

# 15

## CAPÍTULO

# IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE

Lívia Tereza de Andrade Souza  
Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo  
Benevides Costa Pessela João  
Marcelo Matos Santoro  
Rodrigo R. Resende  
Adriano A. Mendes

## 15.1 INTRODUÇÃO

As exigências atuais por processos industriais sustentáveis que contemplem os princípios da química verde, bem como as limitações existentes na obtenção de produtos ou intermediários específicos de importância industrial, têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais atrativa para a aplicação em diversos ramos industriais. Diferentemente dos catalisadores químicos convencionais, as enzimas são catalisadores naturais altamente específicos e, portanto, capazes de discriminar não somente as reações, como também os substratos (especificidade quanto ao tipo de substrato), partes similares das moléculas (regioespecificidade) e isômeros

ópticos (estereoespecificidade)<sup>1</sup>. Além disso, as enzimas exibem uma elevada atividade catalítica sob condições brandas de temperatura, pressão e pH.

O mercado consumidor de enzimas está em expansão. De acordo com a reportagem da Business Communications Company, o valor de venda das enzimas para utilização industrial foi estimado em 5 bilhões de dólares em 2008. As projeções naquela época previam um aumento na taxa de crescimento do mercado de biocatalisadores de aproximadamente 4% a 5% ao ano<sup>2</sup>. Entretanto, essas expectativas foram superadas, e o crescimento da demanda global alcançou taxas de 9,1% ao ano com valor de venda estimado em 6 bilhões de dólares em 2016<sup>3</sup>.

O uso de catalisadores de alto custo, como as enzimas, requer a recuperação e a reutilização destas para tornar o processo economicamente viável. Isso é alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada. O reúso do biocatalisador somente é possível quando a preparação enzimática é estável o suficiente. A estabilidade requerida também pode ser alcançada pela técnica de imobilização, uma vez que o processo pode alterar as propriedades da própria enzima, produzindo biocatalisadores com elevada atividade, especificidade e estabilidade<sup>4,5</sup>. Dessa forma, a imobilização enzimática tem sido considerada, nos últimos anos, a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala. É importante ressaltar que a técnica pode ser utilizada em conjunto com avanços na área de estabilização de proteínas alcançados pela engenharia de proteína, biologia molecular e biologia computacional.

Existem, hoje, diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e eficiência. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável para todas as enzimas conhecidas, sendo indispensável o conhecimento prévio das características do suporte e do efeito dos métodos empregados para selecionar a técnica de imobilização a ser utilizada para uma determinada finalidade. Sendo assim, para cada aplicação de um biocatalisador imobilizado é ideal escolher o procedimento mais simples e barato<sup>4,5</sup>.

## 15.2 HISTÓRICO

O primeiro relato de uso de enzimas com propósitos industriais data de 1940, com a patente de Langlois e Dale, que objetivou o emprego de amilases para a obtenção de xarope de milho. Entretanto, a aplicação de enzimas em outros processos industriais foi dificultada pela escassa disponibilidade e

elevado custo dos biocatalisadores<sup>6</sup>. Para contornar essa limitação, a comunidade científica direcionou seus estudos para dois focos: o primeiro foi encontrar linhagens microbianas com potencial de produção e secreção das enzimas; o segundo foi desenvolver métodos de tornar a enzima imobilizada para posterior reutilização<sup>7</sup>.

Em 1953, Grubhofer e Schleith descreveram a primeira tentativa de confinar uma enzima em uma matriz insolúvel<sup>8</sup>. O trabalho desses autores foi posteriormente seguido pelo pesquisador Manecke e seus colaboradores, que, a partir de 1955, direcionaram esforços para a descoberta de polímeros a serem utilizados como suportes para a imobilização de enzimas e outras proteínas biologicamente ativas<sup>9</sup>.

Em 1960, a tecnologia enzimática despontou como área de intensa investigação, culminando em 1969, no Japão, com as duas primeiras aplicações industriais de enzimas imobilizadas: a isomerização de glicose em frutose por glicose isomerase, como descrito por Takasaki e colaboradores (1969), e a resolução óptica de aminoácidos com aminoácido acilase, relatada por Chibata e Tosa (1976)<sup>10,11</sup>.

Ainda na década de 1960, foi inicialmente desenvolvida a técnica de reticulação de enzimas via reação com glutaraldeído por entrecruzamento de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) reativos na superfície da proteína<sup>12</sup>. Entretanto, o uso industrial dos cristais de enzima reticulados foi somente iniciado na década de 1990 por cientistas da Vertex Pharmaceuticals<sup>13</sup> e posteriormente comercializado pela Altus Biologics<sup>14-17</sup>. Os estudos iniciais foram realizados com os cristais de enzima reticulados de termolisina para a produção de aspartame, e, subsequentemente, foi demonstrado que esse método pode ser aplicado a diversas enzimas<sup>18</sup>.

Apesar do longo histórico da imobilização de enzima, Straathof e colaboradores (2002) estimaram que apenas 20% dos processos biocatalíticos envolvem enzimas imobilizadas<sup>19</sup>. No entanto, ao longo dos últimos anos um número interessante de novas metodologias de imobilização enzimática tem sido relatado na literatura e nos pedidos de patentes, indicando que a imobilização de enzimas está em contínua evidência<sup>20</sup>.

### 15.3 POR QUE ENZIMAS IMOBILIZADAS?

Os principais problemas da utilização de enzimas solúveis são: alto custo de produção e purificação, instabilidade da estrutura tridimensional quando isoladas do seu ambiente natural e perda de atividade devido às condições

do processo ou inibição pelo substrato ou produto<sup>1</sup>. Isto resulta em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado. Além disso, muitas enzimas atuam na forma solúvel em meio aquoso (catálise homogênea), na qual contaminam o produto desejado e não podem ser recuperadas do meio reacional na forma ativa<sup>1</sup>.

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas<sup>21</sup>.

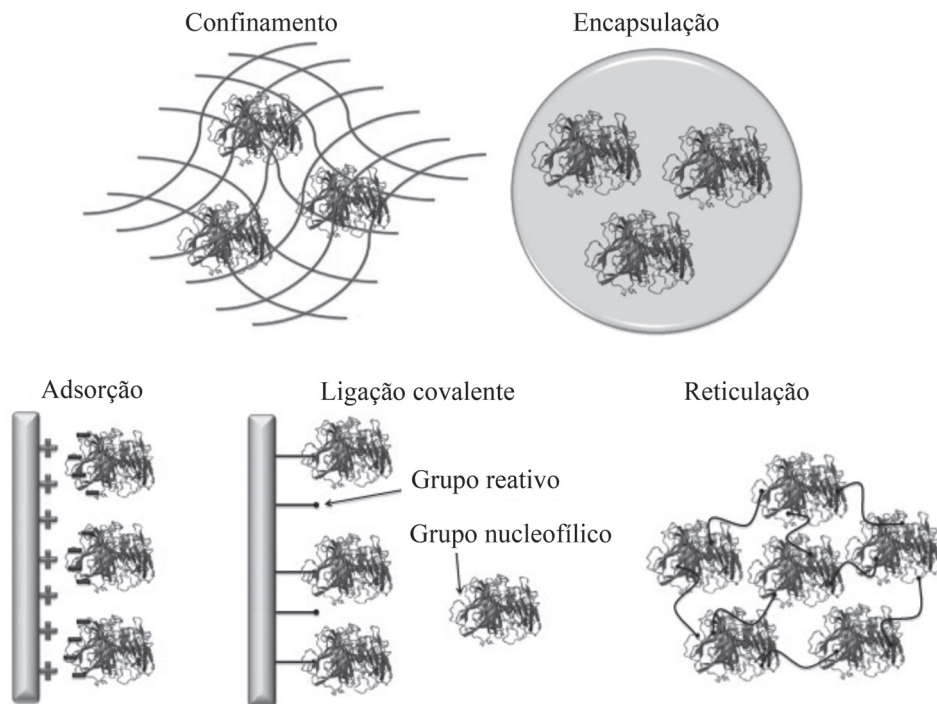
Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos<sup>20,22</sup>. Outras importantes vantagens das enzimas imobilizadas em comparação com as enzimas solúveis são: possibilidade de reutilização do biocatalisador; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão; além da possibilidade de conduzir processos contínuos<sup>20,22</sup>.

Entretanto, dependendo da relação entre o custo do suporte e a estabilidade do derivado imobilizado, a imobilização, ao invés de reduzir o custo de um determinado processo, pode torná-lo ainda mais oneroso.

## 15.4 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; encapsulação; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (Figura 15.1)<sup>21,23,24</sup>.

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. Isso se deve às diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e às diversificadas aplicações dos produtos obtidos (Figura 15.2). Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações. Conseqüentemente, as condições ótimas de imobilização para uma determinada enzima são determinadas empiricamente pelo processo de erro e acerto, a



**Figura 15.1** Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação. Modificada de Fernández-Fernández et al. (2013)<sup>25</sup>.

fim de se obter maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e durabilidade<sup>1</sup>.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada<sup>22-24</sup>.

