

# USO DE BIOCATALISADORES IMOBILIZADOS: UMA ALTERNATIVA PARA A CONDUÇÃO DE BIOPROCESSOS

## Resumo

A imobilização de biocatalisadores é uma estratégia que pode ser utilizada para a condução de bioprocessos em situações variadas. De uma forma geral, busca-se, com a imobilização, propiciar o uso de enzimas ou células por períodos prolongados através de processos contínuos ou semicontínuos. Na presente revisão, aspectos básicos e aplicados sobre este tema são apresentados de maneira seqüencial, evidenciando-se novas tendências na área. Em adição, o uso de células imobilizadas para a produção de cerveja em processo contínuo é apresentado.

**Palavras-chave:** Imobilização, células, enzimas, cerveja

## Summary

The immobilization of biocatalysts is a strategy that can be used for the conduction of bioprocesses in a number of situations. By using an immobilization method, one is seeking to use the enzymes or the cells for prolonged periods, through continuous or semi-continuous processes. In the present review, basic and applied aspects of this subject are presented in a sequential fashion, highlighting new tendencies in the area. In addition, the use of immobilized cells for the continuous production of beer is presented.

**Keywords:** Immobilization, cells, enzymes, beer

## Introdução

Biocatalisadores, enzimas ou células, têm sido amplamente utilizados em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Há muitos anos, esforços intensivos têm sido empreendidos não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. Apesar destes esforços intensivos, amplamente documentados na forma de publicações técnicas e registros de patentes, poucos processos baseados em técnicas de imobilização, seja de enzimas ou de células, foram implementados em escala industrial.

Acredita-se que o desenvolvimento de novos suportes de imobilização, aliado à utilização de técnicas de biologia molecular, possam contribuir para o desenvolvimento de novos processos em larga escala. Os conhecimentos adquiridos até o momento serão de fundamental importância para os progressos que venham a ser obtidos. Como objetivo final, deve-se ter em mente o planejamento de processos economicamente viáveis.

Face ao exposto, o presente trabalho tem por objetivo revisar a literatura relativa ao uso de biocatalisadores imobilizados, principalmente células, assim como ilustrar novas tendências na área. Desta forma, temas como conceito, vantagens, métodos de imobilização, tipos de suporte, reatores utilizados e exemplos de aplicações industriais já implementadas são abordados. O uso de células imobilizadas para a produção de cerveja em sistema contínuo de fermentação, com perspectivas de aplicação em escala industrial, é apresentado.

## Definição

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (Henniker, Estados Unidos, 1971), biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000).

Walter Carvalho\*,  
Larissa Canilha e  
Silvio Silvério da Silva

Faculdade de Engenharia  
Química de Lorena,  
Departamento de  
Biotecnologia

\* Autor para correspondência:  
Rodovia Itajubá-Lorena,  
Km 74,5  
Caixa Postal 116  
CEP: 12600-970.  
Lorena. SP  
Fone: (12) 3159-5027  
Fax: (12) 3153-3133  
E-mail:  
carvalho@debiq.faenquil.br

## Vantagens

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 realização de um processo contínuo (Beynum, 1980).

Uma vez que muitas reações comercialmente importantes envolvem sistemas multienzimáticos complexos, nos quais a presença de passos que requerem provisão de energia ou uso de cofatores é comum, a utilização de enzimas é economicamente inviável, porque a necessidade de adição de substâncias como ATP e coenzimas eleva consideravelmente o valor do produto final (Corcoran, 1985). Para estes casos, é dada ênfase à imobilização de células ao invés de enzimas propriamente ditas. Além da regeneração de cofatores ocorrer de maneira natural, vantagens como eliminação da necessidade de extração e purificação, estabilidade operacional geralmente maior, menor custo, maior rendimento de atividade e maior resistência a perturbações ambientais são descritas na literatura (Corcoran, 1985).

Por outro lado, o uso de células imobilizadas tem sido considerado como uma alternativa para aumentar a produtividade global de fermentações, tradicionalmente realizadas com células em suspensão, uma vez que permite o trabalho com elevadas concentrações celulares no reator (Ramakrishna e Prakasham, 1999). Entretanto, de acordo com Groboillot *et al.* (1994), o aumento de produtividade determinado pela imobilização celular ocorre principalmente através da operação contínua e da reutilização das células. De fato, a imobilização celular pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos fermentativos, possibilitando a reutilização dos mesmos biocatalisadores por longos períodos e estimulando processos contínuos, que podem reduzir os custos de produção (Gamarra *et al.*, 1988), além de poder aumentar a proteção das células contra inibidores e facilitar a separação dos biocatalisadores da fase líquida, onde os produtos de interesse estão presentes (Corcoran, 1985).

## Métodos de imobilização

Existem quatro princípios básicos para a imobilização de biocatalisadores: Ligação a superfícies, aprisionamento em matrizes porosas, contenção por membranas e auto-agregação (Gerbsch e Buchholz, 1995).

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, sendo a principal desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacio-

nal. 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).

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas normalmente envolve a sintetização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. 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 a matriz de aprisionamento geralmente resulta em limitações de transferência de massa, a imobilização na forma de esferas é geralmente preferida devido à elevada área superficial (Groboillot *et al.*, 1994). Como principais desvantagens, são citados o pequeno volume disponível para a contenção das células imobilizadas, a perda de células para o meio de fermentação, que limitam a quantidade de células imobilizadas nas esferas, e a instabilidade dos suportes normalmente utilizados, que limita a utilização dos agregados por longos períodos (Park e Chang, 2000).

