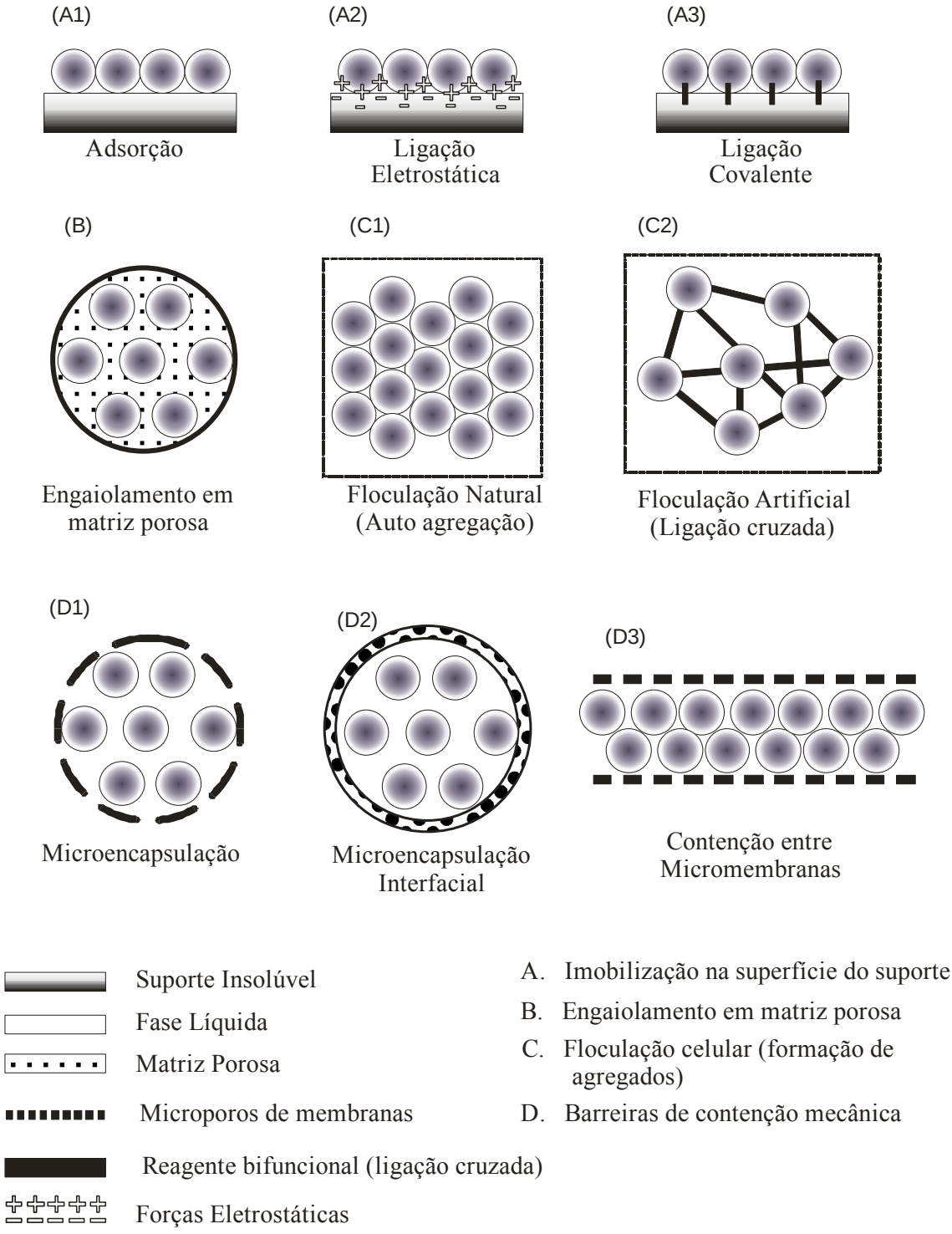


Figura 2. Diferentes métodos de imobilização celular de microrganismos, adaptado de KOURKOUTAS et al., 2004.

Embora apresente algumas desvantagens, o uso de células microbianas imobilizadas é compensado pelas vantagens que o método proporciona. O processo de imobilização pode não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar

a fisiologia e cinética do crescimento celular. Além, disso a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e evolução de gases, devido às limitações na transferência de oxigênio (WANG et al., 2005). Assim, para que a IC apresente sucesso é necessário escolher adequadamente a metodologia a ser utilizada.

A IC também representa uma alternativa ao uso dos sistemas sólidos de fermentação. Os processos empregando MI podem ser realizados em espaço físico menor, como em biorreatores, ocorrem em ambientes com maior atividade de água e permitem melhor controle de contaminações (DOMÍNGUEZ; COUTO; SANROMÁN, 2001).

O *Monascus purpureus*, por exemplo, é produtor de pigmentos intracelulares sob fermentação submersa, os quais são secretados para o meio quando cultivado em estado sólido. Porém, o uso de resíduos agrícolas, como casca de arroz, dificulta a recuperação do pigmento do meio de cultivo e o emprego de MI foi uma maneira encontrada para recriar as condições fisiológicas do estado sólido, resultando ainda no aumento de produtividade (FENICE et al., 2000).

A eficiência do suporte no processo de IC pode ser avaliada pela capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células viáveis possível, sem limitar a transferência de massa entre o microrganismo e o meio de cultivo, a qual é determinada pela razão entre a quantidade em gramas de biomassa microbiana e a de suporte em peso seco.

Diferentes métodos de IC têm sido utilizados na obtenção de sistemas eficientes para utilização nos processos fermentativos em reatores industriais, tornando-os economicamente viáveis e apresentando melhor produtividade. Porém, a escolha de uma matriz adequada para a imobilização das células é de fundamental importância para a obtenção do produto desejado, sendo esta escolha peculiar para cada microrganismo e metabólito estudado (PETRE et al., 1999) (Tabela 2). O tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (SILVA et al., 2006).

3.2 Imobilização de células microbianas por adsorção em suportes sólidos

As primeiras pesquisas sobre imobilização de células microbianas surgiram a partir das observações da capacidade de alguns microrganismos se fixarem naturalmente em superfícies de diferentes ambientes, desde caules de árvores como no caso de microrganismos fitopatogênicos, até cateteres hospitalares em se tratando de bactérias oportunistas. A colonização da superfície por formação de biofilmes é uma estratégia universal das bactérias para a sobrevivência e pode ocorrer naturalmente, como no caso das bactérias formadoras da cárie ou até mesmo em instalações industriais, por exemplo (JUNTER; JOUENNE, 2004).

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos amplamente aplicados em processos fermentativos em indústrias, visando principalmente a produção de enzimas de interesse comercial (WANG et al., 2005). Para a IC destes fungos, utilizam-se suportes porosos visto que ocorre adesão das células microbianas à superfície do suporte. Quando os poros são maiores, as células em crescimento (hifas) penetram no suporte, preenchendo seu espaço interno. Este método de imobilização também se utiliza da habilidade dos microrganismos em produzirem e secretarem exopolissacarídeos (EPS) (PRASAD et al., 2005).

Um dos problemas deste tipo de imobilização está relacionado com a formação e acúmulo de biofilme ou EPS sobre a superfície, o que dificulta a absorção de nutrientes resultante das condições não-homogêneas do crescimento celular. Os produtos secretados para o meio extracelular têm sua difusão dificultada e a troca gasosa também pode ser comprometida (XAVIER et al., 2003).

A produção de EPS por células microbianas imobilizadas em suportes porosos também tem sido descrita. Porém, como a secreção de EPS para o meio aumenta excessivamente a viscosidade do mesmo, o uso da IC é limitado para alguns tipos de

microrganismos, de acordo com o comportamento reológico do meio de cultivo e o tipo de matriz utilizada (BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005).

A produção de pululana pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, por exemplo, apresentou maior rendimento quando uma espuma de poliuretano foi utilizada como suporte, em comparação com cubos de agar ou de alginato de cálcio, devido as dificuldades na transferência de massa causadas por estes últimos (WEST; STROHFUS, 2001).

A produção de lacases pelo *Coriolopsis rigida* também foi aumentada significativamente quando este basidiomiceto foi imobilizado em espuma de poliuretano (SAPARRAT et al., 2002). A produção de manganês-peroxidase por micélios livres e imobilizados de *Nematoloma frowardii*, neste mesmo suporte, foi comparada e os cultivos com células imobilizadas apresentaram maior atividade enzimática do que os com células livres (ROGALSKI; SZCZODRAK; JANUZ, 2006). O mesmo fenômeno também foi observado na produção de lacases pelo fungo *Agaricus* sp., que aumentou 13 vezes a produção de lacase (KALUSKAR et al., 1999).

As espumas de poliuretano como suportes para a IC têm sido usados na produção de ácidos orgânicos, na solubilização simultânea de fosfato inorgânico por rhizobactérias e fungos micorrízicos em solos, sendo uma alternativa aos fertilizantes químicos (VASSILEV; VASSILEVA; AZCON, 1997), (VASSILEV et al., 2001). Também têm sido utilizadas na produção de substâncias vinculadas à fisiologia de plantas como a auxina e o ácido abscísico (ÜNYAYAR; ÜNYAYAR; ÜNAL, 2000).

Alguns materiais alternativos têm sido empregados como suportes para imobilizar microrganismos como pedaços de maçã para imobilizar *Saccharomyces cerevisiae* em processos de vinificação. Esta é uma alternativa de baixo custo e compatível com o aroma e sabor dos vinhos (KOURKOUTAS et al., 2001). Peças de cerâmicas têm sido utilizadas como suporte para a *Candida tropicalis* no tratamento de resíduos ricos em carboidratos

procedentes de indústrias alimentícias, e, peneiras de aço inoxidável, utilizadas para imobilizar células de *P. chrysosporium*, visando a produção de peroxidases (GERIN; ASTHER; ROUXHET, 1997).

Esponja de celulose como a *Luffa cylindrica* (bucha vegetal) foi utilizada para a imobilização de *Zymomonas mobilis* para a produção de sorbitol (VIGNOLI; CELLIGOI; SILVA, 2006) e *S. cerevisiae* (OGBONNA; MASHIMA; TANAKA, 2001) para produzir etanol. Grãos de cevada foram citados como suporte na produção de pectinases por *Kluyveromyces marxianus* (ALMEIDA et al., 2003). Outros exemplos de matrizes sólidas são DEAE-celulose, madeira, serragem, bagaço de cana de açúcar, e materiais inorgânicos como rochas, porcelanas e vidros porosos (DOMÍNGUEZ; COUTO; SANROMÁN, 2001).

O método de adsorção é utilizado pela sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes. Há um potencial de equilíbrio entre as células adsorvidas e livres, dependendo do crescimento microbiano e da densidade de células na matriz. A equação 1 representa este equilíbrio assim como a Figura 3. Pode se observar que o ponto de equilíbrio ocorre no início da fase estacionária de adsorção das células.

$$C_{livres} + S \leftrightarrow C_{\mathrm{Im}obilizadas} \quad \text{..... (1)}$$

Tabela 2. Características ideais desejáveis para a matriz ou suporte selecionado para imobilizar células microbianas.

Características	Referências
Ter grande área superficial com espaço intersticial para o crescimento celular.	DEVI S, SRIDHAR, 2000
Possuir grupos funcionais ligantes, no caso de adesão artificial.	FREEMAN; LILLY, 1998
Ser facilmente regenerável e possível de reuso.	CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-GALLOT, 1994
Proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica, por um longo período de tempo.	GARBAYO et al., 2003
Apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano.	NORTON et al., 1995
Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica.	DÍAZ et al., 2001
Não ser degradável facilmente por enzimas ou solventes envolvidos no processo.	BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005
Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio.	MOREIRA et al., 1998
Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial.	FENICE et al., 2000

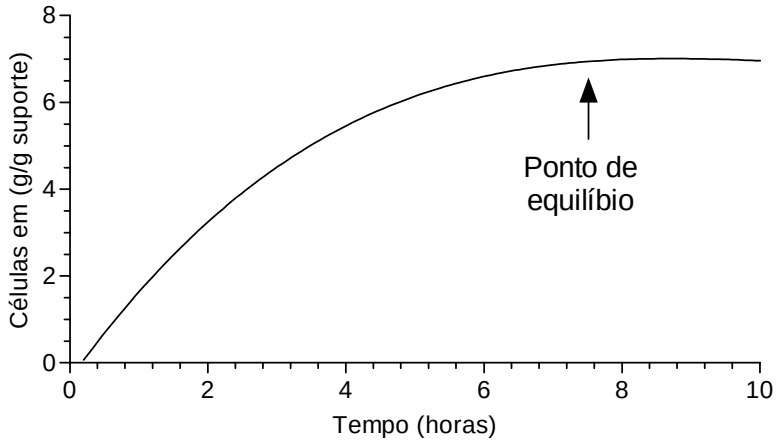


Figura 3. Equilíbrio entre células livres e imobilizadas no suporte pelo princípio de adsorção.

A grande vantagem da IC para a produção de enzimas é que este sistema permite a produção contínua e eficiente destas proteínas pelos microrganismos, por um longo período de tempo (DOMÍNGUEZ; COUTO; SANROMÁN, 2001). Quando se utilizam células livres,

ocorre um pico de atividade enzimática e, no caso do uso de microrganismos imobilizados, ocorre um platô de atividade que pode durar por um período mais longo (PRASAD et al., 2005). O uso de esporos neste tipo de imobilização não é recomendável, uma vez que a agregação destes sobre a superfície do suporte é muito lenta e, em alguns casos, após o processo de imobilização, o fungo cresce na forma de "pellets" e fica disperso no meio de cultivo (GERIN; ASTHER; ROUXHET, 1997).

3.3 Encapsulação e engaiolamento de células microbianas em matrizes

O método de engaiolamento está baseado na inclusão artificial das células, que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semi-rígida, que impede a difusão destas para o meio de cultivo. A gota formada possibilita a troca de nutrientes, metabólitos, gases durante o processo fermentativo. A diferença entre este método e o de encapsulação é que neste último as células ficam apenas envoltas por uma membrana e não há uma malha entre as células por ela envolvidas. (CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-GALLOT, 1994), (KRISHNAN et al., 2001).

O mecanismo clássico de imobilização por engaiolamento é a mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresenta cargas negativas (alginato, pectato, ou outro polímero orgânico com cargas negativas). Esta mistura é gotejada em uma solução com íons Ca^{2+}, por exemplo, conforme ilustra a Figura 4. O íon Ca^{2+} promove a formação de ligações iônicas, que resulta na formação de um gel consistente e insolúvel, o qual imobiliza o microrganismo. O tamanho da gota formada irá depender da velocidade de fluxo, da densidade da gota da solução polimérica e da concentração da solução iônica, na qual o gel será formado. No processo de encapsulação as células microbianas são colocadas em uma solução de cloreto de cálcio, que é gotejada a posteriori na solução polimérica, na qual será formada a cápsula envoltória (WANG et al., 2005).

O crescimento celular nestes tipos de IC depende da limitação imposta pela porosidade do material e do acúmulo de biomassa no interior da matriz. São vários os géis utilizados como: ágar, agarose, goma carragenana, alginato e quitosana, além de géis como o álcool polivinílico (PARASCANDOLA; BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006).

A imobilização de células microbianas em géis de alginato tem sido a mais utilizada em processos fermentativos, envolvendo bactérias, leveduras, e mais raramente, fungos. Como exemplo pode ser citada a produção de ácido lático por *Lactobacillus casei* (YOO et al., 1996) e de carotenóides pelo fungo filamentoso *Giberella fujikuroi* (GARBAYO et al. 2003).

O alginato é um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo β(1→4) e também por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo α(1→4) (GUO et al., 2006). Porém, os géis de alginato de cálcio (Figura 4) são quimicamente instáveis na presença de alguns componentes do meio de cultivo, como íons fosfato e citrato, podendo sofrer rupturas ou até mesmo dissolverem-se no meio. Este problema tem sido contornado com o uso de sais de bário, no lugar do cálcio ou pelo tratamento com quitosana, para aumentar a resistência (YOO et al., 1996).