A eficiência de um protocolo de imobilização é determinada levando-se em consideração alguns parâmetros, como<sup>22,26-30</sup>:

### *Cálculo da concentração de proteína imobilizada (PI)*

A concentração de proteína imobilizada (PI) é quantificada com base na concentração de proteína oferecida e a concentração de proteína presente

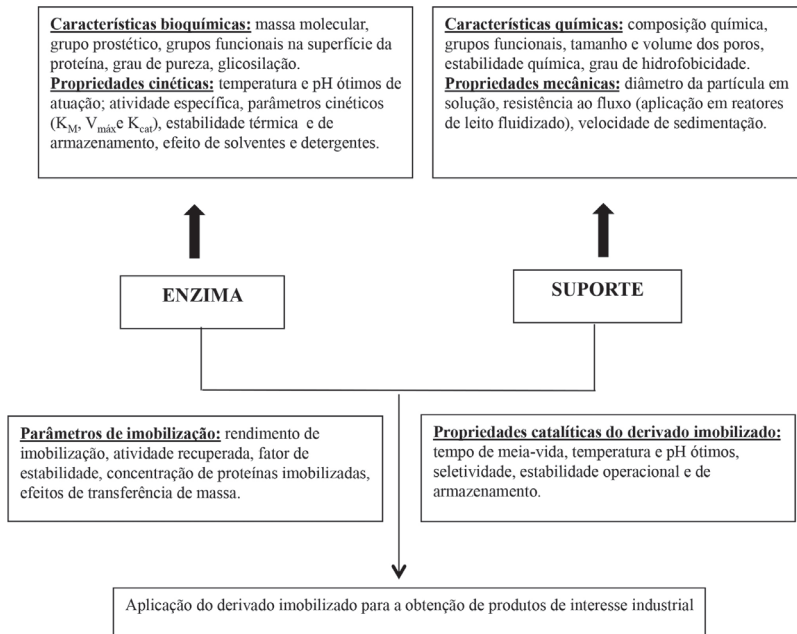


Figura 15.2 Principais parâmetros que devem ser investigados na elucidação de um protocolo de imobilização.

no meio reacional após o processo de imobilização, como mostra a Equação 15.1.

$$(Equação 15.1) \quad PI(\%) = \left( \frac{P_0 - P_f}{P_0} \right) \times 100$$

em que PI é a porcentagem de proteína imobilizada;  $P_0$  e  $P_f$  são as concentrações de proteínas no tempo inicial e final no sobrenadante ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), respectivamente.

### Cálculo da atividade recuperada (AR)

O cálculo da atividade recuperada (AR) é determinado pela relação entre a atividade hidrolítica aparente do derivado, o produto da atividade inicial oferecida e a concentração de enzima imobilizada, conforme mostra a Equação 15.2.

$$\text{(Equação 15.2)} \quad AR (\%) = \left( \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0 - U_f} \right) \times 100$$

em que AR é a atividade recuperada (%);  $U_{\text{imobilizado}}$  é a atividade hidrolítica aparente do derivado imobilizado ( $\text{U.g}^{-1}$  de suporte);  $U_0$  é a atividade oferecida no início da imobilização ( $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína) e  $U_f$  é a atividade no sobrenadante após a imobilização ( $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína) .

### *Cálculo do fator de estabilidade (FE)*

O fator de estabilidade (FE) pode ser calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da enzima imobilizada e solúvel:

$$\text{(Equação 15.3)} \quad FE = \frac{t_{1/2} \text{ imobilizada}}{t_{1/2} \text{ solúvel}}$$

em que FE é o fator de estabilidade;  $t_{1/2}$  solúvel é o tempo de meia-vida para a enzima solúvel e  $t_{1/2}$  imobilizada é o tempo de meia-vida para a enzima imobilizada.

### *Cálculo do rendimento de imobilização (RI)*

O rendimento de imobilização (RI) é calculado pela relação entre a atividade enzimática imobilizada pela atividade inicialmente oferecida ao suporte de imobilização:

$$\text{(Equação 15.4)} \quad RI (\%) = \left( \frac{U_{\text{imobilizado}}}{U_0} \right) \times 100$$

em que RI é o rendimento de imobilização;  $U_{\text{imobilizado}}$  é a atividade enzimática do derivado imobilizado e  $U_0$  é a atividade oferecida no início da imobilização ( $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína).

De modo geral, as enzimas livres e imobilizadas diferem quanto às suas características bioquímicas e cinéticas. As alterações encontradas são atribuídas a dois fatores principais: (1) mudanças conformacionais em sua estrutura tridimensional, por exemplo, maior ou menor flexibilidade da

proteína adquirida pelo contato com o suporte de imobilização; e (2) natureza heterogênea do microambiente em que a enzima se encontra, no qual as concentrações de substrato, produto e cofator podem ser diferentes da presente na solução<sup>7</sup>.

A natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos suportes utilizados, bem como a presença de cargas livres em sua superfície, justificam algumas alterações das propriedades catalíticas das enzimas, como, por exemplo, o pH ótimo de atuação. Portanto, a obtenção de derivados imobilizados com pH ótimo de atuação pode ser diferente do encontrado para a enzima livre. Um exemplo de importância industrial foi encontrado para uma lactase de levedura imobilizada em suporte de vidro revestido com zircônia. Na forma livre, a enzima mostrou-se neutra com pH ótimo entre 6 e 7, porém, quando imobilizada, o pH ótimo de atuação caiu para a faixa de 3 a 4. A redução do pH permitiu o uso da enzima para catalisar a hidrólise de lactose em soro de queijo ácido, aplicação na qual a enzima livre é inadequada devido às condições reacionais<sup>7</sup>.

A imobilização da enzima pode produzir diferentes efeitos na sua atividade e seletividade. A proteína pode ser distorcida, principalmente se interações múltiplas entre a enzima e o suporte ocorrerem. O sítio ativo pode ser bloqueado ou ainda a imobilização pode promover problemas difusionais<sup>26</sup>. Outro efeito da imobilização é o aumento da estabilidade da proteína devido à estabilização da estrutura proteica, ou simplesmente porque o derivado imobilizado é menos acessível a agentes desnaturantes e ataques microbianos<sup>7</sup>.

Durante o processo de imobilização, deve-se atentar para algumas questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem à sua imobilização para uma forma inativa; perda da atividade catalítica e dessorção de moléculas de enzima do microambiente do suporte; efeitos difusionais em decorrência de limitações do acesso de moléculas de substrato ao sítio ativo da enzima e do produto para o meio reacional. Além disso, o custo da imobilização deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador<sup>21,22</sup>.

As seções seguintes relatam as principais características dos métodos de imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, confinamento/encapsulação e reticulação, bem como suas principais vantagens e desvantagens.

### **15.4.1 Adsorção física**

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Neste método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de



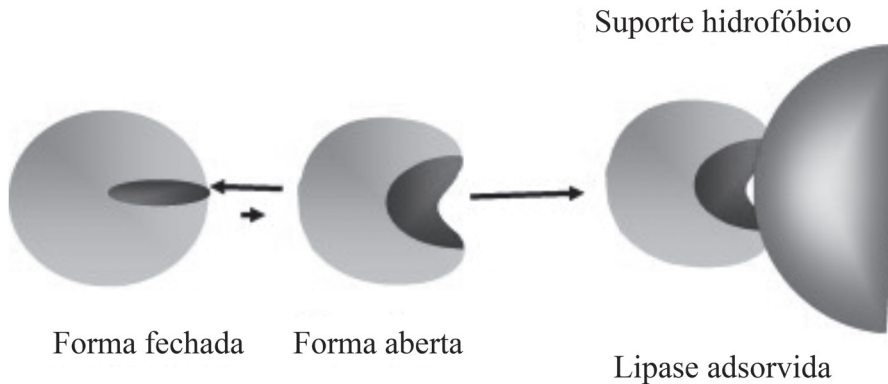
ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas<sup>25,27,28</sup>. Nas reações conduzidas em meio orgânico, não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte. Nessas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso<sup>29</sup>.

As principais vantagens da imobilização por adsorção residem na facilidade e simplicidade da técnica e no baixo custo associado a não necessidade de ativação do suporte e na possibilidade de reutilização do suporte após vários ciclos. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável<sup>27</sup>.

Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica<sup>20,22,30,31</sup>. Contudo, técnicas foram desenvolvidas a fim de reduzir a dessorção da enzima, como, por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros<sup>32,33</sup>. Outros estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática<sup>34</sup>.

Dentre as enzimas imobilizadas por essa técnica, o mecanismo de imobilização das lipases em suportes hidrofóbicos é o mais conhecido, e baseia-se nas particularidades estruturais da enzima (Figura 15.3)<sup>21,35</sup>. As lipases apresentam duas diferentes configurações: uma forma fechada, considerada inativa, na qual o contato entre o sítio ativo e o meio reacional é bloqueado por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica chamada de tampa (*lid*); e a forma aberta, na qual essa tampa é deslocada e o sítio ativo é totalmente exposto ao meio de reação. Na presença de uma superfície hidrofóbica, a molécula de lipase sofre uma mudança conformacional e o equilíbrio é deslocado para a conformação aberta. Nesse caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais (gotas de óleo). Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa por um mecanismo exclusivo denominado “ativação interfacial”<sup>35-38</sup>.

Fernández-Lorente e colaboradores<sup>35</sup> estudaram a imobilização por adsorção de lipases de *Candida antarctica* tipo B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (LTL) e *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL) em diferentes suportes hidrofóbicos (hexil- e butil-*toyoppearl* e butil- e octil-agarose), e obtiveram resultantes interessantes. Os autores verificaram que o tipo de suporte e a fonte da enzima influenciaram a atividade dos derivados



**Figura 15.3** Imobilização de lipases por adsorção hidrofóbica. A exposição da porção hidrofóbica da enzima a um meio hidrofílico (por exemplo, um tampão aquoso) é desfavorável; assim, a lipase em meios homogêneos aquosos estará principalmente na forma fechada. No entanto, a forma aberta é facilmente adsorvida sobre a superfície hidrofóbica, mesmo a uma força iônica muito baixa (ativação interfacial).

imobilizados obtidos, tendo sido verificado um aumento na atividade enzimática para todas as enzimas quando imobilizadas no suporte octil-agarose, especialmente para a lipase LTL (sete vezes). A maior atividade hidrolítica observada para as lipases imobilizadas no suporte octil-agarose em detrimento das imobilizadas no suporte do tipo *toyopearl* pode estar relacionada à morfologia e elevada área superficial do suporte agarose. Os autores também propuseram que os suportes do tipo *toyopearl* promoveram um bloqueio parcial do sítio ativo das lipases e dos seus grupos hidrofóbicos circunvizinhos. Neste trabalho, ainda foram investigadas as concentrações de tensoativos necessárias para a dessorção das enzimas dos suportes. Curiosamente, a concentração de tensoativo necessária para a dessorção total da enzima do suporte octil-agarose foi inferior à concentração necessária para a dessorção nos suportes hexil e butil-*toyopearl*.

