



BIOCATALIZADORES IMOBILIZADOS

Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos

Larissa Canilha

Engenheira Química, Mestre e Doutora em Biotecnologia Industrial
Departamento de Biotecnologia
Escola de Engenharia de Lorena (EEL)
Universidade de São Paulo (USP)
larissa@debiq.faequil.br

Walter de Carvalho

Farmacêutico, Mestre e Doutor em Biotecnologia Industrial - Professor e pesquisador
Departamento de Biotecnologia
Escola de Engenharia de Lorena (EEL)
Universidade de São Paulo (USP)
carvalho@debiq.faequil.br

João Batista de Almeida e Silva

Engenheiro Químico, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Doutor em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica
Professor e pesquisador
Departamento de Biotecnologia
Escola de Engenharia de Lorena (EEL)
Universidade de São Paulo (USP)
joabatista@debiq.faequil.br

Imagens cedidas pelos autores

1 RESUMO

A imobilização de células ou enzimas representa uma alternativa para a condução de bioprocessos uma vez que, teoricamente, os biocatalisadores imobilizados ficam retidos para serem utilizados por tempo indefinido.

É difícil definir quais os melhores suportes e técnica de imobilização a serem utilizados na imobilização de células ou enzimas específicas, pois há uma ampla variação não só nas características dos materiais a serem imobilizados, mas também nas condições prevalentes durante o processo.

A presente revisão busca detalhar alguns dos principais suportes utilizados para a imobilização de células ou enzimas, visando à produção de insumos de interesse industrial a partir de diferentes matérias-primas.

2 INTRODUÇÃO

2.1 O que é imobilização?

A imobilização pode ser definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (TAMPION e TAMPION, 1988). A imobilização também é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989). O uso em processo contínuo, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do material biológico são considerados como as prin-

cipais vantagens propiciadas pela imobilização (VITTOLO, 1988; CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

Existem dois tipos de leito para a imobilização de células, os que as aprisionam fisicamente e os que as aderem à superfície. No primeiro caso, são encapsuladas em glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, de proteínas ou de polímeros sintéticos. No segundo, as células são fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (MEERSMAN, 1992). Como exemplo de um material para adesão superficial de células destaca-se DEAE celulose (diethyl amino etil celulose), material durável, inerte e não poroso, além de fraco trocador iônico. Suas partículas têm superfície suficientemente irregular para formar um traçado permeável de alta resistência ao entupimento. Este material tem mais afinidade com leveduras do que com bactérias. As leveduras imobilizadas em DEAE celulose são aplicadas na maturação contínua de cerveja e na produção de cerveja livre de álcool ou de baixo teor alcoólico (MEERSMAN, 1992; Van IERSEL *et al.*, 2000). Como exemplos de material usado para o aprisionamento físico de células, destacam-se as membranas de alumina, que promovem o alojamento das células no interior de seus poros irregulares, formando uma trama permeável de alta resistência ao entupimento e reduzindo ao mínimo as contaminações (BORENSTEIN, 2003).

2.2 Imobilização versus células livres

O uso de sistemas com células

imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa viável para se aumentar a produtividade em razão das elevadas densidades celulares normalmente obtidas (RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999).

A imobilização eleva a atividade fermentativa da levedura, promovendo a adaptação das células ao meio e eliminando a fase lag em bateladas sucessivas de fermentação (DURAN e BAILEY, 1986). Em sistemas contínuos, há uma diminuição do risco de contaminação em operações com altas taxas de diluição e alta concentração de células, havendo também redução da formação de subprodutos por células residuais e eliminando a necessidade de remoção das células ou de reciclo, tornando a extração do produto mais eficiente (WILLIAMS e MUNNECKE, 1981). Em sistemas com células imobilizadas consegue-se maior massa de células por unidade de volume de trabalho do que em sistemas descontínuos, contínuos e de recuperação de células trabalhando com células livres (WILLIAMS e MUNNECKE, 1981; PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998). Outras vantagens do uso de células imobilizadas em relação ao uso de células em suspensão no meio de fermentação são: a facilidade de reutilização dos biocatalisadores, o aumento da estabilidade destes biocatalisadores e a redução de custos operacionais (PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998; RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999; CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006). O sistema que usa células livres de leveduras em modo contínuo de fermentação é limitado, uma vez que podem ocorrer perdas de células no fermentador. Além disso, as células imobilizadas são mais resistentes a condições adversas, uma vez que a matriz de imobilização geralmente resulta em maior proteção a estas células. Por este motivo, procura-se produzir etanol com células imobilizadas (LEE, AHN e RYU, 1983).

Os reatores com células imobilizadas permitem alto desempenho porque trabalham com altas densidades de células fixadas nos suportes.

Uma desvantagem é que o estado fisiológico dos organismos não pode ser controlado (BORENSTEIN, 2003). Isto é particularmente prejudicial nos sistemas em que o metabólito secundário é o produto principal, pois é produzido na fase estacionária ou de decréscimo de atividade (HAMDY, KIM e RUDTKE, 1990).

Resumidamente, há três motivos básicos para aceitar a imobilização de células: 1- reutilizar o biocatalisador por mais de um ciclo fermentativo; 2- usar um processo contínuo sem reciclo celular; 3- aumentar a estabilidade do biocatalisador em relação às variações de pH, temperatura, concentração de nutrientes ou do meio de fermentação (HAMDY, KIM e RUDTKE, 1990).

Atualmente, a importância e o interesse desta tecnologia são ilustrados pelo grande número de publicações observadas nos últimos anos e também pela estabilização de alguns processos em escala industrial (FREEMAN e LILLY, 1998; RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999; Van IERSEL *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2005).