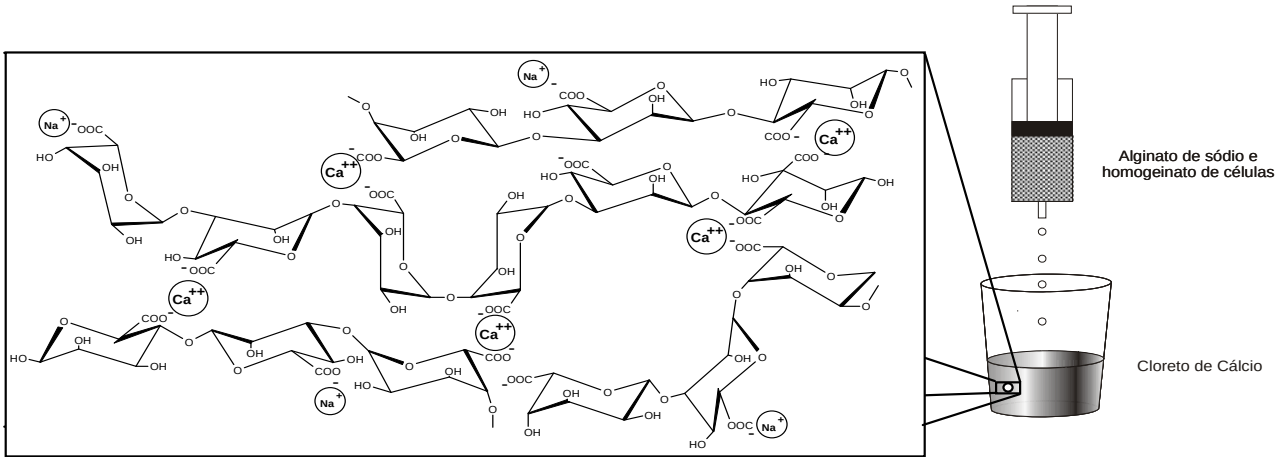


Figura 4. Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.

É importante ressaltar a limitação de transferência de massa imposta aos processos de IC em géis. Geralmente, a quantidade de O_2 que adentra às microesferas do gel de carragenana é estimada na faixa de 0,08 a 0,1mm^3, enquanto que em géis de alginato, estes valores são um pouco maiores (de 0,1 a 0,16mm^3) (OGBONNA et al., 2001).

A distribuição de O_2 é importante à medida que favorece estados metabólicos diferentes, na população de microrganismos imobilizados na microesfera de gel, o que resulta na formação de uma população microbiana não-homogênea, com diferenciações celulares na superfície e no interior da matriz (FREEMAN; LILLY, 1998).

Uma aeração não-uniforme pode ocasionar a migração das células da superfície da gota para o meio externo e o conseqüente rompimento da matriz do gel, sendo esse um dos maiores problemas encontrados neste tipo de imobilização.

SERP et al. (2000) avaliaram o efeito de uma dupla camada de gel na gota, para prevenir o rompimento; entretanto, apesar de ter formado um núcleo celular que impediu que as células microbianas escapassem do seu interior, a dupla camada dificultou a difusão de O_2 e mostrou-se ineficiente como técnica de imobilização.

É difícil quantificar a biomassa microbiana imobilizada na gota, tornando-se um outro problema nestes métodos de IC em processos biotecnológicos. Atualmente, métodos como a gravimetria, determinação de proteínas totais e a quantificação de NADH têm sido associadas à concentração celular no interior das matrizes. NAVRATIL et al. (2000) propuseram um método baseado na luminescência, através da determinação de ATP, como um método rápido e eficiente para a determinação da biomassa microbiana em géis de alginato, pectato de cálcio e goma carragenana.

Para evitar os problemas causados pela instabilidade dos géis tradicionais nos caldos fermentativos, muitos segmentos industriais e pesquisadores vêm optando pelo uso do álcool polivinílico (PVA), um polímero atóxico e mais resistente, pois não depende de

ligações iônicas. O gel de PVA pode ser estável em temperaturas relativamente altas, de até 80ºC, dependendo do agente ligante utilizado no processo. A colonização na matriz do gel também é maior (>100mg/cm^3) (PARASCANDOLA; BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006).

Um dos agentes ligantes mais comuns utilizados neste processo são os grupamentos N-metileno-acrilamida (MAA), como no caso da produção de protease ácida pelo fungo *Humicola lutea* 131-5. O composto polietilenoglicol (PEG) é um composto inerte solúvel em água que confere o controle da porosidade da matriz (ALEKSIEVA; PETRICHEVA; KONSTANTINOV, 1998), (SLOKOSKA et al., 1999).

A Figura 5 mostra um esquema de IC em gel de PVA. Geralmente utiliza-se um agitador magnético (1) e um recipiente estéril (2), contendo as células microbianas, que são misturadas à solução de PVA (responsável pela formação das ligações de hidrogênio). A mistura homogeneizada é bombeada (3) até uma haste, onde é gotejada em um recipiente (6), que contém um líquido à baixa temperatura, geralmente inferior a -10ºC. Devido à dificuldade de manipulação a baixas temperaturas, o líquido é mantido em câmara resfriada (5). O produto formado é depositado na forma de esferas no fundo do recipiente (6).

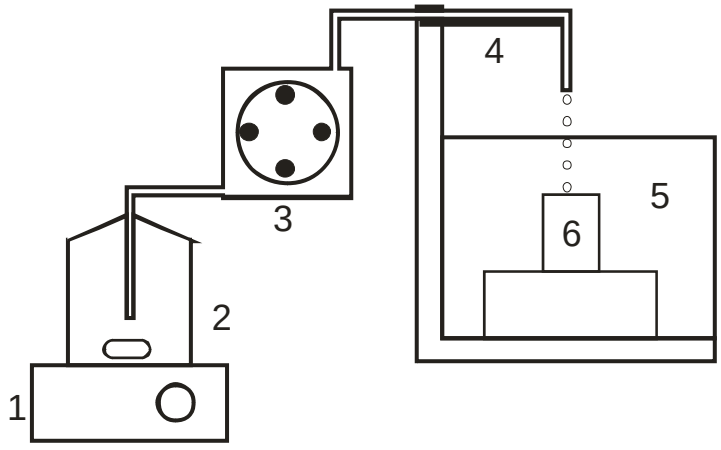


Figura 5. Esquema do procedimento de imobilização microbiana por engaiolamento em álcool polivinílico (PVA).

Song et al. (2005) modificaram o método de imobilização em PVA pela adição de goma xantana e surfactantes; utilizaram uma técnica baseada nos métodos de engaiolamento e encapsulação, denominada imobilização híbrida (Figura 6). Esta imobilização foi utilizada para a remoção de nitrato de águas residuais pelo Ochrobactrum anthropi SY520 e apresentou uma eficiência maior (181%) do que as células imobilizadas pelos métodos tradicionais.

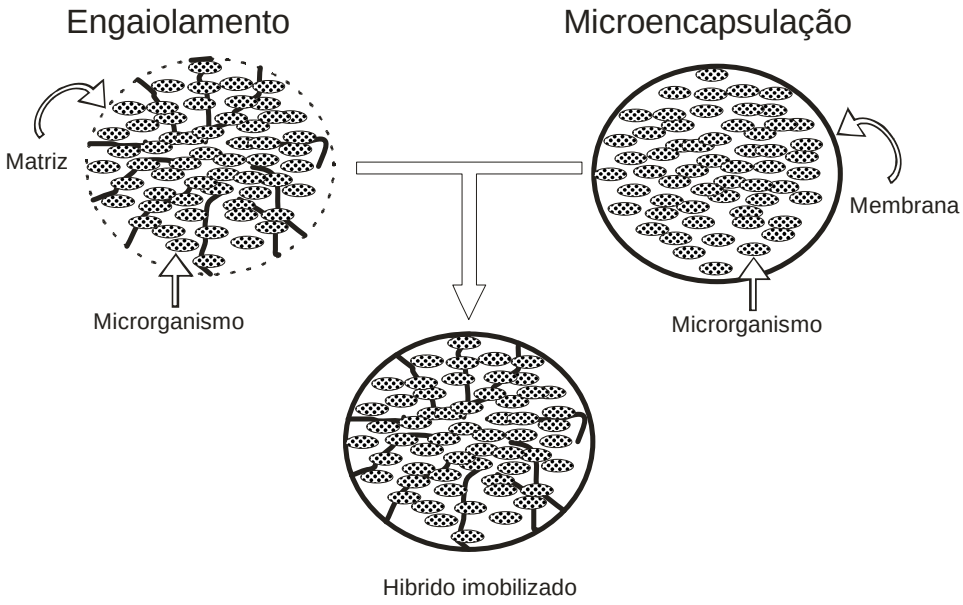


Figura 6. Ilustração da técnica de imobilização híbrida a partir dos métodos de engaiolamento e encapsulação.

A produção de polimetilgalacturonase por *a. niger* (GERIN; ASTHER; ROUXHET, 1997) imobilizado em alginato de cálcio foi 18 vezes maior do que o uso dos esporos livres no cultivo. A atividade enzimática apresentou boa estabilidade com o prolongamento do pico por mais tempo (ANGELOVA; SHEREMETSKA; LEKOV, 1998). A produção de protease alcalina por *Teredinobacter turnirae*, imobilizado em alginato de cálcio, apresentou um rendimento maior (187 vezes) do que os cultivos com células livres, tendo sido reutilizado em 5 ciclos consecutivos (BESHAY, 2003).

PATIL et al. (2006) compararam o uso de *Bacillus* sp. imobilizado em espumas de poliuretano e alginato de cálcio, na degradação de *o*-ftalato (componente das resinas de PVC). Observaram que as células imobilizadas em alginato apresentaram 13 repetições bem sucedidas contra 25 repetições com as imobilizadas em poliuretano, as quais foram mais resistentes (PATIL et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos na produção de antibióticos por *Streptomyces clavuligerus* imobilizado nestes mesmos suportes (DEVI; SRIDHAR, 2000), comprovando a importância da escolha do suporte e do processo de imobilização.

3.4 Imobilização natural de células microbianas (auto-imobilização)

Os fungos são microrganismos eucariontes que apresentam diferentes aspectos morfológicos dependendo do ambiente em que se encontram. Geralmente, podem ser encontrados na forma de esporos ou de filamentos, e quando submetidos a certas condições de crescimento, tendem a formar aglomerados de micélios, que geralmente adotam um formato esférico, os quais são comumente denominados "pellets" (BRAUN; VECHT-LIFSHITZ, 1991), (WANG et al., 2005).

As condições de cultivo interferem nas características físico-químicas e morfológicas das hifas e na tendência destas em formar agregados celulares ou não. A formação de "pellets" pode ser coagulativa, quando proveniente de um aglomerado de esporos na fase inicial de cultivo; como no caso do *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Outra formação é a não-coagulativa, onde a formação do "pellet" é proveniente de um único esporo, o que acontece nos cultivos de alguns actinomicetos do gênero *Streptomyces* (YANG et al., 1992), (NIELSEN et al., 1995), (CARLSEN et al., 1996), (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

As variações físico-químicas observadas em nível macroscópico influenciam na formação de agregados celulares afetando diretamente o metabolismo celular e a produção de metabólitos. Estes agregados são considerados como auto-imobilização celular, a qual é influenciada pela quantidade de inóculo, pelas forças mecânicas empregadas durante a fermentação, pelos componentes e pela tensão superficial do meio de cultivo, assim como pela presença de o_2 dissolvido (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001), (FENG et al., 2003).

Em alguns casos, o estado morfológico é determinante para obtenção do metabólito de interesse, como no caso da produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* (NIELSEN et al., 1995), a qual é maior com o uso de micélios livres no meio de cultivo; e a produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*, que ocorre na forma de "pellets" por este microrganismo (BEROVIC et al., 1991).

A morfologia também afeta diretamente a reologia do meio de cultivo, considerando-se que os caldos fermentados com fungos filamentosos apresentam maior viscosidade aparente, devido a maior secreção de EPS para o meio extracelular, e um comportamento não-Newtoniano. Portanto, alguns dos parâmetros destes processos como agitação, transferência de massa, homogeneidade do meio e remoção do CO_2 formado, podem ser prejudicados pelo estado morfológico da cepa utilizada (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

A viscosidade do meio também afeta as operações unitárias envolvidas nos bioprocessos, como o escoamento do mosto por tubulações, a agitação em tanques, a adição de O_2, a centrifugação, a filtração e a secagem, entre outros. Por outro lado, na presença de "pellets" a viscosidade é menor e ocorre um comportamento mais ou menos Newtoniano (FREEMAN; LILLY, 1998), (WANG et al., 2005).

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é produtor de destruxina, um peptídeo cíclico responsável pelo controle de insetos em grãos armazenados. O tamanho do "pellet" formado influencia o rendimento da produção, sendo 2,0mm de

diâmetro estabelecido como ótimo (FENG et al., 2003). A formação de "pellet" é muitas vezes desejada por facilitar a separação sólido/líquido na fermentação e pode ser induzida em culturas submersas com a diminuição da quantidade de inóculo, da temperatura e da concentração de nitrogênio (NIELSEN, et al. 1995), (FUJITA et al., 2000).

Outro exemplo bastante comum de auto-imobilização é a habilidade que alguns microrganismos apresentam de formarem agregados com partículas sólidas encontradas naturalmente, como o solo, ou até mesmo favorecerem processos de co-imobilização de outros microrganismos. Este tipo de IC é utilizado com sucesso nos processos de biorremediação que envolvem bactérias como *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (YASUDA et al., 2003). Existem ainda os casos de co-imobilização, nos quais bactérias aeróbias e anaeróbias acabam formando agregados muito eficientes na degradação de compostos xenobióticos (PENG; BLY, 1998). A co-imobilização das microalgas *Chlorela* sp. e *Azospirillum brasilense* para remoção de fósforo de águas residuais também foi descrita na literatura, como um método eficiente de co-imobilização de bactérias que atuam na remoção de cargas elevadas de polifosfatos (HERNANDEZ; DE-BASHAN; BASHAN, 2006).

Tabela 3. Vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres na produção de bebidas.

Vantagens	**Referências**
Aumento do período de tempo da atividade e estabilidade do biocatalizador.	PILKINGTON et al., 1998.
Elimina as fases de adaptação celular e favorece processos fermentativos contínuos, diminuindo os custos e o tempo de produção.	YOO et al., 1996.
Aumento da afinidade do microrganismo pelo substrato.	BUZÁS; DALLMAN; SZAJÁNI, 1989
Aumento da tolerância à concentrações elevadas de substratos e compostos tóxicos.	JAMAI, et al., 2001.
Possibilita a fermentação em temperaturas mais baixas.	MELZOCH; RYCHTERA; HABOVA, 1994
Fácil recuperação dos produtos e separação celular do mosto.	JAMAI, et al., 2001.
Regeneração e reuso do biocatalizador sem remoção do mesmo do tanque fermentativo.	CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-GALLOT, 1994
Redução do risco de contaminação microbiológica, devido à alta concentração de células.	FREEMAN; LILLY, 1998.
Redução do tempo de maturação de alguns produtos.	KOURKOUTAS, 2001

3.5 Floculação e contenção de células microbianas em membranas

Apesar das grandes vantagens apresentadas pelos métodos de IC descritos anteriormente, a floculação e a contenção de células entre membranas também têm sido utilizadas em processos industriais. A floculação consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes. Desta maneira, a floculação pode ser considerada como uma das técnicas mais promissoras de imobilização a serem utilizadas em larga escala, devido ao grande potencial de formar agregados celulares nos reatores de leito fixo e fluidizado ou tanques com agitação (FREEMAN; LILLY, 1998).

A prática da floculação é utilizada principalmente na indústria de bebidas, uma vez que a floculação das células de *Saccharomyces cerevisiae* afeta positivamente o tempo da fermentação, facilita a remoção das células e contribui para o aumento da qualidade da cerveja.

HSU et al. (2001) descreveram os mecanismos que ocasionaram a formação de sedimentos pela *S. cerevisiae* como sendo conseqüência das interações que envolvem a composição da parede celular, o pH da solução, o O_2 dissolvido, o estado reprodutivo da célula e a composição do meio de cultura. A Tabela 3 cita as vantagens do uso de células imobilizadas na produção de bebidas.

O princípio do método de imobilização entre membranas é baseado no confinamento da célula entre duas membranas permeáveis. Pode ocorrer o engaiolamento das células em microcápsulas, contenção em membranas filtrantes ou também interação das mesmas, na superfície de dois líquidos não-miscíveis. Esta tecnologia é a mais empregada na produção de vinhos e em fermentações contínuas que requerem a reciclagem de células (KARGUPTA, 1998). A desvantagem está no uso de membranas micro-porosas que limitam a

transferência de massa, impõem resistência à passagem do fluído e aumenta o intumescimento, devido ao crescimento celular no interior da membrana (LEBEAU; JOUENNE; JUNTER, 1998).

De maneira geral, todos os métodos de imobilização induzem alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de bactérias, leveduras e fungos (WALSH; MALONE, 1995), (NORTON et al., 1995), (JUNTER; JOUENNE, 2004,), conforme os parâmetros descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros do crescimento celular microbiano que podem ser modificados pela imobilização.

Parâmetros	**Referências**
Limitação da transferência de massa por difusão.	FREEMAN; LILLY, 1998
Aumento ou diminuição da tensão superficial.	YANG et al., 1992
Efeito na pressão osmótica.	JAMAI et al., 2001
Redução da atividade de água.	WEST et al. , 2001
Dificuldades nas interações célula-célula.	PARASCANDOLA; BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006
Alterações na fisiologia e morfologia celular.	SLOKOSKA et al., 1999
Aumento ou diminuição da permeabilidade celular.	KRISHNAN et al., 2001
Diminuição da viabilidade dos nutrientes.	SRIDEVI; SRIDHAR, 1999
Crescimento de populações não-homogêneas.	SERP et al., 2000

As pesquisas envolvendo microrganismos imobilizados sugerem que os microambientes formados dentro dos hidrogéis sejam responsáveis pelas mudanças na fisiologia e no comportamento metabólico e não a natureza química ou física dos géis (JAMAI et al., 2001).

