

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead
150, caracterização dos derivados e suas aplicações em reatores contínuos e em
batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel**

TESE DE DOUTORADO

CARLA ROBERTA MATTE

Porto Alegre, RS, Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead 150, caracterização dos derivados e suas aplicações em reatores contínuos e em batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel

TESE DE DOUTORADO

CARLA ROBERTA MATTE

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito para a obtenção do Grau de Doutor.

Porto Alegre, RS, Brasil

Dezembro de 2015

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com recursos financeiros da Capes e CNPq.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CNPq, Capes, FAPERGS, Pró-reitoria de Pós-Graduação e Pró-reitoria de Pesquisa pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilização da infraestrutura. Aproveito para me desculpar, oficialmente, pelo *flavor* desagradável (vulgarmente conhecido como “cheiro de *cheetos* da Carla”, causado pelo ácido butírico) que por meses fiz todos sentirem. Foi por um bom motivo!

Ao PPGBCM pela formação acadêmica.

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, por ter me aceitado como integrante do seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada e pelos desafios propostos. Também, por ter oportunizado a participação em atividade de extensão e também participação em projetos de pesquisa colaborativos.

Ao meu co-orientador, Plinho Francisco Hertz, pela amizade, pela disponibilização do seu laboratório e pela grande contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Rafael Costa Rodrigues, por estar sempre disponível para ajudar, pelo grande auxílio no desenvolvimento da pesquisa e pelo incentivo constante para buscar respostas.

Ao Jairton Dupont e a Roberta Bussamara por abrirem as portas do Laboratório de Catálise Molecular (Instituto de Química – UFRGS), por toda a ajuda com explicações e o fornecimento dos líquidos iônicos.

Ao Edilson Valmir Benvenuti e a Tânia Hass Costa pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Sólidos e Superfícies (Instituto de Química – UFRGS), pelo

auxílio nas caracterizações morfológicas e texturais, e também pelos valiosos momentos de *Brainstorming*.

Aos membros da Comissão de Acompanhamento Profs. Patrícia Valente e Carlos Termignoni, pelas contribuições ao trabalho.

À banca julgadora, Nadia Krieger, Manuela Klein e Patrícia Valente por aceitarem ler e corrigir este manuscrito.

Aos funcionários do PPGBCM, Sílvia Centeno e Luciano Saucedo, por estarem prontamente disponíveis para qualquer demanda acadêmica.

A todos as colegas do BBB (Grupo de Biotecnologia, Bioprocessos e Biocatálise), por compartilhar dos momentos tensos e felizes, pela amizade e companhia.

Às bolsistas Katiuscia Berguenmayer e Luana Carrion que acompanharam parte deste trabalho.

À Carolina Bordinhão, que durante praticamente todo o período do doutorado esteve ao meu lado. Obrigado pela dedicação e comprometimento. Nossa parceria foi excelente!

Às amigas Nicole Sehnem, Vanessa Hermes e Jéssie Schöffner pela amizade de anos e auxílio na revisão dos textos.

À colega e amiga Jakeline Poppe (minha equipe!), pela colaboração no trabalho e amizade.

À minha família, principalmente pela educação e valores que me ensinaram, além do apoio incondicional.

Finalmente, um agradecimento mais do que especial ao meu marido, Luciano, pelo amor, carinho, compreensão, companhia nos fins de semana no laboratório e apoio incondicional. Obrigado por ter ficado ao meu lado, sempre. Amo-te!

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Esta tese está estruturada no formato de capítulos. Inicialmente tem-se uma introdução teórica dos temas abordados no decorrer do trabalho. Na sequência, três capítulos escritos na forma de artigo científico, porém formatados de acordo com a ABNT.

O Capítulo I representa a primeira fase do projeto, onde foi selecionado o melhor de nove métodos de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead 150, através dos dados de rendimento e eficiência de imobilização, como também estabilidade térmica e em solventes. Foi avaliado também o comportamento de melhor derivado imobilizado (ImmTLL) em líquidos iônicos. Reações de síntese de aromas (butirato de butila e butirato de iso-amila) foram realizadas com o derivado ImmTLL e um derivado comercial controle a fim de avaliar o desempenho de aplicabilidade em síntese. Esse capítulo foi publicado na revista *Applied Biochemistry and Biotechnology* e sua versão em PDF encontra-se nos anexos da tese.

No Capítulo II o foco principal foi a caracterização do Immobead 150 e do seu derivado ImmTLL, comparando ambos a fim de compreender as alterações do suporte com a imobilização. Foram avaliadas as propriedades morfológicas, texturais, estruturais, físico-químicas e térmicas do suporte. Neste capítulo, além da síntese de aromas foi avaliada a aplicabilidade do derivado ImmTLL na síntese de biodiesel, e realizada a comparação deste com dois controles comerciais (TL-IM e ImmTLLc). Esse capítulo foi submetido à revista *Microporous and Mesoporous Materials*.

O Capítulo III fecha parte do ciclo de estudos do derivado ImmTLL otimizando os parâmetros: a temperatura, quantidade de água adicionada, quantidade de enzima e razão molar dos substratos da reação de síntese de aromas. Com a reação otimizada,

estudou-se a produtividade em quatro configurações de reatores, sendo elas em batelada, através de tanque agitado, e contínuos, com leito fixo (tradicional e com esferas de vidro para reduzir o empacotamento da coluna) e leito-fluidizado. Avaliou-se também a estabilidade operacional do processo em batelada e contínuo. Esse capítulo foi submetido e aceito na revista *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

Para finalizar tem-se uma discussão geral dos resultados obtidos, conclusões finais e as perspectivas. Todas as referências bibliográficas utilizadas no decorrer do trabalho encontram-se reunidas no último capítulo deste manuscrito.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Enzimas.....	4
2.2 Lipases.....	5
2.2.1 Estrutura das lipases.....	6
2.2.2 Mecanismos de ação	10
2.2.3 Especificidade das lipases	11
2.2.4 Reações catalisadas por lipases	13
2.3 Fatores que influenciam a atividade enzimática	19
2.3.1 Síntese em meio não aquoso e o efeito da água.....	20
2.3.2 Efeito do agente acilante	22
2.3.3 pH.....	23
2.3.4 Temperatura	24
2.4 Imobilização enzimática	25
2.4.1 Confinamento	27
2.4.2 Adsorção.....	27
2.4.3 Entrecruzamento	28
2.4.4 Ligação covalente	28
2.5 Suportes	31
2.5.1 Características texturais	33
2.5.2 Hidrofobicidade.....	35
2.5.3 Grupamentos da superfície do suporte	37
2.5.4 Estabilidade do suporte	38
2.6 Reatores enzimáticos	38
2.6.1 Reator enzimático em batelada.....	39
2.6.2 Reator enzimático contínuo.....	39

3. CAPÍTULOS.....	41
Immobilization of <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase by different techniques on Immobead 150 support: characterization and applications	42
Physico-chemical characterization of Immobead 150 and its application for the immobilization of <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase.....	65
Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase immobilized in Immobead 150	92
4. CONSIDERAÇÕES E DISCUSSÃO GERAL	119
CONCLUSÕES.....	124
PERSPECTIVAS.....	126
REFERENCIAS	127
ANEXOS	144

LISTA DE ABREVIATURAS

TLL	Lipase comercial Lipolase, originária do fungo <i>Thermomyces lanuginosus</i> e superexpressa em <i>Aspergillus oryzae</i> . TLL é a simplificação do termo em inglês “ <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase”
ImmTLL	TLL imobilizada por ligação covalente multipontual no suporte Immobead 150 (desenvolvido neste trabalho)
ImmTLLc	Derivado comercial da TLL imobilizada em Immobead 150
TL-IM	Derivado comercial da TLL imobilizada em suporte de silicato (Lipozyme TL-IM)
STR	Reator de tanque agitado
PBR	Reator de leito fixo
FBR	Reator de leito fluidizado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática da conformação aberta e fechada da lipase.....	7
Figura 2.2. Representação esquemática da ativação interfacial de lipases.	8
Figura 2.3. Dobradura canônica α/β hidrolases.....	9
Figura 2.4. Estrutura da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	9
Figura 2.5. Mecanismo de catálise hidrolítica da lipase.....	11
Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica.....	12
Figura 2.7. Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica.	12
Figura 2.8. Esquema das principais reações catalisadas por lipases.	14
Figura 2.9. Reação de hidrólise de triglicerídeo catalisada por lipase.	15
Figura 2.10. Reação de hidrólise de p -nitrofenilpalmitato.....	15
Figura 2.11. Reação de esterificação catalisada por lipase.	16
Figura 2.12. Representação da fórmula química de ésteres sintetizados via catálise enzimática.	18
Figura 2.13. Reação de transesterificação catalisada por lipase.....	19
Figura 2.14. Potencial eletrostático apresentado na superfície molecular da lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> (PDB 1TIB), em diferentes valores de pH.....	24
Figura 2.15. Estratégias de imobilização de enzimas.....	26
Figura 2.16. Representação esquemática de imobilização por ligação covalente.	29
Figura 2.17. Distribuição de resíduos de Lys, Asp, Glu nas quatro faces da superfície de TLL.	30
Figura 2.18. Classificação geral de suportes utilizados na imobilização de enzimas.	31
Figura 2.19. Esquema de suporte macroporoso.	35
Figura 2.20. Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.....	36
Figura 2.21. Umedecimento de suportes altamente hidrofóbicos.	37
Figura 2.22. Esquema de reatores contínuos.	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Aplicações de lipases para a síntese de aromas.....	17
Tabela 2.2. Grupamento funcional da enzima com potencial de formação de ligação covalente.	29
Tabela 2.3. Resumo dos parâmetros importantes da enzima, suportes e derivados enzimáticos no processo de imobilização.	33

RESUMO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar tanto a hidrólise como a síntese de ésteres, destacando-se pelo seu vasto potencial de aplicação industrial. Estas enzimas, quando imobilizadas em suportes sólidos, podem ser reutilizadas ou aplicadas em reatores contínuos. Este trabalho foi realizado em três etapas e teve como objetivos preparar e selecionar um derivado de lipase imobilizada estável, realizar a caracterização do suporte e do suporte com a enzima imobilizada, otimizar o processo de síntese de ésteres e comparar sua produtividade em diferentes modelos de reatores. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em Immobead 150 por nove métodos distintos de imobilização para selecionar o processo mais estável e com melhor eficiência catalítica. A imobilização da enzima por ligação covalente multipontual através dos grupamentos epóxi do suporte demonstrou ser a melhor opção, e dessa forma, o derivado passou a ser denominado de ImmTLL. Utilizando-se uma carga proteica de 150 mg g⁻¹ obteve-se resultados similares a outros derivados imobilizados comerciais, tanto para síntese de ésteres de aroma (butirato de butila) quanto para a síntese de biodiesel. Embora não apresente um perfil uniforme de tamanho de poro, o suporte Immobead 150 é classificado como mesoporoso. As partículas esféricas possuem um diâmetro médio de 155 µm, com cerca de 1.000 µmol de grupos epóxi por grama de suporte, elevada hidrofobicidade e boa estabilidade térmica. Além disso, o processo de imobilização provocou uma diminuição do volume de poros e da área superficial específica, confirmando o revestimento da superfície do suporte pela enzima imobilizada, porém a sua morfologia não foi afetada. Os parâmetros reacionais da síntese de aromas em reações em batelada foram otimizados, possibilitando obter cerca de 84 % de conversão (para cada grama de suporte obteve-se uma produtividade de

270,3 mmol L⁻¹ h⁻¹) em 4 h de reação. Após oito ciclos de uso e reuso, o ImmTLL manteve 86 % da conversão inicial. Reatores contínuos de leito fixo e de leito fluidizado também foram testados, sendo a melhor vazão de substrato 0,02 mL min⁻¹. A maior produtividade, por grama de suporte, foi 1.015,6 mmol L⁻¹ h⁻¹ obtida com o reator de leito fixo. Neste reator, o derivado apresentou boa estabilidade operacional, tendo ao final de 30 dias de operação uma conversão de 63 % da inicial. A comparação entre as configurações de reatores permitiu estabelecer o melhor desempenho de produtividade e estabilidade do ImmTLL, demonstrando que é um derivado robusto e versátil, e com bom potencial de aplicação para a síntese de ésteres de aromas.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes capable of catalyzing both the hydrolysis and the synthesis of esters, standing out for their wide potential for industrial application. These enzymes, when immobilized on solid supports, can be reused or applied in continuous reactors. This work was performed in three stages and its objective was to prepare and select a stable immobilized lipase derivative, to characterize the support and the support with the immobilized enzyme, to optimize the process of ester synthesis and to compare their productivity on different models of reactors. The *Thermomyces lanuginosus* lipase was immobilized on Immobead 150 by nine different immobilization methods to select the most stable process and the best catalytic efficiency. The enzyme immobilization by covalent multipoint attachment on the support epoxy groups showed better results, thus, the derivative was designed as ImmTLL. It was obtained similar results to other commercial immobilized derivatives, for both synthesis of aroma esters (butyl butyrate) and biodiesel, when using a support protein load of 150 mg g^{-1} . Although Immobead 150 did not present an uniform profile of pore sizes, it was classified as mesoporous support. The spherical particles presented a mean diameter of $155 \text{ }\mu\text{m}$, having approximately $1,000 \text{ }\mu\text{mol}$ of epoxy groups per gram of support, a high hydrophobicity, and a good thermal stability. The immobilization process resulted in a decrease of the pore volume and specific surface area, confirming the coating surface of the support with the immobilized enzyme. However, its morphology was not affected. The reaction parameters of aromas synthesis reactions in batch was optimized, allowing to obtain a conversion around 84 % in 4 h of reaction (for each gram of support was obtained a productivity of $270.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). After eight cycles of use, the ImmTLL maintained 86 % of the initial conversion. Continuous packed-bed and fluidized-bed reactors were

also tested, and the best substrate flow rate was 0.02 ml min^{-1} . The highest productivity, per gram of support, was $1,015.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ that was obtained with a packed-bed reactor. In this reactor the derivative showed good operational stability, reaching a conversion of 63 % after 30 days of operation, related to the initial value. This comparison among the reactors parameters allowed establishing the best productivity performance and stability of ImmTLL, showing that it is a robust and versatile derivative, and presents good applicability for the synthesis of flavor esters.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêutica, de alimentos e química-fina do século 21 tem intenção de obter produtos de uma forma mais sustentável, movidas essencialmente pela demanda do interesse público. Com isso, tem se observado um crescente aumento no número de bioprocessos em escala industrial. Tal crescimento é consequência do surgimento de novas tecnologias e do desenvolvimento de biocatalisadores estáveis (SANTOS *et al.*, 2015). Atualmente, a maioria dos processos catalisados por enzimas ainda não são economicamente viáveis em relação a catálise química, neste sentido pesquisas buscam tornar o sistema biotecnológico mais robusto e eficiente, pois as enzimas são capazes de catalisar reações de forma seletiva, específica e sob condições brandas de temperatura e pressão, características estas de grande interesse em escala industrial (ALVES *et al.*, 2014; GUIBAN, 2006).

As lipases (E.C. 3.1.1.3, triglicerolacil-hidrolases), enzimas capazes de catalisar a hidrólise e a síntese de ésteres, destacam-se entre as enzimas com vasto potencial de utilização industrial, com aplicações tão diversas quanto a síntese de biodiesel, importante área para o desenvolvimento de processos geradores de energia renovável, quanto a síntese de aromas para a indústria de alimentos, outro importante setor para a economia do país. Apesar da grande variedade comercial de lipases, o custo atual de aquisição ainda é a principal limitação à sua utilização em processos de grande escala (BLANCO *et al.*, 2004). Uma alternativa para viabilizar a sua aplicação é a utilização de técnicas de imobilização, as quais possibilitam a obtenção de um derivado enzimático estável térmica e operacionalmente, capaz de ser utilizado em síntese por repetidas vezes ou de forma contínua, com elevados rendimentos e uma qualidade superior do produto final obtido (BLANCO *et al.*, 2004; GUIBAN, 2006).

A imobilização das lipases em diferentes suportes, ou por diferentes protocolos no mesmo suporte, permite o desenvolvimento de sistemas com diferentes estabilidades e especificidades, alterando a intensidade da interação enzima-suporte e a orientação da molécula sobre sua superfície (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013). A escolha dos suportes é muitas vezes limitada por alguns fatores relacionados com a sua estrutura, como a forma e o tamanho dos poros. Em geral, quanto maior for a dimensão dos poros, menor é a área de superfície e, por conseguinte, a carga de enzima é menor para a densidade equivalente de grupos ativos por unidade de área. Assim, a eficiência catalítica do derivado enzimático depende do equilíbrio de diversas características do suporte, como a distribuição da enzima imobilizada nos grupos reativos, hidrofobicidade, tamanho de poro e área superficial (BLANCO *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2007).

Biotransformações com enzimas podem ser executadas em diferentes meios, tais como meios aquosos, solventes orgânicos anidros, fluido supercrítico ou líquido iônico. Os suportes e os protocolos de imobilização são fortemente dependentes do meio de reação em que a enzima imobilizada será usada, bem como da configuração de reator, que varia essencialmente entre batelada ou contínuo (GUISAN, 2006).

Com base nos aspectos citados acima, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o processo de imobilização de lipase termofílica de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em suporte sólido (Immobead 150), caracterizar o suporte e o derivado enzimático e avaliar o potencial de aplicação em reações de síntese.