2.3 Células imobilizadas versus enzimas imobilizadas

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e freqüente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização. A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a utilização de um processo contínuo (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006). Porém, à medida que os estudos com células imobilizadas avançaram, observou-se que a imobilização de células é mais vantajosa em relação à imobilização de enzimas, pois evita o trabalho de extraí-las dos microorganismos para fixá-las, em seguida, a um suporte (CHIBATA, TOSA e SATO, 1983). Nos processos onde há imobilização de células, a fermentação é acelera-

da por causa do aumento da densidade celular. Assim é possível conduzir a operação contínua com alta taxa de diluição, atingir rendimento específico mais alto, eliminar fermentadores mais caros e exercer controle fácil e mais eficiente do processo fermentativo (KOLOT, 1980).

Quando os cofatores são necessários no processo biotecnológico, o uso de células é preferível ao de enzimas imobilizadas, pois as células possuem a capacidade de regenerar os cofatores naturalmente, além de não requerer etapas de extração e purificação, apresentar menor custo e maior resistência a perturbações ambientais. As células podem ser imobilizadas sem perda significativa de sua atividade catalítica e, portanto, são mais eficazes quando se trata de catalisar uma série de reações subseqüentes, além de apresentarem alta estabilidade operacional e de armazenamento (CORCORAN, 1985).

3 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO E TIPOS DE SUPORTE

O método e o tipo de suporte a serem empregados em um determinado processo devem ser estabelecidos empiricamente, recaindo a escolha do binômio suporte-método sobre aquele que apresentar maior retenção da atividade. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá basicamente de dois fatores: 1- das características peculiares do material biológico; 2- das condições de uso do sistema imobilizado. Face à variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal, adequados para qualquer processo (CORCORAN, 1985; VITTOLO, 1988).

3.1 Métodos de imobilização

Existem vários métodos para a imobilização de biocatalisadores. Estes métodos podem ser divididos em quatro grandes grupos, conforme ilustrado na Figura 1.

O método de imobilização por meio de auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das célu-

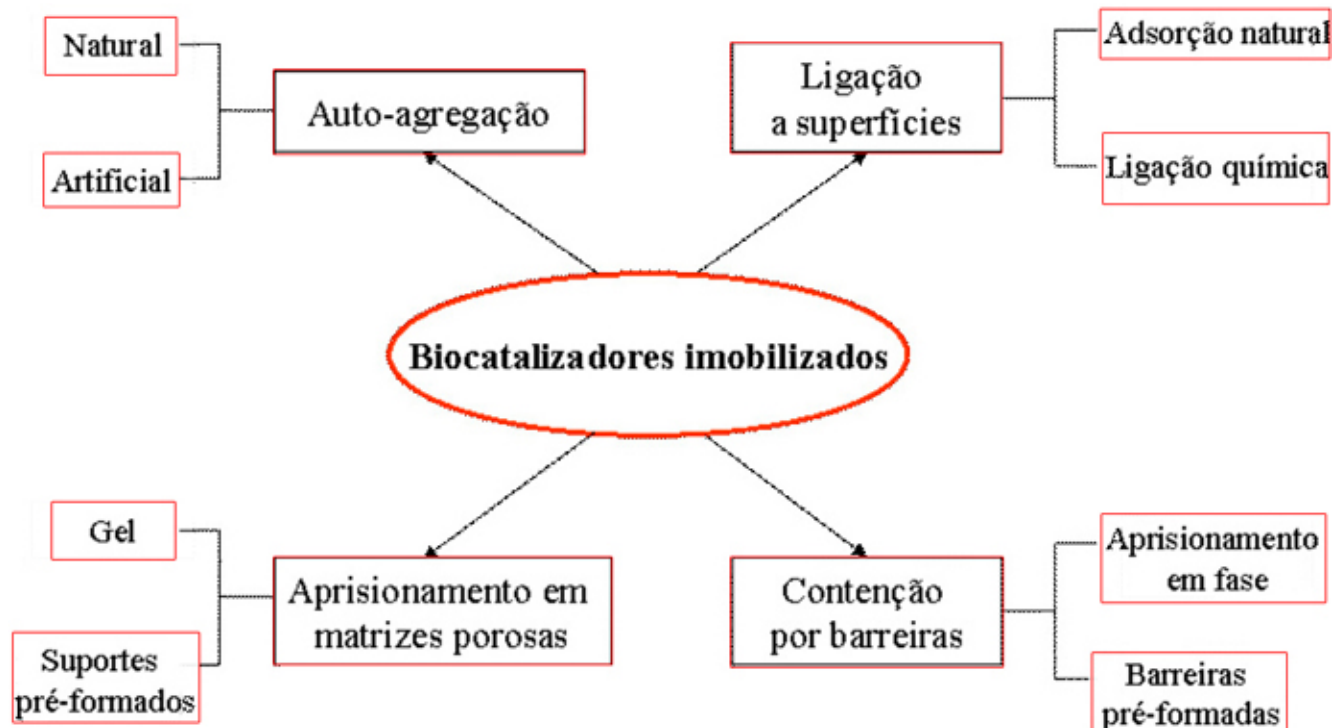


Figura 1 - Métodos de imobilização de enzimas e células

las de maneira natural ou artificialmente induzida. Desta forma, os biocatalisadores são ligados entre si sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização. A floculação natural é uma propriedade de relativamente poucas células. Além disso, agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis a tensões de cisalhamento, sendo necessária a adição de agentes químicos que formam ligações cruzadas entre células, como glutaraldeído, durante a imobilização (GROBOILLOT *et al.*, 1994).

