

BIOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM FASE SÓLIDO/GÁS: PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES

Victor H. Perez^{*a}, Samyra I. S. Boeno^a, Patrícia R. Ferreira^a, Everson A. Miranda^b e Gustavo P. Valença^c^aDepartamento de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 28013-602 Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil^bDepartamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil^cDepartamento de Engenharia de Processos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil

Recebido em 29/07/2013; aceito em 13/09/2013; publicado na web em 24/10/2013

HETEROGENEOUS BIOCATALYSIS IN SOLID/GAS PHASE: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Enzymatic conversion of gaseous substrates into products in aqueous-restricted media, using enzymes or whole cells (free and immobilized) as biocatalysts, constitutes a promising technology for the development of clearer processes. Solid-gas systems offer high production rates for minimal plant sizes, allow important reduction of treated volumes, and permit simplified downstream processes. In this review article, principles and applications of solid-gas biocatalysis are discussed. Comparisons of its advantages and disadvantages with those of the organic- and aqueous-phase reactions are also presented herein.

Keywords: biocatalysis; solid/gas phase; enzymes; whole cells.

INTRODUÇÃO

Tradicionalmente os processos enzimáticos têm sido empregados em meio aquoso, principalmente devido à ideia preconcebida de que este é um bom ambiente para manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente ativa. Esse conceito não é, entretanto, completamente verdadeiro, dado que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela em soluções aquosas, ou em certos casos, até superior.^{1,2} Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original. A incapacidade da proteína de se desdobrar em meio não aquoso deve-se em parte ao fato das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima serem aumentadas em solventes orgânicos, devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares.

Em sentido estrito, podem ser considerados como ambientes não aquosos os solventes orgânicos, os fluidos supercríticos, os gases, os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solventes.¹⁻⁴

Um grande número de trabalhos na área de biocatálise em meios não convencionais pode ser encontrado na literatura especializada, tendo em vista o interesse científico demonstrado por diversos grupos de pesquisa, no sentido de elucidar as propriedades e o comportamento de enzimas em meios não aquosos.^{2,4-6} Consequentemente, o número de rotas de síntese que incorporam um passo enzimático torna-se cada vez mais crescente. Bem ilustrativos são os trabalhos de revisão de literatura publicados,^{1,2,7-12} que reúnem exemplos importantes, sob o ponto de vista de síntese orgânica, de reações catalisadas por diferentes classes de enzimas.

Igualmente, avanços têm sido registrados na catálise enzimática heterogênea, especificamente em sistemas sólido-gás, nos quais substratos gasosos são transformados por ação de um biocatalisador em fase sólida em produtos também em fase gasosa.^{6,13,14} O tipo de

biocatalisador pode ser uma célula microbiana íntegra (*whole cells*) ou uma enzima purificada, ambas na forma livre ou imobilizada. Segundo Bárzana,¹⁵ o estudo pioneiro neste campo foi realizado por Yagi *et al.*¹⁶ em 1969 o qual mostrou que enzimas secas possuíam atividade catalítica para substratos em fase gasosa. No entanto, apenas a partir da década de 90 este tema foi revisitado vislumbrando-se uma gama de aplicações baseadas nas seguintes vantagens do ponto de vista comparativo, principalmente, com os sistemas biocatalíticos em fase aquosa e em solventes orgânicos:^{17,18}

- a) a imobilização covalente da enzima não é necessária, uma vez que esta não tem condições de desprender do suporte dissolvendo-se na fase que a envolve;
- b) a presença do biocatalisador em fase sólida favorece sua recuperação, permitindo a condução de reações em regime descontínuo com reutilização do biocatalisador ou em fluxo contínuo;
- c) como os substratos são voláteis, a presença de solventes também é desnecessária, evitando geração de subprodutos por eventuais reações envolvendo solventes;
- d) substratos e produtos sendo gasosos apresentam viscosidades baixas e altos valores de coeficientes de difusão, tornando estas reações menos susceptíveis a limitações por transferência de massa;
- e) a volatilidade dos substratos e produtos simplifica a etapa de purificação, tendo em vista que os produtos podem ser separados por simples condensação fracionada por meio de ajuste das temperaturas de condensação;
- f) enzimas secas (com atividade de água controlada) têm maior estabilidade térmica.

Em contrapartida, a maior desvantagem da biocatálise em fase gasosa pode ser relacionada ao fato de que muitos dos substratos requeridos para este tipo de sistema reacional apresentam pontos de ebulição muito elevados à pressão normal,¹⁹ dificultando, portanto, a seleção de substratos adequados para diversificar as aplicações desta tecnologia.

Neste contexto, a proposta desta revisão é descrever os principais aspectos tecnológicos envolvidos na biocatálise em fase sólido/gás, abordando de forma geral as questões referentes aos efeitos dos

*e-mail: victorh@uenf.br

diferentes parâmetros e variáveis do processo que caracterizam este sistema.

CATÁLISE ENZIMÁTICA EM FASE GASOSA

Dentre as enzimas usadas nestes sistemas encontram-se as hidrolases, entre as quais podem ser destacadas lipases de diversas fontes, cutinases e esterases; as oxidoredutases como álcool desidrogenase e álcool oxidase; e as liases como benzaldeído liase e benzoilformato descarboxilase. As principais reações estudadas são basicamente: esterificações, transesterificações e oxidação de álcoois a aldeídos conduzidas em regime descontínuo e contínuo em faixas de temperatura variando desde 300 até 345 K, havendo inclusive relatos de estudos efetuados a 370 K.

A maioria dos trabalhos publicados tem centrado o enfoque no mecanismo de interação água-enzima, bem como na influência da atividade de água (*a_w*) exercida na atividade e estabilidade da enzima. Estudos visando determinar como as interações entre o suporte e o substrato afetam o grau de hidratação das enzimas e influenciam a atividade catalítica são também descritos na literatura.^{6,20-24}

A Tabela 1 apresenta de forma resumida alguns destes sistemas

enzimáticos abordando tipos de enzimas e características principais do sistema reacional. As enzimas e reações utilizadas nestes estudos foram na maioria selecionadas como modelos, havendo pouca preocupação de se realizar trabalhos de modelagem matemática e simulação destes sistemas, bem como de desenvolvimento de processos industriais específicos.