O método de imobilização por meio de contenção em membranas 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 *et al.*, 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). De acordo com Gerbsch e Buchholz (1995), uma aplicação promissora deste princípio de imobilização é a contenção de biocatalisadores em micro esferas do tipo *hollow fiber*, formadas através de interações iônicas entre sulfato de celulose e cloreto de poli-dimetil-dialil-amônio. Entretanto, um equipamento especial para a imobilização é necessário.

O método de imobilização por meio de auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células 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).

## Tipos de suporte

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e/ou células através dos princípios de imobilização supracitados. A revisão elaborada por Groboillot *et al.* (1994) apresenta diversos exemplos de materiais tradicionalmente utilizados como suportes para a imobilização de biocatalisadores. De acordo com estes autores, a indústria alimentícia tem mostrado tendência na utilização de polímeros não tóxicos que formam estruturas semelhantes a géis, como proteínas, polissacarídeos e álcoois polivinílicos, em função da biocompatibilidade e aceitabilidade na produção de alimentos. Entre estes, merece destaque o gel de alginato de cálcio, que tem sido extensivamente estudado sob o ponto de vista tecnológico (Gerbsch e Buchholz, 1995).

O desenvolvimento de novos suportes para a imobilização de biocatalisadores, juntamente com as técnicas elaboradas especificamente para a imobilização nestes suportes, tem sido objeto de intenso estudo nos últimos anos. Estima-se que estes novos suportes e técnicas possam contribuir para a implementação de novos processos em escala industrial. Como exemplos, podem ser citados o uso de membranas catalíticas biofuncionais contendo arranjos enzimáticos imobilizados através de sítios específicos (Butterfield *et al.*, 2001), o uso de Eupergit C como um suporte de imobilização para enzimas de interesse industrial (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000) e o uso de criogéis de poli-vinil-álcool como matrizes para a imobilização de células (Lozinsky e Plieva, 1998).

## Uso de membranas catalíticas biofuncionais

O uso de membranas biofuncionais como suportes para a imobilização de enzimas normalmente envolve a imobilização randômica destas biomoléculas através dos numerosos resíduos de lisina presentes na sua estrutura. Entretanto, neste processo a atividade biológica é significativamente reduzida devido às diferentes orientações da enzima em relação à membrana e/ou à ligações através de múltiplos pontos. Para uma atividade catalítica eficiente, a imobilização através de sítios específicos, mantendo o sítio ativo da enzima em uma orientação adequada e afastado da superfície da membrana, é essencial. A utilização de técnicas de biologia molecular como mutagênese direcionada a sítios específicos, tecnologia de fusão de genes e métodos de modificação pós-traducional pode promover a imobilização de enzimas através de sítios específicos, minimizando a redução na atividade catalítica provocada pelos métodos de imobilização randômica tradicionais. Para uma abordagem detalhada do assunto, recomenda-se a leitura das revisões elaboradas por Turková (1999) e por Butterfield *et al.* (2001). Deve-se ressaltar também que técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para “imobilizar” enzimas na superfície celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, de forma a permitir a utilização direta de substratos como amido e celulozossacarídeos, entre outros (Ueda e Tanaka, 2000).

## Uso de Eupergit C

Eupergit C é um suporte que consiste em microesferas (diâmetro entre 100-250  $\mu\text{m}$ ) macroporosas, desenvolvido entre 1974 e 1980 pela *Röhm and Haas* através da copolimerização de N,N'-metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida. Este suporte apresenta potencial para a imobilização de enzimas de interesse industrial na produção de insumos finos e fármacos (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000). Devido à sua estrutura, o Eupergit é estável quimicamente em valores de pH variando entre 0 e 14, ou seja, pode imobilizar qualquer enzima na faixa de pH na qual ela é estável e não perde a sua atividade catalítica. Da mesma forma, a sua estabilidade mecânica é notável, uma vez que não mostrou nenhum atrito após 650 ciclos em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000 L. Este suporte se liga à enzima através de ligações covalentes feitas através de seus grupos oxirano, que reagem com os grupamentos amino das moléculas protéicas em condições neutras ou alcalinas. Alternativamente, o Eupergit pode se ligar à enzima através de seus grupos sulfidril e/ou carboxila em condições ácidas, neutras ou alcalinas. Devido à elevada densidade de grupos oxirano na superfície das microesferas (600  $\mu\text{mol/g}$  suporte seco), as enzimas são imobilizadas em vários sítios da sua estrutura. Este fenômeno, conhecido como ligação multi-ponto, é considerado o fator mais importante para a alta estabilidade operacional das enzimas imobilizadas em Eupergit C. Outra vantagem é o procedimento de imobilização simples, que consiste em misturar a enzima, dissolvida no tampão apropriado, com o suporte e deixar a mistura em contato a 20-25°C por 24 a 100 h. Em seguida, a enzima imobilizada é lavada com água e com a solução tampão a ser utilizada na aplicação subsequente. A capacidade de contenção é de aproximadamente 100 mg enzima/g Eupergit C (peso seco). Este suporte é comercialmente disponível em todo o mundo, em milhares de toneladas por ano, e já vem sendo utilizado por empresas individuais para a produção de biocatalisadores imobilizados. A revisão elaborada por Katchalski-Katzir e Kraemer (2000) oferece uma discussão bastante detalhada do assunto. Várias enzimas imobilizadas em Eupergit C são revisadas em comparação com outros suportes em termos de estabilidade operacional em concentrações de substratos realísticas para processos de produção industrial.