Os objetivos específicos foram:

- Imobilizar a lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead150 utilizando diferentes metodologias;
- Estudar os efeitos da força iônica dos tampões de imobilização;

- Definir a carga enzimática de melhor desempenho em síntese;
- Eleger o derivado mais estável termicamente, em solventes orgânicos e em líquidos iônicos;
- Caracterizar a morfologia do suporte Immobead 150;
- Caracterizar texturalmente o suporte (área superficial específica, tamanho e volume de poro);
- Caracterizar quimicamente o suporte através da quantificação dos grupos reativos e de sua hidrofobicidade;
- Comparar as características do suporte Immobead 150 com seu derivado enzimático (ImmTLL);
- Avaliar e otimizar as reações de síntese de butirato de butila (aroma frutado) e de biodiesel;
- Reutilizar o derivado enzimático para avaliar a estabilidade operacional em reator de tanque agitado;
- Comparar as vazões, rendimento e produtividade de síntese utilizando reator contínuo de leito fixo e fluidizado;
- Avaliar a estabilidade operacional do ImmTLL em sistema contínuo de síntese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores altamente específicos, capazes de promover reações em condições brandas, o que as torna potencialmente atraentes do ponto de vista industrial. Entre as vantagens está a reduzida geração de resíduos, já que, escolhendo a enzima adequada, é possível controlar os produtos obtidos e minimizar a ocorrência de reações secundárias (GUISAN, 2006; SHELDON e VAN PELT, 2013).

As enzimas são encontradas em células animais e vegetais, e podem ser produzidas mediante bioprocessos usando diferentes espécies de microrganismos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Do ponto de vista econômico e industrial, as enzimas de microrganismos são preferíveis, pois apresentam procedimentos mais simples de extração, isolamento e purificação, principalmente quando extracelulares, fato que facilita o controle de processo de cultivo e proporciona a realização do cultivo em escala industrial com baixos custos (SHARMA *et al.*, 2001). Além disso, os microrganismos geralmente apresentam maior facilidade de manipulação genética (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

O mercado mundial de enzimas industriais vem numa crescente histórica, sendo que em 2013 foi de cerca de 4,8 bilhões de dólares. É esperado que o mercado atinja cerca de 7,1 bilhões no ano de 2018, a uma taxa composta de crescimento anual de 8,2 % (BCC, 2014).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classifica as enzimas em seis grandes classes (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases) e cada uma em subclasses de acordo com as reações catalisadas de forma sistemática. As enzimas utilizadas neste trabalho são classificadas

como E.C. 3.1.1.3 (lipases ou triglicerolacil-hidrolases), onde a abreviatura E.C. significa *Enzyme Commission*, o primeiro dígito (3) representa a classe hidrolase, o segundo dígito (1) denota a subclasse (atua sobre ligações éster), o terceiro dígito (1) mostra a sub-subclasse (carboxil éster hidrolase), e o quarto e último dígito (3) é o número de série dentro da sub-subclasse e significa que a lipase atua sobre triacilglicerídeos (IUBMB, 1961).

2.2 Lipases

As lipases são, possivelmente, os biocatalisadores mais utilizados em síntese orgânica. Estas enzimas catalisam *in vivo* a hidrólise de triacilglicerídeos, gerando ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. As lipases são também capazes de hidrolisar uma ampla variedade de ésteres e, em condições adequadas (ex. meios não-aquosos), catalisam reações de esterificação e transesterificação, levando, por exemplo, à síntese de diferentes ésteres carboxílicos e amidas (ADAK *et al.*, 2015; KAZLAUSKAS, 2005; SHARMA *et al.*, 2011).

As lipases ocorrem amplamente na natureza e podem ser produzidas por diversos microrganismos e eucariotos superiores. No entanto, para a produção de enzimas industriais, os microrganismos são a fonte preferida, uma vez que eles têm menor tempo de geração, grande versatilidade às condições ambientais e, simplicidade na manipulação genética e em condições de cultivo (RIBEIRO *et al.*, 2011).

A empresa Novo Nordisk foi a pioneira no desenvolvimento de lipases comerciais. Em 1988, desenvolveu uma lipase que era produzida naturalmente por uma cepa do fungo de *Humicola lanuginosa*, mas as quantidades foram muito baixas para a aplicação comercial. Os métodos tradicionais para aumentar o rendimento não foram bem sucedidos, de modo que o gene que codifica esta lipase foi clonado e inserido no

fungo *Aspergillus oryzae*. Este fungo foi capaz de produzir a enzima com rendimentos comercialmente relevantes. Já em 1994, a Novo Nordisk iniciou a comercialização da primeira lipase comercial, Lipolase (TLL), que se originou a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* e foi também expressa em *A. oryzae* (HASAN *et al.*, 2006; JAEGER *et al.*, 1994).

A TLL é uma hidrolase glicosilada com um massa molecular de 30 kDa e altamente ativa em uma faixa grande de pH (entre 7 e 12), porém o ponto ótimo é no pH 8. Apesar de ser uma lipase proveniente de microrganismo termófilo, a temperatura ótima para a atividade enzimática situa-se entre 30 e 40 °C, podendo apresentar uma atividade ainda significativa até 60 °C (FERNANDES *et al.*, 2004; NEVES PETERSEN *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Aspectos como a estrutura tridimensional e mecanismo de ação das lipases vêm sendo esclarecidos, principalmente mediante o uso de técnicas clássicas de cristalografia de raios-X (BRZOSOWSKI *et al.*, 2000; UPPENBERG *et al.*, 1994) e ressonância magnética nuclear (RMN) (VILLO *et al.*, 2014).

2.2.1 Estrutura das lipases

Por meio de técnicas cristalográficas foi verificada a ocorrência de diferentes conformações de lipases, o que levou à compreensão de particularidades do mecanismo de ação destas enzimas. Estudos realizados por Uppenberg *et al.* (1994) com a lipase da *Candida antarctica* revelaram a existência de uma cadeia polipeptídica (denominada tampa ou *lid*) recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu do sítio ativo da enzima (nesta conformação, com o sítio ativo recoberto, a lipase é considerada pouco ativa) (UPPENBERG *et al.*, 1994). A mudança na conformação está representada na Figura 2.1.

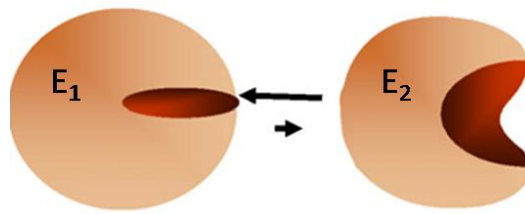


Figura 2.1. Representação esquemática da conformação aberta e fechada da lipase.

Onde a atividade catalítica da conformação aberta (E_2) é muito maior que na conformação fechada (E_1) (MATEO *et al.*, 2007b; RODRIGUES *et al.*, 2013).

A tampa possui resíduos hidrofóbicos em sua face interna, os quais interagem com as regiões hidrofóbicas em torno do sítio ativo quando a enzima está na conformação fechada, inativa. Por outro lado, quando a enzima está na presença de interfaces hidrofóbicas predomina a conformação aberta, onde a tampa se desloca, deixando o sítio ativo da enzima livre e acessível a seus substratos, originando a conformação aberta (ativa) da enzima (CABRERA *et al.*, 2009; PALOMO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2013; SARDA e DESNUELLE, 1959).

A conformação aberta das lipases apresenta um grande bolso hidrofóbico, constituído pela face interna da tampa e por uma região hidrofóbica que circunda o sítio ativo. A existência deste bolso hidrofóbico faz com que as lipases possuam grande afinidade pela superfície hidrofóbica de seus substratos naturais e, também, com que a conformação aberta das lipases tenha grande afinidade por qualquer superfície hidrofóbica. Na presença de uma interface hidrofóbica (conforme Figura 2.2), ocorre a fixação da conformação aberta sobre esta interface, promovendo a “ativação interfacial” da lipase (MENDES *et al.*, 2012; PALOMO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2013; SARDA e DESNUELLE, 1959). Assim as lipases podem se adsorver a diferentes estruturas hidrofóbicas, como gotas de óleo, bolhas de ar, suportes hidrofóbicos, além de proteínas hidrofóbicas, inclusive outras moléculas de lipase (CABRERA *et al.*, 2009).

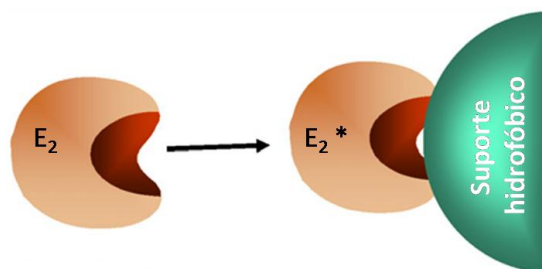


Figura 2.2. Representação esquemática da ativação interfacial de lipases.

Onde a atividade catalítica da enzima representada pela enzima livre na conformação aberta (E_2) é idêntica a da enzima ligada ao suporte hidrofóbico (E_2^*), representando a ativação interfacial (MATEO *et al.*, 2007b; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Quando as primeiras estruturas de lipase tornaram-se conhecidas, notou-se que havia dobras muito semelhantes, apesar da falta de similaridade de sequência. Uma comparação mais extensa com estruturas de raios-X de outras enzimas diversas (haloalcanodesalogenase, acetilcolinesterase e hidrolasedienelactone) revelou que estas enzimas partilham o mesmo padrão de dobramento. Como todas estas enzimas catalisam reação de hidrólise, este padrão de dobramento comum foi nomeado de dobramento α/β hidrolase (JAEGER *et al.*, 1999).

As estruturas de lipases são do tipo α/β hidrolase com algumas variações, como demonstrado na Figura 2.3. A curvatura das folhas β podem diferir significativamente entre as diversas enzimas, e também, as posições espaciais topológicas equivalentes as α hélices podem variar consideravelmente (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999). As α/β hidrolases apresentam tríades catalíticas compostas de serina (Ser), histidina (His) e aspartato ou glutamato (Asp ou Glu), também encontradas em proteases, esterases e thioesterases (MENDES *et al.*, 2012).

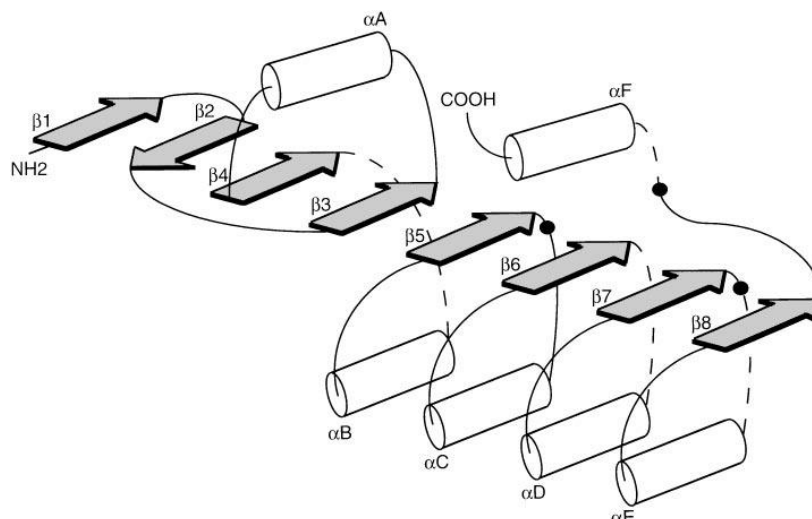


Figura 2.3. Dobradura canônica α/β hidrolases.

Representação da dobradura canônica α/β hidrolases onde os cilindros indicam a α hélices, e as folhas β são indicadas por setas sombreadas. A posição topológica dos resíduos do sítio ativo é mostrada por um círculo sólido; o nucleófilo é o resíduo após folha $\beta 5$, o resíduo Asp/Glu é encontrado após folha $\beta 7$, e o resíduo de histidina está na alça entre a $\beta 8$ e αF (JAEGER *et al.*, 1999).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) apresenta 269 resíduos de aminoácidos, sendo a tríade catalítica é composta pelos resíduos Asp201, His258, e Ser146, destacados na Figura 2.4. Já o Trp89 é considerado como componente da parte central da tampa da TLL (VILLO *et al.*, 2014).

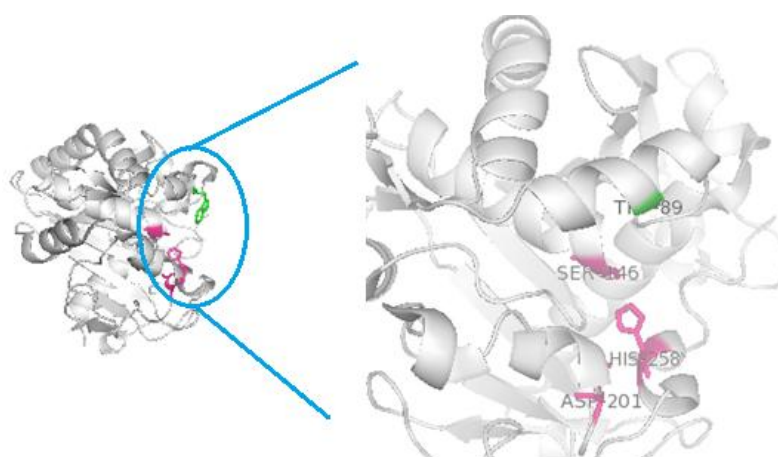


Figura 2.4. Estrutura da lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

A estrutura da TLL depositada no PDB sob o código 1DTE (BRZOWSKI *et al.*, 2000) foi tratada no programa PyMOL, onde em verde é destacado o TRP89 da tampa e em vermelho a tríade catalítica.

2.2.2 Mecanismos de ação

Lipases e proteases apresentam semelhança estrutural no sítio ativo, sendo usado o mecanismo catalítico proposto para a quimotripsina (uma serina protease). O mecanismo hidrolítico consiste na sequência dos cinco passos, como mostrado na Figura 2.5, onde a tríade do sítio ativo é composta dos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp):

- (1) a amina presente no resíduo de His do sítio ativo da enzima desprotona a hidroxila da Ser, possibilitando o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico (complexo enzima-substrato);
- (2) nesta fase, a His atrai o hidrogênio liberado pela Ser e o Asp estabiliza a carga positiva que se forma na His;
- (3) após a sua estabilização, o complexo enzima-substrato é desfeito pelo retorno da ligação C=O e, conseqüentemente, ocorre a clivagem da ligação éster, liberando assim um álcool, cujo oxigênio recebe um próton proveniente da His, formando-se assim um complexo enzima-acilada;
- (4) esse complexo tem seu carbono suscetível atacado pelo íon hidroxila da água abrindo assim a ligação C=O, formando um segundo intermediário;
- (5) por fim, o retorno da ligação C=O desfaz o intermediário tetraédrico, ocorrendo assim a liberação do ácido carboxílico e regenerando o sítio catalítico da enzima (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999; MENDES *et al.*, 2012).

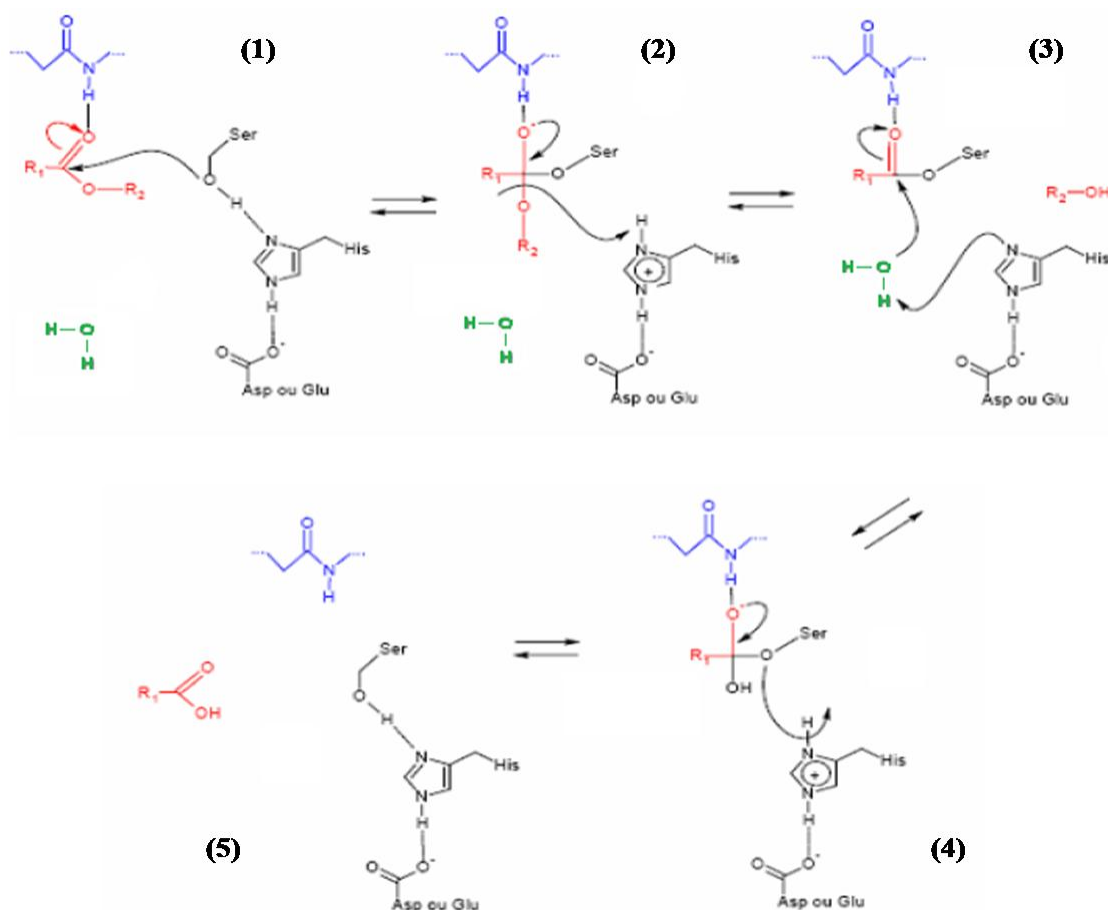


Figura 2.5. Mecanismo de catálise hidrolítica da lipase.

Onde (1) representa o ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster; (2) o intermediário tetraédrico estabilizado; (3) o intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (4) o segundo intermediário tetraédrico; e (5) a liberação do produto e enzima regenerada (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999).