Hidaka e Matsumoto³⁵ efetuaram um estudo cinético usando modelos fenomenológicos a partir dos balanços de massa na reação de oxidação de etanol a acetaldeído em fase gasosa conduzida em reator de leito fixo. De acordo com o modelo proposto, a formação de acetaldeído aumentou com o incremento da temperatura de reação e redução do teor de água no suporte, porém, diminuiu com o incremento da vazão do substrato, sendo constatada uma aproximação satisfatória entre os resultados experimentais e aqueles obtidos pela simulação.

Anteriormente, HWANG e colaboradores³⁸ propuseram um modelo matemático da reação de oxidação do etanol a acetaldeído em fase gasosa, a partir da derivação da equação de fluxo em pistão. O modelo da taxa de reação foi representado por uma equação derivada de um mecanismo Bi-Bi sequencial ordenado.

Destaque pode ser também dado às reações em fase gasosa que

Tabela 1. Reações e enzimas como modelo de estudo em biocatálise em fase gasosa

Tipo de reação	Enzima	Características principais	ref.
Transesterificação e hidrólise	Cutinase de <i>Fusarium solani</i>	Sistema contínuo. Enzima imobilizada, 333 K.	17
Produção de aldeídos	Álcool desidrogenase	Sistema contínuo. Reciclo de NAD, temperatura de 333 K.	20
Transesterificação enantio-seletiva	Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	Reator contínuo usando N ₂ como gás de arraste. A enzima foi imobilizada por adsorção em Chromosorb P AW DMCS (acid washed dimethylchlorosilanized). As velocidades iniciais foram medidas a 343 K e uma vazão total de 900 µmol/min.	25
Redução estereosseletiva de 4-metil-2-pentanona para o quiral (S)-4-metil-2-pentanol	Álcool desidrogenase termofílica	Reator contínuo, enzima imobilizada, atividade de água na alimentação da fase gasosa de 0.9 e temperatura de reação a 333 K.	26
Resolução de alcoóis secundários lineares	Variantes de Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB) obtidas por mutagêneses	Reator contínuo usando N ₂ como gás de arraste, enzima imobilizada, temperaturas de reação de 308 a 363 K e vazão total de 800 µmol/min para os experimentos termodinâmicos.	27
Redução enantioselectiva de proquiral 2-butanona em quiral 2-butanol	Cetorredutase	Reator contínuo, enzima imobilizada, temperaturas de 313K, 323K, 333K, 343K.	28,29
Transesterificação (alcoólise) de metil propionato e propanol	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	Sistema contínuo, reator de leito empacotado, enzima imobilizada, à temperatura de 343 K.	30
Hidrólise de acetato de etila	Lipase de <i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM)	Reator de leito fixo. Enzima imobilizada.	31
Redução enantioselectiva de proquiral acetofenona em 1-feniletanol	Álcool desidrogenase de <i>Thermoanaerobacter sp.</i>	Sistema contínuo, enzima imobilizada, 313,15K.	32
Redução de acetofenona em (R)-1-feniletanol	Álcool desidrogenase de <i>Lactobacillus brevis</i>	Sistema contínuo, reator de leito empacotado, enzima imobilizada, temperaturas de 298, 313, 323 e 333.	33
Produção de acetato de etila	Lipases de <i>R. oryzae</i> , <i>R. niveus</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. cepacia</i> .	As reações de esterificação foram conduzidas em temperaturas de 298 e 318 K, porém não foi observado efeito da temperatura sobre o rendimento das reações.	34
Oxidação de etanol a acetaldeído	Álcool oxidase	Reator de leito fixo. Enzima imobilizada.	35
Produção de ésteres acetato e propionato de etila	Lipase pâncreas de porco	Sistema fechado (reciclo contínuo) em batelada. Enzima imobilizada em lâ de vidro.	36
Síntese de acetato de etila (esterificação)	Lipase pâncreas de porco	Sistema em batelada, a 298 e 373 K.	37
Produção de acetaldeído	Álcool oxidase	Sistema contínuo, reator de leito fixo, temperaturas de 298, 308, 318 e 328 K, enzima imobilizada.	38
Conversão de etanol a acetaldeído	Células de <i>Hansenula polymorpha</i> Álcool oxidase, Catalase	Sistema contínuo, 308 K. Células íntegras e enzimas imobilizadas.	39
Transesterificação de metil e etil propionato	Lipase pâncreas de porco Cutinase de <i>Fusarium solani</i>	Sistema contínuo, temperaturas de 338, 353 e 373 K. Enzima livre.	40
Oxidação de etanol a acetaldeído	Álcool desidrogenase	Sistema em batelada, enzima imobilizada.	41

utilizam enzimas combinadas, tal como no caso da oxidação do etanol a acetaldeído catalisada por álcool oxidase de *Pichia pastoris*.^{35,39} Ao reagir etanol com O₂ são formados acetaldeído e peróxido de hidrogênio (Figura 1), mas sendo este último um inibidor da enzima álcool oxidase a utilização de uma segunda enzima como peroxidase (catalase) é uma estratégia adequada para promover a decomposição irreversível do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

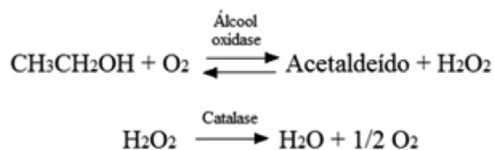


Figura 1. Esquema reacional da oxidação em fase gasosa de etanol a acetaldeído usando uma enzima álcool oxidase

Nas reações em fase gasosa contínua que utilizam enzimas dependentes de cofatores, recomenda-se a alimentação contínua de um co-substrato no sistema, possibilitando a regeneração do cofator pela ação da mesma enzima da reação principal, como ilustrado na Figura 2. Na redução enantiosseletiva de 4-metil-2-pentanona em fase gasosa utilizando 2-propanol como co-substrato ocorre a formação do quiral (R)-4-metil-2-pentanol com concomitante regeneração do cofator NADH usando a mesma enzima álcool desidrogenase imobilizada.²⁶