## Uso de criogéis de polivinil álcool

Criogéis de polivinil álcool, preparados pelo congelamento de soluções aquosas do polímero seguido de degelo, são suportes gélidos promissores para a imobilização de células. Como vantagens definidas da utilização deste suporte em relação a outros hidrogéis comumente utilizados com a mesma finalidade, podem ser citadas: Apresenta elevadas micro e macroporosidades, que permitem condições favorecidas para a transferência de massa de substratos e solutos; apresenta características reológicas de estrutura não quebradiça excelente, permitindo a utilização na maior parte dos biorreatores e exibindo insignificante erosão abrasiva em condi-



ções de agitação intensa; a termoestabilidade excede aquela observada para outros suportes gélidos termoreversíveis; é altamente resistente a degradação microbiológica; apresenta baixa sensibilidade à composição do meio de cultura; é um composto biologicamente compatível, não tóxico e disponível a baixo custo (Lozinsky e Plieva, 1998). O uso de criogéis de polivinil álcool tem se tornado progressivamente popular devido principalmente à sua elevada estabilidade operacional. O procedimento para imobilização, entretanto, não é tão simples como aqueles utilizados para a gelificação de polissacarídeos naturais, como alginato de cálcio, uma vez que envolve o congelamento (geralmente, valores de temperatura inferiores a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  são utilizados) e o degelo das células suspensas na solução de polivinil álcool. Devido às condições drásticas de temperatura utilizadas durante o procedimento de imobilização, a adição de alguns aditivos (sais, açúcares, crioprotetores) para manter a viabilidade do microrganismo é normalmente empregada. A velocidade de congelamento durante a imobilização é determinada pela crioresistência do microrganismo a ser imobilizado, enquanto a velocidade de degelo é o fator mais importante que influencia as propriedades físicas do gel. Quanto mais lento o processo de degelo, maior a estabilidade mecânica e térmica do gel formado. A termoestabilidade da matriz permite trabalhos com organismos mesofílicos e termofílicos, uma vez que as temperaturas de fusão do gel excedem a  $70\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Outra vantagem implícita no uso deste polímero como suporte para a imobilização de células se deve à possibilidade de reutilização. O carreador utilizado pode ser solubilizado por autoclavagem e a solução obtida pode ser reutilizada para a preparação de novos biocatalisadores imobilizados com a atividade desejada após a adição de novas células. Apesar de relativamente nova, esta técnica de imobilização celular encontra-se amplamente documentada na literatura científica e através de patentes. A revisão elaborada por Lozinsky e Plieva (1998) apresenta uma visão detalhada do assunto e referencia diversos trabalhos específicos.

### **Impacto da imobilização na fisiologia celular e atividade fermentativa**

A atividade fisiológica das células imobilizadas pode variar em função do método de imobilização empregado. Por exemplo: a auto-agregação através do uso de agentes químicos modifica quimicamente a membrana celular, afetando o metabolismo e o crescimento; Células adsorvidas podem apresentar propriedades de membrana diferentes e o acúmulo de células em um biofilme pode levar a limitações de transferência de massa; Técnicas de aprisionamento em matrizes porosas normalmente resultam em mudanças nas propriedades físico-químicas do microambiente no qual as células se encontram, influenciando o metabolismo celular. Estas variações na atividade fisiológica das células imobilizadas, dependentes também das características do suporte de imobilização utilizado, podem influenciar positiva ou negati-

vamente a performance do processo fermentativo através de diversos mecanismos, ainda pouco caracterizados e compreendidos (Groboillot *et al.*, 1994). De uma maneira geral, efeitos determinados por componentes solúveis da matriz de imobilização, tolerância e/ou proteção a compostos tóxicos e tipo de metabolismo, entre outros, têm sido utilizados como justificativas para a melhora ou piora na atividade catalítica determinada pela imobilização. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende basicamente de dois fatores: Das características peculiares do microrganismo e das condições de uso do microrganismo imobilizado. Face à variabilidade destes dois fatores, não existe um método e nem um suporte universais, adequados para qualquer processo. De acordo com Vitolo (1988), 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.

### **Reatores**

Após a escolha do suporte e método de imobilização adequados, uma das questões mais importantes consiste na resistência à transferência de massa entre a fase líquida, na qual se encontram os reagentes/substratos, e a fase sólida, na qual se encontram os biocatalisadores imobilizados (Karel *et al.*, 1985).

A transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores imobilizados é dividida em duas fases: a) transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio de fermentação até a superfície do suporte de imobilização, e b) transferência de massa interna, que descreve a transferência de reagentes/substratos no suporte de imobilização. Além das resistências à transferência de massa externa e interna, o “microambiente” no qual os biocatalisadores imobilizados se encontram, é determinado também por efeitos de partição entre a fase líquida e a matriz sólida de imobilização (Pilkington *et al.*, 1998a).

As limitações à transferência de massa interna são de particular importância em sistemas nos quais as células são imobilizadas por meio da técnica de aprisionamento em matrizes porosas, sendo a redução do diâmetro das esferas de imobilização uma alternativa eficiente para minimizar estas limitações (Pilkington *et al.*, 1998).

Supondo que as limitações à transferência de massa interna possam ser desprezadas, deve-se ter em mente que os agregados imobilizados só podem ser completamente ativos se as taxas de transferência dos reagentes/substratos presentes na fase líquida até a superfície do suporte de imobilização superarem as taxas de transferência interna e de reação (Baron *et al.*, 1996). Desta forma, esforços devem ser direcionados no sentido de eliminar as limitações à transferência de massa externa.