2.2.3 Especificidade das lipases

O conhecimento da especificidade das lipases é um fator crucial para uma aplicação industrial. Estas enzimas podem apresentar especificidade em relação ao substrato, incluindo a diferenciação de isômeros (RIBEIRO *et al.*, 2011).

As lipases podem ser divididas em três grupos quanto a sua regioesletividade:

- **Lipases não-específicas:** Estas enzimas clivam moléculas de acilglicerol gerando aleatoriamente ácidos graxos livres e glicerol, bem como mono e diglicerídeos, conforme Figura 2.6. Lipases produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Burkholderia cepacia*

e *Pseudomonas fluorescens* são representantes deste grupo (KAPOOR e GUPTA, 2012; LI *et al.*, 2009; PAQUES e MACEDO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2011).

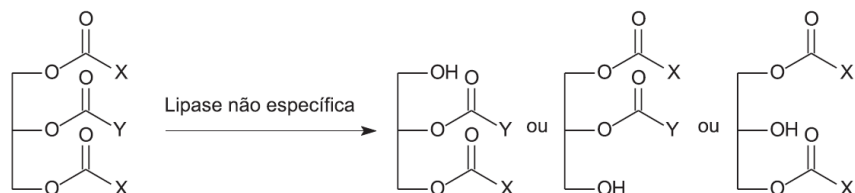


Figura 2.6. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica.

Onde X e Y representam grupos alquila (PAQUES e MACEDO, 2006).

- Lipases 1,3 específicas: Ao reagir, liberam ácidos graxos de posições 1 e 3 (Figura 2.7). Geralmente, a hidrólise dos triglicerídeos para diglicerídeos é muito mais rápida do que aquelas dos monoglicerídeos. São representantes deste grupo as lipases de *Bacillus thermocatenuatus*, *Thermomyces lanuginosus*^{*}, *Candida antarctica B*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii* (KAPOOR e GUPTA, 2012; PAQUES e MACEDO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2011).



Figura 2.7. Reações catalisadas por lipases do tipo 1,3 específica.

Onde X e Y representam grupos alquila (PAQUES e MACEDO, 2006).

^{*} O fornecedor e a maioria dos trabalhos da literatura classificam a lipase de *Thermomyces lanuginosa* uma lipase sn-1,3-específica (ALVES *et al.*, 2014; KAPOOR e GUPTA, 2012; NOVOZYMES, 2014; POPPE *et al.*, 2015b), porém outros a classificam como não específica (LI *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011; SCHMID e VERGER, 1998).

- Tipo-seletivas: Atuam especificamente sobre a hidrólise de ésteres, que têm ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas em posição cis no carbono 9. Esse tipo de especificidade não é comum entre as lipases, e o exemplo mais estudado deste caso é a lipase de *Geotrichum candidum* (KAPOOR e GUPTA, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011; SCHMID e VERGER, 1998).

2.2.4 Reações catalisadas por lipases

As lipases não só têm a capacidade de catalisar a reação de hidrólise, mas também, em ambientes com baixo teor de água, são capazes de catalisar as reações reversas, através de reações de transesterificação e esterificação, com elevada seletividade, proporcionando um processo eficiente (MENDES *et al.*, 2012).

O uso de meios nãoaquosos apresenta vantagens, tais como uma elevada solubilidade da maioria dos compostos orgânicos em solventes orgânicos, uma maior estabilidade de lipases e relativa facilidade de recuperação do produto a partir de solventes orgânicos, em comparação com água (MENDES *et al.*, 2012).

As principais reações catalisadas por lipases estão esquematizadas na Figura 2.8. Assim, as lipases são utilizadas como catalisadores em reações de diversas áreas industriais como detergentes, medicamentos, alimentos, têxteis, papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (HASAN *et al.*, 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; HOUDE *et al.*, 2004; JAEGER e REETZ, 1998; WILLERDING *et al.*, 2011).

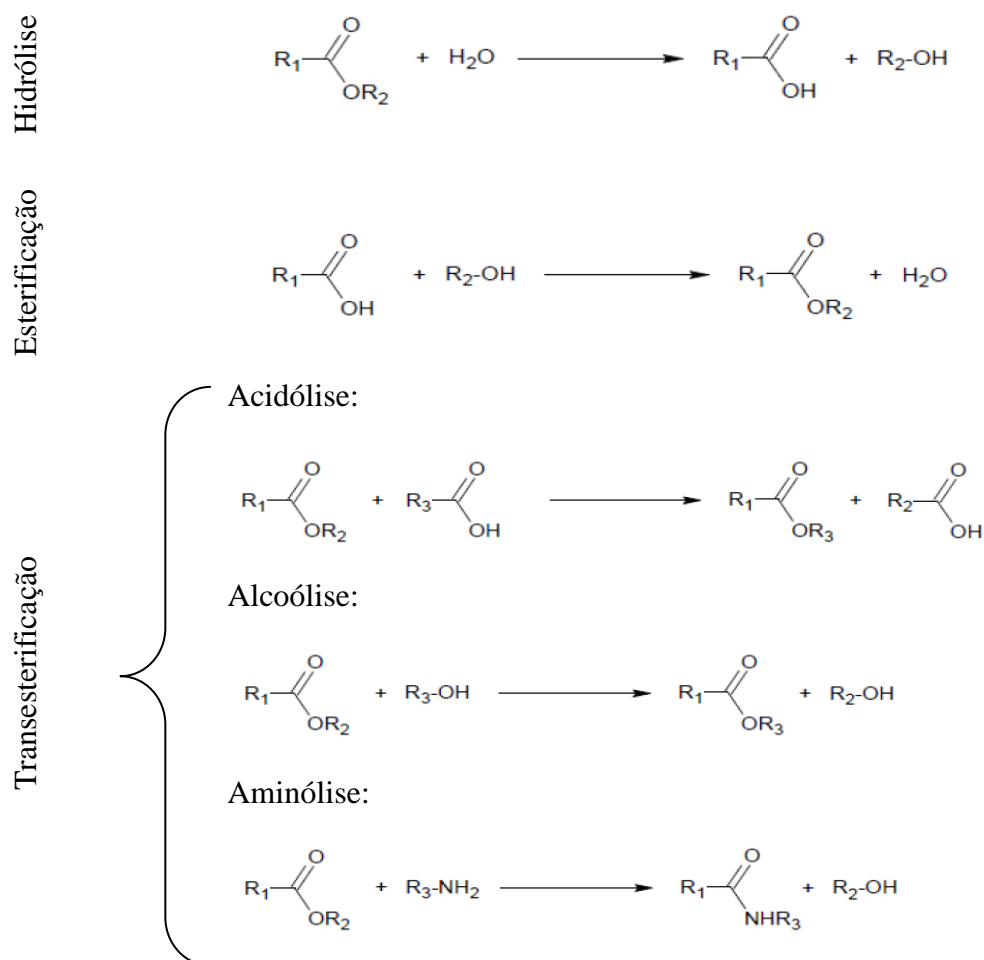


Figura 2.8. Esquema das principais reações catalisadas por lipases.

2.2.4.1 Hidrólise

Tradicionalmente, a reação de hidrólise de triglicerídeos é realizada utilizando catalisadores químicos a uma elevada temperatura (250 °C) e pressão (70 bar). Estas condições podem produzir reações indesejáveis, tais como oxidação ou a interesterificação de triglicerídeos. Neste contexto, as lipases são uma alternativa como biocatalisadores para a produção de ácidos graxos livres, pois a reação é conduzida a temperatura amena e a enzima exibe elevada seletividade, o que conduz a produtos com elevado grau de pureza e com menos subprodutos (ALVES *et al.*, 2014).

Conforme esquematizado na Figura 2.9, a hidrólise ocorre nos grupos acil dos triglicerídeos e ésteres através do consumo de água, produzindo ácidos graxos livres,

acilgliceróis parciais e glicerol. As lipases têm a capacidade de catalisar esta reação na interface óleo/água (SHARMA *et al.*, 2014).

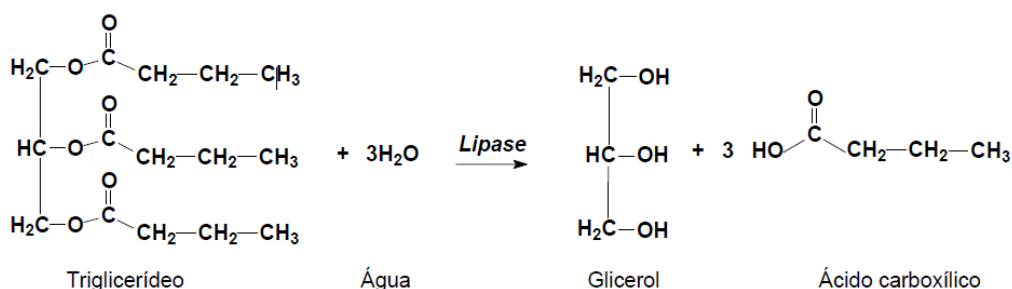


Figura 2.9. Reação de hidrólise de triglicerídeo catalisada por lipase.

Uma das maneiras mais utilizadas para quantificar a atividade de lipases é o método hidrolítico descrito inicialmente por Winkler & Stuckmann (1979), conforme a reação da Figura 2.10. A atividade lipolítica é determinada através da hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) a *p*-nitrofenol (*p*NP) que pode ser quantificado espectrofotometricamente através da coloração amarela do cromóforo (WINKLER e STUCKMANN, 1979).

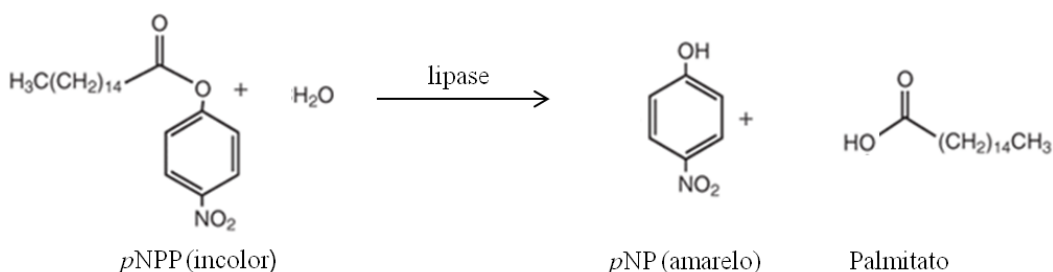


Figura 2.10. Reação de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato.

2.2.4.2 Esterificação

A maioria dos compostos de aromas e fragrâncias são compostos de origem natural e muitos deles são difíceis de isolar a partir de suas fontes. O custo para os procedimentos de extração destes ésteres torna o processo comercialmente inviável. Por outro lado, a utilização de catálise química leva à formação de vários produtos secundários indesejados e impurezas que assim limitam sua aplicação para as indústrias

alimentares e de bebidas. A catálise enzimática vem demonstrando ser um método útil para a síntese de ésteres de aroma (DHAKE *et al.*, 2013). A formação do éster ocorre pela condensação do ácido carboxílico com um álcool de cadeia curta. A Figura 2.11 mostra a reação de esterificação catalisada por lipase, em que a estequiometria entre os reagentes é na razão molar de 1:1.

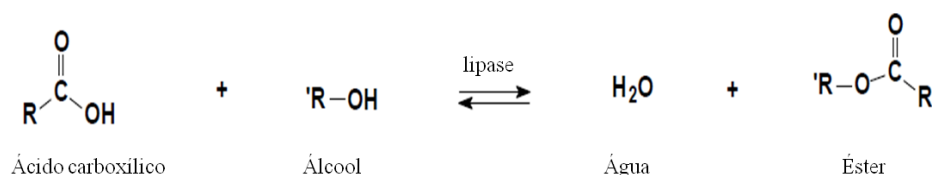


Figura 2.11. Reação de esterificação catalisada por lipase.

Nesta reação, uma molécula de água é liberada como um produto secundário e esta tem potencial para reverter a reação (reação reversível para hidrólise) (DHAKE *et al.*, 2013). Assim é importante elevar a razão molar do álcool frente ao ácido carboxílico, facilitando a reação de síntese de ésteres. O ácido butírico e o ácido acético, são os mais estudados, estão listados na Tabela 2.1 e representados na Figura 2.12.

Ésteres de metila, propila, butila, isobutila e isoamila são de interesse específico para flavorizantes na indústria alimentar, especialmente os ésteres de aroma de frutas (FRIEDRICH *et al.*, 2013; SCHRADER *et al.*, 2004). Os ésteres estão presentes em diversas frutas, sendo seu *flavor* considerado como frutado, por exemplo:

- Butirato de butila contribui com aroma frutado, significativamente presente em abacaxi, maçã, banana e damasco;
- Butirato de etila é um éster naturalmente presente no abacaxi, manga e banana;
- Hexanoato de etila está envolvido no sabor de maçã, abacaxi, banana e pêra;
- Acetato de hexila está presente em damasco, ervas, maçã, verde, pêra e aromas cítricos;

- Octanoato de hexila é um composto aromatizante de maçã, banana e uva (BEN AKACHA e GARGOURI, 2015; DE BARROS *et al.*, 2012; FRIEDRICH *et al.*, 2013).

Tabela 2.1. Aplicações de lipases para a síntese de aromas.

Fonte da lipase	Éster volátil	Descrição sensorial	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	Butirato de etila	Abacaxi	(GUILLÉN <i>et al.</i> , 2012)
<i>Candida rugosa</i>	Valerato de etila	Maçã verde	(BAYRAMOĞLU <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida rugosa</i>	Butirato de etila	Abacaxi	(PIRES-CABRAL <i>et al.</i> , 2007; PIRES-CABRAL <i>et al.</i> , 2009; PIRES-CABRAL <i>et al.</i> , 2010)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Isovalerato de isoamila	Maça	(CHOWDARY <i>et al.</i> , 2000)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Butirato de butila	Abacaxi	(LORENZONI <i>et al.</i> , 2012)
<i>Candida antarctica B</i>	Butirato de etila	Abacaxi	(FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2013)
<i>Candida antarctica B</i>	Acetato de isoamila	Banana	(ROMERO <i>et al.</i> , 2007)
<i>Candida antarctica B</i>	Acetato de butila	Maça	(MARTINS <i>et al.</i> , 2011)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Butirato de butila	Abacaxi	(MARTINS <i>et al.</i> , 2013)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Butirato de isoamila	Pêra	(ANSCHAU <i>et al.</i> , 2011; ARAGÃO <i>et al.</i> , 2009)

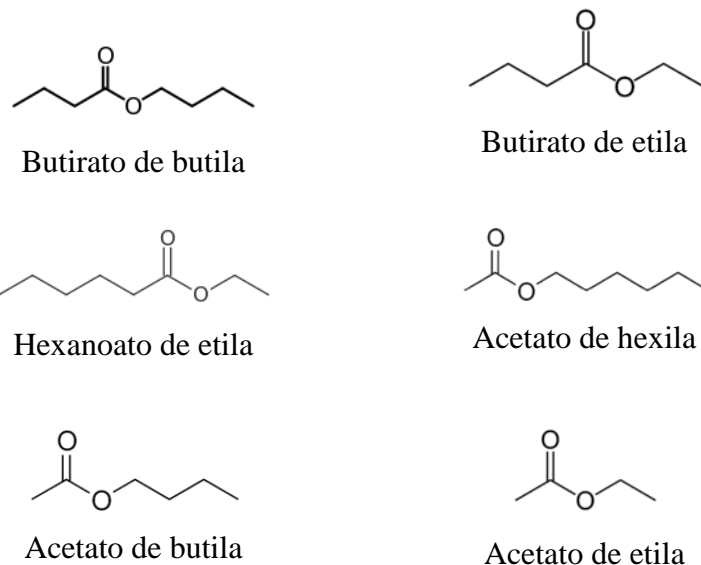


Figura 2.12. Representação da fórmula química de ésteres sintetizados via catálise enzimática.

Algumas regulamentações consideram os ésteres de aroma como “substâncias aromáticas naturais” somente quando obtidos por processos físicos (extração de fontes naturais) ou por processos enzimáticos ou microbianos, que envolvem precursores isolados da natureza. Esta classificação criou uma dicotomia no mercado, pois os compostos rotulados como “naturais” se tornam produtos mais rentáveis, enquanto ésteres que ocorrem na natureza, mas produzidos por métodos químicos devem ser chamados de “idênticos ao natural”. Do ponto de vista químico, não há diferença entre um composto sintetizado na natureza e a molécula idêntica produzido no laboratório, porém o preço de um éster vendido como natural é significativamente mais elevado do que um similar preparado por síntese química (SERRA *et al.*, 2005).

2.2.4.3 Transesterificação

Muitos óleos podem ser usados para sintetizar biodiesel. No Brasil a síntese, por transesterificação via alcoólise, está baseada essencialmente em óleo de soja, o que corresponde a 78 % da produção total de biodiesel no país (ANP, 2015). A reação de

transesterificação via alcoólise consiste na adição de um álcool na estrutura do triglicerídeo e liberação do éster (biodiesel). A Figura 2.13 apresenta de forma esquemática a reação de transesterificação catalisada por lipases, onde os reagentes iniciais são estabelecidos pela estequiometria de um mol de triglicerídeo reagindo com três mols de um álcool de cadeia curta (R-OH), geralmente metanol ou etanol. Os produtos formados são três mols de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e um mol do subproduto glicerol. Esta reação é reversível e ocorre em três etapas diferentes, obtendo-se o diglicerídeo e o monoglicerídeo, como intermediários (MA e HANNA, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2011; SUAREZ *et al.*, 2009). A separação de glicerol gerado como um subproduto e a purificação dos ésteres produzidos é de fácil realização (POPPE *et al.*, 2015a).