Além da utilização para a imobilização de enzimas, a técnica de adsorção física é também utilizada para a imobilização de outras biomoléculas, como por exemplo, anticorpos, com a vantagem da possível reutilização do suporte após a perda da sua capacidade de reconhecimento. Devido à possibilidade de dessorção das biomoléculas, a estratégia de adsorção por troca iônica apresenta limitações quando o complexo suporte-biomolécula é empregado em soluções salinas (exemplo: fluidos biológicos). Neste caso, a adsorção hidrofóbica é recomendada para melhorar a estabilidade do complexo<sup>39</sup>.

### 15.4.2 Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes. A força dessa ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura<sup>21,40,41</sup>. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros<sup>21,40,41</sup>.

Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas<sup>42-45</sup>.

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos<sup>25</sup>.

Geralmente, o glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis<sup>21,46,47</sup>. Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminos ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub> da cadeia terminal,  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> da lisina e/ou NH<sub>2</sub> proveniente de amina química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff<sup>21,21,47</sup>. Outros grupos funcionais da enzima, como grupos carboxilatos de moléculas de aspartato e glutamato, grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano, também podem se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte. O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte<sup>20,25,48,49</sup>. A diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, torna esse método de imobilização aplicável em muitas situações. Contudo, a seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de imobilização<sup>50</sup>. As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos e o fato de a enzima não ser desorvida do suporte<sup>21,25,47,51</sup>. Inconvenientes da técnica estão relacionados à

parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima devido à alteração em sua conformação nativa impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte<sup>49</sup>.

### 15.4.3 Reticulação

A reticulação de enzimas foi primeiramente descrita por Quioco e Richards, em 1964, com o objetivo de estabilizar cristais de enzimas para estudos de difração de raios X. Os autores empregaram um agente bifuncional, como o glutaraldeído, e observaram a formação de cristais de enzima insolúveis com elevada atividade catalítica (cerca de 30% a 70% em comparação aos cristais de enzimas nativas)<sup>12,28,52-54</sup>.

De acordo com a literatura especializada, diversos estudos têm sido realizados visando à obtenção de enzimas imobilizadas livres de suportes. Na maioria dessas abordagens, os derivados imobilizados são diretamente preparados a partir da reação de reticulação entre um agente reticulante e diferentes preparações enzimáticas, tais como a enzima solubilizada<sup>9</sup>,

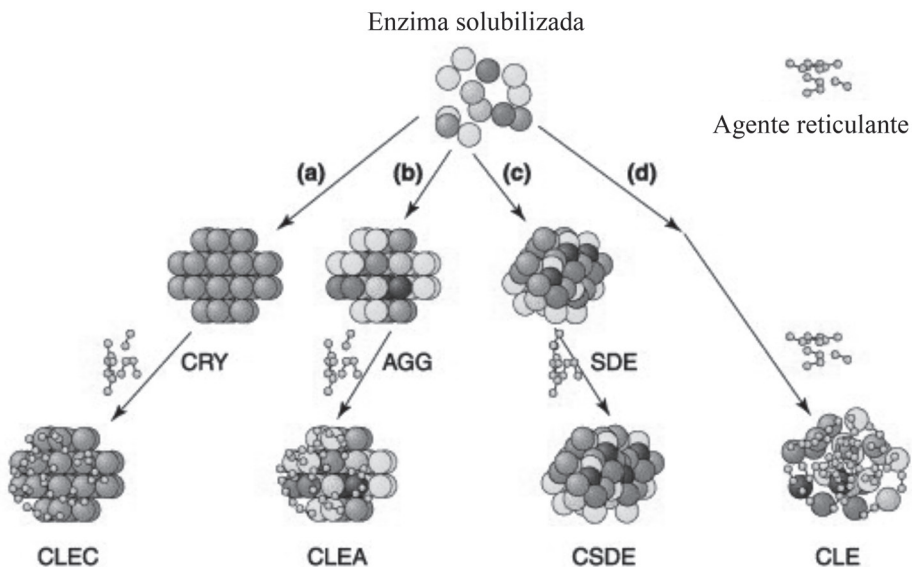


Figura 15.4 Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE, enzima atomizada; CLECs, cristais de enzima reticulados; CLEAs, agregados enzimáticos reticulados; CSDEs, enzimas atomizadas reticuladas; CLEs, enzimas solubilizadas reticuladas. Figura modificada de Cao et al. (2003)<sup>60</sup>.

cristalizada<sup>55,56</sup>, atomizada<sup>57</sup> e agregada<sup>58,59</sup>, que ao final da reticulação resulta na formação de reticulados de enzimas (*cross-linked enzyme* – CLE), cristais de enzima reticulados (*cross-linked enzyme crystals* – CLEC), enzimas atomizadas reticuladas (*cross-linked spray-dried enzyme* – CSDE) e agregados enzimáticos reticulados (*cross-linked enzyme aggregates* – CLEA) (Figura 15.4). Essa abordagem oferece vantagens como atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção decorrentes da exclusão de um suporte sólido<sup>18,60</sup>.

O agente de reticulação é uma molécula que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima. Os reagentes de reticulação disponíveis comercialmente podem ser classificados quanto aos grupos reativos presentes em suas extremidades (homobifuncional e heterobifuncional), a especificidade de seus grupos reativos, o comprimento do braço espaçador (*space arm*), solubilidade e reatividade<sup>61-63</sup>.

A seguir será apresentada uma breve descrição dos mais empregados métodos de imobilização enzimática sem a presença do suporte.

### *Cristais de enzimas reticuladas (cross-linked enzyme crystals – CLECs)*

A obtenção dos CLECs envolve a precipitação controlada de enzimas em microcristais seguida de reticulação por meio do uso de reagentes bifuncionais, para a formação de ligações covalentes entre os grupos reativos de aminoácidos livres na superfície dos cristais de enzima. Após a reticulação, os CLECs são insolúveis em solução tampão e em solvente orgânico, o que permite suas aplicações em diferentes meios reacionais, sem perdas significativas de suas atividades catalíticas. Em seguida, os CLECs podem ser recuperados e reutilizados<sup>64,65</sup>.

Além disso, a reticulação também proporciona maior estabilidade mecânica e térmica aos CLECs<sup>66</sup>, visto que, nesse tipo de imobilização, os cristais de enzimas são estabilizados pelas ligações cruzadas em toda sua estrutura tridimensional, enquanto em imobilizações enzimáticas convencionais a enzima está ligada pontualmente à superfície bidimensional do suporte<sup>64</sup>.

Os CLECs possuem diferentes tamanhos, que podem variar de 1 µm a 100 µm, uniformidade do volume de cristais e, quando liofilizados, podem ser armazenados por longos períodos de tempo (de meses a anos), o que os torna ainda mais atraentes do ponto de vista comercial<sup>18</sup>.

Na literatura, são relatados diferentes protocolos para a preparação de CLECs a partir de diversas enzimas de interesse industrial, como termolissina<sup>67</sup>, ciclodextrina glicosiltransferase<sup>68</sup>, lipase de pâncreas de porco<sup>69</sup>, glicocamilase<sup>56</sup>, lacase<sup>70</sup>, dentre outras, para posterior aplicação na síntese de peptídeos, ciclodextrina, laurato de laurila, hidrólise do amido e no desenvolvimento de biossensores.

Apesar dessa técnica de imobilização resultar em elevada atividade catalítica por volume de meio reacional, uma desvantagem inerente aos CLECs é o requerimento de cristalização da enzima antes da reticulação, o que é, frequentemente, um processo complexo e requer a aplicação da enzima em sua forma pura, o que torna também, o processo bastante oneroso<sup>18,71</sup>.

### *Agregados de enzima reticuladas (cross-linked enzyme aggregates – CLEAs)*

Os CLEAs foram inicialmente desenvolvidos por Cao e colaboradores em 2000 como uma alternativa aos CLEs e CLECs, na tentativa de contornar seus inconvenientes<sup>72</sup>.

A síntese dos CLEAs envolve a precipitação da enzima (sem a necessidade destas estarem em sua forma pura), seguida de sua reticulação química por meio do uso de um reagente bifuncional, geralmente o glutaraldeído, resultando em agregados enzimáticos insolúveis<sup>18,73</sup>.

A precipitação das enzimas é comumente induzida pela adição de agentes precipitantes tais como sais, ácidos, solventes orgânicos e polímeros não iônicos, na solução contendo a enzima, sem a perturbação de sua estrutura tridimensional ativa<sup>18,60,72</sup>.

Os agregados enzimáticos formados a partir da precipitação da solução da enzima são estruturas supramoleculares, da ordem de 0,1 µm a 1 µm, unidas por ligações não covalentes<sup>18</sup>.

A eficiência da reticulação da enzima e a estabilidade dos CLEAs depende, principalmente, da concentração de resíduos lisina e aminoterminal na superfície da enzima. Enzimas que possuem concentração de grupos aminorreativos em sua superfície apresentam uma reticulação inadequada. Consequentemente, pode ocorrer a formação de CLEAs frágeis, o que resulta na dessorção de moléculas da enzima após sucessivos ciclos<sup>18</sup>.