Fatores como tipo, tamanho e condições de operação do biorreator utilizado irão influenciar a transferência de massa ex-

terna em sistemas com biocatalisadores imobilizados, afetando o coeficiente de transferência de massa do filme líquido ( $K_L$ ) que envolve os agregados imobilizados. A otimização da mistura entre a fase líquida e a fase sólida maximiza o contato superficial entre estas fases, minimizando a espessura do filme líquido estagnante que envolve o suporte de imobilização, maximizando o valor de  $K_L$  e, conseqüentemente, minimizando as limitações impostas à transferência de massa (Pilkington *et al.*, 1998).

Embora vários tipos de reatores possam ser selecionados para um dado sistema imobilizado, a eficiência ótima requer uma escolha adequada (Baron *et al.*, 1996). Especificamente para trabalhos com células imobilizadas, fatores como requerimentos de transferência de massa (principalmente suprimento de oxigênio e remoção de gases), método de imobilização e características do suporte utilizados, natureza do substrato e requerimentos para o cultivo do microrganismo devem ser levados em consideração quando da escolha de um determinado tipo ou configuração de reator (Karel *et al.*, 1985; Fukuda, 1994; Baron *et al.*, 1996; Pilkington *et al.*, 1998a).

Os reatores utilizados para o cultivo de 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. Estes reatores podem ainda 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 *et al.*, 1996).

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 *et al.*, 1996). Embora vários tipos de turbinas possam ser utilizadas, 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 aerados, 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  $CO_2$ , compactação do leito, acúmulo de biomassa suspensa, ambos 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 boas condições de mistura (característica dos reatores de mistura) a baixas tensões de cisalhamento (característica dos reatores de leito empacotado). Em contraste com os reatores do tipo leito empacotado, os reatores do tipo leito fluidizado facilitam a mistura entre as fases líquida e sólida, a remoção de gases e minimizam a pressão sobre o leito de agregados imobilizados (Groboillot *et al.*, 1994). 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 fluxo 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, deve-se ressaltar que, dependendo das condições hidrodinâmicas do sistema, os agregados celulares podem sofrer limitações de transferência de massa, o que irá prejudicar as taxas de produção.

De acordo com Gerbsch e Buchholz (1995), o desenvolvimento, modificação e otimização de reatores foi objeto de intensos estudos de engenharia e desenvolvimento de processos nos últimos anos. Apesar destes esforços, nenhum sucesso substancial foi obtido no sentido de introduzir processos biotecnológicos economicamente comparáveis a processos químicos, se negligenciadas algumas poucas exceções. De acordo com estes autores, a principal tarefa da bioengenharia para o futuro é, em cooperação com a biologia molecular, superar este obstáculo, não através do desenvolvimento de novos tipos de reatores, mas através do planejamento e desenvolvimento de processos economicamente viáveis.

## Aplicações Industriais

Apesar do grande volume de literatura publicada sobre imobilização de biocatalisadores, a aplicação desta tecnologia em escala industrial é ainda limitada (Gerbsch e Buchholz, 1995). Como exemplos clássicos, podem ser citados:

**1) Enzimas imobilizadas:** A produção de xarope de milho rico em frutose, através da isomerização contínua de glicose com a enzima glicose isomerase pela *Clinton Corn Producing*, Estados Unidos; A produção contínua de L-aminoácidos com a enzima aminoacilase pela *Tanabe Seiyacu*, Japão; A produção de ácido 6-amino-penicilânico a partir de penicilina G ou V com a enzima penicilina acilase pela Bristol-Myer Squibb, Inglaterra.

**2) Células imobilizadas:** A produção de acrilamida a partir de acrilonitrila por células não viáveis de *Rhodococcus rhodochrous* pela *Nitto Chemical Industries*, Japão (Katchalski-

Katzir e Kraemer, 2000). Com exceção de algumas aplicações na produção de vinagre e no tratamento de efluentes, não se tem notícias do uso de células viáveis imobilizadas em outros processos industriais (Virkaajärvi, 2001); Exceção deve ser feita para o cultivo de células superiores, especialmente células animais, que necessitam ser imobilizadas e são muito utilizadas na produção de insumos farmacêuticos (Wandrey, 1996).

A produção de biosensores é também uma área na qual técnicas de imobilização têm sido aplicadas com sucesso. De acordo com Dong e Chen (2002), estes equipamentos, baseados na incorporação de elementos biológicos (enzimas ou células) em uma camada sensitiva intimamente conectada com um transdutor, têm sido amplamente aplicados em diversos campos, como monitoramento de processos industriais, testes de detecção clínicos e controle ambiental, entre outros. Como vantagens da utilização destes equipamentos, podem ser citadas simplicidade de uso, alta sensibilidade e habilidade para medidas em tempo real e *in loco*.

### Produção de cerveja

A produção de cerveja é geralmente mencionada como um exemplo típico de biotecnologia “velha”, devido à sua longa história. Entretanto, a cervejaria moderna aplica um amplo espectro de novas invenções técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas. Exemplos de progressos contemporâneos podem ser encontrados ao longo de toda a cadeia de produção: O desenvolvimento de novos cultivares de cevada tem propiciado a obtenção de maltes que geram altos rendimentos de extrato e apresentam atividades adequadas de enzimas amilolíticas e proteolíticas; A adição de bactérias lácticas durante a fase de maltagem, além de minimizar o desenvolvimento de microrganismos prejudiciais como *Fusarium sp.*, leva a melhoras na eficiência de filtração do mosto obtido; Ao invés de solventes orgânicos, técnicas de extração com CO<sub>2</sub> supercrítico têm sido utilizadas para a obtenção de extratos de lúpulo, garantindo uma melhor qualidade ao extrato final sem resíduos de solventes; A utilização de mostos de alta densidade no início da fermentação principal, conhecida por processo *high gravity*, promove um significativo aumento da capacidade de produção; Leveduras geneticamente modificadas têm sido desenvolvidas com a finalidade de: a) manter a concentração de diacetil em valores inferiores ao limite de detecção sensorial, b) facilitar a filtração da cerveja, e c) produzir cervejas com baixos teores de carboidratos (Linko et al., 1998).