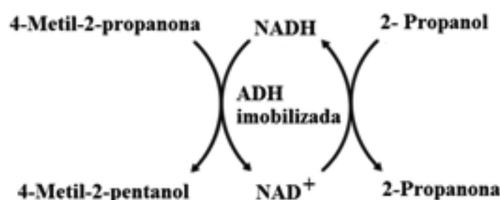


Figura 2. Esquema reacional da redução enantiosseletiva em fase gasosa de 4-metil-2-pentanona para o quiral (R)-4-metil-2-pentanol usando a enzima álcool desidrogenase (ADH). Nomenclatura: ADH – enzima álcool desidrogenase; NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada); NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

Alternativamente ao uso de enzimas purificadas, a regeneração de cofatores⁴² pode ser alcançada explorando a capacidade de células microbianas integras (sistemas multi-enzimáticos) tipo *whole cells* de catalisar reações em fase gasosa. Desta forma, na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos de biocatálise em fase gás que utilizam *whole cells* como biocatalizadores. Particularmente, este tipo de processo pode ser atrativo economicamente em virtude do seu menor custo comparativamente com aqueles observados para enzimas purificadas, além de prover às enzimas um ambiente natural que favorece sua conformação estrutural de modo a evitar mudanças que resultem em perdas de atividades em meios não convencionais.

A Figura 3 apresenta um esquema genérico³¹ de um sistema experimental para o desenvolvimento das reações enzimáticas em fase sólido/gás em escala de laboratório. De uma forma geral, este sistema experimental é constituído por um reator volumétrico de vidro cuja operação se baseia basicamente em princípios da termodinâmica uma vez que a preparação dos substratos ocorre pela saturação da corrente gasosa com seus respectivos vapores quando o gás de arraste, depois de sair do borbulhador e passar pelo saturador, entra em equilíbrio com a fase líquida. Neste caso, a pressão parcial dos reagentes é igual à pressão de vapor correspondente à pressão acima do ponto de orvalho dos compostos puros, na temperatura do saturador (temperatura de saturação). A pressão de vapor em cada caso é medida pela variação da vazão volumétrica e a temperatura de saturação correspondente, determinando-se desta forma a concentração (pressão parcial) dos substratos/produzidos. Pode-se então obter diferentes pressões de vapor para cada substância. Neste contexto, para o estudo e operação destes sistemas em fase gasosa a razão de pressões de vapor P/P_1 pode ser calculada a partir da equação de Clausius-Clapeyron⁵² como ilustrada na Equação 1:

$$\ln \frac{P}{P_1} = - \frac{\Delta H_v}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_e} \right) \quad (1)$$

em que: T é a temperatura do saturador, T_e é a temperatura de ebulição, ΔH_v é a entalpia de vaporização e R é a constante dos gases ideais.

Até o momento, não foram encontrados relatos na literatura

Tabela 2. Biotálise em fase gasosa usando células íntegras de micro-organismos (whole cells)

Reação	Tipo de micro-organismos	Características principais	Ref.
Conversão de etanol a acetaldeído	<i>Hansenula polymorpha</i>	Sistema contínuo, 308 K. Células e enzimas imobilizadas.	39
Hidrólise de 1-clorobutano	Células secas de <i>E. coli</i> recombinante	Sistema contínuo, temperatura de 40°C e atividade de água 0,7. Uma estabilidade baixa foi observada.	43
Oxidação/ redução acopladas de 1-butanol-hexanal	<i>Rhodococcus erythropolis</i> NCIMB 13064	As reações foram conduzidas comparativamente em fase aquosa e em fase gasosa a 40 e 60°C.	44
Hidrólise de 1-clorobutano	Células liofilizadas de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	A a_w ótima foi de 0,9 e a temperatura de 40°C foram adequadas para uma melhor estabilidade e atividade enzimática.	45
Desalogenação hidrolítica de 1-clorobutano	Células liofilizadas de <i>Rhodococcus erythropolis</i> NCIMB 13064	Sistema contínuo, a_w ótima foi de 0,9 e a temperatura de 40°C. A estabilidade do sistema foi dependente de quantidade de HCL acumuladas nas células.	46
Redução de hexanal	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sistema contínuo, temperatura de 45, 65, 75 e 85°C e a_w 0,57.	47
Hidrólise de haloalcanos	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	As células foram suportadas por imobilização covalente em polietilenoimina impregnada com gamma-alumina.	48
Redução de hexanal	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A melhor atividade e estabilidade foram obtidas com a_w de 0,57. Obteve-se 32% de conversão em 20 h.	49
Oxidação de propileno e etano	<i>Mycobacterium</i> PY1 e <i>Xanthobacter</i> PY2	Células livres e imobilizadas em alginato.	50
Produção de óxido de propileno	<i>Methylosinus</i> sp	Células imobilizadas em esferas de vidro poroso.	51

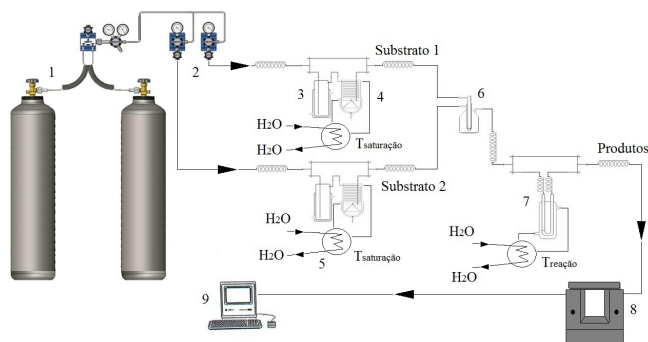


Figura 3. Sistema experimental para reações em fase gasosa o qual opera à pressão atmosférica e se baseia na saturação do gás de arraste pelos substratos em linhas separadas antes de se juntarem na câmara de mistura para seguir até a etapa de reação²¹: (1) sistema de suprimento de gás de arraste e de referência; (2) válvula de ajuste fino; sistemas para a preparação dos substratos: (3) borbulhador e (4) saturador operando na temperatura de saturação ($T_{\text{saturação}}$); (5) banho termostático; (6) câmara de mistura dos gases; (7) biorreator de leito fixo operando na temperatura de reação ($T_{\text{reação}}$); (8) cromatógrafo a gás para monitoramento on-line das reações; (9) computador para aquisição de dados