Wilson e colaboradores (2004) demonstraram que a coprecipitação de enzimas com polímeros iônicos antes da reticulação pode melhorar a formação de CLEAs<sup>74</sup>. A polietilenoimina (PEI) é um polímero catiônico, solúvel

em água e que apresenta em sua estrutura uma elevada densidade de grupos aminoterminais. A coprecipitação da enzima com PEI permite que extensões estreitas da cadeia polimérica (contendo grupos aminoterminais) se aproximem de outros grupos amino presentes na estrutura da enzima (que não estão acessíveis no processo de reticulação convencional), favorecendo a ligação cruzada entre eles<sup>75,76</sup>. Além disso, a coprecipitação com polímeros iônicos também pode proporcionar excelente efeito estabilizante sobre a enzima por meio da alteração do seu microambiente<sup>74,77</sup>.

Diversos pesquisadores também têm empregado essa técnica de imobilização como uma estratégia para a estabilização de enzimas multiméricas, uma vez que o processo de reticulação da enzima pode prevenir a dissociação de suas subunidades, e, conseqüentemente, a perda de sua atividade catalítica<sup>73,78</sup>.

Na literatura, é relatada a preparação de CLEAs de diversas enzimas, tais como papaína<sup>79</sup>, L-aminoacilase<sup>80</sup>, penicilina G acilase<sup>74</sup>, lipases<sup>59,64,81-83</sup>,  $\beta$ -galactosidase<sup>84</sup> e lacase<sup>85</sup>, incluindo as que dependem de um cofator, como oxidorredutases e liases<sup>18</sup>, proporcionando catalisadores estáveis e com elevada atividade catalítica. Essa técnica também tem sido utilizada para a preparação de combi-CLEAs, a partir da reticulação de diferentes tipos de enzimas, para a catálise de múltiplas reações<sup>86</sup> ou processos em série<sup>18</sup>.

No entanto, há uma necessidade de estudos aprofundados em relação à morfologia dos CLEAs, principalmente no que diz respeito ao formato, porosidade e tamanho dos agregados e sua relação com a atividade catalítica, uma vez que os CLEAs podem formar grandes aglomerados (*clusters*) e, com isso, ocasionar limitações difusionais do substrato e do produto no microambiente do biocatalisador. Conseqüentemente, torna-se fundamental o conhecimento e controle dos fatores que influenciam a morfologia do CLEAs, a fim de se produzir partículas catalíticas bem definidas e com elevada atividade<sup>18,24,64,65</sup>.

#### 15.4.4 Encapsulação/Confinamento

A imobilização de enzimas por confinamento ou encapsulação envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura<sup>87-89</sup>. O método de encapsulação é baseado na inclusão das proteínas em estruturas poliméricas com tamanho de poros que permite a difusão dos

substratos e produtos e bloqueia a passagem da proteína. Como não existe uma ligação entre a enzima e o suporte, não há perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo, como frequentemente é observado na imobilização por ligação covalente<sup>7</sup>.

A vantagem da utilização desse método é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos. Além disso, esse é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de proteína com qualquer grau de purificação, além de não promover alterações estruturais nestas<sup>7,20,23,65</sup>.

Como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas, como o controle do tamanho dos poros do suporte, a dessorção da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz<sup>5,20,22,23,25,87,89-91</sup>. Outra desvantagem é que muitos precursores utilizados para a polimerização das matrizes podem inativar as enzimas<sup>89</sup>.

As enzimas têm sido imobilizadas dentro de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituídas de diferentes matérias produzidas especialmente pela técnica sol-gel<sup>5,20,22,23,25,87,89-91</sup>.

## 15.5 TIPOS DE SUPORTES

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte e, apesar de existirem diferentes materiais que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada<sup>41</sup>.

De modo geral, os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras<sup>21,22,92</sup>.

De acordo com sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel<sup>21,22</sup>.

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem uma elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo,



é importante atentar para o diâmetro dos poros do suporte, pois estes devem ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato<sup>23</sup>.

Como inconveniente do uso dos suportes porosos têm-se possíveis problemas relacionados a limitações difusionais, uma vez que o substrato, além de se difundir da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, onde grande parte das moléculas do catalisador está situada. Todavia, a localização das moléculas de enzimas no interior dos poros também confere uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional<sup>21-23</sup>.

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com moléculas de substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por esses suportes é sua mais notória desvantagem<sup>21-23</sup>. Na tentativa de contornar esse problema, muitos pesquisadores têm optado pela utilização de partículas ou fibras finas<sup>93-95</sup>; porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam esses tipos de materiais como, por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos<sup>21-23</sup>.

Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas, porém os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente têm baixo custo e são facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente<sup>96</sup>.

Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os orgânicos naturais agarose e quitosana, resinas acrílicas comerciais (polímeros sintéticos) toyopearl e Sepabeads e os nanomateriais considerando o grande número de trabalhos publicados<sup>21,97-101</sup>.

## Agarose

A agarose é uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto, com maior capacidade de gelificação. Possui as seguintes propriedades: (1) pouca quantidade de grupos eletronegativos (fundamentalmente sulfatos e ácido pirúvico), resultando num polissacarídeo

bastante inerte e adequado para técnicas cromatográficas; (2) fácil dissolução aquosa; (3) excelente transparência óptica tanto nas regiões de espectro visível quanto na região do ultravioleta, que permite uma melhor quantificação por técnicas espectrofotométricas; (4) estrutura macroporosa, na qual é possível variar o tamanho do poro; (5) fácil ativação e derivatização do suporte; e (6) ausência de toxicidade<sup>102</sup>. A agarose é um biopolímero bastante utilizado na separação de moléculas de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos<sup>103</sup>. A eletroforese em gel de agarose é uma das ferramentas mais utilizadas para a verificação da qualidade (pureza e quantidade) de DNA ou RNA de uma amostra, assim como para a purificação desses ácidos nucleicos. Nesta, o DNA de interesse é separado dos demais contaminantes (outras moléculas de DNA de diferente tamanho). A baixa resistência a altas temperaturas pode ser superada pelo entrecruzamento entre as moléculas do polímero com epícloridrina. Altos graus de entrecruzamento implicam maior resistência mecânica e redução do tamanho dos poros. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas. Diversas publicações relatadas na literatura mostram a aplicação desse suporte para a imobilização multi-pontual de enzimas de diversas procedências<sup>106-107</sup>.

### Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose<sup>108</sup>. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Esse biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais<sup>109</sup>. Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) na estrutura da quitosana. Esse biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais<sup>110</sup>. A Figura 15.5 mostra a estrutura química dos biopolímeros celulose, quitina e quitosana.

A quitina é frequentemente obtida de exoesqueletos de crustáceos como, por exemplo, caranguejo e camarão. O biopolímero é adicionado a uma

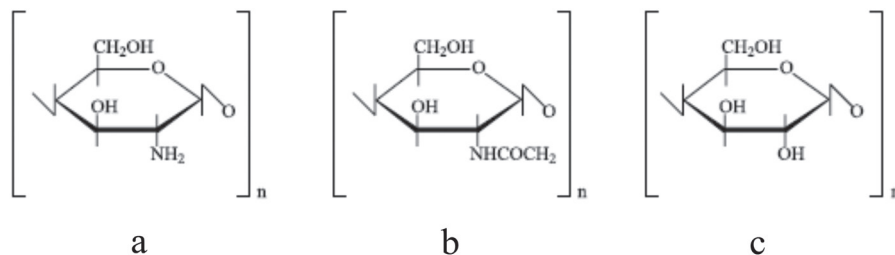


Figura 15.5 Estrutura dos biopolímeros quitosana (a), quitina (b), e celulose (c).

solução aquosa fria de HCl a 2% em massa para a remoção de compostos minerais como carbonato de cálcio. Em seguida, é realizada a hidrólise alcalina a quente em solução aquosa de NaOH 5% em massa para a remoção de proteínas. Após essa etapa, obtém-se a quitina com um grau de acetilação superior a 50%<sup>111</sup>. Para a obtenção da quitosana, a quitina é desacetilada com solução de NaOH a 50% em massa a 60 °C<sup>1</sup>. O grau de desacetilação da quitosana é controlado por essa etapa, e a total desacetilação pode ser atingida por meio do emprego da hidrólise alcalina em etapas consecutivas.

Na etapa de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil da quitina é rompida com formação de unidades de D-glucosamina, que contém um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não é uma macromolécula quimicamente uniforme, apresentando diferentes graus de desacetilação. Acima de 30% de desacetilação, o material já pode ser considerado quitosana, sendo que as aplicações e características dessa macromolécula dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica<sup>112</sup>. Esse biopolímero tem três tipos de grupos reativos funcionais: um grupo amino na posição C-2 e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente<sup>112</sup>. É solúvel em diversos ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos<sup>113</sup>.

A maioria das indústrias que produzem quitina e quitosana em escala comercial está localizada no Japão, onde mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana são manufaturadas por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão<sup>114</sup>. Nessas indústrias, a quitosana é produzida a partir da quitina via processo termoquímico por hidrólise alcalina que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40% a 50% em massa) a 110 °C a 115 °C. Entretanto, os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são a temperatura e tempo de reação e concentração da solução de álcali,

razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitem a despolimerização.

Para produzir 1 Kg de quitosana 70% desacetilada a partir de carapaças de caranguejo, são necessários 6,3 Kg de HCl, 1,8 Kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água de resfriamento<sup>113</sup>.

São diversas as aplicações da quitosana. Entretanto, verifica-se uma centralização para uso na purificação de água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos<sup>1</sup>. A quitosana atua como floculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais e também pode ser utilizada na remoção de petróleo proveniente de derramamentos no mar, contribuindo para a solução de um dos grandes problemas ambientais mundiais<sup>113</sup>. No tratamento de efluentes industriais com elevados teores de metais pesados, a quitosana age como agente quelante na remoção de tais metais e resíduos, devido à presença de diferentes grupos funcionais, que podem ser usados para aumentar a eficiência de remoção de íons metálicos. O grupo funcional NH<sub>2</sub> da quitosana é de grande interesse devido à habilidade de formar ligações coordenadas covalentes com íons metálicos. Trabalhos têm sido realizados quanto à remoção de metais pesados, como cobre, chumbo, cádmio e mercúrio<sup>112</sup>.