O processo de produção de cervejas do tipo *lager*, predominante em todo o mundo nos dias atuais, pode ser resumido em quatro fases, conforme descrito abaixo (Virkaajärvi, 2001).

O primeiro passo consiste na obtenção do malte de cevada, obtido através da germinação de grãos de cevada em condições especiais. Este malte é moído ou triturado e misturado com água. As enzimas presentes no próprio malte, ativadas de acordo com um perfil de temperaturas controlado pelo

mestre cervejeiro, irão hidrolisar os polímeros presentes: amido em dextrinas, mono, di e trissacarídeos, e proteínas em peptídeos e aminoácidos. Esta primeira fase do processo é denominada mosturação. A fração insolúvel do mosto obtido é então filtrada, normalmente utilizando-se a própria casca do malte como camada filtrante.

O próximo passo consiste no cozimento do mosto filtrado por 1 a 2 horas, após a adição de lúpulo. O cozimento irá assegurar a assepticidade necessária, e promoverá a precipitação de complexos entre proteínas e polifenóis, a solubilização/isomerização de componentes do lúpulo, a remoção de compostos que determinam sabores desagradáveis no produto final e a obtenção da concentração desejada de açúcares. As enzimas presentes são inativadas durante o cozimento. O material precipitado, conhecido como *trub*, é então removido. Após a remoção do *trub*, o mosto é resfriado, transferido para o fermentador e aerado até saturação na concentração de oxigênio dissolvido.

A fermentação da cerveja do tipo *lager* é dividida em duas fases: Fermentação principal (ou primária) e fermentação secundária. A fermentação principal dura entre 6 e 10 dias, temperaturas entre 7 e 15°C sendo utilizadas. Durante a fermentação principal, a maior parte dos compostos responsáveis pelas características organolépticas do produto final são formados. Ao final desta fase, a cerveja é resfriada para aproximadamente 4°C e a maior parte das leveduras são retiradas pela base do fermentador. A fermentação secundária pode ser realizada no mesmo tanque da fermentação principal ou a cerveja pode ser transferida para um segundo tanque. O principal objetivo da fermentação secundária é a remoção do diacetil, que causa um sabor desagradável no produto final. Esta fase, também conhecida como maturação, dura entre 1 e 2 semanas.

Finalmente, a cerveja é estabilizada pelo resfriamento a temperatura igual ou inferior a 0°C por um período de até 3 dias. Diferentes agentes estabilizantes, como sílica gel e taninos, podem ser utilizados. Leveduras e complexos entre proteínas e polifenóis irão precipitar, sendo filtrados posteriormente. A carbonatação e o envase finalizam o processo de produção.

A fermentação é a fase mais demorada no processo de produção da cerveja. Desta forma, o uso eficiente dos tanques de fermentação é um elemento crucial na economia global do processo. Tendo em vista que uma das formas de se aumentar a produtividade de um processo em batelada é convertê-lo em um processo contínuo, muitas cervejarias devotaram esforços para a estabilização de processos contínuos em escala industrial nas décadas de 50 e 60. Na década de 70, entretanto, esta linha de pesquisa foi abandonada por diversas dificuldades encontradas para a estabilização da tecnologia de produção. Na década de 80, a tecnologia de imobilização celular começou a ser utilizada com a finalidade de solucionar os problemas previamente encontrados, tendo levado a aplicações industriais na fase de fermentação secundária (Virkaajärvi, 2001). De acordo com Masschelein et al. (1994), a tecnologia de imobilização celular oferece também um



cenário bastante atrativo e eficiente em termos de custos para aplicação na fase de fermentação principal. Impactos importantes do desenvolvimento desta tecnologia no desenvolvimento de novos processos são esperados como consequência.

## Flavour

A cerveja é um produto para o qual a imagem é muito importante. Qualquer mudança no processo de produção com vistas à redução de custos deve preservar as características organolépticas do produto final (Virkajärvi, 2001), tradicionalmente denominadas de *flavour* e consideradas neste trabalho como sabor ou aroma.

A cerveja é uma solução aquosa complexa, contendo CO<sub>2</sub>, etanol, diversos sais inorgânicos e cerca de 800 compostos orgânicos (Hardwick, 1995). O sabor da cerveja é determinado pela matéria-prima, pelo tipo de processo e pela levedura utilizados, além dos compostos produzidos durante a fermentação, que exercem o maior impacto (Virkajärvi, 2001). Entre os compostos produzidos pela levedura, que influenciam marcadamente o sabor da cerveja obtida, encontram-se álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, compostos carbonilados e compostos sulfurados.

O etanol é o álcool encontrado em maior concentração na cerveja, exercendo portanto um impacto no sabor do produto final. Entre os álcoois superiores, merecem destaque os álcoois amílico e isoamílico pelo impacto determinado no sabor do produto. De acordo com Hardwick (1995), os demais álcoois superiores afetam o sabor da cerveja através de efeitos cumulativos, uma vez que as concentrações normalmente presentes raramente ultrapassam os limites de detecção individuais. De acordo com Virkajärvi (2001), como os álcoois apresentam limites de detecção sensorial aproximadamente 10 vezes superiores aos ésteres e 1000 vezes superiores aos compostos carbonilados, os impactos provocados por estes compostos no sabor final da cerveja não são tão importantes, a despeito das elevadas concentrações normalmente presentes.