A comparação do metabolismo de células livres e imobilizadas de leveduras demonstrou que a IC conduz a uma ativação no metabolismo energético e à diminuição do estoque de polissacarídeos estruturais, resultando em alterações do crescimento celular e aumento da afinidade com os substratos (NORTON et al., 1995). A imobilização de *S. cerevisiae* também aumentou a viabilidade celular após estocagem em baixas temperaturas, por longos períodos de tempo (MELZOCH; RYCHTERA; HALOVA, 1994).

A IC também altera os parâmetros bioquímicos considerados ótimos para a produção de metabólitos desejados. BUZÁS et al. (1989) observaram que o pH ótimo para a fermentação usando células livres de *S. cerevisae* era 4,0; enquanto que para as células imobilizadas o valor ótimo de pH foi 6,8.

NORTON et al. (1995) observaram o aumento da tolerância ao etanol por células de leveduras imobilizadas e o atribuíram ao procedimento de encapsulação celular. Este aumento pode ter ocorrido por uma possível proteção da biomassa pelo gel, ou pela modificação dos ácidos graxos da membrana, devido às limitações na difusão de oxigênio. O mesmo foi observado por DALE et al. (1994) no processo de imobilização das células da levedura *Kluyveromyces maximus*.

3.6 Aplicações de microrganismos imobilizados como biocatalizadores

A IC pode ser empregada tanto na produção de metabólitos de interesse, a partir de microrganismos, quanto no uso deles como biocatalizadores, em processos "in situ". Como exemplos podem ser citados a biodegradação de compostos xenobióticos e processos de biotransformação. A característica fundamental das células imobilizadas para o uso nestes processos é a sua alta resistência à exposição a compostos tóxicos e ambientes hostis (JUNTER; JOUENNE, 2004).

A biodegradação de compostos aromáticos e não-aromáticos é geralmente realizada por fungos ligninolíticos produtores das enzimas lacase, manganês-peroxidase (MnP) e lignina-peroxidase (LiP). A IC é benéfica para estas enzimas, uma vez que alguns fatores ambientais como a agitação e a aeração afetam significativamente a sua produção (DEKKER; BARBOSA, 2001), (ROGALSKI et al., 2006), (ZHANG et al. 2005); a imobilização

também prolonga a fase de secreção destas enzimas para o meio extracelular (MOREIRA et al., 1998).

O fungo *P. chrysosporium* foi imobilizado em espuma de poliuretano e utilizado em biorreatores para oxidação de hidrocarbonetos poliaromáticos (ZHENG; OBBARD, 2002), em processos de descoloração de corantes como o poly r-478 (COUTO et al., 2000), e na degradação de organoclorados (SHIM; KAWAMOTO, 2002).

Por sua vez, o fungo *Trametes versicolor* foi imobilizado em náilon para a transformação de pentaclorofenol e 2,4-diclorofenol e houve um aumento da transformação, devido ao aumento da produção das enzimas ligninolíticas lacase e MnP, proporcionado pelas células imobilizadas (SEDARATI et al., 2003). A mineralização de pentaclorofenol e derivados foram observados nos cultivos do *P. chrysosporium* imobilizado em espuma de poliuretano (SHIM; KAWAMOTO, 2002).

Os efluentes de indústrias têxteis são usualmente tratados por meio de processos químicos e/ou físicos, os quais têm se mostrado ineficientes para a remoção da cor, além de apresentarem problemas de adoção pelas indústrias. O tratamento destes resíduos por microrganismos imobilizados tem sido estudado, com ótimos resultados de rendimento e reprodutibilidade. PARK et al. (2006) observaram que a taxa de descoloração de efluentes coloridos com células imobilizadas de *Funalia trogii*, permaneceu estável por sucessivos experimentos durante o período de 10 dias.

As bactérias também têm sido utilizadas nos processos de biodegradação. O *Bacillus* sp. foi capaz de degradar o *o*-ftalato quando imobilizado em espuma de poliuretano, visto que sua atividade catalítica continuou ativa durante 25 ciclos sucessivos (PATIL et al., 2006).

A remoção de sulfatos de águas residuais através de bactérias sulfato-redutoras imobilizadas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa

densidade e cerâmicas baseadas em alumínio, favorecem as condições anaeróbias necessárias ao desenvolvimento desses microrganismos e aumentaram a resistência desses resíduos contendo altas concentrações de sulfato (SILVA et al., 2006).

A bioconversão de fenóis e derivados é geralmente limitada pela inibição do substrato e baixas taxas de conversão. A imobilização dos microrganismos em suportes sólidos, combinada com o uso de biorreatores, permitiu a recirculação do resíduo aquoso a ser tratado, e melhorou significativamente o processo, como no caso da remoção de hidrocarbonetos policíclicos pelo *P. chrysosporium* (PAI et al., 1995), (ZHENG; OBBARD, 2002), (VIGGIANI et al., 2006).

A adsorção de metais pesados também tem sido beneficiada pelo uso de microrganismos imobilizados, visto que, em determinadas condições, o suporte também atuou como adsorvente (COSTA; FRANÇA, 1996).

Díaz et al. (2001) descreveram o uso de um consórcio de bactérias halotolerantes no tratamento de águas salinas contaminadas por derramamento de óleo. As células imobilizadas em fibras de polipropileno foram mais eficientes e apresentaram maior estabilidade, diante os incrementos de salinidade e apresentaram maior viabilidade celular e desempenho em altas concentrações de NaCl (180g/L).

Nos processos de biotransformação, a estabilidade dos suportes à presença de co-solventes como acetona ou metanol é necessária. No caso do uso de biocatalizadores imobilizados por encapsulação ou engaiolamento, o tamanho das cápsulas formadas é determinante no tempo de reação necessário para a biotransformação, considerando-se-se que cápsulas menores (raio ≈ 0,5mm) apresentaram baixa taxa de conversão do substrato (GUO et al., 2006).

Os biocatalizadores são capazes de transformar os compostos aromáticos em menor tempo, quando comparados com células livres e são capazes de tolerar altas

concentrações de substrato (VELANKAR; HEBLE, 2003). O T. versicolor foi utilizado nas transformações de pentaclorofenol (3510ppm) e 2,4-diclorofenol (2100ppm) mediadas pelas enzimas lacases e MnP, somente 5% dos compostos foram adsorvidos pela biomassa fúngica (SEDARATI et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo Botryosphaeria rhodina, isolado de eucalipto em decomposição por Barbosa e colaboradores (1996).

4.1.2 Reagentes

Os principais reagentes químicos utilizados para o preparo das soluções utilizadas para a realização dos experimentos foram de grau analítico e obtidos da Merck, Fluka, Synth, Aldrich ou Sigma.

4.1.3 Suportes

Os suportes avaliados foram duas esponjas comerciais (3M Brasil) constituídas de espuma de poliuretano (EPE) e fibra de poliuretano não-trançada (EPF), e também uma fibra acrílica comercial (SINGER-LDTA) (FAF). A determinação da porosidade dos suportes foi determinada experimentalmente, inserindo-se o suporte num tubo bem ajustado de modo a não permitir o escoamento entre a parede do tubo e o meio poroso. Um fluido newtoniano com viscosidade conhecida, no caso água destilada, foi bombeado por diferentes valores de vazão e a queda de pressão foi medida, sendo os cálculos realizados pelo método de Forscheimer/Darcy.

4.2 Métodos Gerais

4.2.1 Meios de Cultivo

4.2.1.1 Meio de batata-agar-dextrose (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

4.2.1.2 Sais de VOGEL (1956)

O meio mínimo de sais de Vogel foi preparado utilizando-se:

Na_3 citrato 5.H_2O	150,0 g
KH_2PO_4 anidro	250,0 g
NH_4NO_3 anidro	100,0 g
$MgSO_4$ 7.H_2O	10,0 g
$CaCl_2$ 2. H_2O	5,0 g
Solução de Elementos Traços	5,0 mL
Solução de Biotina	2,5 mL

A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina em 50 mL de água destilada. O volume final foi completado para 1 litro e o pH foi acertado para 5,8

com ácido fosfórico ou sulfato de amônio. Para preparar os meios de cultivo, esta solução foi diluída 50 vezes em água destilada.

a) Preparo da Solução de Elementos Traços:

Ácido cítrico	5,0 g
$ZnSO_4$ 7.H_2O	5,0 g
$Fe(NH_4;SO_4)_2$ 6.H_2O	1,0 g
$CuSO_4$ 5.H_2O	0,25 g
$MnSO_4$.H_2O	0,25 g
H_3BO_3 anidro	0,25 g
Na_2MoO_4 2.H_2O	0,25 g

O volume final da solução de elementos traços foi completado para 100 mL, sob agitação constante à temperatura ambiente.

4.2.1.3 Meio de Vogel-glucose-agar (VGA)

Solução de Vogel	20 mL
Glucose	10 g
Agar	20 g
Água destilada	1000 mL

4.2.2 Manutenção dos Microrganismos

O fungo Botryosphaeria rhodina tem sido mantido em meio BDA inclinado a 4°C, com repiques trimestrais.

4.2.3 Preparo d inóculo do *Botryosphaeria rhodina*

Para o preparo do inóculo, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo meio mínimo de sais de VOGEL (1956), agar (20 g/l) e glucose (10 g/l), codificado como VGA, as quais foram incubadas durante 5 dias a 28°C em estufa bacteriológica. Pequenas porções de hifas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (125 ml), contendo 25 ml de meio de Vogel e 5 g/l de glucose como fonte de carbono. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm, 28 °C durante 48 horas. Em seguida, os micélios foram homogeneizados em um micro-processador construído junto ao Depatameno de Engenharia de alimentos, centrifugados (10 minutos a 7000xg) e as células sedimentadas foram ressuspensas em uma solução de salina fisiológica estéril. A referida solução foi diluída até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

4.2.4 Imobilização das células de *Botryosphaeria rhodina* nos diferentes suportes

Os suportes foram previamente lavados com água destilada sob agitação constante, na temperatura de 100 °C durante 90 minutos, com trocas sucessivas de água. Após este período, os suportes foram mantidos em estufa a 70 °C até peso constante. Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, contendo o suporte (1 x 0,5 x 0,5 cm), meio de Vogel e 5 g/l de glucose como fonte de carbono. Cada frasco foi inoculado com 1 ml da solução do homogeinato de células previamente descrita no item anterior. Os frascos foram mantidos sob agitação constante a 150 rpm e 28 °C durante 54 horas.

4.2.5 Preparo do Inoculo usando esferas de Agar

O microrganismo foi transferido para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel, 1% (p/v) de glucose e 2% (p/v) de agar. As placas foram incubadas durante 5 dias a 28 ± 2°C em estufa bacteriológica. Após este período, foram retirados discos de 0,7 cm de diâmetro e transferidos para frascos de Erlenmeyer, com a finalidade de realizar os cultivos em meio líquido.

4.2.6 Fermentação submersa do *Botryosphaeria rhodina* com células livres e imobilizadas

Para realizar a comparação da produção de lacases pelas células do Botryosphaeria rhodina livres e imobilizadas o microrganismo foi cultivado em fermentação submersa e avaliado quanto à viabilidade celular e produção de lacases constitutivas e indutivas. Frascos de Erlenmeyer de 125 ml, contendo meio mínimo de Vogel e glucose 10 g/l, foram inoculados com 1 ml do homogeinato de células obtidos de acordo com o Item 4.2.3 (condição de cultivo com células livres) ou com um suporte contendo células de B. rhodina preparados de acordo com o item 4.2.4 (condição de cultivo com células imobilizadas). Os cultivos foram realizados em duplicatas, na ausência e na presença do indutor álcool veratrílico. Os frascos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm e 28 °C durante 300 horas para a avaliação do perfil de crescimento microbiano e 4,5 dias nos demais experimentos. Após este período, os cultivos foram interrompidos e os sobrenadantes foram coletados sob banho de gelo a 4 °C em ambiente estéril, sendo utilizados para as determinações analíticas.

4.2.7 Análise morfológica através de microscopia ótica

Os fragmentos do fungo Botryosphaeria rhodina crescido no suporte de poliuretano foram fixados em historresina em glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2%, em tampão 0,1 M, pH 7,4 por 3 horas a 4ºC. A seguir, foram desidratados em soluções crescentes de etanol (Merck-Germany), pré-infiltrados em uma mistura de etanol a 100% e resina historresina (LEICA), em partes iguais, durante 4 horas, a temperatura ambiente. Após, foram infiltrados em historreina pura, por 16 horas e, então mantidos em moldes até a polimerização. Os cortes de 10μm foram obtidos em ultra micrótomo (LEICA-Austria), corados em azul de toluidina a 1% (Electron Microscopy Sciences, USA), em borato de sódio, (Merck Germany) a 1% as fotomicrografias foram obtidas em microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de morfologia, IBICEL-UNESP de São José do Rio Preto, SP.

Os fragmentos do fungo Botryophaeria rhodina, em crescimento no suporte de poliuretano foram fixados em glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2%, em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4, por 3 horas, a 4ºC. A seguir foram desidratados em soluções crescentes de etanol (Merck-Germany), e diafanizados em óleo de cedro (Electron Microscopy Scince – USA), durante 5 dias, a temperatura ambiente. Após, foram empregados em parafina a 60ºC, por 2 horas e, então incluídos em moldes com parafina a 60ºC. Os cortes de 8 a 10 μm foram obtidos em micrótomo (Reichert-Jung), corados em hematoxilina e eosina (Merck-Germany). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de morfologia, , IBICEL-UNESP de São José do Rio Preto, SP.

4.2.8 Determinação de Atividades Enzimáticas

4.2.8.1 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada de acordo com Barbosa e colaboradores (1996), através do uso do substrato ABTS (ácido 2,2¹-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). O volume final do ensaio enzimático foi igual a 1 ml, sendo que o sistema de incubação foi constituído de 50 µl de ABTS (50 mM), 150 µl de Tampão McIlvaine (pH 3,0 – 120 mM) e solução enzimática (0,1 a 0,8 ml) diluída quando necessário. Este ensaio foi então incubado durante 5 minutos em banho-maria termostatizado a 50 °C. As leituras foram realizadas a 420 nm (ε = 36000 mol-1 cm-1). A unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade em µmoles de cada substrato oxidados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições acima descritas.

4.2.8.2 Determinação da atividade de β-1,3-glucanase

A medida da atividade de β-1,3-glucanase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados de laminarina que foi utilizada como substrato. O volume final do ensaio foi 0,5 mL, que era constituído por laminarina 0,4 % (m/v) e solução tampão acetato 25 mM (pH 5,0); à 50 °C durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µL de NaOH 1,0 M. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada de acordo com o método do cuproarsenato descrito por SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). A unidade de atividade de β-1,3-glucanase foi definida como o número de µmol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

4.2.9 Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método do cuproarseniato descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944). O método de Somogyi-Nelson consiste na formação de óxido cuproso a partir da redução do reativo de Somogyi pelos açúcares redutores presentes nas amostras. Na presença do reativo de Nelson ocorre a formação de um complexo de cor azul estável de óxido de molibdênio.

4.2.10 Determinação de Açúcares Totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956). O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural a partir de hexoses ou furfural, a partir de pentoses, pela presença do ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol, formando um complexo de cor amarela.

4.2.11 Determinação de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas extracelulares foi efetuada através do método de Bradford (1976). Este ensaio é baseado na ação do corante Coomassie Brilhante Azul G-250 (CBAG). O CBAG se liga a alguns resíduos de aminoácidos da estrutura protéica formando um complexo com absorção máxima em 595 nm (azul). O corante não complexado com a proteína, devido o meio reacional ácido, permanece na forma catiônica com uma absorção em 470 nm (vermelho).

4.2.12 Determinação da Biomassa Fúngica

A biomassa foi determinada por gravimetria, através de secagemda biomassa final produzido no cultivo, em estufa a 70°C até peso constante. O valor final foi descontado o peso do inóculo, que foi iniciado o cultivo.

4.2.13 Determinação do exopolissacarídeo (EPS

Para a quantificação do EPS, 10mL do sobrenadante de cada meio de cultivo foi tratado com três volumes de etanol P.A., separadamente. O EPS precipitado foi filtrado a vácuo, em funil de Büchner com papel de filtro previamente seco em estufa e pré-tarado. O EPS foi determinado após secagem em estufa a 70°C até peso constante.

4.3 Otimização da produção de Lacase

Foi realizado um planejamento fatorial tipo 3^3, com o delineamento mostrado na Tabela 5., e tendo como variáveis a concentração de AV, quantidade de inóculo e o tempo de fermentação, codificadas de acordo com a Tabela 6.

Tabela 5. Desenho experimental 33 para a otimização da produção de lacases por células livres.