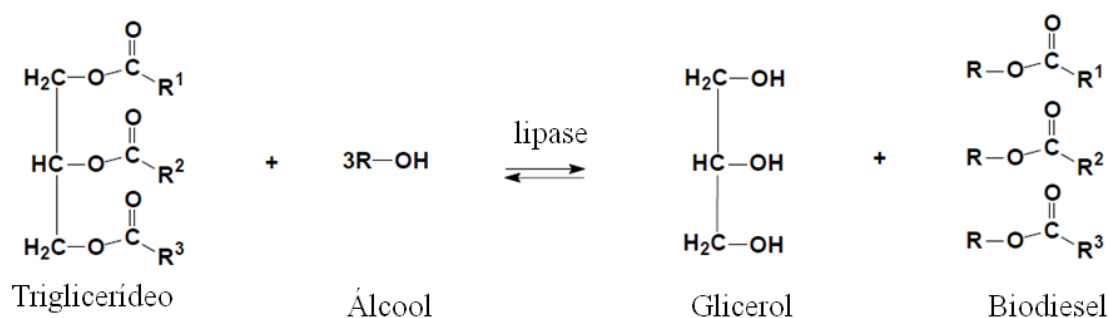


Figura 2.13. Reação de transesterificação catalisada por lipase.

2.3 Fatores que influenciam a atividade enzimática

A viabilidade econômica da catálise enzimática em um processo industrial depende da otimização dos parâmetros reacionais, determinando, principalmente, a estabilidade da enzima (EIJNSINK *et al.*, 2004). Para alcançar a viabilidade econômica, é importante que o meio reacional possibilite um ambiente favorável ao desempenho da enzima como biocatalisador. Para isso, é necessário ter clareza em aspectos como escolha da lipase (especificidade), substratos e sua razão molar, meio de reação (aquoso

ou sistemas com ou sem solvente orgânico e suas estabilidades), pH e temperatura (SZCZESNA ANTCZAK *et al.*, 2009).

2.3.1 Síntese em meio não aquoso e o efeito da água

Uma maneira de realizar a catálise enzimática é utilizar solventes orgânicos no meio reacional. De modo geral, as características do solvente orgânico influenciam, não somente na transferência de massa (solubilidade) dos reagentes e produtos de reação, mas também têm grande efeito sobre a estrutura da enzima, influenciando na quantidade de água ideal para que a enzima possa manter sua máxima atividade (STEPANKOVA *et al.*, 2013).

No estudo de Laane *et al.* (1987), tem-se uma correlação entre a atividade enzimática e propriedades físico-químicas de solventes orgânicos. De posse de dados básicos de termodinâmica, estes registraram o parâmetro $\log P$ (logaritmo do coeficiente de partição em octanol/água em um sistema de duas fases) para diversos solventes orgânicos. Os autores quantificaram a correlação positiva entre os valores de atividade enzimática e $\log P$, estabelecendo que os solventes hidrofóbicos são incapazes de retirar água associada à enzima quando o $\log P$ for maior que 3, mantendo a hidratação necessária para a máxima atividade enzimática. O mesmo não acontece quando a biocatálise é realizada com solventes hidrofílicos, cujo $\log P$ é menor que 2. Estes têm a capacidade de retirar água associada à enzima, influenciando na sua estrutura e flexibilidade frente ao substrato, ocasionando perda de atividade enzimática (LAANE *et al.*, 1987). Porém, trabalhos mais recentes não confirmam completamente estas informações (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; MATTE *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2012). Uma possível influência apontada é o fato de que os grupos funcionais do solvente possam ter efeito sobre a atividade da enzima, pois solventes com grupos

funcionais distintos e semelhantes valores de $\log P$ apresentam diferentes rendimentos de produção de biodiesel (FU e VASUDEVAN, 2009).

Com base no conhecimento existente sobre o comportamento da enzima em meio não aquoso, uma série de estratégias têm sido descritas na literatura para obtenção de preparações de enzimas capazes de catalisar reações em líquidos iônicos com eficiência significativa. Os líquidos iônicos são promissores solventes alternativos para as enzimas, devido à sua alta estabilidade térmica, baixa pressão de vapor e não-inflamabilidade (PEREIRA *et al.*, 2012). Estes sais fundidos apresentam uma ampla gama de diferentes propriedades físico-químicas que podem influenciar diretamente a estabilidade e função das proteínas. No entanto, compreender como os diferentes líquidos iônicos irão agir sobre a estrutura e função de proteínas continua a ser um grande desafio (RODRIGUES *et al.*, 2014).

A presença de água no meio reacional, principalmente em meio orgânico, é essencial para a atividade enzimática. A água deve estar dissolvida no solvente e também ligada à enzima, sendo que esta quantidade de água de solvatação que circunda a enzima contribui para a sua estabilização (geometria espacial). Esta estabilização da enzima reflete-se na sua menor ou maior flexibilidade frente às interações do complexo enzima-substrato (FU e VASUDEVAN, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2008).

No trabalho de Li *et al.* (2010), ao realizar a biocatálise com uma lipase imobilizada de *Candida sp.* para a síntese de biodiesel por transesterificação através da via metílica, indica que a quantidade de água ideal para obter os melhores resultados de conversão varia de 20 até 40 %. Entretanto, acima de 40 % de água, os resultados da conversão são reduzidos, provavelmente pelo equilíbrio da reação ser deslocado para a hidrólise. No entanto, no trabalho de Rodrigues *et al.* (2008), a síntese foi via etílica com a enzima TLL, e a melhor conversão foi obtida com apenas 4 % de água. Para a

síntese de butirato de butila com a lipase Lipozyme (TL-IM), Martins *et al.* (2013) obtiveram valores ainda menores, e a quantidade ótima de água adicionada foi de 0,25 %. Estes estudos demonstram como é conveniente estudar a quantidade de água em relação ao substrato, pois a água adicionada pode aumentar a eficiência catalítica ou desviar a rota para a hidrólise (LI *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2008).

2.3.2 Efeito do agente acilante

O excesso de álcool em relação ao substrato (ácido graxo ou triglicerídeo) é necessário para aumentar a velocidade de conversão da reação na obtenção do produto. No processo enzimático, o excesso de álcool pode ocasionar a inibição das lipases, reduzindo sua atividade enzimática, tornando o processo ineficiente. Este cuidado é necessário, pois a otimização deste parâmetro de reação irá assegurar uma boa difusão do álcool no substrato. Sendo assim, alguns aspectos quanto ao tipo de álcool, comprimento da cadeia, razão molar e solubilidade frente ao substrato devem ser observados para que não ocorra inibição da enzima (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; STAMENKOVIĆ *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014). Os alcoóis mais usados são metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol (SASSO *et al.*, 2015).

A necessidade do adequado balanço da relação solvente *versus* álcool fica evidenciado quando a lipase é suscetível à toxicidade do álcool empregado como agente esterificador e/ou transesterificador, na catálise enzimática. A maioria das reações de alcoólise para a produção de biodiesel envolvem metanólise, por sua alta reatividade. Entre os alcoóis de baixa massa molecular, o metanol é o mais tóxico e polar, enquanto que o etanol é mais prontamente aceito para uso em uma variedade de situações industriais, por

razões ambientais e toxicológicas (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; SASSO *et al.*, 2015).

2.3.3 pH

A propriedade mais intrigante de enzimas em solventes orgânicos, é o efeito de "memória molecular", que provém da sua alta rigidez conformacional em ambientes anidros. O pH afeta fortemente a estrutura da enzima, afetando diretamente a atividade enzimática em solução aquosa. Porém, este parâmetro não teria importância em sistemas com solventes orgânicos (KLIBANOV, 2001). Em vez disso, pesquisas demonstram que as enzimas possuem uma "memória de pH" em meios orgânicos, onde a sua estrutura conformacional permanece idêntica à conformação da última solução aquosa na qual foi exposta. Este fenômeno é devido ao fato de os grupos da proteína manterem o estado de ionização da última solução tamponada. Por conseguinte, a atividade enzimática em tais meios pode ser melhorada, se as enzimas forem secas a partir de soluções aquosas de pH ótimo para a catálise (KLIBANOV, 2001; XU e KLIBANOV, 1996).

Os potenciais elétricos gerados pelos resíduos de aminoácidos têm um papel importante na catálise, uma vez que podem aumentar a ligação do substrato, estabilizar durante o estado de transição e ajudar na liberação eficiente do produto (NEVES PETERSEN *et al.*, 2001). O sinal e a intensidade dos potenciais eletrostáticos determinados em função do pH determinam o perfil de atividade da enzima (Figura 2.14). A região ativa da lipase de *H. lanuginosa* exibe carga negativa apenas após pH 8,5-9,0. Esta carga negativa no sítio ativo é necessária para a expulsão do produto, que também possui carga negativa e, portanto, necessária para a atividade máxima da enzima (NEVES PETERSEN *et al.*, 2001). Este dado corrobora com diversos trabalhos,

que indicam o uma faixa levemente alcalina como o ótimo para a TLL (RIBEIRO *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2011).

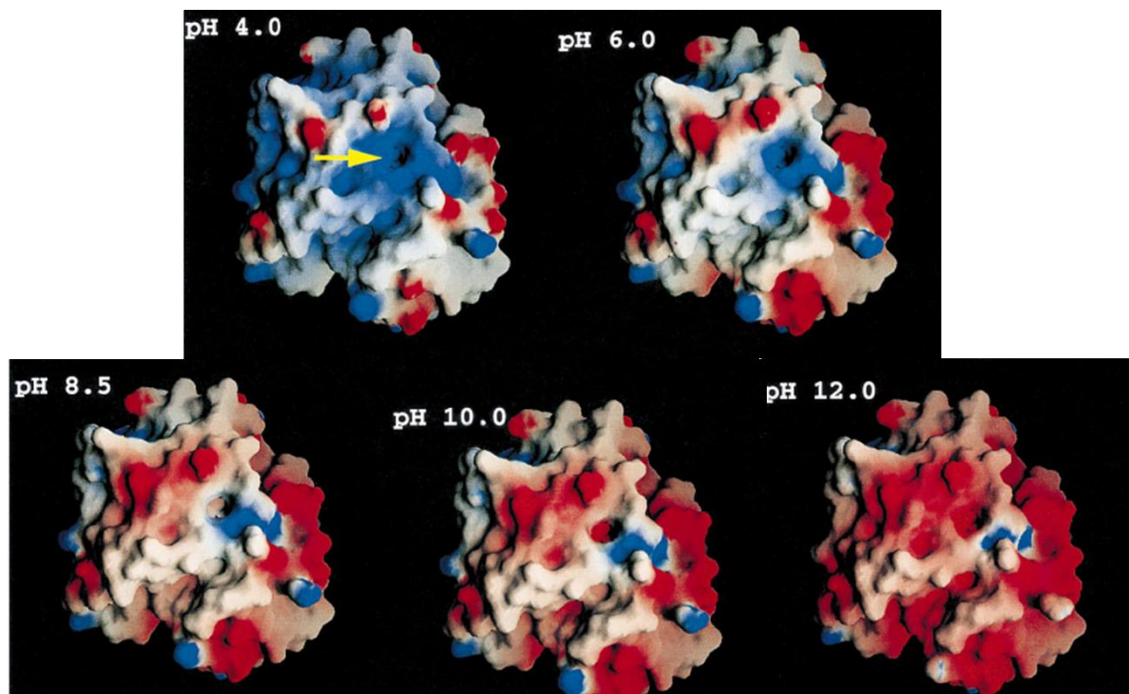


Figura 2.14. Potencial eletrostático apresentado na superfície molecular da lipase de *Humicola lanuginosa* (PDB 1TIB), em diferentes valores de pH.

A seta indica a Ser do sítio ativo catalítico. A cor azul representa um potencial positivo, cor branca potencial neutro e cor vermelha potencial negativo. A escala potencial usado variou de -5 para 5 kTe^{-1} (NEVES PETERSEN *et al.*, 2001).

2.3.4 Temperatura

O efeito da temperatura na catálise enzimática é um parâmetro reacional que merece atenção, devido a sua influência na atividade enzimática. A temperatura ótima da catálise é a temperatura que proporciona a máxima atividade enzimática sem desnaturar a enzima. A reação pode ocorrer a diferentes temperaturas, dependendo principalmente do substrato usado (MA e HANNA, 1999).

Martins *et al.* (2013) testaram uma faixa de 30 a 60 °C para síntese de butirato de butila utilizando TL-IM. A temperatura de máxima atividade foi 50 °C. Já no estudo de Rodrigues *et al.* (2008), a temperatura não apresentou nenhum efeito significativo no

intervalo entre 20 e 40 °C, indicando que, embora a temperatura seja um parâmetro importante que afeta a viabilidade econômica de síntese de biodiesel pela via etílica com TLL, a sua variação teve pouco efeito sobre o rendimento de conversão na faixa de temperatura avaliada. A temperatura otimizada foi de 31,5 °C e temperaturas maiores que 50 °C causaram a inativação térmica da TLL (RODRIGUES *et al.*, 2008). Martins *et al.* (2014) encontraram temperatura ótima muito próxima (32,5 °C) para a síntese de butirato de etila, mostrando um efeito significativo e negativo, ou seja, quanto mais alta, menor a síntese por TL-IM. Estas temperaturas mais brandas surpreendem pelo fato da TLL ser uma enzima proveniente de microrganismo termófilo (MARTINS *et al.*, 2014).

2.4 Imobilização enzimática

A primeira observação científica que levou à descoberta de enzimas imobilizadas foi feita em 1916, onde foi demonstrado que a enzima invertase exibiu a mesma atividade quando adsorvida em um sólido, tal como carvão ou hidróxido de alumínio (HOMAEI *et al.*, 2013). O termo enzima imobilizada foi empregado pela primeira vez na Conferência de Engenharia Enzimática realizada em Henniker (EUA) em 1971, para designar enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, podendo serem usadas repetida e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000).

A imobilização é uma ferramenta fundamental para alcançar as vantagens tecnológicas oferecidas pelas enzimas com redução de custos. O grande interesse no uso de enzimas imobilizadas, principalmente para aplicação industrial, é a possibilidade de sua reutilização e a facilidade de separação do catalisador e produtos, resultando em processos industriais sustentáveis, com vantagens sobre os catalisadores químicos convencionais (principalmente aspectos ecológicos e de toxicidade) (SECUNDO, 2013;

SHELDON e VAN PELT, 2013). Outra vantagem é o ganho de estabilidade que as enzimas imobilizadas apresentam, tanto térmica quanto de estocagem, a qual, geralmente, é superior em relação à enzima livre (MATEO *et al.*, 2007a). Um decréscimo na atividade enzimática total pode ser observado devido a alterações de sua estrutura durante a imobilização e/ou limitações de difusão. As limitações de difusão são principalmente dependentes do tamanho e propriedades do substrato, das propriedades do material do suporte e do método de imobilização. Assim, o suporte deve fornecer adequada área de superfície e proporcionar pouca limitação na difusão, sem restringir o transporte de substrato e de produto das reações enzimáticas (DIZGE *et al.*, 2009).

No ano de 1995, a IUPAC publicou um relatório técnico onde normatiza o processo de imobilização. Os tipos de imobilização (Figura 2.15) são classificados como:

- a) Confinamento da enzima dentro de uma estrutura de polímero insolúvel em água ou membrana semipermeável;
- b) Adsorção da enzima em suporte insolúvel em água;
- c) Ligação cruzada intermolecular de moléculas de enzima utilizando reagentes multifuncionais (entrecruzamento);
- d) Ligação covalente entre a enzima e suporte insolúvel em água (IUPAC, 1995).

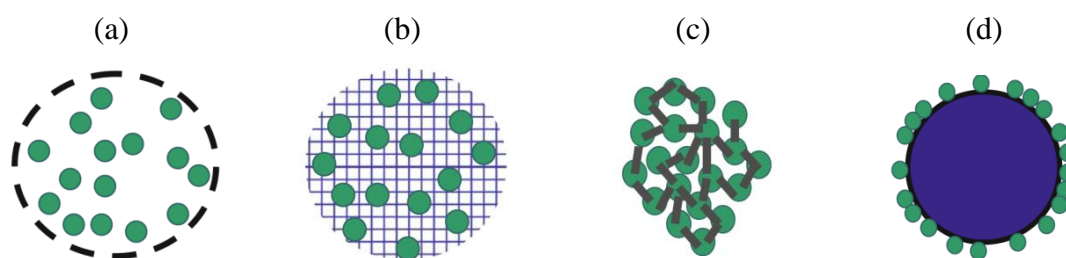


Figura 2.15. Estratégias de imobilização de enzimas.

Onde: (a) representa o encapsulamento, (b) a adsorção, (c) o entrecruzamento e (d) ligação covalente. As enzimas são representadas por pequenos círculos verdes (BRADY e JORDAAN, 2009)

2.4.1 Confinamento

Nesta técnica de imobilização, também conhecida como aprisionamento ou oclusão, ocorre uma retenção física da enzima dentro do polímero ou membrana, porém deve haver a permeabilidade de substâncias de baixa massa molecular. Assim, as proteínas não conseguem atravessar a matriz polimérica ou membrana, enquanto que pequenos substratos e produtos devem poder passar o mais livremente possível. Não ocorrem alterações estruturais ou ligações com grupos reativos ou sítio ativo da enzima (CAMPÁS e MARTY, 2006; CAO, 2006; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; HANEFELD *et al.*, 2009).

Entretanto, esta não é uma das técnicas mais utilizadas, devido justamente a velocidade de difusão dos substratos e produtos ser um fator limitante. Geralmente, são necessárias altas concentrações de substratos a fim de diminuir esta influência negativa (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

2.4.2 Adsorção

A adsorção de enzimas em suportes pode ser realizada através de diferentes tipos de interações fracas (de baixa energia), tais como interações de van der Waals, hidrofóbicas, ligações iônicas, e ligações de hidrogênio (HANEFELD *et al.*, 2009).

A fraca interação suporte/enzima é o fator responsável pela fragilidade apresentada por este tipo de derivado enzimático. A principal desvantagem deste tipo de imobilização é que as ligações podem ser rompidas com facilidade se houver variação do pH ou da força iônica, causando a dessorção da enzima. Entretanto, a estabilidade operacional e a faixa ótima de pH da enzima adsorvida no suporte (derivado

enzimático) pode ser melhorada através da adição de ligações cruzadas adicionais, utilizando um reagente bifuncional, como o glutaraldeído (GUIDINI *et al.*, 2010).