sobre a implantação desta tecnologia em escala industrial. Entretanto, dados de produção de ésteres aromáticos de interesse da indústria de alimentos em sistema de biocatálise sólido/gás foi validado em escala piloto.⁵³ Trata-se de um sistema fechado no qual o N_2 usado como gás de arraste é reciclado reduzindo seu consumo. Este sistema opera basicamente com três diferentes blocos de pressurização, isto é, um bloco de pressão reduzida incluindo essencialmente uma unidade flash, trocador de calor e o biorreator; um segundo bloco que opera com pressões moderadas incluindo essencialmente a unidade de separação líquido/gás e finalmente um bloco de alta pressão que corresponde à etapa de condensação final.

CÁLCULO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO

A taxa (r_A) de reação (Equação 2) para estes sistemas pode ser expressa em moles do substrato limitante consumido por hora e por massa de biocatalisador empregado ($\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$), cujo procedimento de cálculo para reatores sólido/gás tem sido descrito de forma simples na literatura.⁵⁴

$$-r_A = \frac{Q \cdot P_{A0} \cdot x}{R \cdot T \cdot W} \quad (2)$$

em que: P_{A0} é a pressão parcial do substrato A na entrada do reator, atm; Q é a vazão volumétrica, L/h; R é a constante dos gases, 0,082 atm L/mol K; T é a temperatura, K; W é a massa de biocatalisador, mg; e x é a conversão da reação, %.

Entretanto, alguns autores^{6,17,55} sugerem trabalhar com atividade termodinâmica (a_i), a despeito de pressões parciais para expressar as concentrações de substratos e produtos, ou seja, com a razão entre a pressão parcial (P_i) de cada substrato no sistema e a correspondente pressão de saturação da substância pura (P_{sat}) numa dada temperatura (Equação 3).

$$a_i = \frac{P_i}{P_{\text{sat}}} \quad (3)$$

Desta forma, é possível corrigir e quantificar melhor a disponibilidade dos substratos para a enzima, principalmente quando

ocorrem fenômenos de solvatação e dessolvatação que modificam a disponibilidade de substratos e produtos para a enzima.⁵⁶

EFEITO DA ATIVIDADE DA ÁGUA SOBRE A ESTABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A água tem um efeito duplo nas reações catalisadas por enzimas: se por um lado ajuda a preservar a conformação catalítica da enzima, por outro lado participa do seu processo de inativação, especificamente na terminativação.⁴⁰ Geralmente, tem sido considerado que a atividade das enzimas é dependente do nível de hidratação e que uma enzima requer um nível mínimo de hidratação ao redor de 0,2 g H_2O/g para exibir atividade. Entretanto, algumas enzimas podem apresentar atividade em fase gasosa em níveis mais baixos de hidratação.^{57,58}

Halling²¹ descreveu os aspectos necessários para estudar a influência da água em meios não convencionais, enfatizando a necessidade de se caracterizar a disponibilidade da água nestes sistemas através do parâmetro termodinâmico atividade da água (a_w), como a seguir definido:

$$a_w = \frac{P_{v H_2O}}{P_{v H_2O_{ref}}} = \frac{UR}{100} \quad (4)$$

em que: UR é a umidade relativa do ar, em % e P_v ; $P_{v_{ref}}$ são as pressões de vapor da água em equilíbrio com o sistema usado (na temperatura de saturação) e a pressão de vapor da água à temperatura de referência (temperatura de reação), respectivamente.

Este critério foi também adotado por Lamare e Legoy,¹⁷ que demonstraram que a atividade de água é o parâmetro mais relevante em tais sistemas a despeito do teor de água livre na fase gasosa, uma vez que a ligação das moléculas de água com sítios específicos na proteína depende deste parâmetro termodinâmico.

A síntese de acetato de etila em fase gasosa usando lipase foi estudada por Hwang e Park,^{37,59} sendo observada redução da taxa de formação do éster com o incremento do teor de água na enzima. Resultados similares foram descritos na reação de transesterificação⁴⁰ catalisada por lipase pancreática para atividades de água superiores a 0,29, bem como na oxidação de etanol a acetaldeído, sendo verificado aumento da concentração de acetaldeído em função do aumento da temperatura de reação e redução do teor de água no biocatalisador.³⁵ Contudo, estes resultados são discordantes daqueles obtidos por Barzana *et al.*,⁶⁰ que sugerem um efeito contrário da água durante a reação de oxidação de etanol a acetaldeído. No mesmo sistema, usando álcool desidrogenase, a atividade da água afetou favoravelmente a taxa de reação uma vez que a energia de ativação diminuiu com o incremento de a_w , efeito esse justificado em função da rigidez da enzima para baixos níveis de hidratação. Entretanto, a atividade da água também afetou fortemente a estabilidade da enzima em fase gasosa,⁴¹ isto é, um incremento na a_w resultou no aumento da atividade catalítica da enzima, enquanto a estabilidade diminuiu consideravelmente. Por outro lado, desde que a reação aconteça pela interação direta do etanol gasoso com a enzima, os autores concluíram que a formação de uma fase de etanol pré-adsorvida na superfície do suporte não era um pré-requisito para o desenvolvimento da reação.

A adsorção de água em álcool desidrogenase na presença de substratos em fase gasosa com hidrofobicidades diferentes foi estudada por Yang e Russell.^{22,23} Segundo os autores, foi constatada a presença de histerese nas isotermas de adsorção e os dados experimentais foram mais bem ajustados pelo modelo de multicamadas de Huttig, ao invés do modelo de Langmuir, tradicionalmente utilizado.