Também têm sido utilizados para a obtenção de produtos de alto valor agregado, como cosméticos, agentes de liberação controlada de fármacos no organismo, aditivos alimentares, membranas semipermeáveis e produtos farmacêuticos<sup>1,113</sup>.

Na indústria química, a quitosana é largamente utilizada para aplicações em cosméticos em função de sua natureza fungicida<sup>113</sup>; na produção de filmes fotográficos, por sua resistência à abrasão, características ópticas e facilidade de obtenção de filmes<sup>1</sup>; na indústria papelreira, aumentando a resistência mecânica e a impermeabilidade do papel; e também na curtição e acabamento de artefatos de couros<sup>113</sup>.

A aplicação da quitosana como suporte para a imobilização de enzimas se deve às suas diferentes configurações geométricas como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras e outras. Os biopolímeros quitina e quitosana são comercializados pela empresa Sigma-Aldrich nas formas em pó e escamas. Na forma de hidrogel (Chitopearl), é comercializada pela empresa japonesa<sup>113</sup> Fuji Spinning Co. Ltda. A literatura relata também diferentes tipos de preparação de quitosana, nas formas de membranas, cápsulas, fibras e esponjas sintetizadas por diferentes procedimentos, alterando as propriedades físicas do polissacarídeo para aumentar a sua estabilidade e durabilidade<sup>113</sup>. Essa estratégia permite obter um suporte apropriado para os

diferentes procedimentos de imobilização. Outra propriedade importante é a presença de diferentes grupos funcionais, grupos hidroxila e amino, que permitem a utilização de diferentes métodos de imobilização<sup>115</sup>. Possui baixa estabilidade em pH ácido, e diversas alternativas são propostas para remediar essa condição, como reticulação com agentes bifuncionais para a formação de géis mais resistentes ou a aplicação de outros biopolímeros como carragenina, gelatina e alginato. Essas técnicas têm sido utilizadas para diversas aplicações, como liberação controlada de fármacos e suporte para a imobilização de enzimas<sup>101,110</sup>.

### *Resina de afinidade Toyopearl*

A empresa Tosoh Bioscience com sede no Japão e com filiais na Alemanha e Estados Unidos comercializam resinas acrílicas de afinidade chamadas Toyopearl, com diferentes propriedades para processos de separação e purificação de compostos orgânicos, normalmente proteínas\*. Essas resinas apresentam diferentes grupos químicos em sua estrutura, com o objetivo de se ligarem em diferentes grupos reativos. São hidrofílicas, com alta porosidade para poderem acomodar proteínas de alta massa molecular, aproximadamente 1.000 Å de diâmetro de poros, e diâmetros de partículas da ordem de 40 µm a 90 µm, com aplicações em escalas laboratorial e industrial. Podem ser empregadas na síntese de peptídeos e oligonucleotídeos devido à sua excelente estabilidade em diferentes solventes orgânicos e em condições extremas de pH. De acordo com o catálogo informativo fornecido pela Tosoh Bioscience, essas resinas estão divididas em três classes: resinas ativadas que não necessitam de reagentes químicos para a estabilização do complexo resina/proteína; resinas específicas que possuem mecanismos de ligação distintos (quelação e adsorção) e resinas reativas que necessitam desses agentes para a estabilização do complexo.

Resinas ativadas Toyopearl AF-Tresil-650M e Toyopearl AF-Epóxi-650M são de grande importância biotecnológica e possuem em sua estrutura cerca de 20 µmoles de grupos tresil e  $\geq 100$  µmoles de grupos epóxi.mL<sup>-1</sup> de resina úmida. Essas resinas sofrem ataque nucleofílico de grupos amino e tiol de proteínas ideais na imobilização de proteínas, carboidratos e glicoproteínas. Resinas específicas Toyopearl AF-Quelato-650M, Toyopearl AF-Blue HC-650M e Toyopearl AF-Red-650M são bastante empregadas

---

\* Ver [www.tosohbioscience.com](http://www.tosohbioscience.com).

na purificação de polimerases, ciclases, transferases e albumina. Já as resinas reativas são representadas por Toyopearl AF-Carbóxi-650M, Toyopearl AF-Formil-650M e Toyopearl AF-Amino-650M. Essas resinas possuem alta densidade de grupos reativos em sua estrutura e também são empregadas em processos de purificação e separação de diferentes proteínas, conforme exibe a Tabela 15.1. Ligam-se covalentemente aos grupos reativos da enzima e requerem agentes químicos para estabilizar as ligações. AF-Formil-650M e AF-Amino-650M necessitam de cianoborohidreto de sódio a fim de reduzir as bases de Schiff (ligações iminas) após reação covalente com a proteína para a obtenção de um derivado inerte. Já AF-Amino-650M e AF-Carbóxi-650M necessitam de carbodi-imida.

**Tabela 15.1** Concentração de proteína imobilizada em diferentes resinas acrílicas comercializadas pela empresa Tosoh Bioscience

PI (MG.ML <sup>-1</sup> DE GEL)	AF-TRESIL-650M	AF-FORMIL-650M	AF-AMINO-650M	AF-CARBÓXI-650M
Inibidor de tripsina de soja	16,0	3,50	5,80	15,0
Concanavalina A	13,0	–	–	–
α-Quimotripsina	12,5	–	–	–
Mioglobina	12,4	–	–	–
Ovalbumina	–	2,50	6,70	0,80
Albumina de soro bovina	12,4	14,0	19,2	3,30
Imunoglobulina humana	10,0	15,0	6,70	11,7
Lisozima	60,0	20,0	5,80	17,5

**Legenda:** PI, proteína imobilizada (mg.mL<sup>-1</sup> de gel).

**Fonte:** [www.tosohbioscience.com](http://www.tosohbioscience.com)

A resina AF-Amino-650M possui cerca de 90 μmoles de grupos amino x mL<sup>-1</sup> de resina úmida e diâmetro de partícula e poro de 6.500 Å e 1.000 Å, respectivamente, e estabilidade em uma ampla faixa de pH (de 2 a 13), condições ideais em processos de imobilização de enzimas\*. Esse suporte apresenta também grupos hidroxilas que podem ser importantes no processo de imobilização, como mostra a Figura 15.6.

Diferentes agentes de ativação, como glicidol e epícloridrina, reagem preferencialmente com os grupos hidroxila, produzindo géis glioxil, e os

\* Ver [www.separations.us.tosohbioscience.com](http://www.separations.us.tosohbioscience.com).

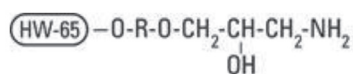


Figura 15.6 Estrutura química da resina acrílica Toyopearl AF-Amino-650M.

grupos amino podem reagir com glutaraldeído, um agente bifuncional bastante empregado em técnicas de imobilização, o que torna interessante o uso dessa resina como matriz de imobilização de enzimas<sup>45</sup>.

## Nanomaterias

Os nanomateriais, como as nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanoporos, nanofolhas e nanocompósitos têm encontrado muitas aplicações em biotecnologia industrial. A Tabela 15.2 apresenta os diversos tipos de suportes nanoestruturados que têm sido empregadas para a imobilização de enzimas. As vantagens de enzimas imobilizadas em partículas de dimensão micrométrica são adquiridas quando os nanomateriais são usados como suportes sólidos para a imobilização das mesmas enzimas<sup>116-118</sup>. Surgem novos fenômenos, geralmente favoráveis quando o tamanho do carreador se aproxima de dimensões nanométricas. Os seguintes fatores, apresentados no contexto de nanomateriais, são considerações importantes na avaliação da adequação de um material para a imobilização da enzima.

- a) *Razão entre superfície e volume*: nanomateriais têm grande razão área superficial e volume. Nanofibras oferecem dois terços de sua relação superfície/volume de (aproximadamente) partículas esféricas de mesmo diâmetro<sup>117,119</sup>.

Tabela 15.2 Lista de materiais nanoestruturados utilizados para a imobilização de enzimas

NANOMATERIAL(IS) USADO(S)	TIPO DE NANOSUORTE	REFERÊNCIAS
Nanopartículas	Nanopartículas de óxido de ferro (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ), poliestireno, sílica, zircônia, quitosana, ácido polilático, ZnO, POS-PVA	120-126
Nanofibras	Nanofibras poli (estireno-co-maleico anidrido), poli-(acrilonitrila-co-ácido maleico), polivinil álcool; nanofibras de celulose, nanofibras de polissulfona, fibra de seda policaprolactona	127-132

NANOMATERIAL(IS) USADO(S)	TIPO DE NANOSUORTE	REFERÊNCIAS
Nanotubos	Os nanotubos de carbono (de parede simples ou múltipla), Peptídeos	133, 134
Nanoporos	Matéria mobil cristalina-41 (MCM-41; tamanho dos poros: 4 nm); Santa Barbara amorphous-15 (SBA-15; pré-tamanho: 5-13 nm), espuma mesocelular (MCF, tamanho dos poros 15-40 nm), folhas dobradas sílicas mesoporosas, FSM4 (4 nm) e FSM7 (7 nm)	135-139
Nanofolhas	Óxido de grafeno	140
Nanocompósitos	Nanopartículas de sílica revestidas; nanopartículas de ouro revestidas; óxido de titânio e silício; partículas magnéticas revestidas com quitosana, nanopartículas revestidas com celulose	141-143