Ésteres são compostos importantes no sabor da cerveja produzida. De acordo com Virkajärvi (2001), acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila e caprilato de etila são os principais ésteres encontrados na cerveja.

A cerveja é levemente ácida. De acordo com Hardwick (1995), ácido carbônico e ácidos orgânicos são os principais responsáveis pelo sabor levemente azedo da cerveja. Os ácidos orgânicos são todos subprodutos do metabolismo, essencialmente excretados pela levedura. Entre os ácidos orgânicos que mais influenciam o sabor da cerveja encontram-se os ácidos acético, cáprico, capróico e caprílico.

Entre os compostos carbonilados, acetaldeído e diacetil são os mais importantes. O acetaldeído pode exceder o valor de detecção sensorial durante a fase ativa da fermentação, mas normalmente é reduzido a etanol na fase de maturação. Por outro lado, o diacetil é o composto chave na determinação das características organolépticas do produto final. O principal objetivo da fermentação secundária é a remoção do

diacetil, que determina um sabor de manteiga no produto final (Angelino, 1991).

Os compostos sulfurados são provenientes principalmente do malte, embora o lúpulo também possa conter resíduos destes compostos. Entre os compostos sulfurados derivados do metabolismo da levedura, encontram-se o sulfeto de hidrogênio e o dióxido de enxofre (Hardwick, 1995). Normalmente, estes compostos são removidos da cerveja durante a fermentação. Entretanto, em algumas situações, como baixa atividade celular e fermentação lenta, a presença de compostos sulfurados pode determinar um aroma de ovo podre no produto final (Angelino, 1991).

## Fermentação principal

A fermentação principal da cerveja em sistema contínuo com células imobilizadas pode se tornar uma realidade na cervejaria moderna em um curto espaço de tempo (Pilkington *et al.*, 1998). De acordo com Linko *et al.* (1998), grandes cervejarias produzem tipicamente 500 milhões de litros de cerveja/ano. Estas cervejarias precisam ser eficientes para sobreviver em um mundo competitivo e globalizado, estando obviamente interessadas em todas as novidades técnicas que possam levar a processos com menor custo e maiores facilidade e segurança. De fato, grandes cervejarias em todo o mundo já vêm empreendendo esforços no sentido de se implementar processos contínuos com células imobilizadas em escala industrial, podendo-se citar como exemplos: *Kirin Brewery Company*, Japão; *Labbat Breweries*, Canadá; *Meura Delta*, Bélgica; *Sapporo Breweries*, Japão; *Hartwall Plc*, Finlândia (Virkajärvi, 2001).

De acordo com Pilkington *et al.* (1998b), os principais fatores que motivam a mudança na tecnologia de produção são a significativa redução no tempo necessário para a produção da cerveja pronta para consumo, a redução dos inventários necessários, a redução do espaço ocupado pela planta e a obtenção de um produto com características uniformes. Estudos preliminares demonstraram que sistemas com células imobilizadas operados de forma contínua podem reduzir o tempo necessário de fermentação principal para apenas 1 dia (Mensour *et al.*, 1996). Conforme será discutido posteriormente, a fase de maturação conduzida com células imobilizadas acoplada a um processo de tratamento térmico já é realizada em escala industrial em apenas 2 horas.

Alguns obstáculos necessitam ainda serem superados para que esta tecnologia seja implementada em escala industrial. Os principais são descritos a seguir:

O primeiro deles se refere às alterações no metabolismo da levedura determinadas pela imobilização. Na produção de cerveja, o objetivo principal é a obtenção de um sabor/aroma balanceado e não somente a realização de uma fermentação eficiente com elevado rendimento em etanol (Linko *et al.*, 1998). A maior parte dos compostos responsáveis pelas características organolépticas do produto final são formados durante a fermentação principal. A imobilização geralmente leva a um consumo reduzido

de aminoácidos, provavelmente devido às limitações ao crescimento celular, determinando uma menor produção de álcoois superiores e ésteres e valores de pH demasiadamente elevados, além de elevados teores de diacetil (Virkajärvi, 2001). A questão crítica é: Como o sabor/aroma tradicional desejado pode ser obtido, baseado em um balanço adequado de numerosos compostos. A resposta não é fácil, tendo em vista as relações complexas entre o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos. De acordo com Linko *et al.* (1998), para a obtenção de uma cerveja com características organolépticas adequadas, é geralmente aceito que a fermentação contínua deveria ser realizada através de estágios, mimetizando a fermentação em batelada convencional. Esta condição poderia ser obtida através da utilização de um padrão de fluxo do tipo *plug flow* através do reator ou, alternativamente, através de uma série de reatores de mistura em cascata. Desta forma, as células poderiam experimentar condições aeróbias nos estágios iniciais da fermentação, utilizando o oxigênio disponível para crescimento, e condições anaeróbias ao final da fermentação. Uma tese de doutorado concluída no Centro de Pesquisas Técnicas da Finlândia (Virkajärvi, 2001) comprovou a possibilidade de se produzir cerveja com características organolépticas adequadas em modo contínuo de fermentação com células imobilizadas, utilizando-se o princípio de estágios de fermentação. Através da variação na composição e quantidade de gases injetados no reator, foi possível controlar a formação de compostos aromáticos durante a fermentação primária.