2.4.3 *Entrecruzamento*

Reagentes bifuncionais, como o glutaraldeído, têm sido utilizados de diversas formas na imobilização de enzimas permitindo situações muito diferentes, como na formação de uma rede de enzimas, na pré-ativação do suporte e no entrecruzamento da enzima previamente imobilizada em suporte sólido (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2007b).

A enzima reticulada entre si é considerada um derivado enzimático isento de suporte, isto é, eliminam-se as vantagens e desvantagens associadas aos suportes sólidos (HANEFELD *et al.*, 2009). Esta técnica de reticulação de proteínas por meio da reação do glutaraldeído com os grupos NH_2 da superfície da proteína foi inicialmente desenvolvida em 1964. Vários agentes de reticulação são conhecidos e podem ser utilizados, porém o glutaraldeído permanece como uma das fontes mais baratas e versáteis (SHELDON *et al.*, 2006). O tamanho de partícula final é dependente da taxa de agitação, taxa de adição de agente precipitante, concentração da proteína, entre outros. Assim, a preparação de um biocatalisador reprodutível apresenta um grande desafio. A reticulação do agregado determina o desempenho final do biocatalisador, em termos de estabilidade, atividade e resistência mecânica (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

2.4.4 *Ligação covalente*

Este método consiste na formação de ligações covalentes entre os grupos reativos do suporte e da enzima. A ocorrência de dessorção da enzima durante as

reações catalíticas é reduzida devido à forte ligação entre a enzima e o suporte (HANEFELD *et al.*, 2009). Esta técnica ainda permite melhorar a estabilidade da enzima por ligação multipontual, conforme mostrado na Figura 2.16.

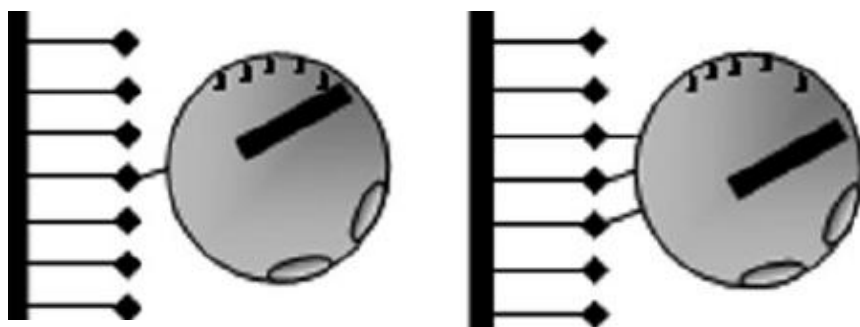


Figura 2.16. Representação esquemática de imobilização por ligação covalente.

Onde (a) representa a ligação unipontual e (b) multipontual entre uma enzima e um suporte (BARBOSA *et al.*, 2013).

As ligações covalentes são formadas pela interação do grupamento amino terminal e/ou dos resíduos de aminoácidos da enzima com os grupos reativos do suporte (FIGUEIREDO, 2013), conforme Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Grupamento funcional da enzima com potencial de formação de ligação covalente.

Grupamento	Aminoácido
Amino	Lisina e arginina
Hidroxila	Serina e treonina
Carboxila	Ácido aspártico e ácido glutâmico
Sulfidrila	Cisteína

O grupo amino da lisina (Lys) é o mais estudado na literatura para formação da ligação covalente multipontual. A Lys é um aminoácido relativamente comum em proteínas, e frequentemente os resíduos localizam-se na superfície da proteína, com alta reatividade e pKa de 10,7 aproximadamente (BRADY e JORDAAN, 2009;

RODRIGUES *et al.*, 2009). De acordo com a Figura 2.17, a TLL apresenta na sua superfície externa sete resíduos de Lys, 19 de Asp e 12 de Glu (RODRIGUES *et al.*, 2009). Sendo assim, utilizando um tampão de pH 10,7 durante a imobilização, serão possíveis, no máximo, sete ligações via Lys entre a TLL e o suporte.

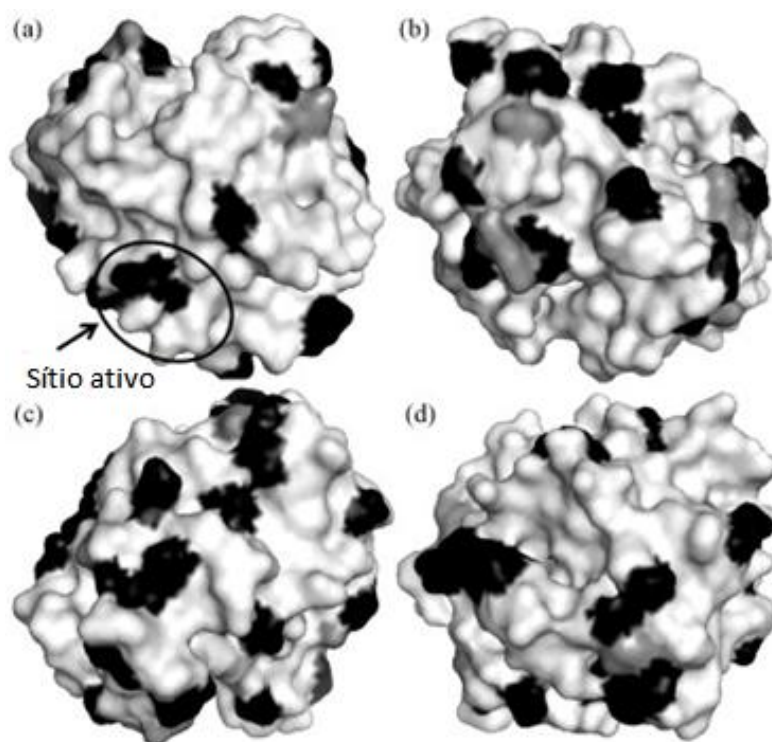


Figura 2.17. Distribuição de resíduos de Lys, Asp, Glu nas quatro faces da superfície de TLL.

Os resíduos de Lys são mostradas em cinza e Asp e Glu em preto. (a) Face frontal que mostra o sítio ativo e face externa da tampa; (b) 90° de rotação da primeira face; (c) 180° de rotação da primeira face; (d) 270° de rotação da primeira face. A estrutura 3D da TLL (código 1DT3) foi obtida a partir do PDB, utilizando o programa PyMOL (RODRIGUES *et al.*, 2009).

A imobilização covalente multipontual é preferida frente as demais técnicas, quando se trabalha sob fatores de desnaturação. Isto ocorre devido às múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte reduzirem a flexibilidade conformacional e as vibrações térmicas, reduzindo assim as possibilidades de desnaturação da proteína pelo seu desdobramento (HANEFELD *et al.*, 2009).

2.5 Suportes

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de características desejáveis da enzima, suporte e método de imobilização, que resultem num derivado enzimático ativo e estável. No entanto, não há um método geral que possa ser aplicado para a imobilização de qualquer enzima. Tradicionalmente, a abordagem usada é a de tentativa e erro, até que um sistema satisfatório tenha sido alcançado (HANEFELD *et al.*, 2009; POPPE *et al.*, 2015a).

Atualmente, dispõe-se na literatura de uma variedade de técnicas de imobilização de enzimas, assim como de um grande número de suportes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos (PAULA *et al.*, 2008; SECUNDO, 2013; TISCHER e WEDEKIND, 1999). Na Figura 2.18 é demonstrada a classificação dos materiais e alguns exemplos.

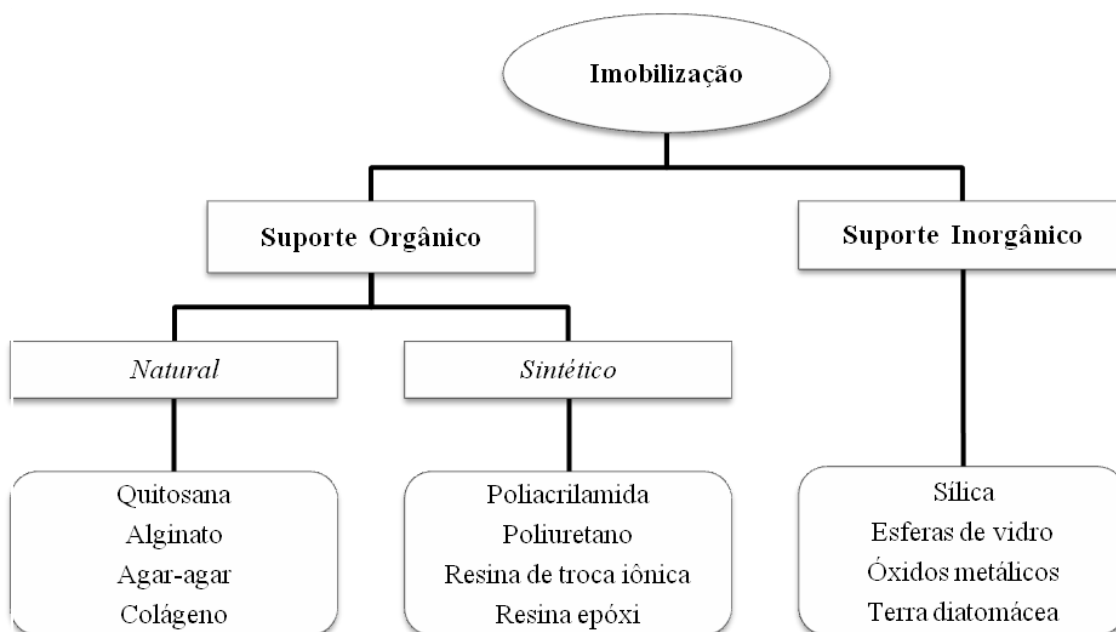


Figura 2.18. Classificação geral de suportes utilizados na imobilização de enzimas.

(JESIONOWSKI *et al.*, 2014; TISCHER e WEDEKIND, 1999)

Na imobilização em suportes sólidos, a enzima pode ficar retida no seu interior (poros) ou na superfície externa do material. O complexo imobilizado enzima-suporte

(derivado enzimático) mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima (PAULA *et al.*, 2008). A Tabela 2.3 apresenta de forma sucinta os principais parâmetros estudados no preparo de um derivado enzimático (TISCHER e WEDEKIND, 1999).

Um requisito essencial para qualquer suporte enzimático é a necessidade de uma grande área de superfície ($> 100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Isto pode ser conseguido com os materiais de partículas pequenas, embora isso possa tornar difícil a separação, ou com materiais altamente porosos, com poros suficientemente grandes para não limitarem a difusão do substrato (HANEFELD *et al.*, 2009; TISCHER e WEDEKIND, 1999).

Tabela 2.3. Resumo dos parâmetros importantes da enzima, suportes e derivados enzimáticos no processo de imobilização.

Enzima	<i>Propriedades Bioquímicas</i>
	Massa molecular, tamanho e grupos funcionais na superfície da proteína;
	<i>Parâmetros cinéticos da enzima</i>
	Atividade específica, pH e temperatura ótimos, parâmetros cinéticos de reação (como K_m , V_{max} , K_{cat}) e a estabilidade da enzima em solventes orgânicos.
Suporte	<i>Características químicas</i>
	Composição química, tipo de ativação, distribuição e densidade de grupos funcionais, estabilidade química, comportamento referente ao inchamento, volume acessível do suporte e tamanho dos poros;
	<i>Propriedades mecânicas</i>
	Diâmetro médio das partículas, área superficial, comportamento de compressão de partículas, resistência mecânica e velocidade de sedimentação.
Enzima	<i>Método de imobilização</i>
imobilizada	Rendimento de imobilização, eficiência de imobilização;
	<i>Efeitos de transferência de massa</i>
	Diferentes concentrações de substrato/produto dentro e fora das partículas do suporte;
	<i>Estabilidade</i>
	Estabilidade operacional (diminuição da atividade sob as condições de reação) e estabilidade de armazenamento;
	<i>Produtividade</i>
	Quantidade de produto formado por unidade de massa por tempo.

2.5.1 Características texturais

A área superficial específica de um suporte sólido é definida como área acessível (ou detectável) por unidade de massa (g) de material (IUPAC, 1994). A área

de superfície de um material poroso é determinada através da determinação do volume de uma monocamada de um gás inerte (tipicamente N₂, He, ou Ar) adsorvido pelo suporte, geralmente usando o método descrito por Brunauer, Emmett e Teller (BRUNAUER *et al.*, 1938). Adsorção de gás é um dos poucos métodos não destrutivos disponíveis para investigar a porosidade (IUPAC, 1994). As isotermas de adsorção-desorção obtidos podem ser classificadas em seis tipos, de I a VI (SING, 1985). A forma da isoterma fornece detalhes da estrutura e geometria do material poroso. A isoterma de adsorção pode também ser usada para fornecer detalhes do diâmetro interno dos poros, a distribuição de tamanho e volume de poros micro e mesoporosos (MAGNER, 2013).

De acordo com a IUPAC (1994), os suportes são classificados:

- Microporosos - diâmetros de poros menores do que 2 nm;
- Mesoporosos - poros com diâmetros na faixa de 2 a 50 nm;
- Macroporosos - diâmetros maiores do que 50 nm.

A caracterização de tamanho de poro de suportes é importante porque as moléculas de enzima com tamanhos iguais ou maiores que o do poro do suporte irão se ligar somente na superfície externa do suporte, por consequência, a carga proteica que poderá ser ligada ao suporte será baixa. Em contraste, enzimas com tamanhos menores que a porosidade do suporte poderão penetrar livremente no suporte poroso, o que possibilita a ligação de um maior número de moléculas proteicas por unidade de suporte (TRAN e BALKUS, 2011). Assim, estima-se que o diâmetro do poro deve ser de no mínimo 4 a 5 vezes maior do que o diâmetro da enzima para assegurar o revestimento completo da superfície do suporte com a enzima em um tempo razoável, conforme Figura 2.19. Porém, poros muito grandes reduzem a resistência mecânica do suporte (SANTOS *et al.*, 2015).

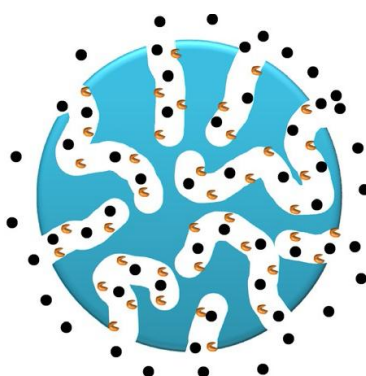


Figura 2.19. Esquema de suporte macroporoso.

Com poros largos não se tem limitações de difusão de substratos (SANTOS *et al.*, 2015).

Para as lipases, um tamanho de poro indicado como conveniente é de cerca de 100 nm. Uma falta de uniformidade nos tamanhos de poros permite que substratos menores possam penetrar, enquanto os substratos maiores irão obstruir os canais, retardando e diminuindo a eficiência das reações. Deste modo, uma distribuição de tamanho de poro não homogêneo interfere não apenas na otimização de carga proteica sobre as superfícies internas, mas também na difusão de substratos e/ou produtos (BLANCO *et al.*, 2004). A imobilização de enzimas causa uma restrição significativa na mobilidade da enzima e também pode afetar o acesso do substrato até a enzima. Os efeitos mais importantes de transferência de massa são observados em suportes porosos devido à difusão interna nos poros (TISCHER e WEDEKIND, 1999). As dificuldades de transferência de massa levam a uma velocidade de reação reduzida em comparação com a enzima solúvel (TISCHER e WEDEKIND, 1999).

2.5.2 Hidrofobicidade

Outra propriedade importante dos suportes de imobilização é a sua hidrofobicidade. Suportes com superfície hidrofóbica são muito interessantes para imobilização de lipase, pois sob baixa força iônica obtém-se a ativação da enzima pelo

seu sítio ativo (interface hidrofóbica) (BARBOSA *et al.*, 2013; MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014), conforme mostrado no esquema da Figura 2.20. Taxas máximas de imobilização são obtidas quando a imobilização em suporte hidrofóbico é realizada com tampão fosfato de sódio de apenas 5-10 mM. A adsorção de lipases é retardada quando a força iônica é aumentada (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998).

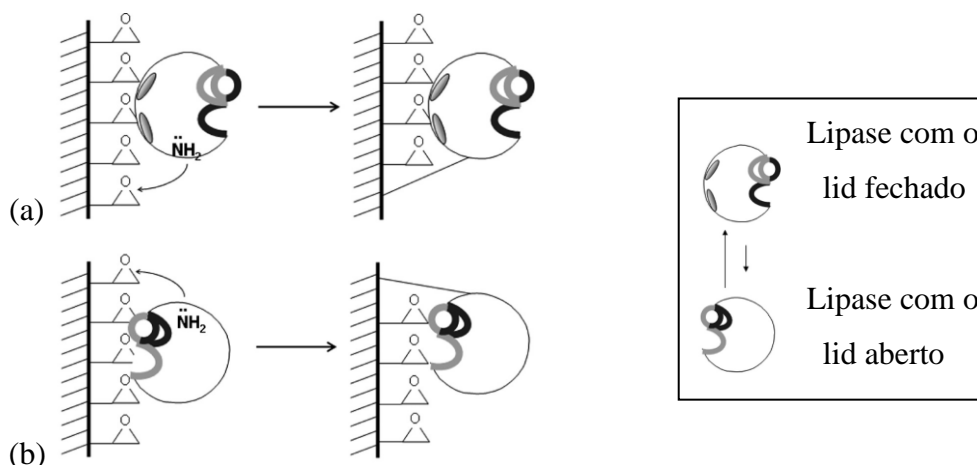


Figura 2.20. Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos.

Onde (a) demonstra uma imobilização sob alta força iônica, ocorrendo primeiramente uma adsorção hidrofóbica seguida de uma ligação covalente e (b) sob baixa força iônica, ocorre a ativação interfacial seguida de ligação covalente (BARBOSA *et al.*, 2013).