Experimentos	[AV] (x_1)	Inóculo (x_2)	Tempo (x_3)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	1
7	-1	1	-1
8	-1	1	0
9	-1	1	1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	1
13	0	0	-1
14	0	0	0
15	0	0	1
16	0	1	-1
17	0	1	0
18	0	1	1
19	1	-1	-1
20	1	-1	0
21	1	-1	1
22	1	0	-1
23	1	0	0
24	1	0	1
25	1	1	-1
26	1	1	0
27	1	1	1

Tabela 6. Codificação das variáveis utilizadas no desenho experimental 3^3.

		Variáveis Codificadas		
		-1	0	1
Concentração de AV (mM)	(x_1)	1	18	35
Quantidade de inoculo (mL)	(x_2)	1	3	5
Tempo (horas)	(x_3)	72	108	144

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de um suporte adequado para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina*

O presente trabalho buscou selecionar um suporte sintético barato que apresentasse características físico-químicas adequadas para uma imobilização eficiente das células do *B. rhodina*, visando o aumento da produção de lacases pelo microrganismo. Foram avaliados três suportes disponíveis comercialmente: 1) Fibra Acrílica Fina (FAF), constituída de uma manta acrílica fina, comercializada pela empresa SINGER-LDTA; 2) Espuma de Poliuretano Expandido (EPE) (Scotch-Brite), que consiste de um material não fibroso, comercializada pela 3M do Brasil LTDA e 3) Espuma de Poliuretano Fibroso (EPF) (Buf-Puf Facial) a qual consiste num suporte de Poliuretano na forma de fibra não-trançada, também comercializada pela 3M do Brasil LTDA.

A permeabilidade é uma propriedade que envolve o arranjo e a distribuição das fibras ou poros na estrutura de um corpo não-compacto, o que é o caso dos suportes sólidos porosos utilizados nas técnicas de imobilização celular por adsorção. Densidade e porosidade são características importantes para esta classe de imobilização e o conhecimento destas características físicas dos suportes permite a determinação do espaço livre de cada matriz e da capacidade de armazenamento das células microbianas. Porém, deve-se considerar também que as células adsorvidas na matriz estão sujeitas à mudanças do metabolismo celular e também podem acumular-se sobre a superfície, limitando a transferência de massa e promovendo a dispersão de micélios no meio de cultivo (Freeman e Lilly, 1998). As características individuais de cada matriz quanto à porosidade e densidade real e aparente estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7. Características físicas dos diferentes suportes avaliados para imobilizar as células do *Botryosphaeria rhodina*.

Características físicas	**FAF***	**EPE***	**EPF***
Densidade real (g/cm^3)	0,45	0,38	0,25
Densidade aparente (g/cm^3)	0,008	0,015	0,011
Porosidade Darciana (m^2)	$3{,}42\times10^{-5}$	$1{,}65\times10^{-7}$	$1{,}65\times10^{-11}$

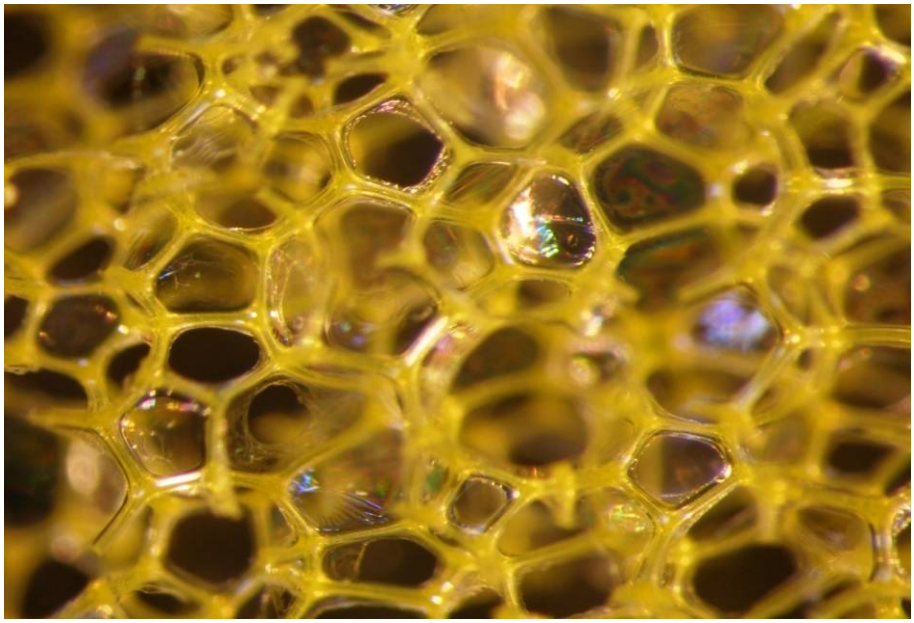
FAF = Fibra Acrílica Fina; EPE= Espuma de Poliuretano Expandido; EPF= Espuma de poliuretano Fibroso

Para a imobilização das células do ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foram utilizados os diferentes suportes, separadamente, de acordo com o procedimento descrito no item 4.4.

Foram realizados testes de inércia química, mostrando que todos os suportes avaliados, apresentaram uma elevada resistência ao ataque de ácido (2M) a quente como: HCl, H_3PO_4 e H_2SO_4. Também se mostraram resistententes em álcali (5M) a quente como NaOH, KOH. Isto foi importante porque mostrou que todos os suportes foram são passíveis de regeneração após o crescimento do fungo.

A Figura 7 ilustra os dois diferentes tipos de arranjo espacial (poliédrico e fibrilar) apresentados pelas matrizes estudadas.

(A)



(B)

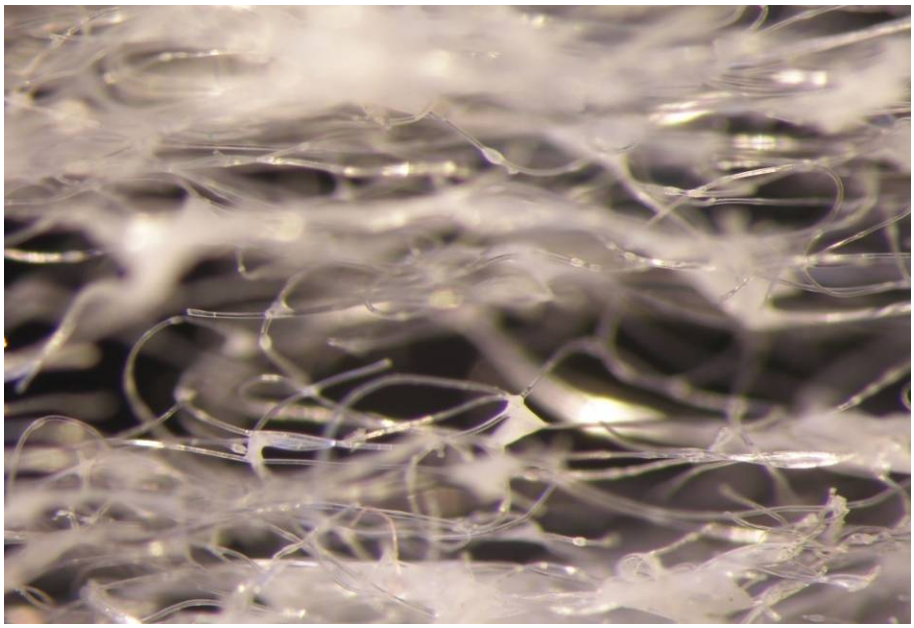


Figura 7. Análise fotográfica obtida através de lupa estereoscópica (ampliação de 30 vezes) das matrizes utilizadas. (A), Espuma de Poliuretano Expandido e (B), Espuma de Poliuretano Fibroso.

5.1.1 **Comparação da imobilização do *B. rhodina* nos suportes EPE, EPF e FAF e seleção do melhor suporte**

O rendimento da imobilização celular foi calculado pela relação gramas de biomassa fúngica/gramas de suporte e está apresentado na Figura 8.

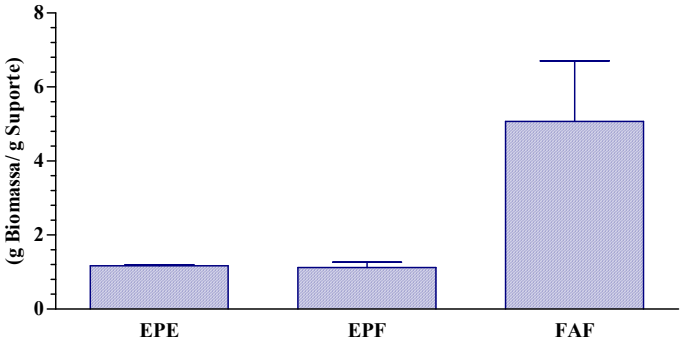


Figura 8. Rendimento do processo de imobilização celular do fungo filamentoso *Botryosphaeria rhodina* nos diferentes suportes avaliados.

O maior rendimento foi observado quando a fibra acrílica fina foi utilizada como suporte. Isto se deve ao fato de que em suportes que apresentam poros pequenos, a adsorção ocorre apenas na superfície; no entanto, quando os poros são maiores, há também a inserção das células microbinas no interior da matriz (Prasad et al., 2005). O sucesso da imobilização celular irá depender também das características morfológicas do microrganismo, e da organização das fibras do suporte selecionado.

Porém, a quantidade de biomassa presente na matriz utilizada não está diretamente relacionada ao rendimento da produção dos metabólitos de interesse. Em alguns casos o aumento da concentração celular pode levar à diminuição da produção dos mesmos, como no caso da produção de lacases pelo fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (Prasad et al., 2005).

Este comportamento está relacionado ao fato de que fungos filamentosos apresentam algumas características peculiares que influenciam diretamente no desempenho do

processo fermentativo. Assim, as mudanças na diferenciação celular causadas pelas dificuldades de transferência de massa, calor e nutrientes, podem levar a mudanças também nas transições das fases de metabolismo primário e secundário, modificando todo o comportamento da cinética de produção de enzimas e outros metabólitos pelo microrganismo (Znidarsic e Pavko, 2001).

De acordo com as análises de microscopia óptica, o crescimento do fungo *Botryosphaeria rhodina* em fibra acrílica não foi uniforme e apresentou uma distribuição da biomassa fúngica heterogênea, a qual pode ser visualizada na Figura 9, que mostra aglomerados de células filamentosas pontuais. Este tipo de desenvolvimento microbiano restringiu a escolha deste suporte, uma vez que houve o acúmulo de células no interior da matriz, o que afetaria sua estrutura e suas propriedades mecânicas, desfavorecendo a produção e secreção de metabólitos pelo *B. rhodina*, conforme discutido por Freeman e Lilly (1998), sobre a viabilidade de células microbianas imobilizadas.

Devido a relatos da literatura e aos conhecimentos previamente adquiridos sobre a fisiologia do *B. rhodina*, o método de adsorção foi escolhido para o desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que o tipo de suporte utilizado foi mais estável aos componentes do meio de cultivo e às mudanças dos parâmetros físico-químicos das condições de cultivo (Pai et al., 1995; Yoo et al., 1996; Devi e Srodhar, 2000).

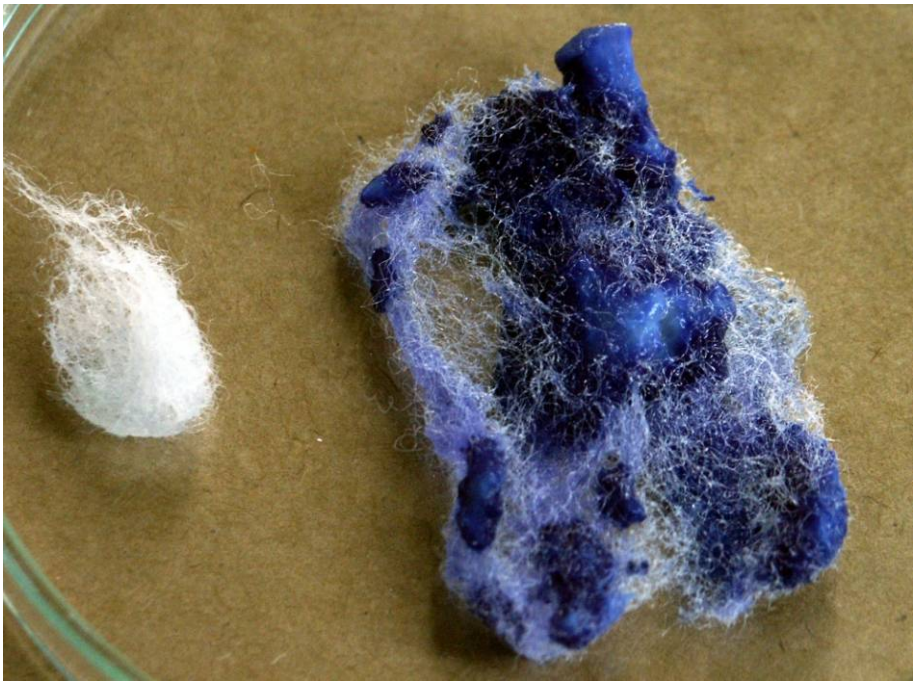


Figura 9. Fotografia do suporte de fibra acrílica fina antes e depois do crescimento do microrganismo após tratamento com solução aquosa de bromofenol 0,01%.

A análise por microscopia óptica da espuma de poliuretano expandido contendo as células imobilizadas do *B. rhodina* revelou que o crescimento do fungo foi superficial, favorecendo a formação de um biofilme ao redor do suporte (Figura 10), o que seria esperado devido à baixa porosidade da espuma (Prasad et al., 2005) e por ser este microrganismo produtor de EPS.

A formação de biofilmes sobre a superfície do suporte dificulta a absorção de nutrientes do meio resultando em condições heterogêneas de crescimento celular. Os produtos secretados para o meio extracelular têm também sua difusão dificultada e a troca gasosa também pode ficar comprometida (Xavier et al., 2003).

Figura 10. Fotografia do suporte de poliuretano antes e ápós o crescimento do *B. rhodina* seguido do tratamento com solução aquosa de bromofenol 0,01%.

O acúmulo de micélios fúngicos na superfície de EPE pode ser melhor visualizado na Figura 11. A região em destaque (A) corresponde à parte externa do suporte, onde pode se observar uma maior concentração celular, correspondente à formação do biofilme. A região (B), correspondente à parte interna, apresentou uma redução significativa das células devido ao baixo crescimento microbiano.

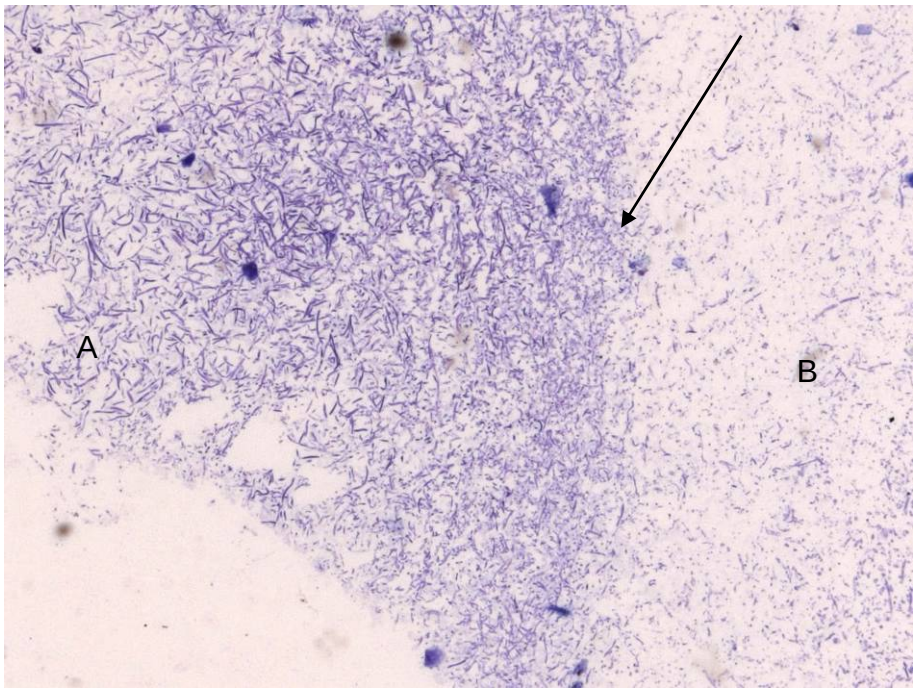


Figura 11. Microscopia óptica (ampliação de 60 vezes) do suporte de poliuretano mostrado na Figura 10 onde o fungo foi corado com azul de metileno. Foi feito um corte transversal que mostra em (A) a região externa e em (B) a região interna do suporte. A seta indica o limite do biofilme formado.