O segundo obstáculo se refere ao preparo do mosto para as fermentações propriamente ditas. As fases de preparo do mosto, coletivamente denominadas de brassagem, constituem ainda uma série de operações em bateladas. Uma brassagem continuamente operada seria atrativa, especialmente se os estágios subseqüentes (fermentações primária e secundária) fossem realizados em modo contínuo de operação. De acordo com Linko *et al.* (1998), a combinação de estágios contínuos e em bateladas é geralmente problemática. Tanques de armazenamento com grandes volumes são necessários, o que poderia diminuir as vantagens econômicas e criar problemas adicionais em termos de contaminação microbiana, uma vez que o mosto é bastante vulnerável ao ataque de microrganismos antes da inoculação.

O terceiro obstáculo diz respeito ao preço do suporte de imobilização. De acordo com Linko *et al.* (1998), o preço do suporte de imobilização é o fator que exerce a limitação econômica mais severa à implantação de processos em escala industrial. Os resultados obtidos até o momento apontam para a utilização de suportes pré-formados e regeneráveis como os mais promissores, podendo ser a imobilização celular processada através de adsorção ou ligações covalentes (Masschelein *et al.*, 1994).

Atualmente, existem diversos grupos ao redor do mundo trabalhando com o objetivo de implementar esta tecnologia

em escala industrial. Para que o objetivo final seja alcançado, uma equipe altamente interdisciplinar de pesquisadores aplicados com sólidos conhecimentos em engenharia bioquímica, microbiologia, química e bioquímica será necessária (Pilkington *et al.*, 1998b).

### **Fermentação secundária**

A remoção de diacetil (2,3-butanodiona) e 2,3-pentanodiona, coletivamente denominados dicetonas vicinais, e de seus precursores,  $\alpha$ -aceto-lactato e  $\alpha$ -aceto-hidróxi-butirato, respectivamente, é um dos principais objetivos da fermentação secundária da cerveja (Masschelein *et al.*, 1994). Três passos estão envolvidos na formação e remoção de dicetonas vicinais: 1) síntese e excreção de  $\alpha$ -aceto-hidróxi-ácidos pela levedura, 2) descarboxilação oxidativa de  $\alpha$ -aceto-hidróxi-ácidos até as respectivas dicetonas, e 3) redução das dicetonas vicinais pela levedura (Masschelein *et al.*, 1994). Embora ambos compostos (diacetil e 2,3-pentanodiona) sejam importantes no controle da maturação da cerveja, o diacetil é o composto que apresenta maior impacto no sabor/aroma do produto final. De acordo com Linko *et al.* (1998), o limite de detecção sensorial do diacetil é de apenas 0,05 mg/L ou menos.

O controle eficiente da concentração de diacetil pode ser obtido de duas maneiras: a) prevenção da formação do precursor ( $\alpha$ -aceto-lactato), ou b) aumento da taxa de descarboxilação química do precursor.

A prevenção da formação do precursor  $\alpha$ -aceto-lactato pode ser alcançada através da utilização de leveduras que contêm o gene que codifica a síntese da enzima  $\alpha$ -aceto-lactato-descarboxilase integrado em seu genoma. Desta forma, o excesso de  $\alpha$ -aceto-lactato produzido através da via de biossíntese do aminoácido valina é convertido diretamente a acetoína pela enzima incorporada ao genoma da levedura (Linko *et al.*, 1998). Estudos em escala piloto confirmaram a possibilidade de uso desta estratégia (Kronlöf e Linko, 1992). Entretanto, a aplicação da tecnologia de DNA recombinante na cervejaria moderna pode ser retardada, ou até mesmo rejeitada, por regulações governamentais e/ou rejeição por parte do consumidor (Masschelein *et al.*, 1994).

A fase limitante na maturação da cerveja é a baixa taxa de conversão espontânea (não enzimática) de  $\alpha$ -aceto-lactato em diacetil. Esta reação, como todas as reações, procede mais lentamente a baixas temperaturas, sendo limitada pela temperatura de maturação de 4°C (Linko *et al.*, 1998). Baker e Kirsop (1973) foram os primeiros pesquisadores a reportar o emprego de tratamento térmico da cerveja para a rápida conversão de precursores de diacetil a diacetil, e a subsequente remoção do diacetil formado por células imobilizadas. Este conceito é o fundamento através do qual processos contínuos de fermentação secundária são utilizados em escala industrial hoje em dia. Após a fermentação principal, a levedura residual é

removida por meio de uma centrífuga hermeticamente fechada, e a cerveja verde é aquecida a 90°C por 10 minutos utilizando-se trocadores de calor. Este tratamento térmico é suficiente para converter todo o  $\alpha$ -aceto-lactato presente em diacetil e acetoína. Após resfriamento, o diacetil remanescente é então convertido em acetoína através de um sistema contínuo, operado em reator de leito empacotado, com células imobilizadas em DEAE celulose, um derivado granular da celulose. Um tempo de residência no reator de apenas 2 horas é suficiente para completar a maturação da cerveja e alcançar níveis de diacetil inferiores ao limite de detecção sensorial (Masschelein et al., 1994; Linko et al., 1998). Deve-se ressaltar que não foram detectadas mudanças significativas nos espectros analíticos e sensoriais impostas por esta nova tecnologia de maturação, podendo-se citar como exemplo de aplicação industrial deste processo a produção de cerveja pela *Sinebrychoff Kerawa Brewery*, Finlândia (Virkajärvi, 2001).