A conversão de etanol em acetaldeído em um biorreator gás-sólido

contínuo foi estudada utilizando células íntegras de *Hansenula polymorpha* e comparou-se os resultados com a reação conduzida por álcool oxidase purificada e catalase como uma segunda enzima para degradar peróxido de hidrogênio formado.³⁹ Estes autores observaram que a estabilidade da enzima álcool oxidase no reator aumentava com a redução do teor de água. A estabilidade das células íntegras foi maior do que a das enzimas purificadas, sendo que o sistema se manteve estável por mais de um mês à temperatura de 308 K com conversão completa de etanol a acetaldeído, enquanto o teor de umidade da enzima era mantido aproximadamente em 8%.

Robert *et al.*²⁰ publicaram um trabalho sobre o papel da água na biocatálise em fase gasosa, estudando o desempenho da álcool desidrogenase e de enzimas lipolíticas em um reator gás-sólido contínuo. Em relação às enzimas lipolíticas concluíram que a água tinha um efeito positivo na atividade inicial da enzima, mas comprometia sua estabilidade, ou seja, tanto a atividade quanto a estabilidade da enzima eram altamente dependentes de seu nível de hidratação inicial. Determinaram a isoterma de adsorção de água para uma enzima cutinase termoestável de *Fusarium solani* clonada em *E. coli* e consideraram que valores de atividade de água menores que 0,2 correspondem à água ligada à estrutura da enzima, entre 0,2 e 0,7 correspondem à água na primeira camada de hidratação e acima de 0,7 correspondem à água livre que se envolve no processo de desnaturação da enzima.

Por outro lado, Condor *et al.*⁶¹ reportaram uma isoterma de atividade de água para a Lipozyme IM, uma lipase de *Mucor miehe* imobilizada em resina de troca aniônica, à temperatura de 303 e 313 K e ajustaram uma equação polinomial de quarta ordem para o teor de água no sólido em função da atividade de água (a_w) a qual é válida para $a_w < 0,88$.

Graber *et al.*²⁴ compararam o papel da água nos parâmetros de ativação termodinâmica na reação de alcoólise de metil propionato e n-propanol catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em um biorreator sólido-gás contínuo e em um sistema em meio orgânico. Os autores concluíram que as variações de entalpia e entropia foram diferentes e opostas nestes sistemas. Em fase gasosa, com o aumento da a_w foi observado um decréscimo na barreira energética da reação e predominaram modificações na flexibilidade da enzima. No sistema em meio orgânico o fenômeno predominante que afetou os parâmetros termodinâmicos foi o aumento da polaridade do solvente para altos níveis de a_w , resultando em incrementos da energia de ativação da reação e um decréscimo da entropia do sistema. Em ambos os casos a energia livre de Gibbs foi negativa.

EFEITO DO SUPORTE SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas podem ser usadas tanto em solução (sistemas homogêneos) como em forma sólida. As enzimas na forma sólida podem ser usadas como precipitados (sólidos liofilizados), ligadas quimicamente a matrizes ou imobilizadas.⁶² Nos sistemas que contêm enzimas imobilizadas em suportes sólidos, o suporte tem uma influência significativa na atividade enzimática, podendo deslocar o equilíbrio da reação devido a sua interação com as moléculas de água.

A imobilização de enzimas minimiza sua desnaturação durante os processos de preparação e aplicação subsequente,⁶³ e ainda minimiza a agregação de enzimas, que pode levar a uma perda de atividade e estabilidade reduzida.¹⁸ Em contrapartida, sabe-se que enzima adsorvida nos poros de um suporte pode apresentar menor atividade catalítica comparada à enzima livre, devido a uma ruptura da conformação da proteína.¹⁸

Nos estudos de biocatálise, em geral se tem observado certa preferência pelo uso de matrizes orgânicas como suporte de enzimas. Porém alguns tipos de suportes inorgânicos têm sido utilizados tanto em pesquisa básica como industrialmente. Esta preferência deve-se fundamentalmente ao fato que suportes orgânicos apresentam alta reatividade, facilitando a ligação com as enzimas e permitindo a sua modificação estrutural e química. Contudo, suportes inorgânicos, devido às suas propriedades físicas, são preferidos para aplicações industriais.⁶⁴ Alta resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ao ataque microbiano são algumas das vantagens que apresentam os suportes inorgânicos quando comparados aos orgânicos. Além disso, os materiais inorgânicos não apresentam mudanças na sua estrutura pela influência de amplas faixas de pH, temperatura e pressão e podem ser facilmente regenerados por pirólise.

Nas pesquisas de biocatálise em fase gasosa matrizes orgânicas e inorgânicas têm sido utilizadas (Tabela 3), mas geralmente o efeito do suporte e algumas de suas propriedades (caráter ácido/básico, estrutura, etc.) sobre o comportamento deste sistema não têm sido exaustivamente discutido. Contudo, desde que a imobilização covalente possa ser evitada nestes sistemas em fase gasosa, há uma clara preferência pela adoção da adsorção física como método de imobilização, como pode ser verificado na Tabela 3.

Muito embora a atividade de água venha a ser a melhor maneira de se definir a disponibilidade de moléculas de água para interação com a proteína, deve-se levar também em consideração a influência do

Tabela 3. Alguns tipos de suportes usados em biocatálise em fase gasosa

Enzima	Tipo de Suporte	Método de imobilização	Ref.
Lipase de <i>Candida cylindracea</i> e Cutinase recombinante de <i>Fusarium solani</i>	Chromosorb P	Adsorção	17
Cutinase recombinante de <i>Fusarium solani</i>	Resina de troca iônica	Covalente	17
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Tecido de fibra de vidro	Adsorção	18
Lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB) obtida de <i>Pichia pastoris</i>	Chromosorb P AW DMCS (acid washed dimethylchlorosilanzed)	Adsorção	25, 27
Álcool desidrogenase	Esferas de vidro não poroso	Adsorção	26
Lipases de <i>Mucor javanicus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. cepacia</i> .	Zeólitas sintéticas MCM-41 e Al-MCM-41	Adsorção	34
Álcool oxidase	Amberlite IRA-400	Adsorção	38
Álcool oxidase de <i>P. pastoris</i> e Catalase de <i>Aspergillus niger</i>	DEAE-celulose	Adsorção	39
Álcool oxidase de <i>Pichia pastoris</i> e Catalase de <i>Aspergillus niger</i>	DEAE-celulose Pérolas de vidro poroso (CGP)	Adsorção	41
Álcool desidrogenase	Partículas porosas de albumina bovina e glutaraldeído	Adsorção	65