Embora a elevada hidrofobicidade do suporte geralmente se mostre positiva no processo de imobilização de lipases, há também desvantagens. A solução enzimática tamponada deve chegar a toda a superfície do suporte, tanto na externa como na superfície interna dos canais dos poros. O acesso à estrutura interna pode ser limitada pela capacidade de umedecimento do suporte; desse modo, para superfícies muito hidrofóbicas, a fase aquosa pode não difundir nos poros (Figura 2.21) (BLANCO *et al.*, 2007). Assim, essa propriedade tem uma influência significativa sobre a distribuição de moléculas de enzima no suporte.

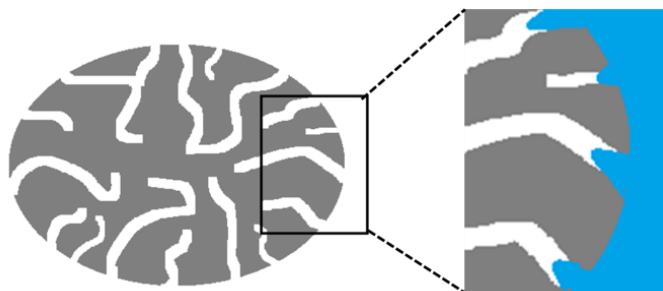


Figura 2.21. Umedecimento de suportes altamente hidrofóbicos.

A fase aquosa não consegue penetrar nos poros, atingindo assim apenas a parte externa do canal (Figura do autor).

2.5.3 Grupamentos da superfície do suporte

O número de grupos ativos na superfície do suporte é outro fator chave para conhecer a interação enzima-suporte. Somente se há vários grupos ativos disponíveis no suporte é possível uma multi-interação com a enzima. Com o aumento do número de grupos reativos no suporte, a multi-interação pode ocorrer de forma mais intensa (SANTOS *et al.*, 2015).

Grupos funcionais reativos podem ser introduzidos na matriz de suportes poliméricos (HANEFELD *et al.*, 2009). A ativação dos polímeros sintéticos pode ser conseguida por uma variedade de métodos. Basicamente, os grupos reativos podem ser introduzidos durante a polimerização, por seleção de monômeros adequados, ou podem ser gerados através da modificação do polímero (TISCHER e WEDEKIND, 1999), como a hidrólise de grupamentos epóxi a aldeídos (MATTE *et al.*, 2014).

Suportes que serão ativados com glutaraldeído devem ser preparados no momento da utilização, pois o grupo reativo tem baixa estabilidade (SANTOS *et al.*, 2015). Já os suportes com grupamentos epóxi são produzidos numa forma ativada, portanto, estes não necessitam de qualquer outro tratamento para imobilizar a enzima. Na forma seca ou em condições de umidade (em pH neutro) sob baixas temperaturas, o suporte pode ser armazenado durante meses, sem alterar a reatividade dos grupamentos

epóxi. Em soluções de pH alcalino (por exemplo, pH 10), os grupos epóxi são menos estáveis, mas a sua meia-vida pode ainda ser medida em semanas, permitindo a incubação da enzima e do suporte por um longo período de tempo, um requisito para aumentar as perspectivas de uma intensa reação enzima-suporte (BARBOSA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015).

2.5.4 Estabilidade do suporte

O suporte deve satisfazer alguns quesitos principais, como:

- grupos funcionais quimicamente estáveis na superfície do suporte para possibilitar sua ligação com a enzima (BARBOSA *et al.*, 2013; MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014);
- estabilidade física, mesmo sob condições de cisalhamento ou pressão do sistema reacional (MATTE *et al.*, 2012);
- resistência ao ataque microbiano (DAMNJANOVIĆ *et al.*, 2012).

Estas características de estabilidade possibilitam o uso repetido do derivado enzimático durante vários ciclos, ou ainda, a sua aplicação em um processo contínuo (MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014).

2.6 Reatores enzimáticos

A seleção de uma configuração de reator adequada é outro aspecto importante na concepção de síntese enzimática industrial (DAMNJANOVIĆ *et al.*, 2012). Os tipos de reatores podem ser classificados como de batelada ou contínuos, conforme descrito a seguir.

2.6.1 Reator enzimático em batelada

O reator de tanque agitado (*stirred tank reactor* - STR) é o tipo mais simples e de mais fácil execução. Pode ser equipado com dispositivos de medição e controle de temperatura e um sistema de agitação. Após a conclusão da reação, a recuperação da enzima imobilizada é realizada através da sua separação do substrato não reagido e produto formado. Esta separação é realizada geralmente por centrifugação, filtração ou decantação (POPPE *et al.*, 2015a).

Neste tipo de configuração de reator é importante considerar uma diminuição gradual de atividade enzimática ao longo das reutilizações, devido à perda de derivado enzimático nas operações unitárias de limpeza e remontagem de reação. Outra desvantagem é a alta tensão de cisalhamento imposta pela agitação mecânica do meio, necessária para a homogeneização (POPPE *et al.*, 2015a).

2.6.2 Reator enzimático contínuo

Uma forma de aumentar a estabilidade mecânica é utilizar reatores contínuos, principalmente de leito fixo (*packed-bed reactor* - PBR) ou leito fluidizado (*fluidized-bed reactors* - FBR), esquematizados na Figura 2.22. O processo contínuo pode ser operado por longos períodos de tempo sob condições de estado estacionário reacional.

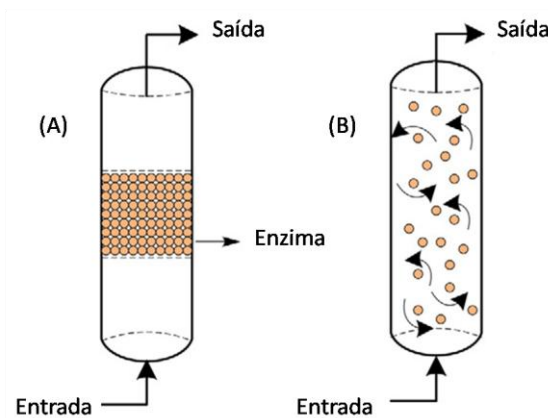


Figura 2.22. Esquema de reatores contínuos.

Onde em (A) tem-se a representação de reator de leito fixo e em (B) de leito fluidizado (POPPE *et al.*, 2015a).

Os PBRs são os reatores mais comuns para preparações enzimáticas em operação contínua devido à sua alta eficiência volumétrica, alta estabilidade operacional e facilidade de construção e operação (GROSOVÁ *et al.*, 2008; SÉVERAC *et al.*, 2011). O PBR consiste basicamente em uma coluna cilíndrica em que o derivado enzimático fica confinado de forma fixa e entre o qual o substrato é bombeado sob uma vazão específica (POPPE *et al.*, 2015a).

O FBR é basicamente uma variação do PBR, onde a solução de substrato é bombeada a partir da base do reator (fluxo ascendente). Normalmente o substrato causa a fluidização do meio através de uma vazão elevada de alimentação ou com o uso de uma bomba que promove a recirculação (GROSOVÁ *et al.*, 2008).

FBRs são utilizados com sucesso em muitos processos industriais. No entanto, informações sobre a sua aplicação na síntese de éster são, atualmente, bastante limitadas na literatura. A maioria dos estudos sobre a síntese de éster é focada em sistemas de PBR, enquanto a síntese de éster em FBR permanece ainda pouco explorada (DAMNJANOVIĆ *et al.*, 2012). Portanto, o estudo da aplicação de diferentes tipos de reatores pode fornecer informações fundamentais, de modo a melhorar os processos de síntese enzimática, contribuindo assim para aumentar o conhecimento existente na área específica.

3. CAPÍTULOS

Nestes capítulos serão apresentados os trabalhos resultantes do período de doutorado.

O primeiro trabalho intitulado “Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: characterization and applications” foi publicado em 2014 na revista Applied Biochemistry and Biotechnology, sob o DOI 10.1007/s12010-013-0702-4.

Os demais trabalhos foram submetidos à publicação. O trabalho “Physico-chemical characterization of Immobead 150 and its application for the immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase” ainda está sob avaliação, já o trabalho "Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150" foi aceito para publicação na revista Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.

Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobead 150 support: characterization and applications

Carla Roberta Matte¹, Roberta Bussamara², Jairton Dupont², Rafael C. Rodrigues¹, Plinho Francisco Hertz¹, Marco Antônio Záchia Ayub^{1*}

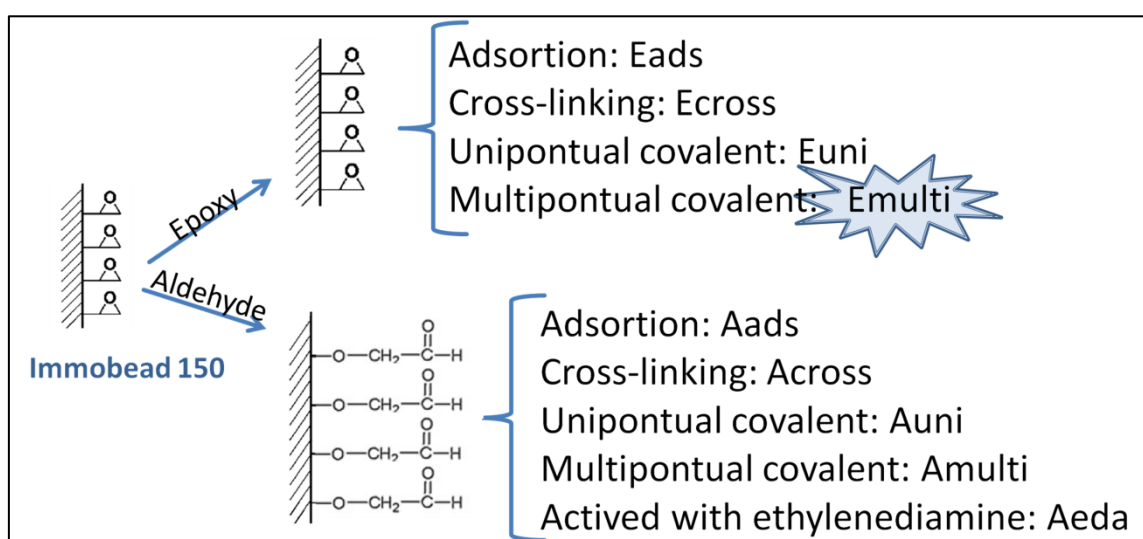
¹ Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratory of Molecular Catalysis, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author. Food Science & Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.

E-mail address: mazayub@ufrgs.br

Website: www.ufrgs.br/bbb



Scheme 1. Graphical abstract

ABSTRACT

Thermomyces lanuginosus lipase (TLL) was immobilized on native and modified Immobead 150, with epoxy groups removed by hydrolysis and oxidized to add aldehyde on its surface. Immobilizations on both supports were performed by adsorption, adsorption and cross-linking, covalent attachment, multipoint covalent attachment and, for the modified support, also multipoint covalent attachment using ethylenediamine. Biocatalysts were evaluated for thermal and solvent stabilities and the best biocatalyst was also tested after incubation in ionic liquids and used in the synthesis of butyl butyrate and isoamyl butyrate. Multipoint covalent immobilized TLL on the native Immobead 150 (*Emulti*) showed a half life of 5.32 h at 70 °C, being approximately 30 times more stable than its soluble form; it showed high stability in acetone, hexane, and iso-octane. Its enzymatic activity was up to 40 % when incubated in ionic liquids. Ester synthesis produced yields of esterification above 60 % in 24 h. Of all immobilization protocols, the *Emulti* performed best concerning the thermal, solvent, and ionic liquids stabilities. *Emulti* was successfully applied to the synthesis of butyl butyrate and isoamyl butyrate, which are very important products for the food and beverages industries.

Keywords: Lipase; Enzyme immobilization; Immobead 150; Butyl butyrate; Isoamyl butyrate.

1. INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3) are an important group of enzymes that catalyze the hydrolysis and the synthesis of esters from glycerol and long-chain fatty acids (BUSSAMARA *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011b; SHANGGUAN *et al.*, 2011). The growing interest in lipases applications is based on their biotechnological versatility and the ability of these enzymes to catalyze a large number of bioconversion reactions potentially important in pharmaceuticals and drugs production, in energy (biodiesel), chemical industry, and in food technology (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Many of these applications are performed with immobilized lipases, which can be continuously and repeatedly used, avoiding enzyme solubilization, improving the stability of the biocatalyst, and reducing industrial costs avoiding product contamination by the enzyme (especially relevant for food applications) (BUSSAMARA *et al.*, 2013; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; GUISAN, 2006; HASAN *et al.*, 2006).

Lipases are produced by several microorganisms and, as consequence, exhibiting different physical properties and specificities. TLL is a lipase preparation from the fungus *Thermomyces lanuginosus*, produced in industrial scale using recombinant *Aspergillus oryzae* as the host microorganism (JAEGER *et al.*, 1994) and commercialized in soluble and immobilized forms by Novozymes. TLL is classified as 1,3-specific and has high affinity for long-chain fatty acids and is a single chain protein consisting of 269 amino acids (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Due to the fact that TLL presents only seven Lys groups in its molecular composition, intense multipoint covalent attachment may be difficult to be achieved with this enzyme (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

The activity of the immobilized lipases depends on several parameters such as enzyme and support types, and the protocols of immobilization (YUCEL *et al.*, 2011).

Immobilization of lipases on different supports, or by different protocols in the same support, allows the development of systems with different stabilities and specificities, depending on the support used, the intensity of the enzyme-support interaction, and the orientation of the enzyme molecule on the support surface (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; RODRIGUES e AYUB, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013). The immobilization of an enzyme may produce different adverse effects on the enzyme activity because the enzyme molecule may become distorted, mainly when some multi-interactions between the enzyme and the support occur. Also, the active center may become blocked by the immobilization itself. Finally, immobilization may promote diffusion problems of the substrate. These problems may have a different impact on the activity of the enzyme depending on the different immobilization strategies (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). Several approaches have been reported for the immobilization of lipases, consisting either on physical adsorption of the enzyme on a carrier material (ROMDHANE *et al.*, 2011) or by covalent binding to a solid matrix (MATEO *et al.*, 2007a; MENDES *et al.*, 2011b; RODRIGUES *et al.*, 2009; ROMDHANE *et al.*, 2011).

Immobead 150 is a new commercial support of methacrylate polymers with epoxy functions and an average particle size of 0.15-0.30 mm. Recently, one study reported the use of Immobead 150 to immobilize acid phosphatase from *Shigella flexneri* via multipoint attachment on the surface epoxy groups, showing a binding efficiency of 100 % and remaining catalytic efficiency of 70 % (BABICH *et al.*, 2012).

Supports containing epoxy groups are characterized as having short spacer arms and being very stable at neutral pH. They have been reported to immobilize enzymes through multipoint covalent attachment at their amino, phenolic and thiol groups at alkaline pH, or at their carboxylic groups at moderately acid pH (MATEO *et al.*, 2007a; TORRES-SALAS *et al.*, 2011). However, epoxy-supports show low

immobilization recoveries with highly glycosylated enzymes, since the polysaccharide fraction shields the active groups in the protein surface (TORRES-SALAS *et al.*, 2011). One possible strategy to overcome this negative effect is the substitution of epoxy by aldehyde groups in the support surface. These modified supports are suitable for the development of strategies of immobilization of enzymes, due to the absence of steric hindrance for the chemical reaction between aldehyde groups and the amine groups on the enzyme (GUISAN, 1988).

The use of organic solvents as reaction media for enzymatic reactions provides several industrially attractive advantages, when compared to traditional aqueous reaction systems. Enhancement of substrates solubility, reversion of thermodynamic equilibrium, suppression of water-dependent reactions, and elimination of microbial contaminations are some of the advantages (LERIN *et al.*, 2011). However, enzyme activity can be strongly affected by the organic solvent, which may cause the denaturation of the enzyme (BATISTELLA *et al.*, 2012). It is important to test the best solvents for each derivative, according to the reactions of interest. The *log P*-value is generally used to correlate solvent polarity with enzyme activity and stability in non-aqueous phases (LAANE *et al.*, 1987). Generally, the most adequate organic solvents for enzymatic catalysis are the non-polar ones (*log P*>4), decreasing in order to those of high polarity (*log P*<2), which can cause denaturation of the biocatalyst (BATISTELLA *et al.*, 2012; LAANE *et al.*, 1987; YANG *et al.*, 2012). The stability of lipases in organic solvents is an important parameter for industrial applications, since many syntheses reactions such as esterification and transesterification, must be performed at low water activities and carried out in organic media.

Organic solvents are usually volatile, inflammable, and pollutant liquids. It would be desirable to test the stability of the catalysts in alternative solvents. Ionic

liquids (ILs) are a new class of liquid solvents, holding a unique array of physico-chemical properties that makes them suitable for numerous industrial applications, besides been considered environmentally friendly (DE DIEGO *et al.*, 2009; DUPONT *et al.*, 2002). The appropriate combination of the cationic and anionic regions of the IL might increase substrate solubility, improve the enzyme selectivity or enhance the enzyme activity and/or stability (DE DIEGO *et al.*, 2009; ZHAO e BAKER, 2013).

The aims of this research were to compare the effects of nine different methods of immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on Immobead 150 support in its native (epoxy) and modified (aldehyde) forms. All derivatives were evaluated for the support load of protein, thermal and solvent stabilities. The most stable biocatalyst (*Emulti*) was also evaluated for its stability in ionic liquids in order to check the possibility of using this new technology in future works using immobilized lipases. *Emulti* was also used for the esterification reactions to obtain butyl butyrate and isoamyl butyrate.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Lipase from *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100 L, soluble form) and TLL immobilized on a silicate support (Lipozyme TL IM) were purchased from Novozymes (Brazil). Immobead 150, *p*-nitrophenylpalmitate (*pNPP*), *p*-nitrophenol (*pNP*), ethylenediamine (EDA) were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Support modification

The hydrolysis of epoxy groups to introduce aldehydes units was performed according to Mateo et al. (MATEO *et al.*, 2006) with the following modifications. The hydrolysis of 1 g of Immobead 150 was carried out with 10 mL 0.5 M sulphuric acid during 15 h, followed by washings with distilled water. Suspensions of 1 g of support in 10 mL of distilled water was added of 1 mL of 0.1 M sodium periodate solution under gentle stirring for 2 h to complete the oxidation. Then, the aldehyde-support was washed with an excess of distilled water.