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies pode ser realizado por meio de interações iônicas ou adsorptivas, ou através de ligações covalentes entre grupos reativos do suporte e do biocatalisador. A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples e barato, existindo a possibilidade de regenerar a matriz utilizada, porém apresenta como desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional impedindo o trabalho em condições muito severas. Para aumentar a massa de biocatalisadores imobilizados, suportes porosos têm sido geralmente

utilizados, permitindo a ligação do biocatalisador também à estrutura superficial interna. Por outro lado, a imobilização por meio de ligações covalentes resulta em uma interação biocatalisador-suporte mais forte, sendo a principal desvantagem o risco de danos à membrana celular, no caso de imobilização de células (GROBOILLOT *et al.*, 1994; PRADELLA, 2001).

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas, como o alginato e a carragena, normalmente envolve a sintetização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Os poros da matriz formada são menores que as células contidas no interior (PRADELLA, 2001). Este método tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização (GROBOILLOT *et al.*, 1994). Além disso, as células imobilizadas em uma matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não adequadas de pH, temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio de fermentação (PARK e CHANG, 2000).

Como principais desvantagens são citadas: o pequeno volume disponível para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio de fermentação e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos (PARK e CHANG, 2000; PRADELLA, 2001).

O método de imobilização por meio de contenção por barreiras envolve a utilização de membranas pré-formadas (reatores do tipo *hollow fiber*) ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas (KAREL, LIBICKI e ROBERTSON, 1985). Este método, também conhecido como encapsulamento, tem sido utilizado como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, uma vez que oferece vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de células para o meio de fermentação. Devido à ausência de núcleo gelificado, as limitações à transferência de massa também são reduzidas (PARK e CHANG, 2000).

Face ao exposto, todos os métodos de imobilização apresentam vantagens e desvantagens. Embora a estabilidade das células não possa

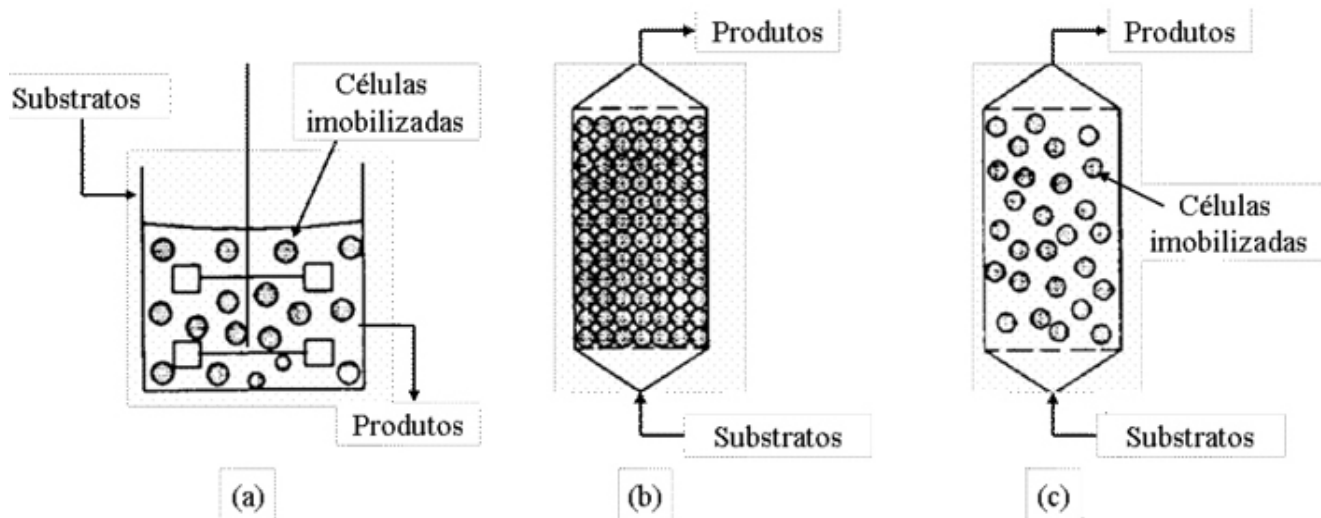


Figura 2 - Tipos de reatores para trabalhos com células imobilizadas: (a) reator de mistura; (b) reator de leito empacotado; (c) reator de leito fluidizado

ser garantida em todos os casos, as seguintes vantagens são citadas: inóculo retido no suporte, possibilidade de melhor controle das propriedades reológicas do meio, maior pureza e rendimento de produtos, não há necessidade de extração e purificação das enzimas e podem ser esperados resultados econômicos mais favoráveis (GROBOILLOT *et al.*, 1994; PRADELLA, 2001).

3.2 Tipos de suporte

Na literatura são citados inúmeros materiais inertes que podem ser usados como suportes. A natureza física destes suportes varia desde materiais geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragena, etc) até superfícies sólidas (vidro poroso, Eupergit C, alumina, etc). Os suportes podem ser classificados em cinco tipos fundamentais: 1. microporosos ou não porosos (vidro, sílica, nylon); 2. microencapsulados (nitrocelulose, triacetato de celulose); 3. polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamida); 4. polímeros com baixo grau de ligações cruzadas (sephadex, DEAE celulose); 5. macroporosos (sílica, alumina) (VITOLLO, 1988; GERBSCH e BUCHHOLZ, 1995).

Os materiais utilizados como suportes deveriam idealmente ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, resultar em baixo

custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala, não apresentar toxidez as células, apresentar alta capacidade de retenção e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional (NAGASHIMA, 1984; PRADELLA, 2001). Os suportes inorgânicos são mais vantajosos que os orgânicos pela durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade (NAGASHIMA, 1984). Segundo MOUEDDEB *et al.* (1996), os materiais inorgânicos também apresentam como vantagem a facilidade de esterilização e limpeza.