suporte na distribuição destas moléculas.¹⁷ Lamare e Leogy¹⁷ observaram um aumento da atividade enzimática em função do aumento da atividade de água (de 0,1 a 0,8%) no sistema para cutinase imobilizada em uma resina trocadora de íons tipo IV, enquanto observaram um máximo para a atividade enzimática da mesma enzima suportada por adsorção em matriz apolar (Chromosorp P) para uma atividade de água de 0,6%. A retenção de água pelo primeiro suporte, por ser este hidrofílico, seria bem superior à retenção pelo segundo que, sendo hidrofóbico, não competiria pela água, permitindo que para menores atividades de água a enzima tivesse hidratação suficiente para, com alta mobilidade, alcançar desnaturação.

Debeche *et al.*¹⁸ reportaram que suportes hidrofóbicos são os preferidos em bioprocessos sólido/gás, pois sua interação com a água é muito baixa mesmo em atividades de água elevadas. Contudo, tratando-se de imobilização de lipases, os suportes hidrofóbicos têm sido utilizados com frequência, pois a bolsa hidrofóbica em torno do sítio catalítico de lipases facilmente interage com o suporte, sendo ele também hidrofóbico.¹⁸ Estes mesmos autores compararam duas diferentes estruturas de suporte, hidrofílica (suporte de tecido de fibra de vidro) e hidrofóbica (suporte de fibra de carbono) e concluíram que a lipase imobilizada no suporte hidrofóbico exibiu maior atividade provavelmente devido à hiperativação, ou seja, uma ativação interfacial promovida pela superfície hidrofóbica do suporte.

EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA

A polaridade do substrato pode afetar a adsorção de água pela enzima e assim modificar as propriedades catalíticas desta. Por exemplo, a adsorção de água pela enzima álcool desidrogenase foi estudada em presença de substratos orgânicos gasosos com reciclo do cofator NAD⁺, avaliando a interação da água com a enzima. Estes resultados foram comparados com a adsorção de água pela enzima na presença de uma mistura de gases livres de substratos orgânicos (vapor de água e hélio). Os resultados mostraram que a presença do composto hidrofóbico 3-metil-2-buten-1-ol não afetou a adsorção de água pela enzima, enquanto que a maior hidrofobicidade da acetona propiciou menor adsorção de água, indicando que moléculas orgânicas podem competir com a água durante o processo de hidratação da enzima em sistema gasoso.²²

Resultados similares foram obtidos por Carvalho *et al.*⁶⁶ no estudo sobre a influência da presença de gases (dióxido de carbono, propano e mistura destes) na reação de transesterificação por subtilisina Carlsberg. A composição da fase gasosa afetou a adsorção de água pela enzima como reportado nos estudos de Yang e Russell.^{22,23} Na presença do composto apolar, propano, a hidratação da enzima foi maior do que aquela encontrada na presença de fase gasosa polar, contendo dióxido de carbono, para a mesma concentração de água no sistema. Devido à baixa atividade da enzima na presença de dióxido de carbono, conclui-se que este gás, apesar de apresentar algumas conveniências, não é um gás promissor para o arraste de substratos.

Durante as reações de transesterificação em fase gasosa de metil e etil propionato com álcoois de cadeia lineares saturadas de tamanhos diferentes usando lipase pancreática e uma cutinase em reator de leito fixo contínuo observou-se que a atividade da enzima dependeu da natureza do éster e do comprimento da cadeia dos álcoois, isto é, um aumento do comprimento da cadeia e, consequentemente, da hidrofobicidade do álcool que resultou em taxas de reações menores, mas conferiu à enzima uma maior estabilidade.^{33,34}

Lamare *et al.*⁶⁷ observaram que álcoois utilizados na reação de transesterificação com cutinase podem substituir as moléculas de água na solvatação, com um efeito positivo sobre a taxa da reação, favorecendo a interação da enzima com os compostos não polares,

em baixos níveis de hidratação, ou seja, para baixos valores de atividade da água. Ao mesmo tempo esses autores observaram um incremento na afinidade da enzima pelo substrato à medida que aumentava a disponibilidade da água e a apolaridade do substrato. Assim, quando a disponibilidade da água no sítio ativo é limitada, a reatividade dos compostos não polares diminui devido à ausência de moléculas polares necessárias para interagir com os resíduos polares, para que as interações hidrofóbicas ocorram. Neste caso foi possível observar uma ação cooperativa, de um dos substratos com a enzima, em condições tais que este tem um papel importante na solvatação da proteína, interagindo com um grande número de resíduos e favorecendo a atividade catalítica.

EFEITO DA ADIÇÃO DE SOLVENTES EM SISTEMAS SÓLIDO/GÁS

Como discutido até aqui, sabe-se que enzimas secas, ou quase secas, apresentam atividade catalítica para substratos gasosos e ainda possuem maior estabilidade.^{18,33,68} Adicionando-se componentes orgânicos ao meio reacional, estes irão afetar o processo de interação entre o substrato e a enzima imobilizada.¹³ Sendo assim, Létisse *et al.*,¹³ investigando o efeito de componentes água, 2-metil-2-butanol e hexano na atividade da lipase B de *Candida antarctica*, para relacionar os efeitos desses componentes sobre os valores de K_i, constataram que o caráter inibitório do componente adicionado diminuiu conforme o composto era mais hidrofóbico, e ainda os valores de K_i para cada componente diminuíram com o aumento da hidrofobicidade do composto. Isto significa que componentes hidrofóbicos e apolares como o hexano aumentam a inibição por propanol. Entretanto, com a adição de componentes hidrofílicos e polares como a água, a inibição por propanol é menor, embora a inibição pelo próprio componente (água) seja maior. Estes efeitos têm de estar relacionados com o caráter inibitório dos compostos resultante de interações com a região polar em torno do sítio ativo da enzima.