A melhor distribuição de biomassa fúngica foi observada na espuma de poliuretano fibroso (EPF), escolhida como suporte para a imobilização celular do *B. rhodina*. Esta escolha foi baseada na disdribuição homogênea da biomassa, conforme mostrado nas Figuras 12, 13 e 14

A EPF vem sendo empregada como suporte nos processos de imobilização celular de fungos filamentosos, com sucesso, por apresentarem porosidade e leveza mais adequadas para o crescimento destes microrganismos, e também pela ausência de limitações na transferência de massa quando comparados com outros suportes (Vassilev et al., 1997; Kim; Shoda, 1999; Wang et al., 2005).

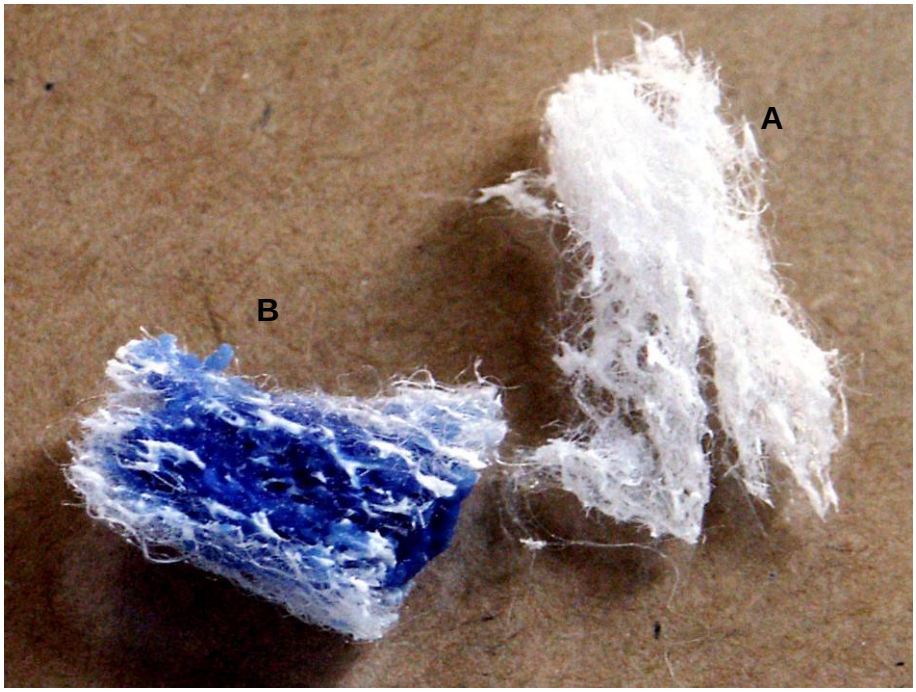


Figura 12. Fotografia dos suportes de poliuretano antes e após o crescimento do *B. rhodina* tratados com solução aquosa de bromofenol 0,01%. (A) Controle do suporte sem fungo, (B) Suporte com o fungo

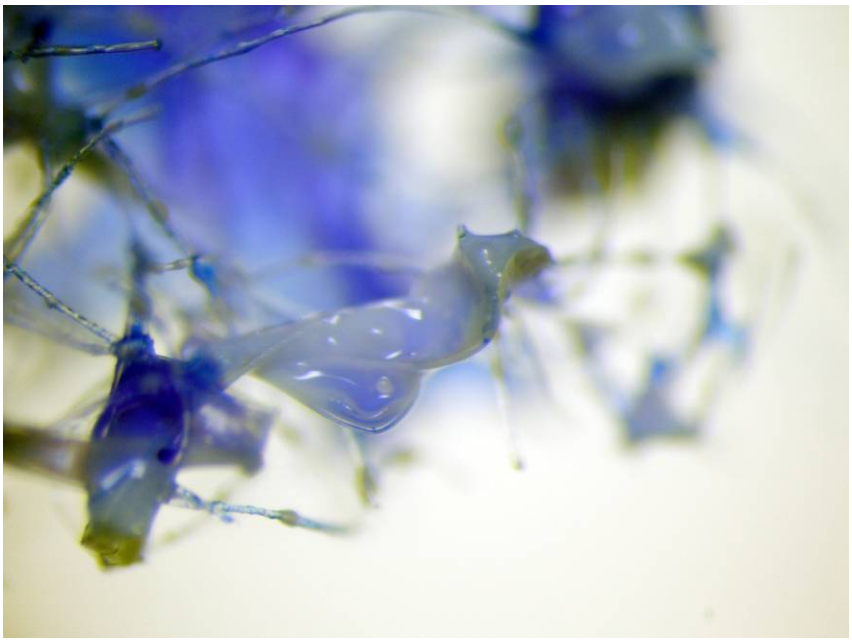


Figura 13. Análise fotográfica obtida através de lupa estereoscópica (ampliação de 30 vezes) da matriz de poliuretano, após o crescimento do *B. rhodina*. Observação à fresco, corado do solução de bromofenol a 0,01 %.

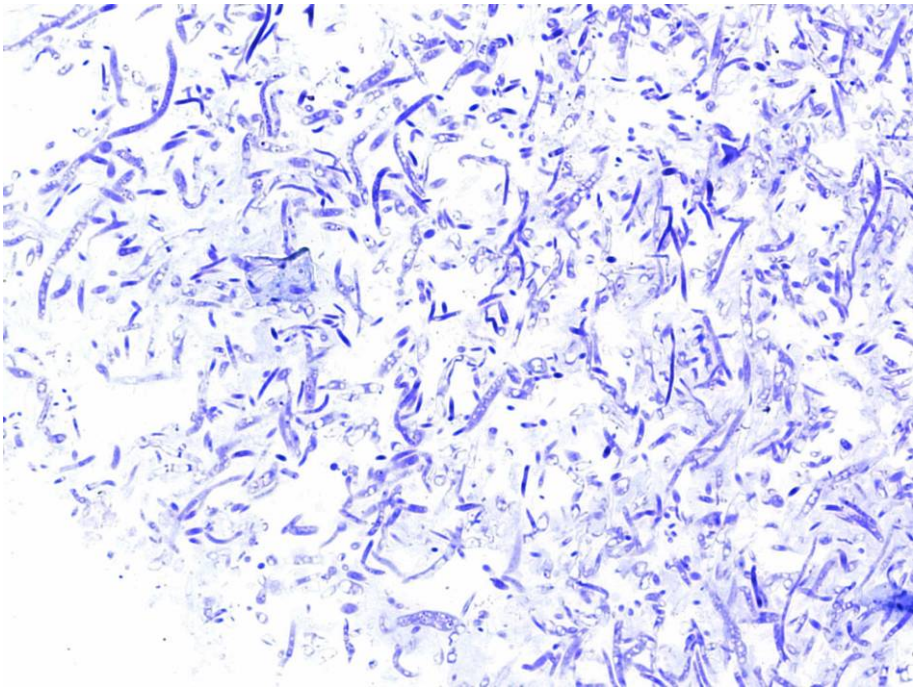


Figura 14. Microscopia óptica (ampliação de 60 vezes) do suporte de poliuretano, após o crescimento do *B. rhorina*. Tratamento com parafina histológica, tratado com solução de azul de metileno 0,05%.

Na Figura 8 pode ser observado um crescimento homogêneo do *B. rhodina*, visto que não houve diferença de concentração celular nas regiões internas e externas do suporte, conforme observado anteriormente na Figura 11.

A Figura 15 mostra a hifa do *B. rhodina* imobilizada na espuma de poliuretano fibroso (EPF), por microscopia eletrônica. Pode ser observado que houve aderência da hifa (A) à EPF (B). Outro detalhe importante foi também revelado pela microscopia eletrônica, ou seja, a camada de EPS que envolveu tanto a hifa como o suporte EPF. Esta interação pode aumentar tanto a resistencia mencânica como a eficiencia da imobilização, que são parâmetros desejáveis para a escolha de um suporte para imobilizar célula microbiana (Tolstoguzov 2004).

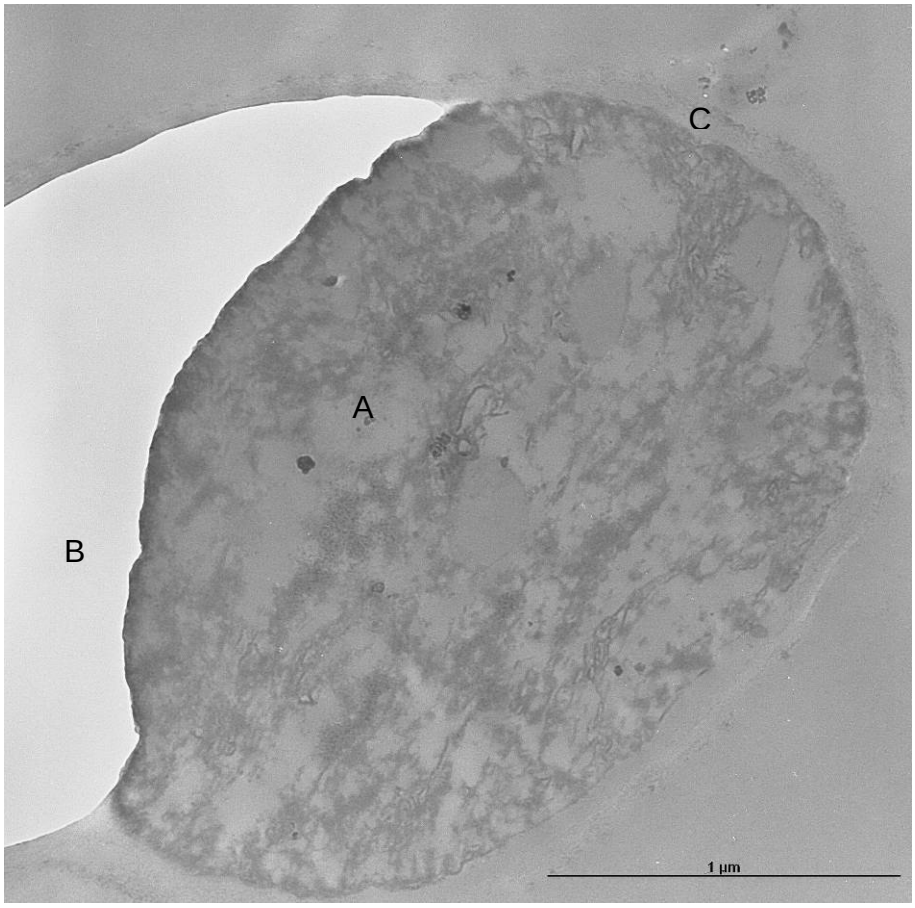


Figura 15. Análise de microscopia eletrônica da matriz de poliuretano após o crescimento microbiano. A=Corte transversal da hifa do fungo *B. rhodina*; B=fibra de poliuretano em contato com o microrganismo; C= Camada de EPS produzido pelo fungo *B. rhodina* recobrindo a hifa e a fibra.

5.2 Comparação da produção de lacases por *Botryosphaeria rhodina* em células livres e imobilizadas em EPF, na ausência de álcool veratrílico

A imobilização celular pode resultar em mudanças no metabolismo microbiano e apresentar alterações nas fases de crescimento e produção de metabólitos primários e secundários (Dominguez et al., 2001; Prasad et al., 2005). Portanto, neste trabalho foram avaliados alguns parâmetros do metabolismo do fungo *B. rhodina* antes e após o processo de imobilização em espuma de poliuretano.

O perfil de crescimento e produção de lacase constitutiva pelo *Botryosphaeria rhodina* cultivado em meio basal durante 300 horas foi avaliado através da quantificação da biomassa fúngica, determinação da atividade de lacase no decorrer do tempo. Também foram quantificadas as proteínas extracelulares, o pH do ECF (fluído extracelular) e consumo de glucose. A determinação dos açúcares totais permitiu avaliar se houve produção de EPS pelo fungo, enquanto que a dos açúcares redutores favoreceu avaliar o metabolismo considerando-se que a glucose foi a única fonte de carbono utilizada. Estes resultados podem ser observados na Figura 16.

De acordo com os resultados da Figura 16, observa-se que após 48 horas de cultivo o *B. rhodina* atingiu a fase estacionária de crescimento, a qual foi acompanhada de uma queda significativa do pH, que diminuiu de 5,9 para 3,8. Após o período de 4 dias (96 horas), o valor do pH permaneceu estável na faixa entre 6,0 e 6,5. Queda semelhante de pH tem sido observada nos cultivos de fungos produtores de EPS, como o *Aureobasidium pullulans*, produtor de uma α-(1→3;1→6)-glucana denominada pululana. Carolan e colaboradores (1976) observaram que para este fungo, o carbono 1 da glucose é transformado em CO_2, promovendo, desta forma, uma rápida queda do pH pela formação de ácido carbônico no início da fermentação. Para este microrganismo, o metabolismo dos açúcares

seguida da formação de etanol também contribuiu para a diminuição do pH, o qual aumentou no final da fermentação, provavelmente devido a um aumento da transferência da quantidade de O_2 dissolvido.

Provavelmente a queda do pH durante a fase exponencial do B. rhodina seja também devido à formação de ácido carbônico como explicado acima para o A. pululas, visto que o *B. rhodina* é produtor de uma β-glucana.

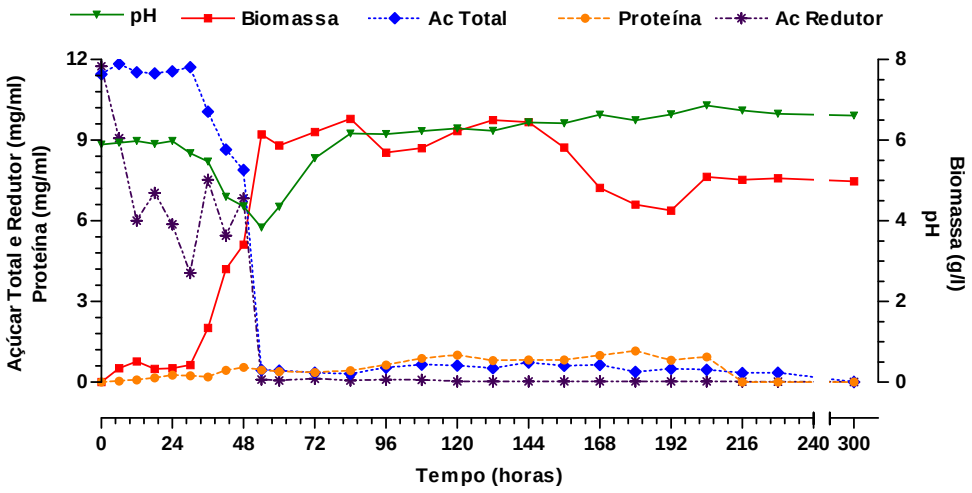


Figura 16. Perfil do crescimento das células livres do *B. rhodina* cultivado em glucose (10 g/L) durantes 300 horas.

A produção de EPS ocorreu durante o cultivo do *B. rhodina* concomitantemente com a produção de lacase (Figura 17). A atividade máxima de lacase foi detectada em 120 horas de cultivo (0,86 U/ml) enquanto que o pico de produção de EPS ocorreu em 108 horas de cultivo (2,7 g/l). Durante este período não foram detectados açúcares redutores residuais no sobrenadante do meio de cultivo. Em alguns fungos basidiomicetos, como o *P. ostreatus*, a atividade máxima de lacase constitutiva ocorreu na fase de crescimento exponencial microbiano (Prasad et al., 2005), o que não foi observado para o *B. rhodina* no presente trabalho.

A produção de EPS silmutaneamente com a secreção de lacases também foi descrita para o fungo *Agaricus* sp. Acredita-se que este fato esteja relacionado com mecanismos de proteção do micélio, contra espécies moleculares altamente reativas e tóxicas produzidas pelo fungo durante a fase ligninolítica. Outra hipótese relatada seria que o EPS protegeria o fungo dos produtos gerados pela ação das lacases e peroxidases sobre a lignina (Kaluskar et al., 1999).

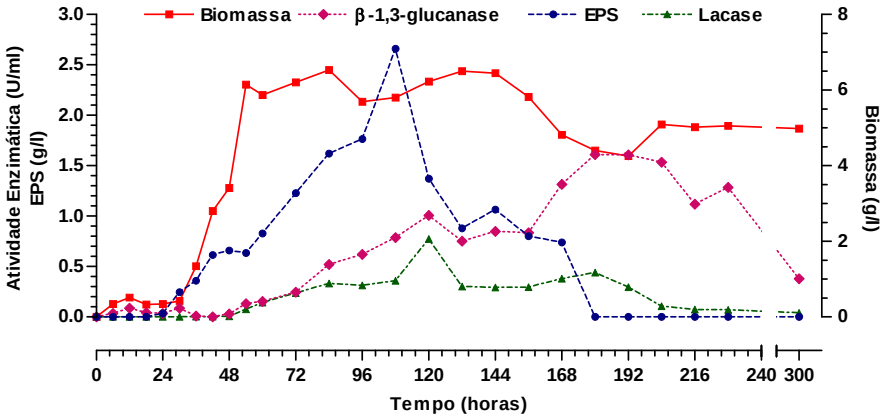


Figura 17. Perfil de crescimento do *B. rhodina*, produção de lacases, β-1,3-glucanases e EPS pelas células livres deste fungo cultivado em glucose (10 g/L) durantes 300 horas.