3.3 Tipos de reatores utilizados com células imobilizadas

Os reatores para trabalhos com células imobilizadas podem ser divididos em três categorias, de acordo com o padrão de fluxo: reatores de mistura, reatores de leito empacotado e reatores de leito fluidizado (Figura 2). Estes reatores podem também ser modificados para melhorar as características de transferência de massa e a capacidade de controle das condições de cultivo ou para minimizar o estresse imposto ao suporte de imobilização (FUKUDA, 1994; BARON, WILLAERT e BACKER, 1996).

Os fatores que devem ser levados em consideração quando da escolha de um determinado tipo de

reator para o cultivo de células imobilizadas são: 1- requerimentos de transferência de massa (principalmente suprimento de oxigênio e remoção de gases), 2- método de imobilização empregado, 3- características da matriz de imobilização utilizada, 4- natureza do substrato, 5- requerimentos para o cultivo do microorganismo utilizado (FUKUDA, 1994; PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998). A escolha inadequada do reator pode provocar rompimento do suporte de imobilização. Desta forma, é importante escolher um reator que permita uma adequada mistura do meio sem provocar danos a matriz de imobilização (PILKINGTON, MARGARITIS e MENSOUR, 1998).

Os reatores de mistura representam o tipo de reator mais amplamente utilizado para o cultivo de células em suspensão, seja em escala laboratorial, seja em escala industrial (BARON, WILLAERT, BACKER, 1996). Embora vários tipos de turbinas possam ser utilizados, a principal desvantagem relativa ao uso deste tipo de reator para o cultivo de células imobilizadas refere-se à tensão de cisalhamento imposta a matrizes sensíveis (GROBOILLOT *et al.*, 1994). Este reator apresenta vantagens como fácil controle de temperatura e pH, e a sua operação em modo contínuo é adequada em casos

de inibição pelo substrato (FUKUDA, 1994). Além disso, oferece as melhores características de mistura e transferência de oxigênio (GROBOILLOT *et al.*, 1994).

Nos reatores de leito empacotado, os agregados imobilizados são empacotados em uma coluna, através da qual o meio de fermentação é passado. Apesar da simplicidade de *design* e baixo custo, este tipo de reator é mais utilizado em fermentações anaeróbicas. Para cultivos aeróbios, entretanto, a aeração do meio de fermentação geralmente não é suficiente para oxigenar todo o reator devido à depleção rápida do oxigênio no início da coluna (GROBOILLOT *et al.*, 1994). Além disso, desvios do comportamento ideal de fluxo, do tipo *plug flow*, são constantemente observados durante as fermentações por motivos diversos (acúmulo de gases como de CO₂, compactação do leito, acúmulo de biomassa suspensa), levando à formação de caminhos preferenciais, o que prejudica as taxas de produção através de limitações à transferência de massa (FUKUDA, 1994).

Os reatores de leito fluidizado representam um compromisso entre os reatores de mistura e os reatores de leito empacotado, aliando as boas condições de mistura (característica dos reatores de mistura) às baixas tensões de cisalhamento (característica dos reatores de leito empacotado). Em contraste com os reatores de leito empacotado, os reatores de leito fluidizado facilitam a mistura entre as fases líquida e sólida, facilitam a remoção de gases e minimizam a pressão sobre o leito de agregados imobilizados. Para a obtenção de boas características de fluidização, a diferença de densidade entre os agregados celulares e o meio de fermentação deve ser a maior possível. Desta forma, géis de hidrocolóides hidratados, como alginato de cálcio, não são recomendados devido à semelhança de densidades entre o polímero e o meio de fermentação aquoso. Dependendo do tamanho e densidade do suporte, das taxas de fluxos de gases e líquidos e da geometria do leito, diversos padrões de mistura podem ser obtidos nos quais

as fases líquidas e sólidas podem estar sendo adequadamente misturadas ou não. Desta forma, dependendo das condições hidrodinâmicas do sistema, os agregados celulares podem sofrer limitações de transferência de massa, o que irá prejudicar as taxas de produção (GROBOILLOT *et al.*, 1994).

3.4 Suportes utilizados para a imobilização de enzimas

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Entre eles, Eupergit C, alumina e sílica (Tabela 1) têm sido bastante reportados na literatura.

3.4.1 Eupergit C

Eupergit C é um suporte que consiste em microesferas macroporosas, desenvolvido através da copolimerização de N,N'-metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida. Este suporte é quimicamente estável em qualquer valor de pH, ou seja, pode imobilizar uma enzima em qualquer faixa de pH entre 0 e 14, na qual ela é estável e não perde a sua atividade catalítica. Eupergit C também é mecanicamente estável, uma vez que não apresentou nenhum desgaste após 650 ciclos de operação em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000L (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). Este suporte já foi avaliado para a imobilização de várias enzimas: β -galactosidase de *Bacillus circulans*, α -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, para transformar lactose em glicose e galactose, ou produzir galacto-oligosacarídeos (HERNAIZ e CROUT, 2000); ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) de *Thermoanaerobacter* sp., para a formação de ciclodextrina (MARTÍN *et al.*, 2003); β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme 188), para produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos (TU *et al.*, 2006); lipase de *Candida rugosa*, para produção de glicerol (KNEZEVIC *et al.*, 2006). A revisão elaborada por KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER (2000) apresenta uma visão detalhada do assunto e tam-

bém referencia outros trabalhos que usaram este suporte para a imobilização de enzimas.