- b) *Carregamento da enzima*: materiais em escala nanométrica oferecem alta carga de enzima, devido à sua grande área superficial relativa. Alto carregamento de enzimas leva a uma melhor atividade biocatalítica e estabilidade. Isso faz com que o nanosporte seja um suporte ideal para a imobilização de enzima em relação aos materiais convencionais.
- c) *Taxa de fluxo*: o nanomaterial imobilizado se comporta como uma partícula estável, monodispersa em suspensão aquosa e exibindo o movimento browniano<sup>119</sup>. De acordo com a equação de Stokes-Einstein, a mobilidade e difusibilidade de nanopartículas têm que ser menores do que as das enzimas livres, com base em seus tamanhos relativamente grandes. Essa diferença de mobilidade pode apontar para uma região de transição entre a catálise homogênea com enzimas livres e a catálise heterogênea com enzimas imobilizadas. Tem sido demonstrado que o movimento browniano pode ser responsável por atividades elevadas obtidas quando as enzimas são imobilizadas em nanopartículas<sup>144</sup>.
- d) *Transferência de massa*: a atividade enzimática aparente poderia ser melhorada devido à aliviada limitação de transferência de massa de substrato sem nanoestruturas, quando comparada com as matrizes em escala macro na imobilização convencional de enzimas. As enzimas imobilizadas em nanomateriais têm baixa resistência à transferência de massa e, portanto, têm uma elevada atividade e estabilidade<sup>116</sup>.
- e) *Facilidade de separação*: nanomateriais magnéticos facilitam grandemente a separação, permitindo a utilização de um ímã para remover rápida e eficientemente a enzima imobilizada do produto<sup>145</sup>. Isto permite uma maior capacidade de reutilização e preservação da estabilidade da enzima ligada em comparação com os sistemas de matrizes convencionais, nos quais a centrifugação/filtração é a única opção para separar a enzima



a partir do produto. Tais operações podem levar à lixiviação/instabilidade da enzima devido à mecânica de cisalhamento, enquanto se mistura o *pellet* com o tampão apropriado ao começar uma nova reação<sup>146</sup>. Por conseguinte, mostrou-se que os baixos custos dos processos de nanopartículas magnéticas fazem deles uma opção interessante e econômica.

- f) *O projeto do reator*: relatou-se na literatura que um número de reatores enzimáticos melhoram o desempenho da eficiência da enzima<sup>147</sup>. A imobilização de enzimas é fundamental para o desenvolvimento de reatores, biossensores ou sistemas de análise total ou micro<sup>132</sup>. Os nanomateriais, especialmente as nanofibras, oferecem maior flexibilidade na concepção do reator, pois são mais fáceis de serem preparadas e manuseadas<sup>128</sup>. A pequena perda de pressão e a alta taxa de fluxo das membranas de nanofibras representam as vantagens mais importantes dos biorreatores de membrana de nanofibras com enzima imobilizada sobre os biorreatores tradicionais de membrana com enzima imobilizada e biorreatores de leito fixo. Um biorreator de membrana fibrosa com enzima imobilizada foi estabelecido com uma conversão de hidrólise contínua constante a uma velocidade constante e taxa de fluxo sob condições ideais<sup>148</sup>.

## 15.6 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

As enzimas são capazes de catalisar reações de hidrólise, transesterificação, isomerização, oxirredução esterificação, transferência de grupos inter e intramoleculares, adição de grupos em ligações duplas, dentre outras. Ou seja, são capazes de catalisar qualquer tipo de reação orgânica atuando de maneira específica e em condições reacionais brandas. Desde 1960, quando a tecnologia enzimática surgiu como área de investigação, as enzimas imobilizadas têm sido testadas para a produção de produtos de interesse em ramos industriais diversificados. A Tabela 15.3 sumariza exemplos de enzimas imobilizadas por diferentes técnicas sendo testadas na obtenção de produtos de interesse biotecnológico.

**Tabela 15.3** Métodos de imobilização de enzimas, tipos de suportes e aplicações dos sistemas imobilizados na obtenção de produtos de interesse industrial

ENZIMA	SUORTE	MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO	APLICAÇÕES	REFERÊNCIA
$\alpha$ -Amilase	Nanopartículas de sílica	Adsorção	Formulações de sabão em pó	149
$\alpha$ -Quimiotripsina	Nanopartículas magnéticas de quitosana	Ligação covalente	Síntese de peptídeos	150
$\alpha$ -Galactosidase	Grafeno funcionalizado	Ligação covalente	Hidrólise de oligossacarídeos	151
$\beta$ -Galactosidase	Partículas de quitosana e agarose	Ligação covalente	Hidrólise da lactose	152
$\beta$ -Glicosidase	Partículas de quitosana	Ligação covalente	Hidrólise da isoflavona	153
Álcool oxidase	Nanofibras de poliestireno-co-anidrido maleico (PSMA)	Ligação covalente e adsorção seguida de reticulação	Determinação de álcool em saliva	154
Fosfatase alcalina	Lâminas de vidro recobertas por filmes de sílica	Adsorção	Desenvolvimento de superfícies bioativas para aplicações médicas	155
Catalase	Nanotubos de titanatos	Ligação covalente	Biossensores	156
Glicoamilase	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	Ligação covalente	Biossensor para detecção de amido	157
Invertase	poliuretano	Ligação covalente	Síntese de açúcar invertido	158
Lacase	Nanopartículas de titânia e membranas de titânia funcionalizada	Adsorção, Ligação covalente e adsorção seguida de reticulação	Remoção de compostos recalcitrantes em águas residuais	159
Lactatodesidrogenase	Nanopartículas magnéticas revestidas com sílica	Ligação covalente	Produção de compostos quirais	160
Lipase	Partículas de poli-hidroxibutirato	Adsorção	Síntese de aroma	161
Tripsina	Nanopartículas magnéticas decarboximetilquitosana	Adsorção	Digestão de proteínas	162
Urease	Partículas de quitosana	Ligação covalente	Biossensor para determinação do conteúdo de ureia	163

## 15.7 CONCLUSÃO

Para que a substituição de processos químicos convencionais por tecnologia enzimática continue a se expandir é de fundamental importância a continuidade de esforços científicos que proponham alternativas de redução de custo do processo, principalmente das enzimas. Os principais desafios referem-se à produção de biocatalisadores robustos e economicamente viáveis. Nesse sentido, a imobilização de enzimas abre possibilidades para a obtenção de biocatalisadores com propriedades catalíticas e operacionais adequadas para uma infinidade de aplicações industriais. Além disso, a principal vantagem da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização, o que torna a tecnologia enzimática menos onerosa e, portanto, mais competitiva. Ao longo dos anos, várias técnicas e suportes têm sido investigados; conseqüentemente, preparações enzimáticas com ampla faixa de eficiência, estabilidade e atividade estão disponíveis em escala laboratorial. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável a todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada em biocatálise é necessário escolher o procedimento mais simples, mais barato e mais sustentável, que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional.

## 15.8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para ampliar a utilização em larga escala de enzimas imobilizadas é necessária a resolução de desafios tecnológicos, incluindo a constante busca por novos suportes e protocolos de imobilização que mantenham a atividade catalítica da enzima após o processo de imobilização, suprimam interações deletérias entre as enzimas, ofereçam uma transferência de massa facilitada, apresentem baixo custo de aquisição e potencial para aplicações comerciais diretas. Uma boa compreensão da química dos nanomateriais, realizando a funcionalização, e da natureza das enzimas selecionadas, combinada com a seleção adequada da técnica de imobilização, podem levar ao desenvolvimento de novos sistemas nanobiocatalíticos robustos.

A inativação de enzimas por solventes durante a produção de biodiesel, por exemplo, pode ser evitada através da procura de uma solução robusta, lipase estável/tolerante ao solvente. Isso será possível por meio de engenharia de proteínas, tais como mutagênese iterativa saturada (*iterative saturated mutagenesis* – ISM) ou outras abordagens de biologia molecular, que podem

produzir novos e robustos biocatalisadores recombinantes com maior eficiência e estabilidade biocatalítica com potencial para múltiplas reutilizações. ISM tem provado ser muito mais eficiente do que todos os esforços sistemáticos anteriores utilizando reação em cadeia da polimerase propensa a erros em diferentes taxas de mutação, mutagênese de saturação em pontos quentes e/ou embaralhamento do DNA (*DNA shuffling*). Efeitos epistáticos positivos pronunciados foram encontrados e podem ser a principal razão para isso<sup>164</sup>.

A combinação interdisciplinar de biotecnologia e nanotecnologia representa uma oportunidade promissora, abrindo a porta para um aumento da quantidade e da eficiência de produção de produtos potencialmente comerciais. O uso repetido de sistemas nanobiocatalíticos estáveis e eficientes poderia melhorar significativamente a viabilidade econômica desses produtos no futuro.

## REFERÊNCIAS

1. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol.* 2004;35(2-3):126-39.
2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-51.
3. BCC Research. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications 2012 [Internet]. [Cited 2013 May 4]. Available from: <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>.
4. Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol.* 2007;41(5):565-9.
5. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev.* 2009;38(2):453-68.
6. Langlois DP, Dale JK. Sirup and method of making the same. 1940; United States patent US 2201609, 1940.
7. Marconi W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reac Polym.* 1989;11(0):1-19.
8. Grubhofer N, Schleith L. Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. *Naturwissenschaften.* 1953;40(19):508.
9. Manecke G. Immobilization of enzymes by various synthetic polymers. *Biotechnol Bioeng Symp.* 1972;3:185-7.
10. Takasaki Y, Kosugi Y, Kanbayashi A. *Fermentation Advances*. Perlman D, editor. New York: Academic Press; 1969.
11. Chibata I, Tosa T. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. In: Wingard LB, Katchalski-Katzir E, Goldsmith L, editors. *Appl Biochemistry Bioengineering*. 1. ed. London: Academic Press; 1976. p. 239-360.
12. Doscher MS, Richards FM. The Activity of an Enzyme in the Crystalline State: Ribonuclease S. *J Biol Chem.* 1963;238:2399-406.
13. St. Clair NL, Navia MA. Cross-linked enzyme crystals as robust biocatalysts. *J Am Chem Soc.* 1992;114:7314-16.
14. Margolin AL. Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.* 1996;14(7):223-30.
15. Lalonde JJ. Application of cross-linked enzyme crystals as elective catalysts for synthesis. *Curr Opin Drug Discovery Dev.* 1998;1:272-7.
16. Haring D, Schreier P. Cross-linked enzyme crystals. *Curr Opin Chem Biol.* 1999;13:35-8.
17. Margolin AL, Navia MA. Protein Crystals as Novel Catalytic Materials. *Angew Chem Int Ed.* 2001;40(12):2204-22.