2.3. Lipase immobilizations

In all experiments, immobilization efficiency and yields were followed by measuring the hydrolytic activities and the protein concentrations in the supernatant solution. Immobilization yields (Eq. (1)) were calculated after determining the amount of protein and enzyme units that disappeared from the supernatant and comparing with the initial protein and enzyme concentrations offered to reaction (U g^{-1} of support). Efficiency (Eq. (2)) was calculated after determining the activity of the immobilized enzyme and comparing with the number of enzyme units that disappeared from the supernatant (theoretically immobilized).

Immobilization yield

$$= \frac{(\text{total starting activity} - \text{total residual activity})}{\text{total starting activity}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Efficiency} = \frac{\text{observed activity}}{(\text{total starting activity} - \text{total residual activity})} \times 100 \quad (2)$$

2.3.1. Immobilization by adsorption

A total of 1 g of support was resuspended in 10 mL of enzyme solutions (protein contents of 5, 10, and 20 mg g⁻¹ resin; these same amounts were used in the next protocols as well) in buffer 1 M sodium phosphate pH 7 at 20 °C, under gentle stirring on roller mixer for 2 h. After immobilization, enzyme preparations were washed with buffer 0.1 M sodium phosphate pH 7 to eliminate any remaining protein that had not been attached to the support. The preparations were named *Eads* when immobilized in epoxy groups, and *Aads*, when immobilized in aldehyde groups.

2.3.2. Adsorption followed by cross-linking

An amount of 1 g of derivatives prepared by adsorption (*Eads* or *Aads*) were treated with 2 mL of a solution containing 1 % (volume fraction) glutaraldehyde in buffer 0.1 M sodium phosphate pH 7 and kept under gentle stirring on a roller mixer for 1 h (BARBOSA *et al.*, 2012; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). This treatment permitted to fully modify the primary amino groups of the enzyme and the support with just one glutaraldehyde molecule (BARBOSA *et al.*, 2012). After immobilization, enzyme preparations were washed with 0.1 M sodium phosphate pH 7 to remove the excess of glutaraldehyde. The preparations were named *Ecross* when immobilized in epoxy groups, and *Across*, when immobilized in aldehyde groups.

2.3.3. One-point covalent immobilization

An amount of 1 g of support was resuspended in 10 mL of enzyme solutions in 1 M sodium phosphate pH 7 under gentle stirring for 24 h at 20 °C. After immobilization, successive washings with buffer 0.1 M sodium phosphate pH 7 were used to remove the excess of enzyme until no activity could be detected in the washed fractions. To check the covalent binding, washings with NaCl (1 M) and ethylene glycol

(30 % volume fraction) were performed to eliminate ionic and hydrophobic interactions between enzyme and support. After the immobilization covalent step, Schiff's bases present in the Immobead 150 were reduced using sodium borohydride (1 mg mL⁻¹ solution at 20 °C during 30 min) (MATEO *et al.*, 2007b). The preparations were named *Euni* when immobilized in epoxy groups, and *Auni*, when immobilized in aldehyde groups.

2.3.4. Multipoint covalent attachment

An amount of 1 g of support was resuspended in 10 mL of enzyme solution in 1 M sodium phosphate pH 7 at 20 °C for 24 h, under gentle agitation on roller mix. After immobilization, enzyme preparations were washed with 0.1 M bicarbonate buffer, pH 10.05. The biocatalyst was added to 10 mL 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 10.05 under gentle stirring for 12 h at 20 °C, for multipoint attachment. After this, the biocatalyst was washed and Schiff's bases were reduced as described above in 2.3.3. The preparations were named *Emulti* when immobilized in epoxy groups, and *Amulti*, when immobilized in aldehyde groups.

2.3.5. Multipoint covalent attachment with activated resin ethylenediamine

Modified Immobead 150 (aldehyde-resin) was activated with ethylenediamine according to the method described by Fernandez-Lafuente *et al.* (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993) 1 g of Immobead 150 aldehyde-resin was resuspended in 4 mL of 2 M ethylenediamine (EDA) pH 10.0 and stirred for 2 h at 20 °C. After that, 56 mg of solid NaBH₄ were added and the suspension was stirred for 2 h. The resulting support was washed with 0.1 M borate buffer, pH 9.0, and with 0.1 M acetate buffer, pH 4.0, followed by extensive washings with distilled water. For activation with

glutaraldehyde, 1 g of the modified support (*Aeda*) was added to 10 mL of 25 % glutaraldehyde solution and the system was kept under gentle agitation for 18 h. Finally, the activated resin was extensively washed with distilled water. Lipase was added to 10 mL 0.1 M bicarbonate buffer (pH 10.05) mixed with 1 g of this support and kept under slow stirring for 24 h at 20 °C. After this, the derivatives were washed and Schiff's bases were reduced as described above in 2.3.3. This preparation was named *Aeda*.

2.4. Protein Determination

Soluble protein was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as protein standard (BSA).

2.5. Hydrolytic activity assay

The hydrolysis reaction was carried out using *p*-nitrophenylpalmitate (*p*NPP). Substrate solution was prepared mixing one volume of 10 mM solution of *p*NPP in 2-propanol with nine volumes of 10 mM phosphate buffer solution pH 8.0 containing 0.44 % (mass fraction) Triton X-100 and 0.11 % (mass fraction) arabic gum. The lipase activity was measured using 100 μ L of lipase solution or suspension and 900 μ L of the substrate solution (10 mM *p*NPP) at 55 °C for 2 min. The absorbance of *p*-nitrophenol released was spectrophotometrically monitored at 410 nm. One unit of lipase activity was expressed as the release of 1 μ mol *p*-nitrophenol per minute under the assay conditions. The calibration curve was prepared using *p*-nitrophenol as standard. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

2.6. Thermal stability

The different TLL preparations were incubated in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 at 70 °C. Samples were withdrawn at different times using a pipette with a cut-tip under vigorous stirring to have a homogeneous biocatalyst suspension, and the activity was measured. The half-life times ($t_{1/2}$) were determined by applying an exponential nonlinear decay model and the stability factor (Eq. (3)) is the ratio between the $t_{1/2}$ of the immobilized derivate and $t_{1/2}$ of the soluble enzyme.

$$\text{Stabilization factor} = \frac{\text{half – life of the immobilized enzyme}}{\text{half – life of the soluble enzyme}} \quad (3)$$

2.7. Organic solvent stability

Immobilized TLL preparations were incubated in different organic solvents (methanol, acetonitrile, ethanol, acetone, iso-propanol, iso-amyl alcohol, butanol, hexane and iso-octane) under agitation during 60 min at 20 °C. Samples were withdrawn at different times using a pipette with a cut-tip under vigorous stirring to have a homogeneous biocatalyst suspension.

2.8. Ionic Liquid stability

Stability on ILs was tested by incubating 0.1 g of *Emulti*-TLL in 1 mL of IL under agitation on a roller mixer during 1 h at 20 °C. Samples were withdrawn at different times using a pipette with a cut-tip and under vigorous stirring to have a homogeneous biocatalyst suspension, and activity was measured. The ILs were prepared as previously described by Cassol *et al.* (CASSOL *et al.*, 2006). The following ILs were tested: Tetrafluoroborate 1-butyl-3-methylimidazolium ([Bmim][BF₄]), Hexafluorophosphate 1-butyl-3-methylimidazolium ([Bmim][PF₆]),

Bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide 1-butyl-3-methylimidazolium ([Bmim][NTf₂]) and Bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide 1-propyl-3-methylimidazolium ([Pmim][NTf₂]).

2.9. Esterification reactions

Esterification reactions were carried out in 50 mL Erlenmeyer flask using n-hexane as organic solvent. Butyl butyrate and isoamyl butyrate were prepared by mixing 0.1 M n-butanol or 0.1 M isoamyl alcohol with 0.1 M butyric acid, followed by the addition of the immobilized lipase (50 % by substrate weight). The mixtures were incubated at 50 °C for 24 h at 150 rpm.

The progress of esterification was monitored by titration determining the residual acid content. Samples were withdrawn (0.5 mL) and diluted in 5 mL of ethanol as quenching agent, and titrated with 0.005 M NaOH using phenolphthalein as the end-point indicator. The amount of ester was calculated as being equivalent to the consumed acid.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Immobilization of TLL by different protocols

Results for immobilization yields and efficiencies for each immobilization protocol are presented in Tables 1 and 2. In the protein immobilization process, two phenomena are simultaneously occurring; the protein diffusion throughout the pore and the chemical reaction between protein and support surfaces (BOLIVAR *et al.*, 2011). In order to study the effects of immobilization on enzyme activity, the enzymatic loads of 5, 10, and 20 mg g⁻¹ of resin were chosen to prevent diffusion limitations and intermolecular interactions (MATEO *et al.*, 2003). Immobilizations on the native

support containing epoxy groups presented higher efficiencies than the immobilization on modified support containing aldehyde groups (Table 2). The results indicated that the highest immobilization yield and efficiency were observed using protein concentration of 5 mg g⁻¹ of support. Comparatively, Mendes *et al.* (MENDES *et al.*, 2011b) reported yields of 32 % and efficiencies of 61 % for TLL (5 mg g⁻¹) using a protocol for covalent multipoint attachment on glyoxyl support. The amino groups present in the lysine residues on the enzyme surface and the amino terminal group are very reactive when unprotonated. This reactivity causes a very intense multi-interaction with the activated support and allows a multipoint attachment with 7 Lys on the external surface of TLL (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Table 1. Yields and efficiencies of the TLL immobilization by different methods on native Immobead 150.

Protein load (mg g ⁻¹ of support)	Epoxy							
	<i>Eads</i> ^a		<i>Ecross</i> ^b		<i>Euni</i> ^c		<i>Emulti</i> ^d	
	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)
20	100	53	100	51	99	40	99	41
10	100	98	100	100	98	89	100	76
5	100	90	100	100	94	100	97	100

^a Immobilization by adsorption; ^b adsorption followed by cross-linking; ^c one-point covalent immobilization; ^d Multipoint covalent attachment.

Table 2. Yields and efficiency of the TLL immobilized on modified Immobead 150 by different methods.

Protein load (mg g ⁻¹ of support)	Aldehyde									
	<i>Aads</i> ^a		<i>Across</i> ^b		<i>Auni</i> ^c		<i>Amulti</i> ^d		<i>Aeda</i> ^e	
	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)	Yield (%)	Eff. (%)
20	100	50	100	45	98	44	98	56	93	20
10	100	77	100	94	99	64	97	81	92	38
5	100	59	100	95	98	60	95	84	91	48

^a Immobilization by adsorption; ^b Adsorption followed by cross-linking; ^c One-point covalent immobilization; ^d Multipoint covalent attachment; ^e Multipoint covalent attachment with activated resin ethylenediamine.

However, when the support was treated with EDA and glutaraldehyde, yields of 100 % and efficiencies of only 18 % were obtained under the same conditions. Yucel *et al.* (YUCEL *et al.*, 2011) reported yields of 23.7 % for TLL (4.79 mg g⁻¹) when it was immobilized by adsorption on the reactive aldehyde groups of styrene-divinylbenzene polymer.

The use of the NaBH₄ in order to reduce the Schiff's bases on the biocatalyst obtained by covalent immobilization produces a negative effect on the recovered activity (efficiency) of the immobilized enzyme. However, this reduction reaction usually produces an increased stability factor (ADRIANO *et al.*, 2008).

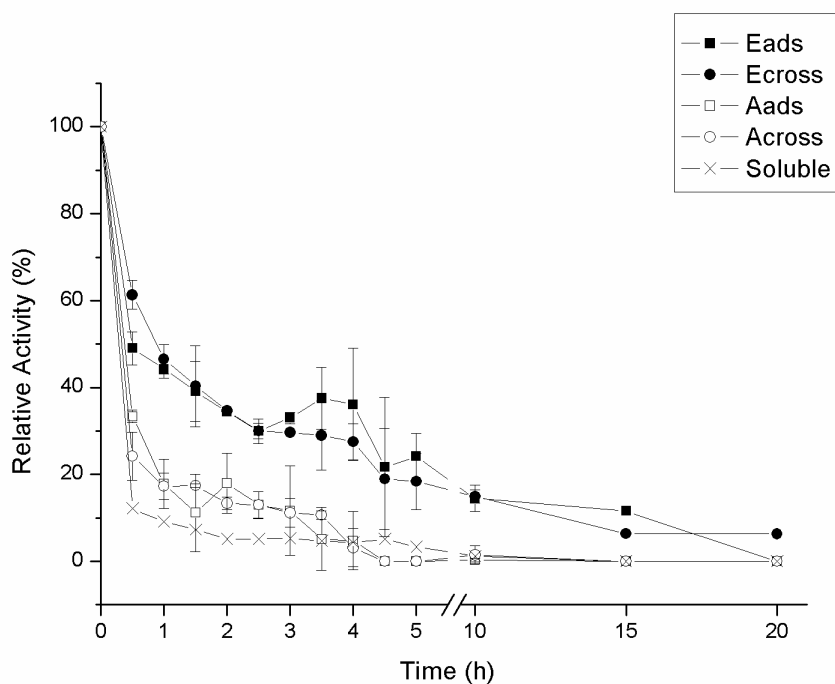
3.2. Thermal stability

Thermal stabilities for soluble and immobilized biocatalysts were evaluated by measuring the residual activity of the lipase preparations exposed to 70 °C in buffer phosphate 0.1 M, pH 7.0. The results are shown in Figure 1A and 1B, while the half-life ($t_{1/2}$) and the stability factor for each preparation are presented in Table 3. The $t_{1/2}$ values

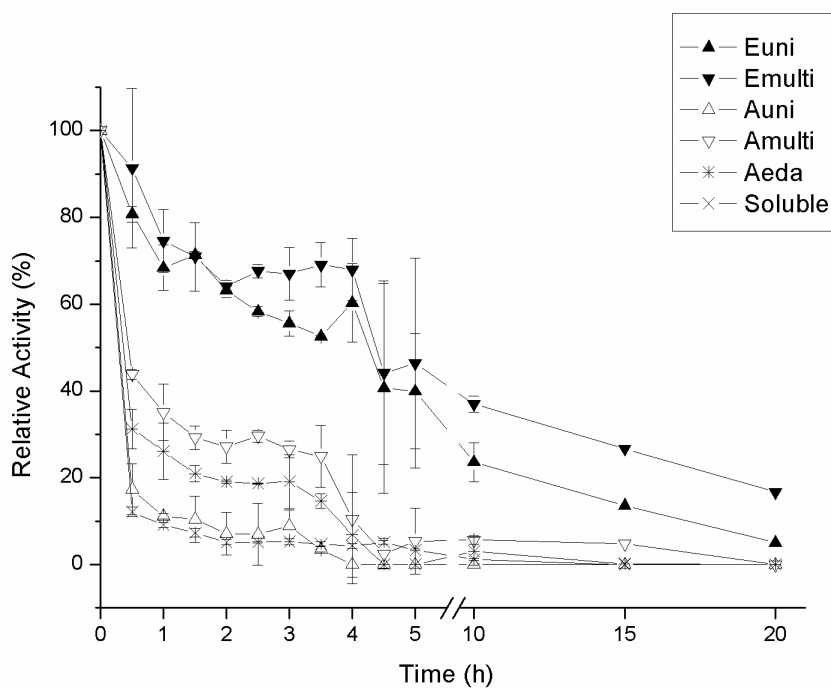
for TLL derivatives varied from 0.23 h to 5.32 h and the stability factor for *Emulti* was approximately 30 times higher than that of the soluble lipase ($t_{1/2} \approx 0.18$ h) at 70 °C. The $t_{1/2}$ of TLL in *Emulti* (5.32 h) was higher than that reported by other works, e.g. by Mendes et al. (MENDES *et al.*, 2011b) ($t_{1/2} = 1.93$ h at 70 °C for multipoint covalent attachment on Toyopearl AF-amino-650M), by Mendes *et al.* (MENDES *et al.*, 2011a) ($t_{1/2} = 3.99$ h at 70 °C for TLL- chitosan-alginate-TNBS derivatives). Rodrigues *et al.* (RODRIGUES *et al.*, 2009) reported that glyoxyl preparations were more thermo-stable than the control CNBr-TLL (immobilized lipase in cyanogen bromide-activated-Sepharose support), which presented $t_{1/2} = 0.5$ h under conditions of inactivation (25 mM sodium phosphate at 70 °C and pH 7). The glyoxyl support increased the stabilization 8 times (multipoint covalent attachment), and the aminated enzyme in this same support was even more stable, with $t_{1/2}$ 40 times higher than the control.

Table 3. Thermal stability parameters for different immobilized TLL preparations at 70 °C.

Method	Half-life (h)	Stabilization factor
<i>Eads</i>	1.57	8.72
<i>Ecross</i>	1.47	8.17
<i>Euni</i>	3.74	20.78
<i>Emulti</i>	5.32	29.56
<i>Aads</i>	0.40	2.22
<i>Across</i>	0.34	1.89
<i>Auni</i>	0.23	1.28
<i>Amulti</i>	0.97	5.39
<i>Aeda</i>	0.55	3.06
Soluble	0.18	1.00
Lipozyme TL-IM	0.56	3.11



A



B

Figure 1. Thermal stability of the TLL immobilized by different methods at 70 °C in 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.0. A) *Eads* (■), *Ecross* (●), *Aads* (□), *Across* (○), and soluble enzyme (×). B) *Euni* (▲), *Emulti* (▼), *Auni* (△), *Amulti* (▽), *Aeda* (*), and soluble enzyme (×). The results are the mean of triplicates.