3.4.2 Alumina

A alumina é um material inorgânico, inerte, poroso, transparente, estável e não tóxico além de apresentar boa durabilidade (ALBRAS, 2003). Em ensaios que fizeram uso da alumina para a imobilização de enzimas, foi constatado que este suporte é um material bastante resistente a altas temperaturas e pHs (COSTA *et al.*, 2001). Conforme descrito por IDA, MATSUYAMA e YAMAMOTO (2000), a membrana de alumina pode ser usada como suporte para a imobilização de enzimas, pois ela é mecanicamente forte e quimicamente estável. Por estas e outras características a alumina vem sendo utilizada na imobilização de diversas enzimas: catalase de *Bacillus* sp., para o tratamento de efluentes têxteis (COSTA *et al.*, 2001); glicoamilase de *A. niger* (IDA, MATSUYAMA e YAMAMOTO, 2000); lipase de *Candida antarctica*, para síntese de butil butirato (LOZANO *et al.*, 2002); amilase de *Bacillus subtilis*, utilizada nas indústrias alimentícias e fermentativas (RESHMI, SANJAY e SUGUNAN, 2006).

A alumina, a quitosana e a celulose também foram utilizadas como suportes na imobilização da enzima catalase de *A. niger*, para a decomposição de peróxido. O sistema que resultou em maior atividade foi a imobilização em glutaraldeído-celulose. A atividade da catalase em glutaraldeído-celulose foi aumentando após alguns meses de estocagem, provavelmente devido à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, desenvolvidos com o tempo. Já a enzima imobilizada na alumina ficou inativa e a estrutura da enzima imobilizada na quitosana foi destruída (EBERHARDT *et al.*, 2004).

3.4.3 Sílica

Sílica é um produto sintético, produzido pela reação de silicato de sódio e ácido sulfúrico. Ao serem misturados, forma-se um hidrosol que

Tabela 1 - Exemplos de suportes utilizados para a imobilização de enzimas

Suporte	Microorganismo	Enzima	Referência
Eupegit C	<i>Bacillus circulans</i>	β -galactosidase	Hemaiz e Crout (2000)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	α -galactosidase	Hemaiz e Crout (2000)
	<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	Ciclodextrina glicosiltransferase	Marín <i>et al.</i> (2003)
	<i>Aspergillus niger</i>	β -glicosidase	Tu <i>et al.</i> (2006)
	<i>Candida rugosa</i>	Lipase	Knezevic <i>et al.</i> (2006)
Alumina	<i>Bacillus sp.</i>	Catalase	Costa <i>et al.</i> (2001)
	<i>A. niger</i>	Glucoamilase	Ida, Matsuyama e Yamamoto (2000)
	<i>Candida antarctica</i>	Lipase	Lozano <i>et al.</i> (2002)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Amilase	Reshmi, Sarjay e Sugunan (2006)
Alumina, Quitosana e Celulose	<i>A. niger</i>	Catalase	Eberhardt <i>et al.</i> (2004)
Sílica gel	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertase	David <i>et al.</i> (2006)
	<i>Caldariomyces fumago</i>	Cloroperoxidase	Petri, Gambicorti e Salvadori (2004)
Sílica gel e Alumina	<i>Candida cylindracea</i>	Lipase	Moreno e Sinisterra (1994)

Tabela 2 - Exemplos de suportes utilizados na imobilização de células.

Suporte	Microorganismo	Referência
Alginato de cálcio	<i>Candida tropicalis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jamai <i>et al.</i> (2001)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Becerra <i>et al.</i> (2001)
	<i>Candida guilliermondii</i>	Carvalho <i>et al.</i> (2005)
Carragena	-	López, Lázaro e Marques (1997)
	<i>S. cerevisiae</i>	Nigam (2000)
	<i>Pseudomonas dacunhae</i>	Çahk <i>et al.</i> (1999)
	<i>Escherichia coli</i>	Leng, Zheng e Sun (2006)
Poliacrilamida	<i>S. cerevisiae</i>	Siess e Divies (1981)
	<i>S. uvarum</i>	Pundle, Prabhume e Sivaraman (1988)
	<i>S. cerevisiae</i>	Norouziyan <i>et al.</i> (2003)
Alumina	<i>S. cerevisiae</i>	Hamdy, Kim e Rudtke (1990)
	<i>S. cerevisiae</i>	Santos <i>et al.</i> (1998)
	<i>S. cerevisiae</i>	Borenstein (2003)
	<i>Zymomonas mobilis</i>	Bekers <i>et al.</i> (2001)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Moueddeb <i>et al.</i> (1996)
	Bactérias redutoras de sulfato e Bactérias metanogênicas	Silva <i>et al.</i> (2006)
	Levedura/fabricação de vinhos	Kourkoutas <i>et al.</i> (2006)
Terra de Kanuma, Carvão ativado, Celulose em pó	Levedura/produção de etanol	Kumakura, Yoshida e Asano (1992)

lentamente se contrai para formar uma estrutura sólida de sílica gel, também chamada hidrogel. A sílica gel é bastante utilizada como suporte para a imobilização de enzimas por apresentar as seguintes vantagens: possui alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química; possui alta resistência à contaminação e à degradação microbiana; apresenta elevada área superficial porosa (PEREIRA e KUBOTA, 2004; DAVID *et al.*, 2006). Conforme descrito na Tabela 1, sílica gel foi utilizada como suporte na imobilização das seguintes enzimas: lipase de *Candida cylindracea*, que catalisa a hidrólise de triacilglicerol em ácidos graxos livres e glicerol (MORENO e SINISTERRA, 1994; CARVALHO *et al.*, 2003); cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*, que podem ser usadas na degradação oxidativa de clorofenóis e compostos fenólicos presentes em águas residuais de refinaria (PETRI, GAMBICORTI e SALVADORI, 2004; HERNANDEZ, 2005); invertase de *S. cerevisiae*, utilizada em indústrias alimentícias para produção de adoçantes (DAVID *et al.*, 2006).