Graber *et al.*,³⁰ analisando o efeito inibitório de solventes para lipase CalB de *Candida antarctica*, concluíram que havia uma inibição competitiva do solvente com o substrato. Para explicar os efeitos observados, esses autores sugerem inibição por solvente ao invés de mudança conformacional da enzima, devido à preferência dos solventes inibitórios (cetona e álcool terciário) de fixar no sítio ativo da enzima durante as simulações, enquanto o solvente não inibitório (hidrocarboneto) não tem possibilidade de ficar ligado por ligações de hidrogênio. Além disso, nenhuma alteração significativa na conformação da enzima foi observada durante as simulações. Confirmando o estudo anterior, Graber *et al.*⁵⁶ observaram que ao adicionar 2-metil-2-butanol em reação sólido/gás houve aumento da inibição por propanol, explicando a menor atividade da lipase CalB na presença de cetonas e álcool terciário no meio de reação. Entretanto, Leonard *et al.*⁶⁹ não reportaram qualquer efeito real sobre a enantiosseletividade da lipase B de *Candida antarctica* quando componentes orgânicos foram adicionados em sistema sólido/gás na reação de alcoólise estudada.

USO DE ADITIVOS PARA MELHORAR O DESEMPENHO ENZIMÁTICO EM SISTEMAS SÓLIDO/GÁS

Recentemente, melhoramentos no desempenho das enzimas têm sido descrito por meio da indução da estabilização pela adição de aditivos aos suportes de imobilização. Neste contexto, apenas alguns trabalhos têm sido publicados, entre os quais se encontram estudos de adição de sacarose^{32,35} e glicerol⁷⁰ sobre a atividade e estabilidade de álcool desidrogenase imobilizada,^{32,35} respectivamente. Ferloni *et al.*,³⁵ visando prolongar a vida útil da enzima, otimizando sua estabilidade,

observaram que ao adicionar sacarose na reação de redução catalisada por álcool desidrogenase em sistema gás/sólido, houve um aumento na estabilidade operacional do catalisador, a meia-vida da enzima aumentou quarenta vezes e a degradação enzimática foi irrelevante até temperaturas de 323 K. Isto foi devido, provavelmente, à formação de ligações de hidrogênio com a superfície da proteína, tornando-as mais compactas e termodinamicamente estáveis, sendo protegidas contra desnaturação térmica e maior umidade relativa.³⁵ Da mesma forma, Trivedi *et al.*³² obtiveram resultados semelhantes ao estudar o efeito de aditivos (sacarose) na catálise em fase gasosa usando uma álcool desidrogenase de *Thermoanaerobacter* (ADH T). Os resultados demonstraram que com a adição da quantidade ótima de sacarose (cinco vezes a quantidade da proteína) havia menos perda da atividade enzimática durante a imobilização e um aumento da estabilidade térmica da preparação imobilizada de ADH T.

Nos estudos de Nagayama *et al.*,⁷⁰ utilizando glicerol como aditivo, a proposta foi baseada no fato do conhecido efeito estabilizante do glicerol sobre enzimas e desta forma a adição deste composto na imobilização da álcool desidrogenase de *Parvibaculum lavamentivorans* em esferas de vidro não porosas mudou significativamente o desempenho da enzima, em termos de atividade catalítica, estabilidade, enantioseletividade assim como na produtividade do sistema reacional sólido/gás.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biocatálise em fase sólido/gás é um tema emergente e suas aplicações no campo da biotecnologia moderna como nas indústrias, química, farmacêutica e de alimentos são promissoras. Além disso, suas aplicações se estendem ao desenvolvimento de biossensores como métodos de detecção para aplicações analíticas^{15,71} e à detoxificação de correntes gasosas.⁴³⁻⁴⁶ Com base nos trabalhos revisados pode-se concluir que nestes sistemas a hidratação da enzima constitui um fator de extrema importância para garantir o equilíbrio entre a atividade enzimática e a estabilidade do biocatalisador em reações em fase gasosa. A atividade de água (a_w) é o parâmetro mais indicado para caracterizar e controlar a disponibilidade da água nesses sistemas. A polaridade do substrato deve ser também considerada como um parâmetro relevante na determinação da cinética destes processos. Nos sistemas contendo enzimas imobilizadas em suportes sólidos, o suporte pode afetar a atividade enzimática devido à dependência das suas propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas, podendo competir pela água durante a reação e deslocando o equilíbrio. Estudos de mecanismos da interação entre enzima, substrato, água e suporte e suas implicações na estabilidade, seletividade e atividade destes biocatalisadores, assim como a diversificação de aplicações e estudos de ampliação de escala para a implantação tecnológica desta tecnologia, são ainda aspectos que necessitam ser aprofundados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradem o apoio financeiro das Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