Após 168 horas de cultivo, pode ser observado que o EPS e a atividade de lacase não foram mais detectados no meio extracelular. Entretanto, houve um aumento da produção de β-1,3-glucanases. Estas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de β-1,3-glucanas extracelulares, que constituem uma reserva energética para o fungo, após o cunsumo da fonte de carbono do meio de cultivo (Rapp, 1989). A produção de β-1,3-glucanases pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* e sua ação hidrolítica sobre o EPS botriosferana foram descritos recentemente por Giese e colaboradores em 2005 e 2006.

De acordo com o perfil de crescimento, observou-se que o *B. rhodina* metabolizou a glucose livre usada como única fonte de carbono, durante a sua fase de crescimento exponencial. Em seguida, houve uma depleção da concentração de glucose e um

aumento na produção de EPS e de lacase, coincidindo com o início desta fase. Após este período, o microrganismo passou a secretar maior quantidade de β-1,3-glucanases (1,5 U/ml), que promoveram a hidrólise do EPS, e conseqüentemente, o seu desaparecimento do meio extracelular. Comportamento metabólico semelhante foi observado para o fungo filamentoso *Sclerotium glucanicum* (Rapp, 1989).

Como citado anteriormente, os processos fermentativos que envolvem células microbianas imobilizadas têm sido freqüentemente utilizados por possibilitarem uma maior produção de metabólitos, devido às mudanças causadas no comportamento bioquímico do microrganismo imobilizado (Junter e Jouenne, 2004). A Figura 18 mostra o perfil do crescimento do *B. rhodina* imobilizado em espuma de poliuretano, previamente selecionada como suporte neste trabalho.

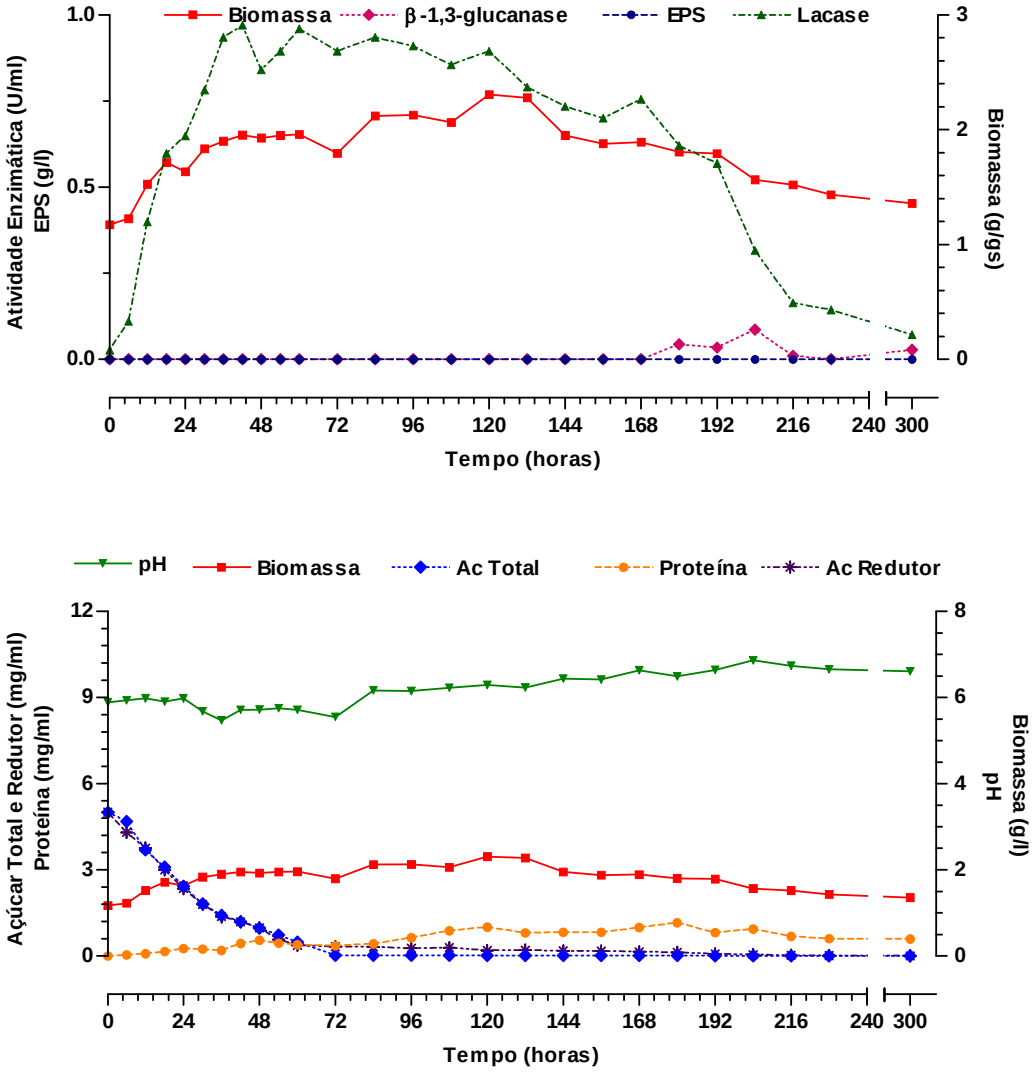


Figura 18. Perfil do crescimento do fungo *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase pelas células imobilizadas em espuma de poliuretano fibroso (EPF) cultivado em glucose (5 g/l), durante 300 horas.

O metabolismo do fungo *B. rhodina* foi alterado significativamente com o uso das células imobilizadas. Considerando-se que o processo de imobilização celular foi realizado pelo contato das células livres com o suporte, por 72 horas, antes de se iniciar a fermentação, as fases lag e exponencial do crescimento microbiano não foram observadas. Também não houve mudanças nos valores de pH durante as 300 horas de cultivo.

A quantidade inicial de biomassa fúngica adsorvida na espuma de poliuretano era equivalente a 1,2g. Após 24 horas, houve um pequeno aumento do peso seco para aproximadamente 2,3g, o qual foi acompanhado pelo consumo de glucoe presente no meio. Provavelmente, este aumento foi devido à produção de EPS pelo *B. rhodina*, o qual permaneceu aderido às células microbianas, formando um biofilme, como foi observado na Figura 15, uma vez que o EPS não foi detectado no meio de cultivo.

A atividade máxima de lacase foi detectada após 36 horas de cultivo (1,1 U/ml), permanecendo constante (1,1 ±0,5 U/ml) durante 84 horas (3,5 dias). Portanto, a produção de lacase pelas células imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina* foi contínua, e após vários dias de cultivo, os níveis presentes no meio extracelular foram até 80% maiores do que os valores detectados nos cultivos desenvolvidos com células livres. Esta constitui uma característica muito importante para a produção de enzimas por microrganismos imobilizados. A atividade de lacase decresceu à medida que foi iniciada a secreção de β-1,3-glucanases para o meio, em 8,5 dias.

A produção de lacases pelo basidiomiceto *Coriolopsis rigida* aumentou significativamente quando este microrganismo foi imobilizado neste mesmo tipo de suporte matriz (Saparrat et al., 2002). A produção de manganês-peroxidase por micélios livres e imobilizados de *Nematoloma frowardii* utilizando-se espuma de poliuretano como suporte, também demonstrou que com as células imobilizadas a atividade enzimática foi maior (1,69 vezes) do que os cultivos com células livres (Rogalski et al., 2006).

A grande vantagem da imobilização celular para a produção de lacases tem sido a possibilidade de produção contínua e eficiente destas enzimas, por um longo período de tempo. Quando se utilizam células livres, ocorre um pico de atividade enzimática e, no caso do uso de microrganismos imobilizados há um platô de atividade, que pode durar mais tempo

(Dominguez et al., 2001; Prasad et al., 2005). A Figura 19 mostra a comparação do perfil de produção de lacases pelo *B. rhodina* com células livres e imobilizadas.

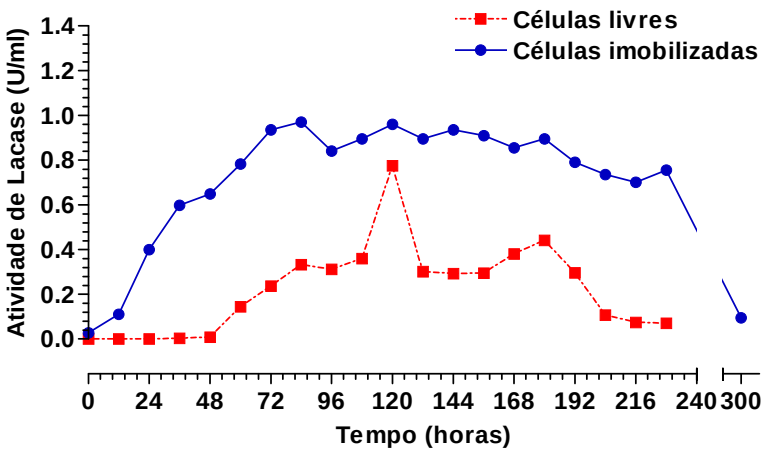


Figura 19. Comparação da produção de lacases por células livres e imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina*, cultivado em glucose (10 g/l), durante 300 horas.

Pelos resultados da Figura 19 pode-se constatar que a produção de lacase foi antecipada, houve uma produção exponencial a partir de 12 horas de cultivo, além de manter o platô de atividade durante vários dias consecutivos (cerca de 10 dias) e a queda de atividade ocorreu aproximadamente 44 horas após a queda de atividade da produção com células livres.

5.3 Comparação da produção de lacases por *Botryosphaeria rhodina* com células livres e imobilizadas em EPF, na presença de álcool veratrílico

Diferentes tipos de inóculo têm sido utilizados para a produção de lacases: suspensão de esporos (Eggert et al., 1996), micélios fúngicos (Palmieri et al., 2003), homogeinato de células (Pointing et al., 2000), e esferas de agar colonizadas com hifas fíngicas (Soden e Dobson, 2001).

As esferas de agar colonizadas com hifas fúngicas têm sido utilizadas para a produção de lacases pelo *Botryosphaeria rhodina* (Barbosa et al., 1995; Barbosa et al., 1996; Vasconcelos et al., 2000). Quando utilizado este tipo de inóculo, o *Botryosphaeria rhodina* tolerou concentrações elevadas de álcool veratrílico (AV), até 100 mM (Dekker e Barbosa, 2001). Constatou-se que dependento da concentração deste álcool no meio de cultivo, também aumentou a produção de lacase. Vasconcelos e colaboradores otimizaram a produção de lacase adicionando-se AV e verificaram que a maior produção ocorreu em 4,5 dias de cultivo, com 30,4 mM de AV (Vasconcelos et al., 2000).

Porém, neste trabalho, quando foi utilizado um homogeinato de células como inóculo, o *Botryosphaeria rhodina* não cresceu na presença dos 30,4 mM de AV. afetou negativamente o desenvolvimento microbiano e conseqüentemente, a produção de lacases. A Figura 20 mostra a comparação dos níveis de produção de lacase pelo *Botryosphaeria rhodina* cultivado na ausência e na presença de AV nas concentrações de 10 e 30, 4 mM, utilizando-se como inóculo as esferas de agar colonizadas com micélios e o homogeinato de células descrito na item (4.2.5) deste trabalho.

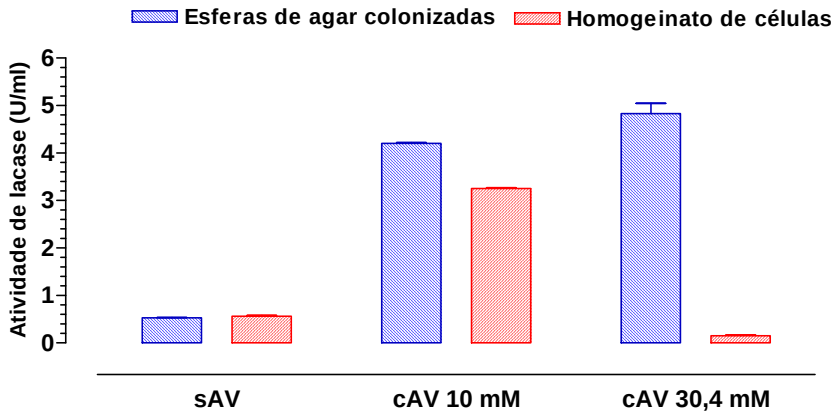


Figura 20. Comparação da produção de lacases pelo *Botryosphaeria rhodina* utilizando-se dois tipos de inóculo.

A grande diferença tanto do crescimento quanto da produção de lacases pelo *Botryosphaeria rhodina*, dependendo do tipo de inóculo utilizado no meio de cultivo está relacionado à toxicidade do AV. Este parece ser mais tóxico para as hifas fúngicas rompidas durante o processo de homogeneização no "blender", do que para as hifas intactas do inoculo com as esferas de agar. Esta sensibilidade à altas concentrações de AV foi descrita na literatura para alguns basidiomicetos, que apresentaram um aumento na produção de lacase quando foram cultivados na presença de concentrações mais baixas de compostos aromáticos indutores (Eggert et al., 1996; Soden e Dobson, 2001).

Portanto, optou-se por desenvolver novos experimentos para determinar a concentração de AV que poderia ser utilizada para a produção de lacases por células livres, utilizando-se um homogeinato de céluas de *B. rhodina*. Para isto foi realizado um planejamento estatístico, baseado no delineamento 3^3, exposto no item 4.3

Os termos lineares e quadráticos para a variável quantidade de inóculo foram descartados por não serem significativos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, o intercepto foi significativo indicando que o ponto central (concentração de AV de 18 mM, 4,5 dias de cultivo e inóculo de 3 ml) foi escolhidos adequadamente.

Tabela 8. Análise dos fatores e suas interações na produção de lacases por céluas livre do B. rhodina, na presença de AV.

	Coeficientes	Desvio Padrão	t	*p*
Intercepto	4,71978	0,406276	11,6172	0,000000
[AV](L)	-0,27450	0,188069	-1,4596	0,159938
[AV] (Q)	-3,78950	0,325745	-11,6333	0,000000
Inóculo (L)	0,02194	0,188069	0,1167	0,908275
Inóculo (Q)	-0,04483	0,325745	-0,1376	0,891907
Tempo (L)	0,60367	0,188069	3,2098	0,004397
Tempo (Q)	-0,91867	0,325745	-2,8202	0,010574

[AV]= concentração de Álcool Veratrílico
(L) grau de significância linear
(Q) grau de significância ao quadrado

A análise de variância apresentada na Tabela 9, mostrou que a regressão foi significativa (p <0,05) e que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para a produção de lacases por células livres do B. rhodina, na presença de AV.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	*F* [a]	*p* [b]
(1)[AV] L+Q	87,5182	2	43,75908	68,73228	0,000000
(2)Inóculo L+Q	0,0207	2	0,01036	0,01628	0,983866
(3)Tempo L+Q	11,6231	2	5,81157	9,12821	0,001525
Erro Padrão	12,7332	20	0,63666		
Total	111,8952	26			

[a] *F* – relação (regressão/residual); [b] *p* – relação (desvio da regressão/erro padrão)

Os resultados experimentais sobre a produção de lacases por células livres do *B. rhodina* estão apresentados na Tabela 10. A maior atividade de lacase (5,5 U/ml) foi observada em 5 dias de cultivo, utlizando-se 1 ml de inóculo e 18 mM de AV.

Tabela 10. Valores experimentais da produção de lacases por células livres do *B. rhodina*, na presença de AV.

[AV] (x_1)	Inóculo (x_2)	Tempo (x_3)	Lacase (U/ml)
-1	-1	-1	0,024
-1	-1	0	0,687
-1	-1	1	0,512
-1	0	-1	0,025
-1	0	0	1,345
-1	0	1	1,013
-1	1	-1	0,028
-1	1	0	0,729
-1	1	1	0,699
0	-1	-1	1,864
0	-1	0	5,486
0	-1	1	5,034
0	0	-1	1,843
0	0	0	5,648
0	0	1	4,315
0	1	-1	1,987
0	1	0	5,534
0	1	1	4,986
1	-1	-1	0,000
1	-1	0	0,009
1	-1	1	0,012
1	0	-1	0,000
1	0	0	0,019
1	0	1	0,021
1	1	-1	0,000
1	1	0	0,015
1	1	1	0,045

O valor de r^2 representa o ajuste do modelo matemático proposto pelo método estatístico, ao conjunto de experimentos realizados. Pelo valor de r^2, pode-se observar que 87 % da variação das respostas pode ser explicada pelo modelo, ou seja, pelos fatores experimentais e suas interações. O erro padrão baixo indicou a boa reprodutibilidade dos dados experimentais.

A Figura 21 mostra a superfície de resposta obtida para a presente otimização, indicando que o ótimo de produção de lacase (preditivo) pelas células livres de *B. rhodina*, na presença de 18 mM de AV, 3 mL de inóculo, 126 horas de cultivo, a 180 rpm e 28 ° C, foi 5,64 U/ml.