3.5 Suportes utilizados para a imobilização de células

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suporte para a imobilização de células. Géis de alginato, carragena e poliácridamida, alumina, terra de Kanuma, caule de cana e sílica são alguns exemplos de suportes descritos na literatura (Tabela 2).

3.5.1 Alginato de cálcio

O método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio é uma técnica extensivamente utilizada para a imobilização de células viáveis (RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999). Como a formação do gel ocorre rapidamente na presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, a atividade e a viabilidade dos microorganismos imobilizados são conservadas (CORCORAN, 1985). Vantagens como baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de

ampliação de escala de produção e a aceitação das substâncias utilizadas para a imobilização (alginato e cloreto de cálcio) como aditivos na produção de alimentos têm sido citadas na literatura (CORCORAN, 1985; CHAMPAGNE, BLAHUTA e GAGNON, 2000). Entre as desvantagens do uso deste polímero como suporte destacam-se a instabilidade química na presença de agentes quelantes do íon cálcio (como fosfato, lactato e citrato), a tendência das esferas em sofrer dilatação na presença de cátions monovalentes e as limitações impostas à transferência de substratos e produtos (FREEMAN e LILLY, 1998). Este suporte já foi utilizado para a imobilização de células de *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*, na produção de etanol (JAMAI *et al.*, 2001); *Kluyveromyces lactis*, na produção de lactose (BECERRA *et al.*, 2001); *Candida guilliermondii*, na produção de xilitol (CARVALHO *et al.*, 2005).

3.5.2 Carragena

A carragena é um polímero natural presente na estrutura celular de algas do tipo Rodophyceae. Este polissacarídeo tem a particularidade de formar colóides e géis em meios aquosos a concentrações muito baixas (CREDIDIO, 2006). O sistema de imobilização de células em carragena é promissor para a produção industrial de etanol. Quando foi utilizado gel de alginato de cálcio para a imobilização de células, o suporte não apresentou boa estabilidade operacional quando comparado ao uso de células imobilizadas em carragena (CHIBATA, TOSA e SATO, 1986). Este suporte já foi então utilizado para a imobilização de células de *S. cerevisiae*, visando à produção de etanol (LÓPEZ, LÁZARO e MARQUES, 1997; NIGAM, 2000); *Pseudomonas dacunhae*, visando à produção de L-alanina (ÇAHK *et al.*, 1999); *Escherichia coli*, visando à produção de L-fenilalanina (LENG, ZHENG e SUN, 2006).

3.5.3 Poliacrilamida

Um outro tipo de suporte utilizado em fermentação alcoólica é a

poliacrilamida. A poliacrilamida é um polímero formado pela mistura de dois monômeros, acrilamida e bisacrilamida, formando uma espécie de rede. Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram imobilizadas em gel de poliacrilamida e foi verificado que dentro das partículas do gel a viabilidade celular se comportou de forma heterogênea, com um elevado número de células não-viáveis. Por outro lado, as células que se encontravam na superfície do gel mantiveram a capacidade de formar colônias com boa atividade fermentativa (SIESS e DIVIES, 1981). Também foi avaliada a estabilidade desse suporte para imobilização de células de *Saccharomyces uvarum* na produção de etanol. A estabilidade das células imobilizadas em gel de poliacrilamida foi maior que as das células imobilizadas em alginato de cálcio (PUNDLE, PRABHUME e SIVARAMAN, 1988). A poliacrilamida também foi utilizada na imobilização de *S. cerevisiae*, para a bioconversão de etanol e butanol em aldeídos (NOROUZIAN *et al.*, 2003).

3.5.4 Alumina

Conforme visto anteriormente, a alumina é um material inorgânico que apresenta diversas vantagens para ser utilizada como suporte de imobilização. Sua vida útil, se não ilimitada, é mais longa do que a dos suportes orgânicos mais comumente usados em testes com fermentação alcoólica (SANTOS *et al.*, 1998; BEKERS *et al.*, 2001; RESHMI, SANJAI e SUGUNAN, 2006). NAVARRO, LUCCA e ALLIERI (1982) também assinalaram que o baixo custo da alumina torna-a mais atrativa para imobilizar células de leveduras. MOUEDDEB *et al.* (1996) ressaltaram que a alumina apresenta algumas vantagens sobre os materiais orgânicos, destacando-se a facilidade de esterilização e limpeza. Por estas características, este material vem sendo utilizado na imobilização de células de *S. cerevisiae*, para a produção de etanol (HAMDY, KIM e RUDTKE, 1990; SANTOS *et al.*, 1998; BORENSTEIN, 2003); *Zymomonas mobilis*, para produção de levânio e etanol (BEKERS *et al.*, 2001);

Lactobacillus rhamnosus, para a produção de ácido láctico (MOUEDDEB *et al.*, 1996). Segundo BEKERS *et al.* (2001), desde 1982 a alumina vem sendo amplamente utilizada como suporte para a imobilização de enzimas e microorganismos. A revisão elaborada por estes autores referencia diversos trabalhos que utilizaram este suporte para imobilização de biocatalisadores.