- Lima, A. W. O.; Angnes, L.; *Quim Nova* **1999**, 22, 229.
- Krishna, S. H.; *Biotechnol. Adv.* **2002**, 20, 239.
- Illanes, A.; Cauherff, A.; Wilson, L.; Castro, Guillermo R.; *Bioresour. Technol.* **2012**, 115, 48.
- Matsuda, T.; *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, 115, 233.
- Itabaiana Jr., I.; Miranda, L. S. M.; de Souza, R. O. M. A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 85-86, 1.
- Lamare, S.; Legoy, M. D.; Graber, M.; *Green Chem.* **2004**, 6, 445.
- Liese, A.; Vivela filho, M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 595.
- Schulze, B.; Wubbolts, M. G.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10, 609.
- De Conti, R.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, Paulo J. S.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 672.
- Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 272.
- Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 187.
- Wells, A.; *Industrial Applications of Biocatalysis: An Overview*; Carreira, E. M.; Yamamoto, H., eds.; Elsevier Ltd., 2012, cap 9.
- Létisse, F.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; Graber, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1652, 27.
- Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 413.
- Bárzana, E.; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1996**, 53, 1.
- Yagi, T.; Tsuda, M.; Mori, Y.; Inokuchi, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2801.
- Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 45, 387.
- Debeche, T.; Marmet, C.; Minsker, L. K.; Renken, A.; Juillierat, M. A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 36, 911.
- Paiva, A. L.; Malcata, F. X.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, 3, 99.
- Robert, H.; Lamare, S.; Parvaresh, F.; Legoy, M. D. *Prog. Biotechnol.* **1992**, 8, 23.
- Halling, P. J.; *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, 16, 178.
- Yang, F. X.; Russell, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 700.
- Yang, F. X.; Russell, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 709.
- Graber, M.; Dubouch, M. P. B.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1648, 24.
- Chaput, L.; Marton, Z.; Pineau, P.; Domon, L.; Tran, V.; Graber, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, 84, 55.
- Nagayama, K.; Spieß, A. C.; Büchs, J.; *J. Chem. Eng. Jpn.* **2011**, 44, 995.
- Marton, Z.; Léonard-Nevers, V.; Syrén, P. O.; Bauer, C.; Lamare, S.; Hult, S.; Tranc, V.; Graber, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 65, 11.
- Nagayama, K.; Spiess, A. C.; Büchs, J.; *Biochem. Eng. J.* **2010**, 52, 301.
- Nagayama, K.; Spiess, A. C.; Büchs, J.; *Biotechnol. J.* **2010**, 5, 520.
- Graber, M.; Irague, R.; Rosenfeld, E.; Lamare, S.; Franson, L.; Hult, K.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, 1774, 1052.
- Perez, V. H.; Valença, G. P.; Miranda, E. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, 1, 23.
- Trivedi, A. H.; Spiess, A. C.; Dausmann, T.; Büchs, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 71, 407.
- Ferloni, C.; Heinemann, M.; Hummel, W.; Dausmann, T.; Büchs, J.; *Biotechnol. Progr.* **2004**, 20, 975.
- Pires, E. L.; Miranda, E. A.; Valença, G. P.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, 98, 963.
- Hidaka, N.; Matsumoto, T.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 909.
- Barton, J. W.; Reed, E. K.; Davison, B. H.; *Biotechniques* **1997**, 11, 747.
- Hwang, S. O.; Park, Y. H.; *Biotechnol. Lett.* **1994**, 16, 379.
- Hwang, S. O.; Trantolo, D. J.; Wise, D. L.; *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 667.
- Kim, C.; Rhee, S.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, 14, 1059.
- Parvaresh, F.; Robert, H.; Thomas, D.; Legoy, M. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 39, 467.
- Bárzana, E.; Karel, M.; Klivanov, A.; *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, 34, 1178.
- de Carvalho, C. C. R.; *Biotechnol. Adv.* **2011**, 29, 75.
- Marchand, P.; Cremont, M.; Lamare, S.; Goubet, I.; *Biocatal. Biotransform.* **2009**, 27, 195.
- Marchand, P.; Rosenfeld, E.; Erable, B.; Maugard, T.; Lamare, S.; Goubet, I.; *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 43, 423.

45. Erable, B.; Maugard, T.; Goubet, I.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 45.
46. Erable, B.; Goubet, I.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; Maugard, T.; *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 47.
47. Goubet, I.; Maugard, T.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 425.
48. Dravis, B. C.; Swanson, P. E.; Russell, A. J.; *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *75*, 416.
49. Maugard, T.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *73*, 164.
50. Hamstra, R. S.; Murriss, M. R.; Traper, J.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 884.
51. Hou, C. T.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1984**, *19*, 1.
52. Green, D. W.; Perry, R. H.; *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. 8th ed. McGraw-Hill, 2007.
53. Lamare, S.; Caillaud, B.; Roule, K.; Goubet, I.; Legoy, M. D.; *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 361.
54. Fogler, H. S.; *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*. 4^a Ed. LTC, Brasil, 2012.
55. Janssen, A. E. M.; Vaidya, A. M.; Halling, P. J.; *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 340.
56. Graber, M.; Leonard, V.; Marton, Z.; Cusatis, C.; Lamare, S.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52*, 121.
57. Lind, P. A.; Daniel, R. M.; Monk, C.; Dunn, R. V.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1702*, 103.
58. Dunn, R. V.; Daniel, R. M.; *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **2004**, *359*, 1309.
59. Hwang, S. O.; Park, Y. H.; *Bioprocess. Eng.* **1997**, *17*, 51.
60. Bárzana, E.; Karel, M.; Klibanov, A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *15*, 25.
61. Condoret, J. S.; Vankan, S.; Joulia, X.; *Chem. Eng. Sci.* **1997**, *52*, 213.
62. Lortie, R.; *Biotechnol. Adv.* **1997**, *15*, 1.
63. Trivedi, A. H.; Spiess, A. C.; Dausmann, T.; Büchs, J.; *Biotechnol. Progr.* **2006**, *22*, 454.
64. Kenedy, J. F.; Cabral, J. M. S.; Enzyme immobilization. In *Biotechnology, vol. 7a, Enzyme Technology*; Kennedy, J. F., ed.; Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, Germany, 1987, cap. 7.
65. Pulvin, S.; Legoy, M. D.; Lortie, R.; Pensa, M.; Thomas, D.; *Biotechnol. Lett.* **1986**, *8*, 783.
66. Carvalho, I. B.; Sampaio, T. C.; Barreiros, S.; *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 399.
67. Lamare, S.; Robert, L.; Legoy, M. D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 1.
68. Kulishova, L.; Dimoula, K.; Jordan, M.; Wirtz, A.; Hofmann, D.; Schubel, B. S.; Fitter, J.; Pohl, M.; Spiess, A. C.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 271.
69. Leonard, V.; Lamare, S.; Legoy, M. D.; Graber, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *32*, 53.
70. Nagayama, K.; Spieß, A. C.; Büchs, J.; *Chem. Eng. J.* **2012**, *207*, 342.
71. Guilbeault, G.; Luong, J.; *J. Biotechnol.* **1988**, *9*, 1.