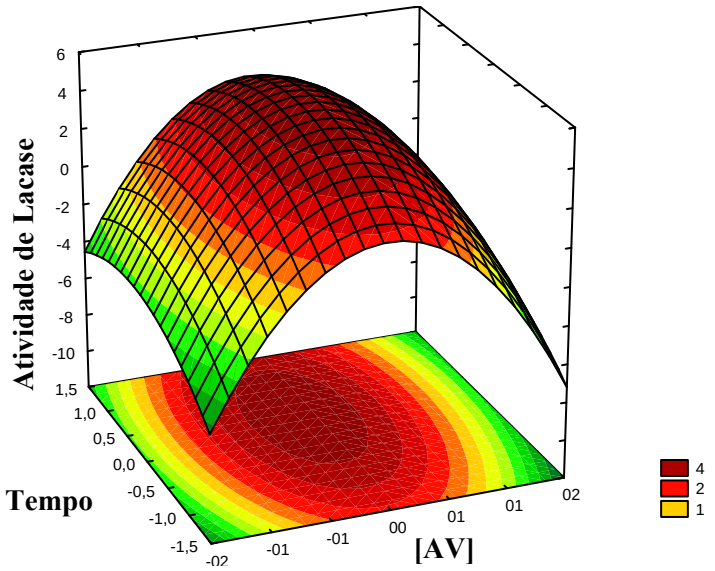


Figura 21. Gráfico de níveis para a produção de lacases por células livres do *Botryosphaeria rhodina* em função da concentração de AV, quantidade de inóculo e tempo de cultivo.

Quando Vasconcelos e colaboradores, em 2000, otimizaram a produção de lacases por células livres de *B. rhodina*, utilizaram esferas colonizadas com hifas como inóculo; chegaram a um valor preditivo de 5,6 U/mL em 4,5 dias de cultivo, e o valor observado foi 5,4 ± 0,21 U/mL, com adição de 30,4 mL de AV no tempo zero de cultivo, nas mesmas condições de temperatura e agitação utilizados neste trabalho. Portanto, pelo tipo de inóculo utilizado neste trabalho e pelos resultados de otimização aqui obtidos, observou-se que com 18 mM de AV e 6 dias de cultivo, pode-se atingir os mesmos níveis de atividade de lacase obtidos por Vasconcelos e colaboradores, indicando ser este o potencial de produção de lacase pelo *B. rhodina*, na presença de AV. Porém, foi vantajoso o inóculo utilizado neste trabalho porque utilizou-se12,4 mM a menos de AV, para obter-se os mesmos níveis de produção de lacases, embora em 1,5 dia de cultivo à mais.

Para validar o experimento de otimização de lacase por células livres do *B. rhodina*, na presença de AV, bem como comparar com o perfil de crescimento e produção de lacase apresentados nas Figuras 16 e 17, o fungo foi cultivado durante de 300 horas, na

presença de 18 mM de AV.Os parâmetros avaliados foram os mesmos anteriores e estão apresentados na Figura 22.

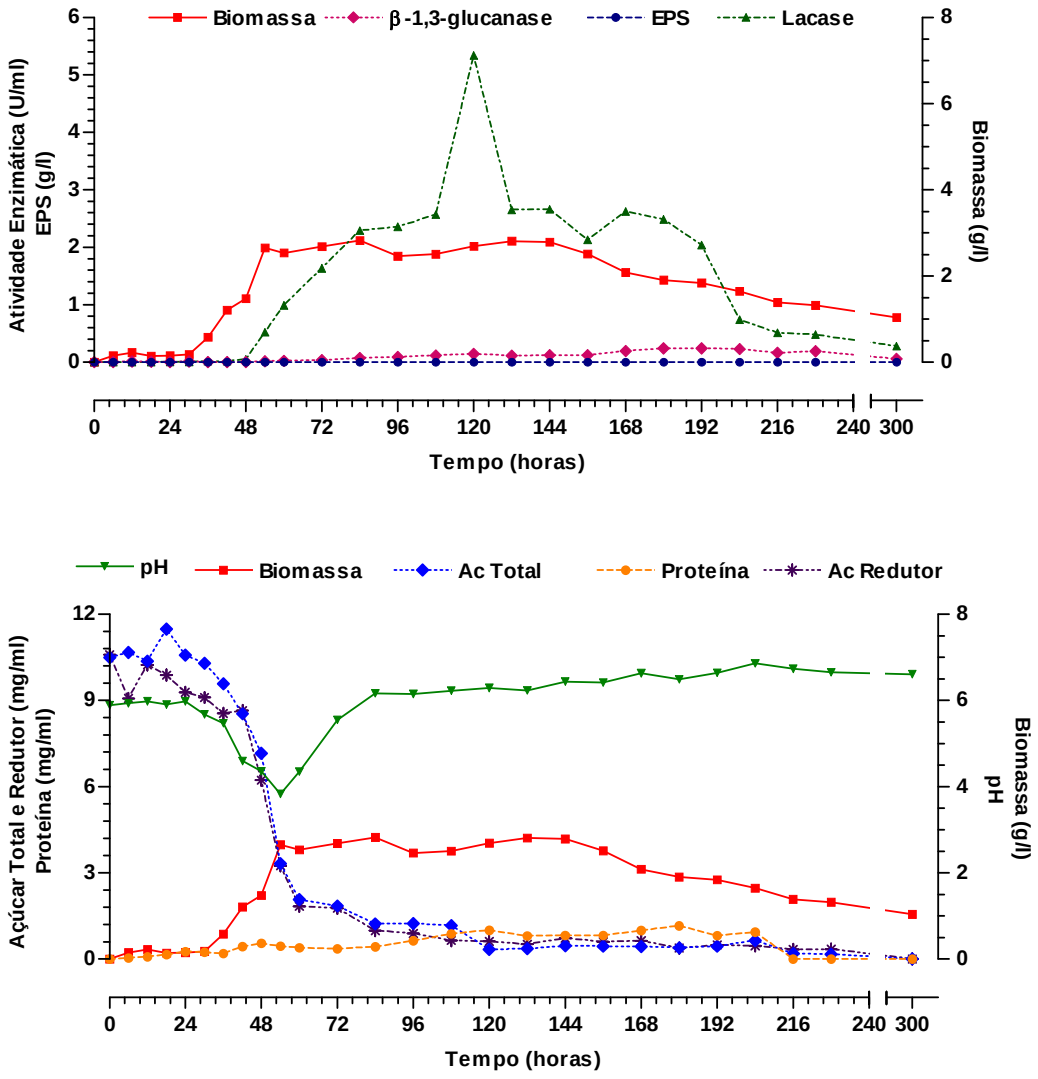


Figura 22. Perfil de crescimento do *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase e outros parâmetros bioquímicos do cultivo de células livres do fungo, em glucose (10 g/l), durante 300 horas, na presença de 18 mM de AV e 3 ml de solução de inóculo.

Os dados apresentados na Figura 22 mostram que o pico de produção de lacase (5,34 ± 0,9 U/mL) foi obtido em 120 horas de cultivo, confirmando-se o valor preditivo da otimização, no tempo também relativamente próximo do previsto (126h).

A produção de biomassa foi estabilizada em 56 horas, concomitantemente com uma queda do pH e dos açúcares redutores do meio de cultivo.

A beta-1,3-glucanase é produzida constitutivamente por esse fungo (Giese 2005) e foi reprimida pela presença do AV, confirmando a hipótese de regulação de algumas hidrolases por este álcool aromático, conforme relatado por Dekker e colaboradores em 2001. A produção de EPS não foi detectável, possivelmente por ter sido também inibida pela presença de AV, o que também foi descrito por Dekker e Barbosa em 2001.

O uso de células imobilizadas parece aumentar a tolerância dos microrganismos à presença compostos tóxicos (Prasad et al., 2005). Portanto, um novo experimento foi desenvolvido objetivando-se avaliar a produção de lacases, por células imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina* em diferentes concentrações de AV, e determinar a concentração deste álcool que se torna tóxico para o fungo imobilizado, conforme mostra a Figura 23.

Os resultados apresentados na Figura 23 mostram que houve produção de lacase pelas células imobilizadas em todas as concentrações de AV avaliadas. Quando comparado com o meio de cultivo onde não foi adicionado AV, houve um aumento pequeno (0,4 U/mL) nos cultivos com 20, 40, 60, até 100 mM. Entretanto, as células imobilizadas produziram lacase em concentrações elevadíssimas de AV como 500 mM, enquanto que células livres de *B. rhodina* deixaram de secretar lacase no meio de cultivo na presença de 60 mM deste álcool (Dekker e Barbosa, 2001). Portanto, estes resultados confirmaram os relatos de Prasad e colaboradores (2005), de que as células imobilizadas toleram maior concentração de compostos tóxicos. Pode-se observar que a tolerância ao AV foi até 200 mM, quando a partir desta concentração houve uma diminuição da produção de lacase, inferior àquela quando o AV não estava presente, embora a presença de lacase tenha sido detectável nos cultivos com até 500 mM de AV.

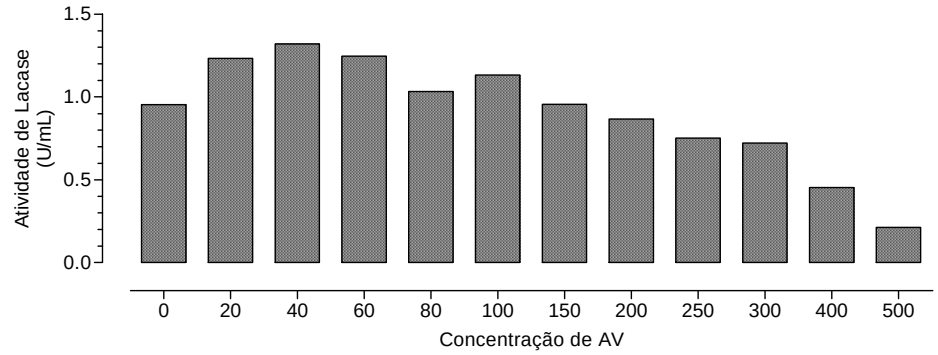


Figura 23. Comparação da produção de lacase por células do *Botryosphaeria rhodina* imobilizadas em EPF, na presença de glicose (10g/l) e diferentes concentrações de AV (0 a 500 mM), após 120 horas de cultivo.

Quando cultivado na ausência de AV, ou seja, somente no meio basal, o *Botryosphaeria rhodina* apresentou um aspecto filamentoso. Entretanto, na presença de AV, verificou-se a formação de pequenos grânulos, também descritos previamente por Giese e colaboradores em 2004.

Geralmente, nas fermentações submersas são observados dois tipos de morfologia dos fungos: formação de micélios filamentosos ou de grânulos, envolvidos diretamente na produção de metabólitos.

Nos cultivos que os fungos apresentam micélios filamentosos, têm sido observado uma viscosidade aparente elevada e um comportamento não-Newtoniano, o que resulta em uma deficiência na transferência de massa e decréscimo da produtividade de certos metabólitos. Isto tem sido observado nos cultivo do *B. rhodina*, quando cultivado em 50 g/L de glucose para a produção de EPS (Dekker e Barbosa, 2001). Por outro lado, na presença de grânulos, há baixa viscosidade e um comportamento mais ou menos Newtoniano (Wang et al., 2005). Este aspecto também tem sido observado nos cultivos de *B. rhodina*, quando são cultivadas células livres na presença de AV, onde há um aumento significativo da produção de lacase (Dekker e Barbosa, 2001).

Considerando-se que: 1) as células imobilizadas de *B. rhodina* tornaram-se mais tolerantes ao AV, conforme os dados da Figura 23, 2) os estudos prévios de Vasconcelos e colaboradores, em 2001, demonstraram que a adição de 30,4 mM de AV foi a concentração ótima estabelecida para células livres, embora com inóculo utilizando esferas de agar, 3) dentre os resultados mostrados na Figura 23 deste trabalho, as concentrações na faixa de 20 a 60 mM de AV se destacaram na produção de lacase, por células imobilizadas deste fungo, optou-se por avaliar o perfil de crescimento e produção de lacases e β-1,3-glucanase, além de outros parâmetros bioquímicos das células imobilizadas do *B. rhodina*, durante 300 horas, na presença de 30,4 mM de AV, como parâmetro de comparação, estes resultados estão apresentados na Figura 24.

Os resultados da Figura 24 mostram que não houve grandes variações no valor de pH durante o cultivo, como ocorre nos cultivos com células livres. O pico de produção de lacases (2,18 U/mL) foi em 48 horas de cultivo, e em seguida, foi diminuindo gradualmente, embora ainda tenha sido detectada em 300 horas (0,385 U/mL). A β-1,3-glucanase foi somente detectável em 198 horas, quando provávelmente estava havendo lise celular, dada a diminuição da biomassa fúngica. Houve exaustão da fonte de carbono em 72 horas, provavelmente ainda houve formação de EPS, visto que após este tempo a biomassa aumentou, considerando-se que o EPS corresponde a uma reserva energética para o fungo, embora neste experimento tenha sido utilizado 50 % menos de fonte de carbono em comparação com os experimentos anteriores tanto com células livres como imobilizadas. O perfil de açúcar redutor residual foi semelhando ao do açúcar total, mantendo-se baixo após 72 horas de cultivo.

Embora a atividade de lacase não tenha atingido os níveis da condição otimizada para as células livres, cabe salientar que será necessário otimizar a produção de lacase por células imobilizadas, considerando-se que o inoculo foi uma partícula de 0,5 cm^3

de EPF, cultivado previamente durante 72 horas para preencher com a biomassa de *B. rhodina*.

Conseqüentemente, estudos visando a otimização dos parâmetros que levam ao aumento da produção de lacase pelo fungo como as concentrações de inóculo, AV, glucose e tempo de cultivo, provavelmente maiores níveis de lacase serão atingidos.

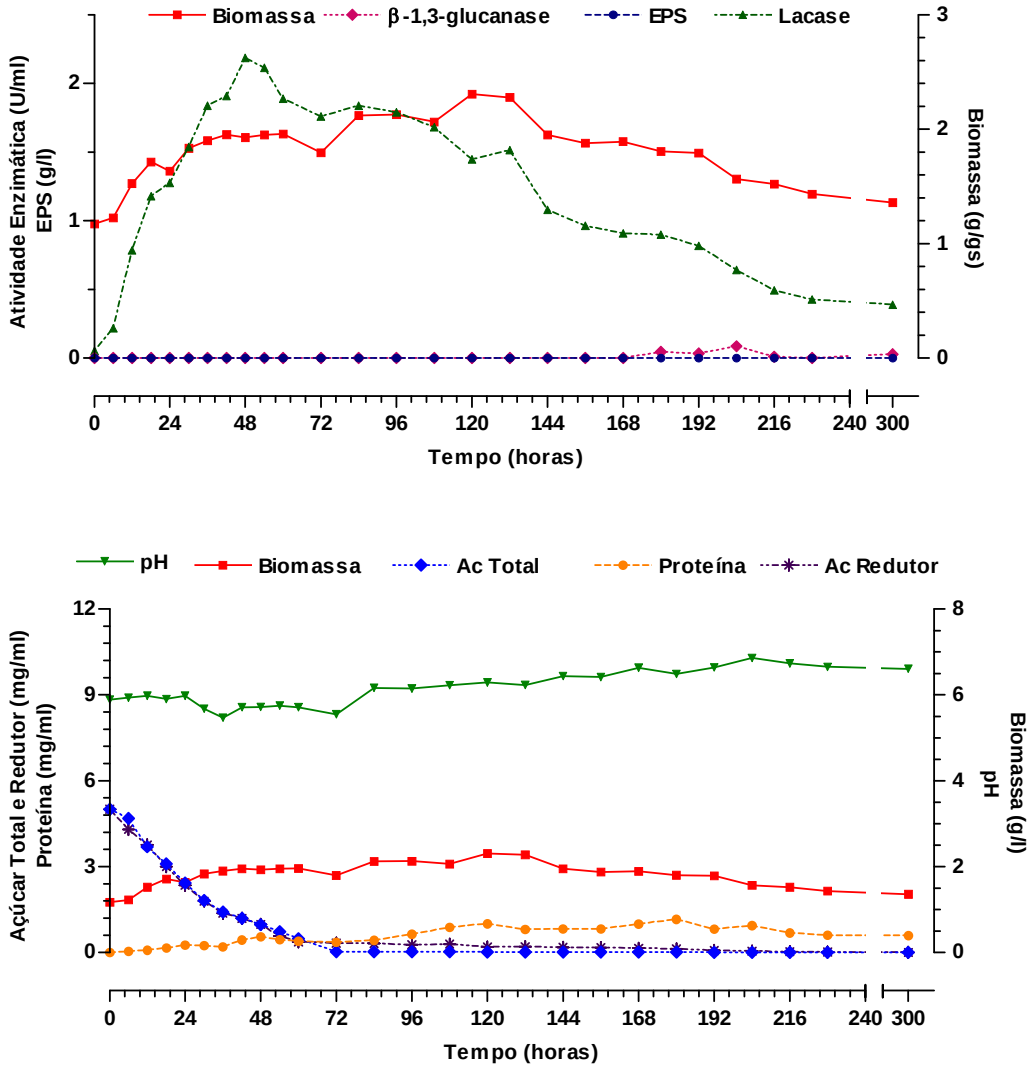


Figura 24. Perfil de crescimento do *Botryosphaeria rhodina*, produção de lacase e β-1,3-glucanase e outros parâmetros bioquímicos do cultivo de células imobilizadas, cultivado em glicose (5 g/l), durante 300 horas, na presença de 30,4 mM de AV.