## Conclusão

A tecnologia de imobilização trouxe novas perspectivas para a aplicação de enzimas e células em processos industriais. Aliada as novas invenções técnicas, bioquímicas, microbiológicas e genéticas, esta tecnologia pode ser utilizada como uma ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos e, conseqüentemente, reduzir custos de produção. Por outro lado, apesar da tendência de se pensar em agregados macroscópicos que permitem a fácil separação da fase sólida presente no meio reacional (agregado enzimático) ou no meio de fermentação (agregado celular), não se deve esquecer dos recentes progressos trazidos pela tecnologia de membranas. Atualmente, técnicas modernas já permitem a fácil separação dos biocatalisadores a partir de uma suspensão (células) ou de uma solução (enzimas) através do uso de membranas de microfiltração ou ultrafiltração, respectivamente (Kragl e Dwars, 2001).

## Referências

- ANGELINO, SAGF. *Beer*. **Journal of Food Science and Technology**. v.44, p.581-616, 1991.
- BAKER, DA; KIRSOP, BH. *Rapid beer production and conditioning using a plug fermentor*. **Journal of the Institute of Brewing**. v.79, p.487-494, 1973.
- BARON, GV; WILLAERT, RG; BACKER, LUC. *Immobilized cell reactors*. In: WILLAERT, RG. **Immobilized living cell systems: Modelling and experimental methods**. London: John Wiley & Sons, p. 67-95, 1996.
- BEYNUM, G.M.A. Immobilized biocatalysts. **Biotechnology Letters**. v.2, p.127-132, 1980.
- BUTTERFIELD, DA; BHATTACHARYYA, D; DAUNERT, S; BACHAS, L. *Catalytic biofunctional membranes containing site-specifically immobilized enzyme arrays: a review*. **Journal of Membrane Science**. v.181, p.29-37, 2001.
- CORCORAN, E. *The production and use of immobilized living microbial cells*. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.
- DONG, S; CHEN, X. *Some new aspects in biosensors*. **Reviews in Molecular Biotechnology**. v.82, p.303-323, 2002.
- FUKUDA, H. *Immobilized microorganism bioreactors*. In: ASENJO, JA; MERCHUK, JC. **Bioreactor System Design**. New York: Marcel Dekker. 1994, p. 339-75.
- GAMARRA, JAG. *Produção de etanol em batelada repetida com reciclo celular completo usando um reator catalítico agitado tipo cesta com leveduras imobilizadas*. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- GERBSCH, N; BUCHHOLZ, R. *New processes and actual trends in biotechnology*. **FEMS Microbiology Reviews**. v.16, p.259-269, 1995.
- GROBILLOT, A; BOADI, DK; PONCELET, D; NEUFELD, RJ. *Immobilization of cells for application in the food industry*. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.14, p.75-107, 1994.
- HARDWICK, WA. *The properties of beer*. In: **Handbook of Brewing**. New York: Marcel Dekker. 1995, p.551-585.
- KAREL, SF; LIBICKI, SB; ROBERTSON, CR. *The immobilization of whole cells: Engineering principles*. **Chemical Engineering Science**. v.40, p.1321-54, 1985.
- KATCHALSKI-KATZIR, E; KRAEMER, DM. *Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential*. **Journal of Molecular Catalysis**. v.10, p.157-176, 2000.
- KRAGL, U; DWARS, T. *The development of new methods for the recycling of chiral catalysts*. **Trends in Biotechnology**. v.19, p.442-449, 2001.
- KRONLÖF, J; LINKO, M. *Production of beer using immobilized yeast encoding  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase*. **Journal of the Institute of Brewing**. v.98, p. 479-491, 1992.
- LINKO, M; HAIKARA, A; RITALA, A; PENTTILÄ, M. *Recent advances in the malting and brewing industry*. **Journal of Biotechnology**. v.65, p.85-98, 1998.
- LOZINSKY, VI; PLIEVA, FM. *Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization: Overview of recent research and developments*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.23, p.227-242, 1998.
- MASSCHELEIN, CA; RYDER, DS; SIMON, JP. *Immobilized cell technology in beer production*. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.14, p.155-177, 1994.
- MENSOUR, N; MARGARITIS, A; BRIENS, CL; PILKINGTON, H; RUSSEL, I. *Immobilized yeast applications in the brewing industry*. In: WIJFFELS, RH; BUITELAAR, RM; BUCKE, C; TRAMPER, J. **Immobilized Cells: Basics and Applications**. Amsterdam: Elsevier Science. 1996, p.3-16.
- PARK, JK; CHANG, HN. *Microencapsulation of microbial cells*. **Biotechnology Advances**. v.18, p.303-319, 2000.
- PILKINGTON, PH; MARGARITIS, A; MENSOUR, NA. *Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes*. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 18, p. 237-55, 1998a.
- PILKINGTON, PH; MARGARITIS, A; MENSOUR, NA; RUSSELL, I. *Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review*. **Journal of the Institute of Brewing**. v.104, p.19-31, 1998b.
- RAMAKRISHNA, SV; PRAKASHAM, RS. *Microbial fermentations with immobilized cells*. **Current Science**. v.77, p.87-100, 1999.
- TURKOVÁ, J. *Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function*. **Journal of Chromatography**. v.722, p.11-31, 1999.
- UEDA, M; TANAKA, A. *Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface*. **Biotechnology Advances**. v. 18, p.121-140, 2000.
- VIRKAJÄRVI, I. *Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast*. 2001. 137 f. Tese (Doutorado em Tecnologia) – Helsinki University of Technology, Helsinki, Finlândia.
- VITULO, M. *Imobilização de células e enzimas*. **Biotecnologia: Agropecuária - Energia - Saúde**. Jan., 1988.
- WANDREY, C. *Why immobilize?* In: WIJFFELS, RH; BUITELAAR, RM; BUCKE, C; TRAMPER, J. **Immobilized Cells: Basics and Applications**. Amsterdam: Elsevier Science. 1996, p.3-16.