SILVA *et al.* (2006) avaliaram vários tipos de suportes, inclusive a alumina, na imobilização de bactérias redutoras de sulfato e bactérias metanogênicas. Espuma de poliuretano e carbono vegetal foram os suportes mais indicados para a imobilização das bactérias redutoras de sulfato enquanto que a cerâmica de alumina apresentou-se como o suporte mais indicado para as *archaea* metanogênicas. Estes autores afirmam que o sucesso de um reator anaeróbico está diretamente associado com o material usado como suporte da imobilização. Já, KOURKOUTAS *et al.* (2006) avaliaram o efeito de armazenamento e reuso das células imobilizadas de levedura em alumina, “kissiris” e pedaços de maçã, durante a fabricação do vinho. As células imobilizadas apresentaram maior estabilidade que as células livres quanto ao período de estocagem e atividade, independentemente do suporte utilizado. Os resultados também mostraram que as células imobilizadas não apresentaram efeito negativo na composição dos produtos responsáveis pelo aroma dos vinhos, durante a estocagem. Estes autores também destacam outros trabalhos da literatura que utilizam alumina, “kissiris” e pedaços de maçã como suporte para a imobilização na produção de vinhos.

3.5.5 Outros tipos de suportes

Células de levedura também foram imobilizadas em suportes porosos de terra de Kanuma (solo proveniente do Japão), carvão ativado e celulose em pó, por polimerização e por irradiação a baixa temperatura. As fermentações alcoólicas foram realizadas em reatores com células imobilizadas ou com recuperação de

células. Os reatores com células imobilizadas se apresentaram como a melhor alternativa nesse bioprocessamento quanto ao custo e complexidade, além de terem produzido mais etanol. A terra de Kanuma foi mais efetiva que a celulose em pó, pois a atividade das suas células imobilizadas permaneceu constante por longos períodos. Ao final, células imobilizadas obtidas por copolimerização de dois monômeros (10% de metoxi nonaetilenoglicol metacrilato e 10% de hidroxietil metacrilato) usando 30% de terra de Kanuma apresentaram a mais alta produtividade em etanol (KUMAKURA, YOSHIDA e ASANO, 1992).

4 CONCLUSÕES

O uso de biocatalisadores imobilizados (enzimas e células) é uma estratégia a ser utilizada para a condução de bioprocessos em várias situações. Aliada à engenharia, bioquímica, microbiologia e genética, esta tecnologia pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir custos de produção. Para aproveitar o enorme potencial desta metodologia, os desafios a superar passam pela produção de suportes e coadjuvantes eficientes e de baixo custo, assim como pela harmonização dos componentes do trinômio suporte - método de imobilização - uso do sistema imobilizado.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALBRAS. Matéria-prima. Alumina. Disponível em: http://www.albras.net/materia_prima.htm. Acessado em: 24/07/2003.
- BARON, G.V.; WILLAERT, R.G.; BACKER, L.U.C. Immobilized cell reactors. In: WILLAERT, R.G. Immobilized living cell systems: Modeling and experimental methods. London: John Wiley & Sons, 1996, p.67-95.
- BECERRA, M.; BAROLI, B.; FADDA, A.M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.I.S. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Microbial Technology*, v.29, p.506-512, 2001.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKEVICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levam-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, v.36, p.979-986, 2001.
- BORENSTEIN, I.M. Uso de alumina como suporte para imobilização de leveduras. São Paulo: USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003 (Dissertação de Mestrado).
- ÇAHLK, G.; SAVASÇI, H.; ÇAHLK, P.; ÖZDAMAR, T.H. Growth and k-carrageenan immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for L-alanine production. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p.67-74, 1999.
- CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. *Journal of Food Science*, n.3, p.3-20, 1989.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v.26, jan./fev., 2003.
- CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. Metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. *Biochemical Engineering Journal*, v.25, p.25-31, 2005.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. *Revista Analytica*, n.23, p.60-70, 2006.
- CHAMPAGNE, C.P.; BLAHUTA, N.; GAGNON, C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.68, p.681-688, 2000.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Immobilized biocatalysts to produce aminoacids and other organic compounds. In: LASKIN, A.I. Enzyme and Immobilized Cells in Biotechnology. p.37-70. The Benjamin/Cummings, U.S.A., 1983.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cells immobilization. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington/American Chemical Society, 1986.
- CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, v.10, p.12-50. England/Ellis Horwood, 1985.
- COSTA, S.A.; TZANOV, T.; PAAR, A.; GUDELJ, M.; GÜBITZ, G.M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of catalases from *Bacillus SF* on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p.815-819, 2001.
- CREDIDIO, E. Carragena: um antigo alimento do futuro. Disponível em: www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=39. Publicado em: 26/04/2004; Acessado em: 23/08/2006.
- DAVID, A.E.; WANG, N.S.; YANG, V.C.; YANG, A.J. Chemically

- surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial process. *Journal of Biotechnology*, v.125, p.395-407, 2006.
- DURAN, P.M.; BAILEY, J.E. Effects of immobilization on growth, fermentation properties and macromolecular compositions of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnology and Bioengineering*, v.28, p.73-87, 1986.
- EBERHARDT, A.M.; PEDRONI, V.; VOLPE, M.; FERREIRA, M.L. Immobilization of catalase from *Aspergillus niger* on inorganic and biopolymeric supports for H₂O₂ decomposition. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.47, p.153-163, 2004.
- FREEMAN, A.; LILLY, M.D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.335-345, 1998.
- FUKUDA, H. Immobilized microorganism bioreactor. In: ASENJO, J.A.; MERCHUK, J.C. *Bioreactor system design*. p.339-375. New York/ Marcel Dekker, 1994.
- GERBSCH, N.; BOCHHOLZ, R. New processes and actual trends in biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, v.16, p.259-269, 1995.
- GROBOILLOT, A.; BOADI, D.K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.14, p.75-107, 1994.
- HAMDY, M.K.; KIM, K.; RUDTKE, C.A. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. *Biomass*, v.21, p.189-206, 1990.
- HERNAIZ, M.J.; CROUT, D.H.G. Immobilization/stabilization on Eupergit C α -galactosidase from *B. circulans* and α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.26-32, 2000.
- HERNANDEZ, C.E.L.R. Degradação de clorofenóis e compostos fenólicos em águas residuais de refinaria por cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*. Rio de Janeiro: UFRJ/Bioquímica, 2005 (Tese de Doutorado).
- IDA, J.I.; MATSUYAMA, T.; YAMAMOTO, H. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD. *Biochemical Engineering Journal*, v.5, p.179-184, 2000.
- 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 tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Letters*, v.204, p.375-379, 2001.
- KAREL, S.F.; LIBICKI, S.B.; ROBERTSON, C.R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, v.40, p.1321-54, 1985.
- KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis*, v.10, p.157-176, 2000.
- KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, v.30, p.269-278, 2006.
- KOLOT, F.B. New trends in yeast technology- immobilized cells. *Process Biochemistry*, v.15, p.2-8, 1980.
- KOURKOUTAS, Y.; KANELAKI, M.; KOUTINAS, A.A.; TZIA, C. Effect of storage of immobilized cells at ambient temperature on volatile by-products during wine-making. *Journal of Food Engineering*, v.74, p.217-223, 2006.
- KUMAKURA, M.; YOSHIDA, M. ASANO, M. Preparation of immobilized yeast cells with porous substrates. *Process Biochemistry*, v.27, p.225-229, 1992.
- LEE, T.H.; AHN, J.C.; RYU, D.Y. Performance of an immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v.5, p.41-45, 1983.
- LENG, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z.H. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52. *Process Biochemistry*, v.41, p.1669-1672, 2006.
- LÓPEZ, A.; LÁZARO, N.; MARQUÉS, A.M. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads. *Journal of Microbiological Methods*, v.30, p.231-234, 1997.
- LOZANO, P.; PÉREZ-MARÍN, A.B.; DE DIEGO, T.; GÓMEZ, D.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; BELLEVILLE, M.P.; RIOS, G.M. IBORRA, J.L. Active membranes coated with immobilized *Candida antarctica* lipase B: preparation and application for continuous butyl butyrate synthesis in organic media. *Journal of Membrane Science*, v.201, p.55-64, 2002.
- MARTÍN, T.M.; PLOU, F.J.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular catalysis B:*

- Enzymatic, v.21, p.299-308, 2003.
- MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. *Cerevisiae and Biotechnology*, v.17, p.55-56, 58-59, 1992.
- MORENO, J.M.; SINISTERRA, J.V. Immobilization of lipase from *Candida cylindracea* on inorganic supports. *Journal of Molecular Catalysis*, v.93, p.357-369, 1994.
- MOUEDDEB, H.; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for lactic acid production. *Journal of Membrane Science*, v.114, p.59-71, 1996.
- NAGASHIMA, M. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v.21, p.49-58, 1984.
- NAVARRO, A.C.; DURAND, G. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. *European Journal of Applied Microbiology*, v.4, p.243-254, 1977.
- NAVARRO, A.C.; LUCCA, M.E.; ALLIERI, D.A.S. Producción continua de etanol con levaduras inmovilizadas en bagazo. *Acta Cient. Venezolana*, v.33, p.214-218, 1982.
- NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*, v.80, p.189-193, 2000.
- NOROUIAN, D.; AKBARZADEH, A.; INANLOU, D.N.; FARAHMAND, D.; SALEH, M.; SHEIKH-UL-ESLAM, F.; VAEZ, J. Biotransformation of alcohols to aldehydes by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5080. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p.150-153, 2003.
- PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, v.18, p.303-319, 2000.
- PEREIRA, A.C.; KUBOTA, L.T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. *Química Nova*, v.27, 2004 (on line).
- PETRI, A.; GAMBICORTI, T.; SALVADORI, P. Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.27, p. 103-106, 2004.
- PILKINGTON, P.H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N.A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.18, p.237-255, 1998.
- PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. cap.16, p.355-372.
- PUNDLE, A.; PRABHUME, A.; SIVARAMAN, H. Immobilization of *Saccharomyces uvarum* cells in porous beads of polyacrylamide gel for ethanolic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.29, p.426-429, 1988.
- RAMAKRISHNA, S.V.; PRAKASHAM, R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*, v.77, p.87-100, 1999.
- RESHMI, R.; SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Enhanced activity and stability of α -amylase immobilized on alumina. *Catalysis Communications*, v.7, p.460-465, 2006.
- SANTOS, P.S.; LIMA, U.A.; SANTOS, H.S.; KIYOHARA, P. Preparation of channeled alumina and aluminum hydroxide beads and membranes for yeast cell immobilization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.70, p.23-24, 1998.
- SISS, M.H.; DIVIES, C. Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in a polyacrylamide gel and performing alcoholic fermentation. *Eur. J. Applied Microbiology Biotechnology*, v.12, p.10-15, 1981.
- 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, p.93-98, 2006.
- TAMPION, J.; TAMPION, M.D. Immobilized cells: principles and applications. Cambridge University Press. 257p., 1988.
- TU, M.; ZANG, X.; KURABI, A.; GILKES, N.; MABEE, W.; SADDLER, J. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters*, v.28, p.151-156, 2006.
- Van IERSEL, M.F.M.; BROUWER-POST, E.; ROMBOUTS F.M.; ABEE, T. Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p. 602-607, 2000.
- VITOLO, M. Imobilização e células e enzimas. *Biotecnologia*. n.11, p.2, janeiro, 1988.
- WILLIAMS, D.; MUNNECKE, D.M. The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v.23, p.1813-1825, 1981.