Quando as células microbianas são imobilizadas para a produção de qualquer produto metabólico, se faz necessário determinar quantos ciclos de reuso são eficientes. Este foi o objetivo do próximo experimento apresentado na Figura 25.

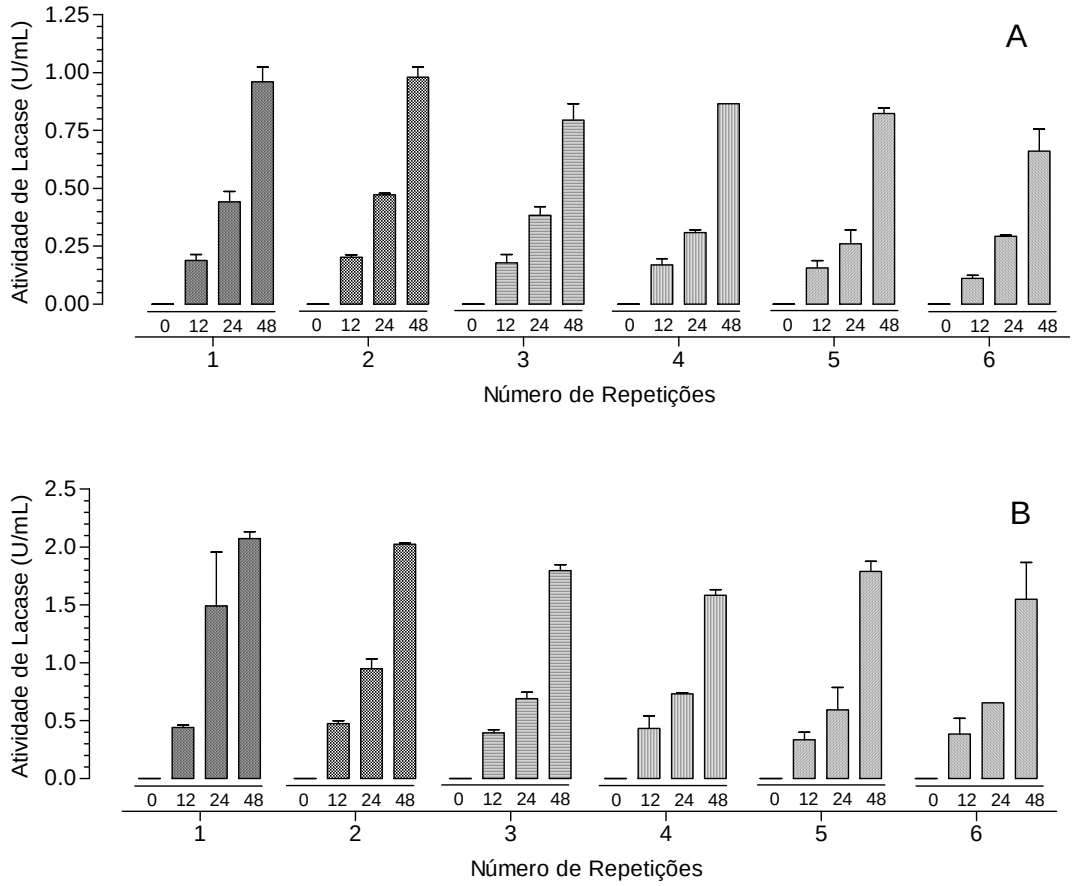


Figura 25. Cultivos sucessivos para determinar o número de reuso das células imobilizadas do *Botryosphaeria rhodina* para a produção de lacases, na ausência de AV (A) e na presença de 30,4 mM de AV (B).

Os resultados da Figura 25 mostram que as células imobilizadas do *B. rhodina* se mostraram eficientes para a produção de lacases por mais de 6 ciclos de

fermentação, em frascos de Erlenmeyer de 125 ml, contendo glucose (5 g/l) como fonte de carbono, tanto na presença quanto na ausência de AV.

Um trabalho de pesquisa não tem término porque indica sempre novos experimentos a serem desenvolvidos. Neste trabalho algumas conclusões podem ser obtidas, conforme descritas no item a seguir.

6 CONCLUSÕES

6.1 A espuma poliuretano fibroso (EPF) foi o melhor suporte para imobilizar as células do *B. rhodina*, na qual houve uma colonização homogênea.

6.2 O potencial de produção de lacase com células livres do *B. rhodina* (~ 5,6 U/mL) foi atingido, utilizando-se um homogeinato de células como inóculo, após os estudos de otimização por delineamento fatorial.

6.3 Na ausência do AV, os cultivos com as células imobilizadas de *B. rhodina* promoveu maior estabilização do pH, diminuiu o tempo de produção de lacase e não inibiu a produção de EPS e de β-1,3-glucanase.

6.4 Na presença do AV, os cultivos com as células imobilizadas de *B. rhodina* também estabilizou o pH do cultivo, diminuiu o tempo de produção de lacase, porém inibiu a síntese de EPS e reprimiu parcialmente a produção de β-1,3-glucanase extracelular.

6.5 A imobilização das células do *B. rhodina* comprovou o aumento da tolerância na presença de compostos aromáticos tóxicos, como o AV (500 mM), demonstrado pela produção de lacase. Entretanto, a produção desta polifenol oxidase foi maior entre as concentrações de 20 a 60 mM.

6.6 As células de *B. rhodina* imobilizadas apresentaram 6 ciclos viáveis de fermentação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSIEVA, P.; PETRICHEVA, E.; KONSTANTINOV, H. Enhancement of acid proteinase production by the fungus Humicola lutea 120-5 immobilized in crosslinked poly(vinyl alcohol) mixed with poly(ethylene glycol). Process Biochemistry, v. 33, n. 7, p. 725-728, 1998.

ALMEIDA, C.; BRANYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 96, n. 6, p. 513-518, 2003.

ANGELOVA, M.; SHEREMETSKA, P.; LEKOV, M. Enhanced polymethylgalacturonase production from Aspergillus niger 26 by calcium alginate immobilization. Process Biochemistry, v. 33, n. 3, p. 299-305, 1998.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARDY, G. In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. Proc. 4th Pacific Rim Biotechn, Conference. Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, Botryosphaeria sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. Letters in Applied Microbiology, v.23, p.93-96, 1996.

BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of Lactobacillus rhamnosus RW-9595M. Journal of Applied Microbiology, v. 98, n. 2, p. 272-284, 2005.

BEROVIC, M.; CIMERMAN, A.; STEINER, W.; KOLOINI, T. Submerged citric-acid fermentation - Rheological properties of Aspergillus niger broth in a stirred tank reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 35, n. 5, p. 579-581, 1991.

BESHAY, U. Production of alkaline protease by Teredinobacter turnirae cells immobilized in Ca-alginate beads. African Journal of Biotechnology, v. 2, n. 3, p. 60-65, 2003.

BOZA, Y.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 3, p. 1201-1209, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. v.72, p.248-254, 1976.

Braun, S; Vecht-Lifshitz, S. E. Mycelial morphology and metabolite production. Trends in Biotechnology, v. 9, n. 2, p. 63-68, 1991.

BUZÁS, Z. S.; DALLMAN, K.; SZAJÁNI, S. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology and Bioengeneering*, v. 34, n. 6, p. 882-884, 1989.

CARLSEN, M.; SPOHR, A. B.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Morphology and physiology of an alpha Amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 3, p. 266-276, 1996.

CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 14, n. 2, p. 109-134, 1994.

COSTA, A. C. A.; FRANÇA, F. P. The use of seaweeds as immobilization supports for microorganisms used in continuous cadmium biosorption. *Biotechnology Techniques*, v. 10, n. 10, p. 761-766, 1996.

COUTO, S. R.; RIVELA, I.; MUÑOZ, M. R.; SANROMÁN, A. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess and Biosystems Engineering,* v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.

DALE, A.; EAGER, A. M.; OKOS, M. R. Osmotic inhibition of free and immobilized *K. marxianus*: Anaerobic growth and ethanol productivity in whey permeate concentrate. *Process Biochemistry*, v. 29, n. 7, p. 535-544, 1994.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 28, n. 1, p. 81-88, 2001.

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2000.

DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCÍA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 4, p. 523-569, 2001.

DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 6, p. 451-455, 2001.

DOMINGUEZ, A.; RIVELA, I.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 5, p. 549-554, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

Eggert 1996

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* v. 34, n. 1, p. 22-25, 2003.

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. *Journal of Biotechnology*, v. 80, n. 3, p. 271-276, 2000.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

FUJITA, M.; ERA, A.; IKE, M.; SODA, S.; MIYATA, N.; HIRAO, T. Decolorization of heat-treatment liquor of waste sludge by a bioreactor using polyurethane foam-immobilized white rot fungus equipped with an ultramembrane filtration unit. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 4, p. 387-394, 2000.

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 33, n. 5, p. 629-634, 2003.

GERIN, P. A.; ASTHER, M.; ROUXHET, P. G. Peroxidase production by the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium* in relation to immobilization in "filtering" carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, n. 4, p. 294-300, 1997.

GIESE 2004

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β-1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3783–3788, 2005.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; MONTEIRO, N. K.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β-1,3-glucanases produced by

Botryosphaeria rhodina and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, on-line em 24 de Janeiro de 2006.

GUO, X-L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M-X. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

HERNANDEZ, J-P.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp*. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 1-2, p. 190-198, 2006.

HSU, J. W.; SPEERS, R. A.; PAULSON, A. T. Modeling of orthokinetic flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biophysical Chemistry*, v. 94, n. 1-2, p.47-58, 2001.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicallis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 204, n. 2, p. 375-379, 2001.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

KALUSKAR, V. M.; KAPADNIS, B. P.; JASPERS, C.; PENNINCKX, M. J. Production of laccase by immobilized cells of *Agaricus sp*.: induction effect of xylan and lignin derivatives. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 76, n. 3, p. 161-170, 1999.

KARGUPTA, K.; DATTA, S.; SANYAL, S. K. Analysis of the performance of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 1, n. 1, p. 31-37, 1998.

KIM, S. J.; SHODA, M. Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus Geotrichum candidum Dec 1. *Biotechnology and Bioengineering, v.* 62, n. 1, p. 114-119, 1999.

KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 49, n. 3, p. 1417-1425, 2001.

KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELLAKI, M.; HACK, C. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 112, n. 1, p. 25-35, 2004.

KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim* 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 193-202, 2001.

LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, n. 3, p. 309-313, 1998.

LUSTA, K. A.; CHUNG, I. K.; SUL, I. W.; PARK, H. S.; SHIN, D. I. Immobilization of fungus *Aspergillus* sp. by a novel cryogel technique for production of extracellular hydrolytic enzymes. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1177-1182, 2000.

MELZOCH, K.; RYCHTERA, M.; HABOVA, V. Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 59-65, 1994.

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, O.; LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*, v. 1, n. 66, p. 27-39, 1998.

NAVRATIL, M.; DOMENY, Z.; HRONSKY, V.; STURDIK, E.; SMOGROVICOVA, D.; GEMEINER, P. Use of bioluminometry for determination of active yeast biomass immobilized in ionotropic hydrogels. *Analytical Biochemistry*, v. 284, n. 2, p. 394-400, 2000.

NELSON, N. A. COLORIMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR DETERMINATION OF GLUCOSE. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, V.153, P.376-380, 1944.

NIELSEN, J.; JOHANSEN, C. L.; JACOBSEN, M.; KRABBEN, P.; VILLADSEN, J. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol Progress,* v. 11, n. 1, p. 93-98, 1995.

NORTON, S.; WATSON, K.; D'AMORE, T. Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 1, p. 18-24, 1995.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2001.

PAI, S-L.; HSU, Y-L.; CHONG, N-M.; SHEU, C-S.; CHEN, C-H. Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus sp*. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technology*, v. 1, n. 51, p. 37-42, 1995.

PARASCANDOLA, P.; BRANDUARDI, P.; ALTERIIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 5, p. 184-189, 2006.

PARK, C.; LEE, B.; HAN, E-G.; LEE, J.; KIM, S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 3, p. 371-374, 2006.

PATIL, N. K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.; NAYAK, S.; KAREGOUDAR, T. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus sp*. immobilized cells in alginate and polyurethane. *International Biodeterioriation and Biodegradation,* v.57, n. 2, p. 82-87, 2006.

PENG, C. A.; BLY, M. J. Analysis of xenobiotic bioremediation in a co-immobilized mixed culture system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 1, n. 1, p. 63-75, 1998.

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 27, n. 4, p. 309-332, 1999.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 104, p. 19-31, 1998.

Pointing 2000

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 Microbiology,* v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.

Rapp 1989

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; JANUSZ, G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 3, p. 469-476, 2006.

SAPARRAT, M. C.; GUILLEN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SEDARATI, M. R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY, A. A.; EVANS, C. S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Eletronic Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 104-114, 2003.

SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 70, n. 1, p. 41-53, 2000.

SHIM, S. S.; KAWAMOTO, K. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research*, v. 36, n. 18, p. 4445-4454, 2002.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe*, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SLOKOSKA, L.; ANGELOVA, M.; PASHOVA, S.; PETRICHEVA, E.; KONSTANTINOV, C. Production of acid proteinase by *Humicola lutea* 120-5 immobilized in mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate beads. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 1, p. 73-76, 1999.

Soden dobson 2001

SOMOGYI, M. A. A NEW REAGENT FOR DETERMINATION OF SUGARS. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, V.160, P.61-68, 1945.

SONG, S. H.; CHOI, S. S.; KYUNGMOON, P.; YOO, Y. J. Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. *Enzyme and Microbial Technology,* v. 37, n. 6, p. 567-573, 2005.

SRIDEVI, V.; SRIDHAR, P. Effect of support materials on cephamycin C production by immobilized *Streptomyces clavuligerus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 37, n. 3, p. 274-279, 1999.

Tolstoguzov 2004

ÜNYAYAR S, ÜNYAYAR A, ÜNAL E. Production of auxin and abscisic acid by *Phanerochaete chrysosporium* ME446 immobilized on polyurethane foam. *Turkish Journal of Biology,* v.24, n. 1, p. 6-11, 2000.

VASCONCELOS, A. D. F.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. otimization of laccase production by botryosphaeria sp in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. process biochemistry, kidlington, v.35, p.1131-1138, 2000.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R. Solubilization of rock phosphate by immobilized *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 59, n. 1, p. 1-4, 1997.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; FENICE, M.; FEDERICI, F. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. *Bioresource Technology*, v. 79, n. 3, p. 263-271, 2001.

VELANKAR, H. R.; HEBLE, M. R. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 90-103, 2003.

VIGGIANI, A.; OLIVIERI, G.; SIANI, L.; DI DONATO, A.; MARZOCCHELLA, A.; SALATINO, P.; BARBIERI, P.; GALLI, E. An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology*, v. 123, n. 4, p. 464-477, 2006.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 240-243, 2006.

VOGEL, H. J. a convenient growth medium for neurospora crassa. genetic bull., v. 13, p. 42, 1956.

WALSH, P. K.; MALONE, D. M. Cell growth patterns in immobilization matrices. *Biotechnology Advances*, v. 13, n. 1, p. 13-43, 1995.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WEST, T. P.; STROHFUS, B. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors. *Microbiological Research*, v. 156, n. 3, p. 285-288, 2001.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. V. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. *Boletim de Biotecnologia*, v. 76, n. 1, p. 2-13. 2003.

YANG, H.; REICHL, U.; KING, R.; GILLES, E. D. Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, n. 1, p. 44-48, 1992.

YASUDA, T.; KATOH, S.; INOUE, Y.; SHIMI, N. A bioremediation method based on self immobilization of cells in shallow layer of soil. *Journal Chemical Engineering of Japan*, v. 36, n. 2, p. 216-219, 2003.

YOO, I-K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 5, p. 428-433, 1996.

ZHANG, Y. M.; RITTMANN, B. E.; JIANLONG, W.; YUHONG, S.; JUNTANG, Y.; HANCHANG, S.; YI, Q. High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicallis*. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 857-863, 2005.

ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Polycyclic aromatic hydrocarbon removal from soil by surfactant solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* oxidation. *Journal of Environmental Quality*, v. 31, n. 6, p. 1842-1847, 2002.

ZINDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology Biotechnology*, v. 39, n. 3, p. 237-252, 2001.