18. Sheldon RA, Schoevaart R, Van Langen LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal Biotransform.* 2005;23(3-4):141-7.
19. Straathof AJJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(6):548-56.
20. Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett.* 2009;31(11):1639-50.
21. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(6):1451-63.
22. Mendes AA, Oliveira PCd, Castro HFd, Giordano RLC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova.* 2011;34(5):831-40.
23. Dalla-Vecchia R, Nascimento MdG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova.* 2004;27(4):623-30.
24. Illanes A, Cauherff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol.* 2012;115(0):48-57.
25. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* 2013 Dec;31(8):1808-25.
26. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv Synth Catal.* 2011;353(16):2885-904.
27. Zhou Z, Inayat A, Schwieger W, Hartmann M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. *Microporous Mesoporous Mat.* 2012;154(1):133-41.
28. Zheng M-M, Lu Y, Dong L, Guo P-M, Deng Q-C, Li W-L, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresour Technol.* 2012;115(1):141-6.
29. Secundo F, Miehé-Brendlé J, Chelaru C, Ferrandi EE, Dumitriu E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;109(1-3):350-61.
30. Arıca MY, Altıntaş B, Bayramoğlu G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):665-9.
31. Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochem Eng J.* 2010;52(2-3):137-43.
32. Reis P, Witula T, Holmberg K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. *Microporous Mesoporous Mat.* 2008;110(2-3):355-62.

33. He J, Song Z, Ma H, Yang L, Guo C. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. *J Mater Chem*. 2006;16(44):4307-15.
34. Serra E, Mayoral Á, Sakamoto Y, Blanco RM, Díaz I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous Mesoporous Mat*. 2008;114(1-3):201-13.
35. Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem*. 2008;43(10):1061-7.
36. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. 1990;343(6260):767-70.
37. Derewenda U, Brzozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. 1992;31(5):1532-41.
38. Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B: Enzym*. 2002;19-20(1):279-86.
39. Marciello M, Bolivar JM, Filice M, Mateo C, Guisan JM. Preparation of Lipase-coated, stabilized, hydrophobic magnetic particles for reversible conjugation of biomacromolecules. *Biomacromolecules*. 2013;14(3):602-7.
40. Macario A, Moliner M, Corma A, Giordano G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous Mesoporous Mat*. 2009;118(1-3):334-40.
41. Miletić N, Vuković Z, Nastasović A, Loos K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins – Versatile immobilization supports for biocatalysts. *J Mol Catal B: Enzym*. 2009;56(4):196-201.
42. Pedroche J, del Mar Yust M, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(5):1160-6.
43. Manrich A, Galvão CMA, Jesus CDF, Giordano RC, Giordano RLC. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *Int J Biol Macromol*. 2008;43(1):54-61.
44. Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Gonçalves LRB, Giordano RLC. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B: Enzym*. 2008;51(3-4):100-9.

45. Mendes AA, Giordano RC, Giordano RdLC, de Castro HF. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J Mol Catal B: Enzym.* 2011;68(1):109-15.
46. Chaubey A, Parshad R, Taneja SC, Qazi GN. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process Biochem.* 2009;44(2):154-60.
47. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochem.* 2012;47(8):1220-7.
48. Guisán J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1988;10(6):375-82.
49. Erdemir S, Yilmaz M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. *J Mol Catal B: Enzym.* 2009;58(1-4):29-35.
50. Cowan DA, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb Technol.* 2011;49(4):326-46.
51. Mendes AS, de Castro HF, Rodrigues DS, Adriano WS, Tardioli PW, Mammarella EJ, et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011;38(8):1055-66.
52. Quiocho FA, Richards FM. The enzymic behavior of Carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry.* 1966;5(12):4062-76.
53. Sigler PB, Skinner HCW. The reaction of diisopropylfluorophosphate with crystals of  $\gamma$ -chymotrypsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963;13(3):236-40.
54. Quiocho FA, Richards FM. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964;52:833-9.
55. Roy JJ, Abraham TE. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2006;38(1):31-6.
56. Abraham TE, Joseph JR, Bindhu LBV, Jayakumar KK. Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations. *Carbohydr Res.* 2004;339(6):1099-104.
57. Amotz S, Novo Industri A/S. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent. US4665028; 1987.
58. Cruz J, Barbosa O, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R, Torres R, Ortiz C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;80(1):7-14.



59. Gupta P, Dutt K, Misra S, Raghuwanshi S, Saxena RK. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. *Bioresour Technol.* 2009;100(18):4074-6.
60. Cao L, Langen Lv, Sheldon RA. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(4):387-94.
61. La Rotta Hernandez CE, Lütz S, Liese A, Bon EPS. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37(6):582-8.
62. Han K-K, Richard C, Delacourte A. Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents. *Int J Biochem.* 1984;16(2):129-45.
63. Wong SS, Wong L-JC. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb Technol.* 1992;14(11):866-74.
64. Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2006;43(1-4):124-7.
65. Sheldon RA. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal.* 2007;349(8-9):1289-307.
66. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnology.* 2007;25(2):66-73.
67. Persichetti RA, Clair NLS, Griffith JP, Navia MA, Margolin AL. Cross-linked enzyme rystals (CLECs) of thermolysin in the synthesis of peptides. *J Am Chem Soc.* 1995;117(10):2732-7.
68. Kim W, Chae H, Park C, Lee K. Stability and activity of cross-linking enzyme crystals of cyclodextrin glucanotransferase isolated from *Bacillus macerans*. *J Mol Catal B: Enzym.* 2003;26(3-6):287-92.
69. Gogoi S, Hazarika S, Rao PG, Dutta NN. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. *Biocatal Biotransform.* 2006;24(5):343-51.
70. Roy JJ, Abraham TE, Abhijith KS, Kumar PVS, Thakur MS. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosens Bioelectron.* 2005;21(1):206-11.
71. Jegan Roy J, Emilia Abraham T. Strategies in making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem Rev.* 2004;104(9):3705-22.
72. Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett.* 2000;2(10):1361-4.
73. Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb Technol.* 2009;45(6-7):405-18.

74. Wilson L, Illanes A, Abián O, Pessela BCC, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Co-Aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):852-7.
75. López-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Alonso N, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules*. 2005;6(4):1839-42.
76. Wilson L, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Illanes A, Guisán JM, Palomo JM. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb Technol*. 2006;39(4):750-5.
77. Andersson MM, Hatti-Kaul R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *J Biotechnol*. 1999;72(1-2):21-31.
78. Wilson L, Betancor L, Fernández-Lorente G, Fuentes M, Hidalgo A, Guisán JM, et al. Cross-linked egggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):814-7.
79. Wang M, Jia C, Qi W, Yu Q, Peng X, Su R, et al. Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. *Bioresour Technol*. 2011;102(3):3541-5.
80. Vaidya BK, Kuwar SS, Golegaonkar SB, Nene SN. Preparation of cross-linked enzyme aggregates of l-aminoacylase via co-aggregation with polyethyleneimine. *J Mol Catal B: Enzym*. 2012;74(3-4):184-91.
81. Shah S, Sharma A, Gupta MN. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal Biochem*. 2006;351(2):207-13.
82. López-Serrano P, Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol Lett*. 2002;24(16):1379-83.
83. Brem J, Turcu MC, Paizs C, Lundell K, Toşa M-I, Irimie F-D, et al. Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters. *Process Biochem*. 2012;47(1):119-26.
84. Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, van Rantwijk F, et al. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng*. 2004;87(6):754-62.
85. Matijošytė I, Arends IWCE, de Vries S, Sheldon RA. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J Mol Catal B: Enzym*. 2010;62(2):142-148.
86. Dalal S, Kapoor M, Gupta MN. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *J Mol Catal B: Enzym*. 2007;44(3-4):128-32.
87. Kato M, Sakai-Kato K, Matsumoto N, Toyooka T. A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. *Anal Chem*. 2002;74(8):1915-21.

88. Hage D, Ruhn P. An introduction to affinity chromatography. In: Hage DS, editor. Handbook of affinity chromatography. Chromatographic Science Series. Second Edition ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 3-13.
89. Hodgson RJ, Chen Y, Zhang Z, Tleugabulova D, Long H, Zhao X, et al. Protein-doped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. *Anal Chem.* 2004;76(10):2780-90.
90. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym.* 2000;9(4-6):113-48.
91. Alfaya AAS, Kubota LT. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova.* 2002;25:835-41.
92. Talbert JN, Goddard JM. Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf B.* 2012;93(1):8-19.
93. Wang Y, Hsieh YL. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J Membrane Sci.* 2008;309(1-2):73-81.
94. Huang X-J, Chen P-C, Huang F, Ou Y, Chen M-R, Xu Z-K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B: Enzym.* 2011;70(3-4):95-100.
95. Liu C-X, Zhang S-P, Su Z-G, Wang P. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. *Bioresour Technol.* 2012;103(1):266-72.
96. Dalla-Vecchia R, Nascimento MD, Soldi V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. *Química Nova.* 2004;27(4):623-30.
97. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 2000 ;26(7):509-15.
98. Palomo JM, Munoz G, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B:Enzym.* 2002;19:279-86.
99. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lorente G, Pedroche J, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol Progress.* 2002;18(3):629-34.
100. Lopez-Gallego F, Montes T, Fuentes M, Alonso N, Grazu V, Betancor L, et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *J Biotechnol.* 2005;116(1):1-10.
101. Adriano WS, Mendonca DB, Rodrigues DS, Mammarella EJ, Giordano RLC. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules.* 2008;9(8):2170-9.

102. Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, Lopez-Gallego F, et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):274-80.
103. Adkins NL, Johnson CN, Georgel PT. Characterization of chromatin samples in the presence of *Drosophila* embryo extract by quantitative agarose gel electrophoresis. *J Biochem Bioph Meth.* 2006;67(2-3):141-50.
104. Fernandez-Lafuente R, Cowan DA, Wood ANP. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17(4):366-72.
105. Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J Chromatogr A.* 2004;1038(1-2):267-73.
106. Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Goncalves LRB, Giordano RLC. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B:Enzym.* 2008;51(3-4):100-9.
107. Fernandez-Lorente G, Godoy CA, Mendes AA, Lopez-Gallego F, Grazu V, de las Rivas B, et al. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules.* 2008;9(9):2553-61.
108. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – A review. *J Control Release.* 2006;114(1):1-14.
109. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol.* 2004;35(2-3):126-39.
110. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;57(1):19-34.
111. Gupta KC, Jabrail FH. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydr Polym.* 2006;66(1):43-54.
112. Li N, Bai RB. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Ind Eng Chem Res.* 2005;44(17):6692-700.
113. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46(1):1-27.
114. Tsigos I, Martinou A, Kafetzopoulos D, Bouriotis V. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2000;18(7):305-12.
115. Chiou S-H, Wu W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials.* 2004;25(2):197-204.
116. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem Eng Sci.* 2006;61(3):1017-26.

117. Gupta MN, Kaloti M, Kapoor M, Solanki K. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artif Cell Blood Sub.* 2011;39(2):98-109.
118. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol Adv.* 2012;30(3):512-23.
119. Wang P. Nanoscale biocatalyst systems. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(6):574-9.
120. Dyal A, Loos K, Noto M, Chang SW, Spagnoli C, Shafi KVPM, et al. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003;125(7):1684-5.
121. Tang ZX, Qian JQ, Shi LE. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Mater Lett.* 2007;61(1):37-40.
122. Wang X, Dou PP, Zhao P, Zhao CM, Ding Y, Xu P. Immobilization of Lipases onto Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for application in biodiesel production. *Chemsuschem.* 2009;2(10):947-50.
123. Chen YZ, Ching CB, Xu R. Lipase immobilization on modified zirconia nanoparticles: Studies on the effects of modifiers. *Process Biochem.* 2009 ;44(11):1245-51.
124. Andrade LH, Rebelo LP, Netto CGCM, Toma HE. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. *J Mol Catal B:Enzym.* 2010;66(1-2):55-62.
125. Wu Y, Wang YJ, Luo GS, Dai YY. Effect of solvents and precipitant on the properties of chitosan nanoparticles in a water-in-oil microemulsion and its lipase immobilization performance. *Bioresour Technol.* 2010 Feb;101(3):841-4.
126. Chronopoulou L, Kamel G, Sparago C, Bordi F, Lupi S, Diociaiuti M, et al. Structure-activity relationships of *Candida rugosa* lipase immobilized on polylactic acid nanoparticles. *Soft Matter.* 2011;7(6):2653-62.
127. Ye P, Xu ZK, Wu J, Innocent C, Seta P. Nanofibrous membranes containing reactive groups: Electrospinning from poly(acrylonitrile-co-maleic acid) for lipase immobilization. *Macromolecules.* 2006;39(3):1041-5.
128. Nair S, Kim J, Crawford B, Kim SH. Improving biocatalytic activity of enzyme-loaded nanofibers by dispersing entangled nanofiber structure. *Biomacromolecules.* 2007;8(4):1266-70.
129. Sinha S, Dhakate SR, Kumar P, Mathur RB, Tripathi P, Chand S. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of chitooligosaccharides. *Bioresour Technol.* 2012;115:152-7.
130. Wang Y, Hsieh YL. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *J Membrane Sci.* 2008;309(1-2):73-81.
131. Huang XJ, Chen PC, Huang F, Ou Y, Chen MR, Xu ZK. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. *J Mol Catal B:Enzym.* 2011;70(3-4):95-100.

132. Song J, Kahveci D, Chen ML, Guo Z, Xie EQ, Xu XB, et al. Enhanced catalytic activity of lipase encapsulated in PCL nanofibers. *Langmuir*. 2012;28(14):6157-62.
133. Yu LT, Banerjee IA, Gao XY, Nuraje N, Matsui H. Fabrication and application of enzyme-incorporated peptide nanotubes. *Bioconjugate Chem*. 2005;16(6):1484-7.
134. Shah S, Solanki K, Gupta MN. Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chem Cent J*. 2007 29;1.
135. Diaz JF, Balkus KJ. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J Mol Catal B:Enzym*. 1996;2(2-3):115-26.
136. Kang Y, He J, Guo XD, Guo X, Song ZH. Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15. *Ind Eng Chem Res*. 2007;46(13):4474-9.
137. Serra E, Mayoral A, Sakamoto Y, Blanco RM, Diaz I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. *Microporous Mesoporous Mat*. 2008;114(1-3):201-13.
138. Nikolic MP, Srdic VV, Antov MG. Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatal Biotransform*. 2009;27(4):254-62.
139. Matsuura S, Ishii R, Itoh T, Hamakawa S, Tsunoda T, Hanaoka T, et al. Immobilization of enzyme-encapsulated nanoporous material in a microreactor and reaction analysis. *Chem Eng J*. 2011;167(2-3):744-9.
140. Zhang JL, Zhang F, Yang HJ, Huang XL, Liu H, Zhang JY, et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir*. 2010;26(9):6083-5.
141. Long JW, Logan MS, Rhodes CP, Carpenter EE, Stroud RM, Rolison DR. Nanocrystalline iron oxide aerogels as mesoporous magnetic architectures. *J Am Chem Soc*. 2004;126(51):16879-89.
142. Georgelin T, Maurice V, Malezieux B, Siaugue JM, Cabuil V. Design of multifunctionalized  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{/SiO}_2$  core-shell nanoparticles for enzymes immobilization. *J Nanopart Res*. 2010;12(2):675-80.
143. Teng ZG, Su XD, Chen GT, Tian CC, Li H, Ai L, et al. Superparamagnetic high-magnetization composite microspheres with  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{/SiO}_2$  core and highly crystallized mesoporous  $\text{TiO}_2$  shell. *Colloid Surface A*. 2012;402:60-5.
144. Jia H, Zhu G, Vugrinovich B, Kataphinan W, Reneker DH, Wang P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnol Progress*. 2002;18(5):1027-32.
145. Safarik I, Safarikova M. Magnetic nano- and microparticles in biotechnology. *Chem Papers*. 2009;63(5):497-505.
146. Yiu HHP, Keane MA. Enzyme-magnetic nanoparticle hybrids: new effective catalysts for the production of high value chemicals. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012;87(5):583-94.

147. Sotowa KI, Takagi K, Sugiyama S. Fluid flow behavior and the rate of an enzyme reaction in deep microchannel reactor under high-throughput condition. *Chem Eng J.* 2008;135:S30-S6.
148. Huang XJ, Yu AG, Xu ZK. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresour Technol.* 2008;99(13):5459-65.
149. Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K.  $\alpha$ -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;74(1-2):1-5.
150. Ju H-Y, Kuo C-H, Too J-R, Huang H-Y, Twu Y-K, Chang C-MJ, et al. Optimal covalent immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan nanoparticles. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;78(1):9-15.
151. Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. Cicer  $\alpha$ -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chem.* 2014;142(1):430-8.
152. Vieira DC, Lima LN, Mendes AA, Adriano WS, Giordano RC, Giordano RLC, et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochem Eng J.* 2013;81(1):54-64.
153. Chang J, Lee Y-S, Fang S-J, Park D-J, Choi Y-L. Hydrolysis of isoflavone glycoside by immobilization of  $\beta$ -glucosidase on a chitosan-carbon in two-phase system. *Int J Biol Macromol.* 2013;61(1):465-70.
154. Zhao L, Liu Q, Yan S, Chen Z, Chen J, Li X. Multimeric immobilization of alcohol oxidase on electrospun fibers for valid tests of alcoholic saliva. *J Biotechnol.* 2013;168(1):46-54.
155. Ehlert N, Müller PP, Stieve M, Behrens P. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. *Microporous Mesoporous Mat.* 2010;131(1-3):51-7.
156. Ai Q, Yang D, Li Y, Shi J, Wang X, Jiang Z. Highly efficient covalent immobilization of catalase on titanate nanotubes. *Biochem Eng J.* 2014;83(1):8-15.
157. Lang Q, Yin L, Shi J, Li L, Xia L, Liu A. Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell. *Biosens Bioelectron.* 2014;51(1):158-63.
158. Cadena PG, Jeronimo RAS, Melo JM, Silva RA, Lima Filho JL, Pimentel MCB. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresour Technol.* 2010;101(6):1595-602.
159. Hou J, Dong G, Ye Y, Chen V. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *J Membrane Sci.* 2014;452(1):229-40.
160. Yusdy, Patel SR, Yap MGS, Wang DIC. Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem Eng J.* 2009;48(1):13-21.

161. Silva NCA, Miranda JS, Bolina ICA, Silva WC, Hirata DB, de Castro HF, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochem Eng J.* 2014;82(1):139-49.
162. Sun J, Hu K, Liu Y, Pan Y, Yang Y. Novel superparamagnetic nanoparticles for trypsin immobilization and the application for efficient proteolysis. *J Chromatogr B.* 2013;942-943(1):9-14.
163. Krishna BL, Singh AN, Patra S, Dubey VK. Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. *Process Biochem.* 2011;46(7):1486-91.
164. Reetz MT. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: A prolific source of catalysts for asymmetric reactions. *Angew Chem Int Edit.* 2011;50(1):138-74.