The best thermal stabilities were obtained for TLL immobilized derivatives *Euni* and *Emulti*. These derivatives were approximately 20 and 30 times more stable than soluble lipase, respectively. In the case of *Emulti*, this suggests that the increase in enzyme stability was related to the formation of multipoint covalent linkages between enzyme and support. The multipoint attachment between the epoxy groups in the support and the amino groups in the enzyme occurs during the third step of immobilization, which is the incubation under alkaline conditions, providing an increased enzyme stabilization (MATEO *et al.*, 2007a). The increased stability attained by multipoint covalent linkages is evidenced when it was compared, at the same temperature, the *Emulti* derivative with the commercial preparation, Lipozyme TM-IM. While for *Emulti*, the half-life at 70 °C is 5 h, for Lipozyme TL-IM the half-life is lower than 1 h (Table 3). In another work, a similar half-life was obtained when the temperature used was 60 °C, and as in the present work, the ionic adsorbed enzyme (Lipozyme TL-IM) presented lower thermal stability than the multipoint covalently attached lipase (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.3. Stability in organic solvents

Acetone and hexane ($\log P = -0.23$ and 3.5 , respectively) are some of the most used solvents to carry out reactions with lipases. These solvents were tested for all derivatives and compared with the control reaction (incubation with buffer), and results are shown in Figure 2. In general, all preparations made up with the native Immobead 150 were more stable than those based on the aldehyde-modified support.

Based on the stability data obtained for all derivatives, it was selected *Emulti* to the next experiments, because it was the most stable derivative at 70 °C and in solvents of distinct $\log P$.

In this work, it was not found a correlation between $\log P$ and enzymatic activity according to results shown in Figure 2 and 3, corroborating findings from Hernández-Rodríguez *et al.* (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009) and Yang *et al.* (YANG *et al.*, 2012), although several articles mention a possible correlation between $\log P$ and enzymatic activity (SAPONJIĆ *et al.*, 2010; SEBRÃO *et al.*, 2007). It has been suggested that the stability of enzymes are influenced by the solvent polarity (LAANE *et al.*, 1987), but correlations between a simple parameter, such as solvent $\log P$, and a complex factor as enzyme denaturation, might be difficult to predict.

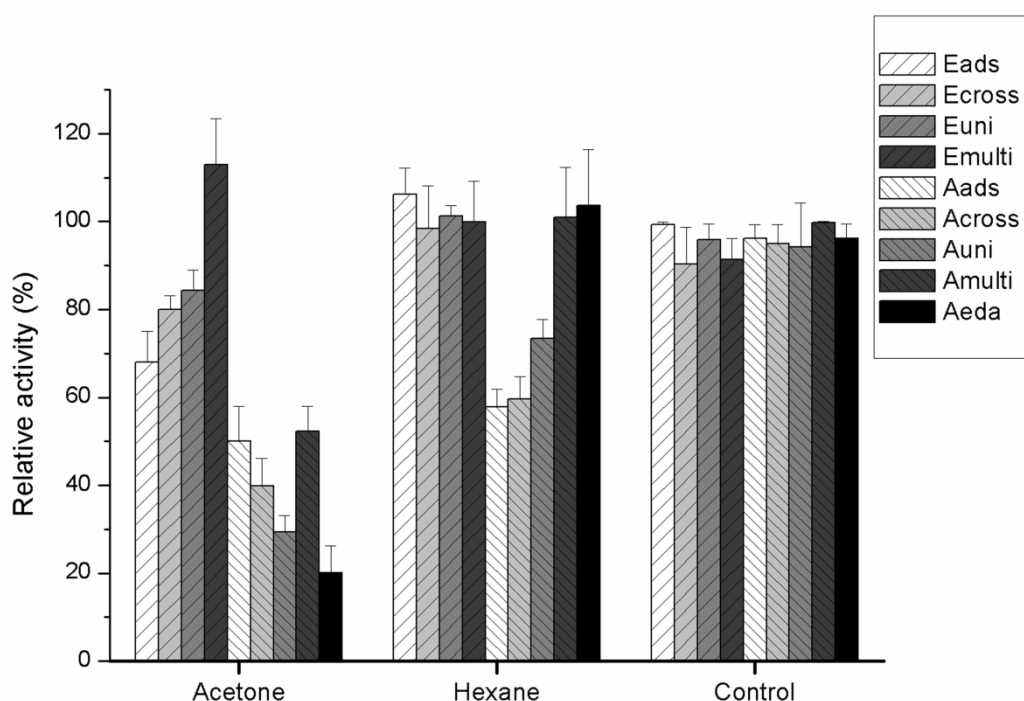


Figure 2. Effects of acetone and hexane on the stability of the biocatalysts measured as the relative hydrolytic activity. The residual enzymatic activity (%) was expressed as a comparison with control (incubation with 0.1M sodium phosphate buffer pH 7). Results are the mean of duplicates.

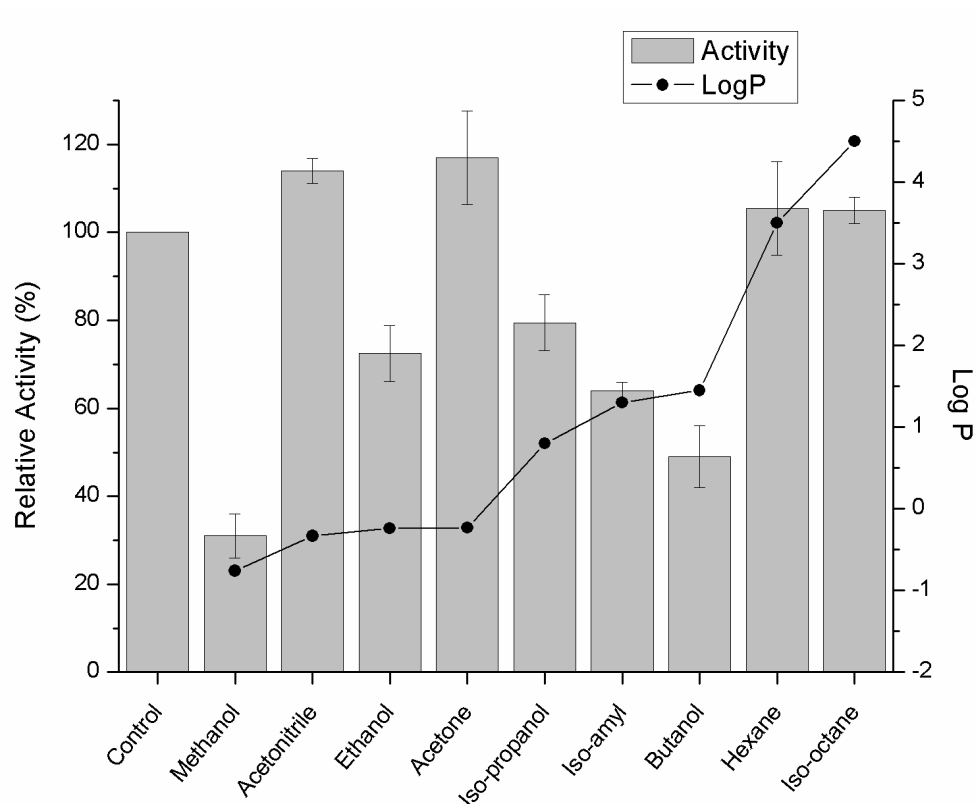


Figure 3. Relative hydrolytic activity of *Emulti* incubated in various solvents with their respective $\log P$ value. The residual enzymatic activity (%) was expressed as a comparison with control (incubation with 0.1M sodium phosphate buffer pH 7). Results are the mean of duplicates.

3.4. Biocatalysts stability after incubation in ionic liquids

The *Emulti* preparation was tested for its stability in different ionic liquids. As can be seen in the Figure 4, the reactions carried out with [Bmim][NTf₂] showed just a slight increase of activity (10 %) compared to the control reaction, while in the reactions that were conducted with [Bmim][BF₄] there was a significant increase of enzyme activity (40 %). The remaining of ILs tested did not have any effect on the biocatalyst.

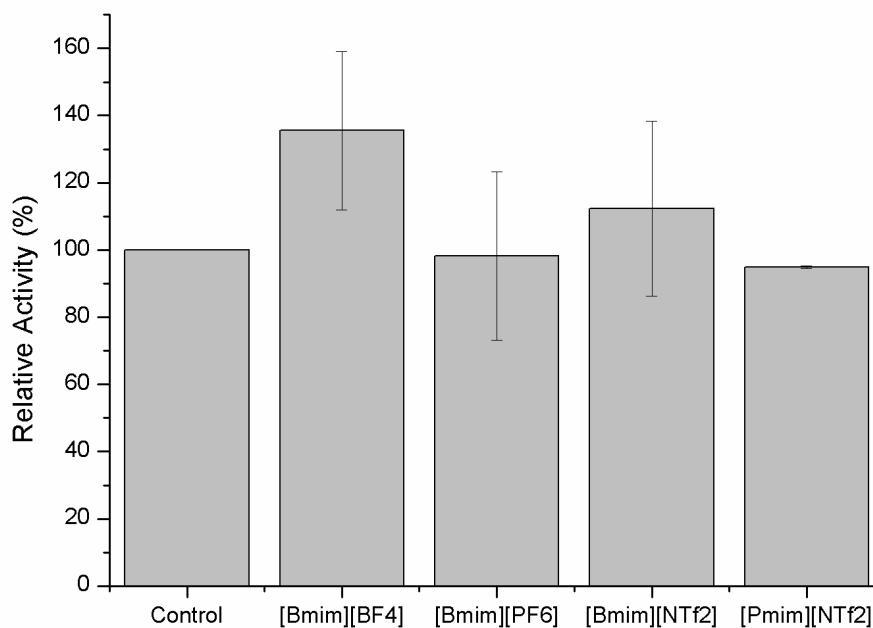


Figure 4. Relative hydrolytic activity of *Emulti* incubated in different ionic liquids. The residual enzymatic activity (%) was expressed as a comparison with control (incubation with 0.1M sodium phosphate buffer pH 7). Results are the mean of duplicates.

Water molecules are distributed among the vicinities of the enzyme macromolecule, thus one important aspect, rather than the bulk concentration of water in the medium, is its availability to the enzyme molecule in order to sustain the catalytic properties (PEREIRA *et al.*, 2012). The miscibility of ILs with water varies widely and unpredictably because [Bmim][BF₄] is water-miscible, but [Bmim][PF₆] and [Bmim][NTf₂] are only partially miscible in water. Therefore, [Bmim][BF₄] provided a proper environment for lipase activity. These observations endorse that the identity of the anion exerts great influence on the interactions between water and IL molecules (PEREIRA *et al.*, 2012).

ILs are more viscous fluids than conventional organic solvents (PEREIRA *et al.*, 2012). Nevertheless, the high viscosity of the ILs may slow down conformational changes of proteins, allowing enzymes to maintain their native structures and activity.

Lipases from different microorganisms were tested for stability after incubation in IL have shown diverse effects, ranging from no change in activity to complete denaturation. According to Arai *et al.* (ARAI *et al.*, 2010) r-mdIB (*Aspergillus oryzae* lipase immobilized on cuboidal solids of reticulated polyurethane) kept its original activity in [Bmim][BF₄] after 72 h at 30 °C, while w-ROL (*Rhizopus oryzae* lipase immobilized in the same support and under the same conditions) lost 70 % of its activity after incubation.

3.5. Esterification reactions

Esters from short chain carboxylic acids and alcohol are important components of natural aromas used in the food, cosmetics and pharmaceutical industries (BERGER, 2009). Therefore, in order to test the best biocatalyst obtained in this work regarding stability (*Emulti*), which was prepared by multipoint covalent attachment, for practical applications, the reaction of synthesis of butyl butyrate and isoamyl butyrate were carried out. In this case, in order to prepare the biocatalyst, a higher enzyme load with 200 mg enzyme per g⁻¹ of support was offered, while the reaction was carried out in the presence of hexane, one of the best solvents concerning stability of the biocatalyst. Results depicted in figure 5 show the efficiency of esterification reaction for this preparation and the comparison with a commercial enzymatic source. *Emulti* was compared with the commercial TLL preparation (Lipozyme TL-IM) for the synthesis of butyl butyrate and isoamyl butyrate (results in Figure 5), and both preparations presented similar performances. These results show the potential applicability of support Immobead 150 with TLL immobilized via multipoint attachment for esterification reactions.

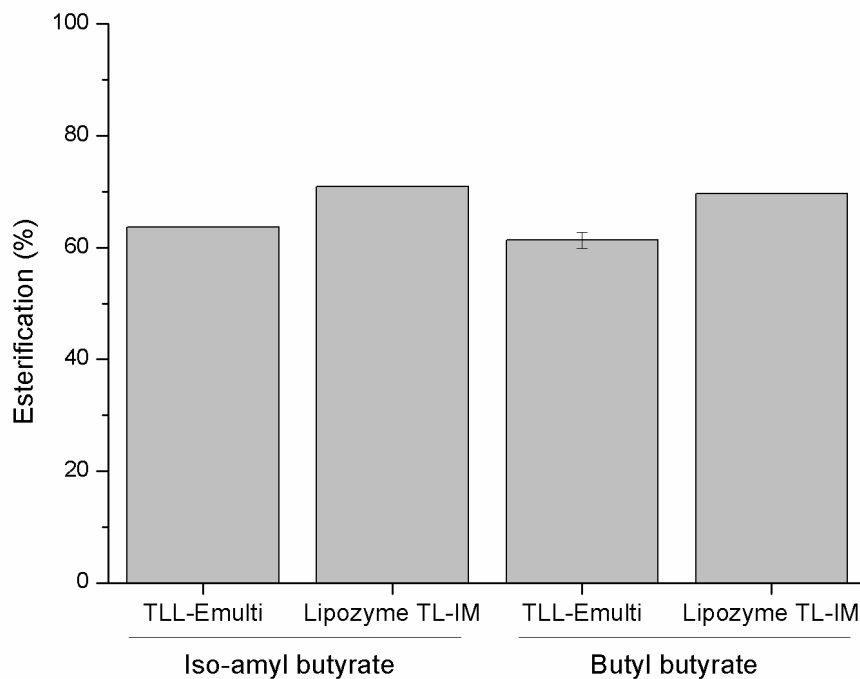


Figure 5. Isoamyl butyrate and butyl butyrate synthesis catalyzed by *Emulti* compared with a commercial lipase preparation (Lipozyme TL-IM). Results are the mean of duplicates.

4. Conclusions

Nine different immobilized derivatives of the same support were obtained by varying immobilization conditions and modification of the support by the introduction of aldehyde groups. TLL immobilized on native Immobead 150 (epoxy groups) by multipoint covalent attachment (*Emulti*) performed best concerning the thermal and solvent stabilities, being 30 times more stable at 70 °C in relation to the soluble lipase. Best stabilities in solvent were obtained using acetonitrile, acetone, hexane, and iso-octane. Enzyme activity was improved by incubation in ionic liquids that showed no denaturation of TLL. *Emulti* was successfully applied to the synthesis of butyl butyrate and isoamyl butyrate.

Acknowledgments

This work was partially financially supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). The first author acknowledges the scholarship from CNPq.

Physico-chemical characterization of Immobead 150 and its application for the immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase

Carla R. Matte¹, Carolina Bordinhão¹, Jakeline K. Poppe¹, Edilson V. Benvenuti²,
Tania H. Costa², Rafael C. Rodrigues¹, Plinho F. Hertz¹, Marco A. Z. Ayub^{1*}

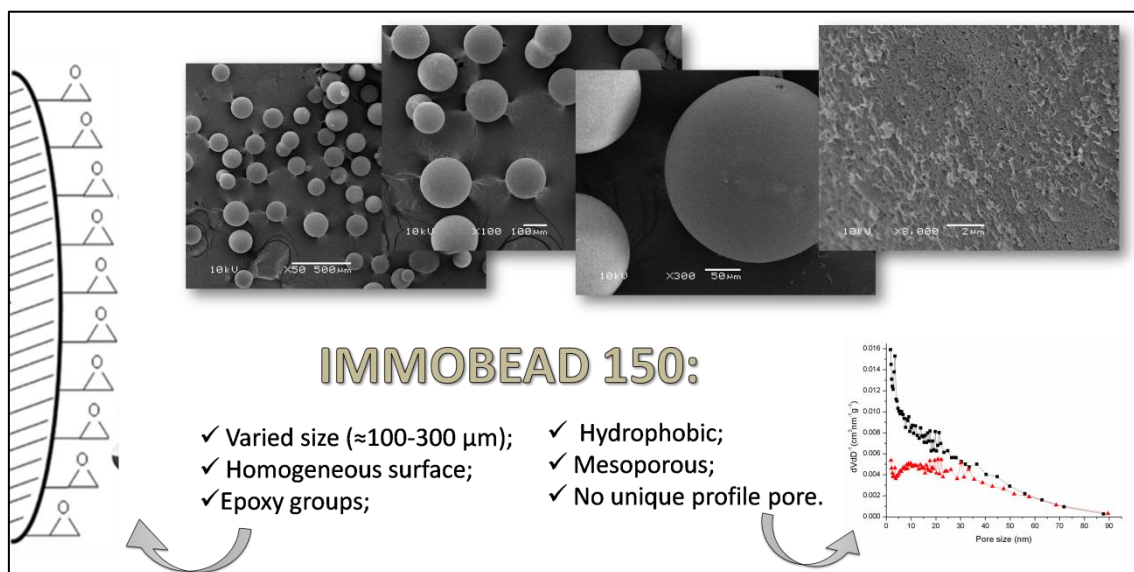
¹ Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

² Laboratory of Solids and Surfaces, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author. Food Science & Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Phone: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.

E-mail address: mazayub@ufrgs.br

Website: ww.ufrgs.br/bbb



Scheme 2. Graphical abstract

ABSTRACT

We carried out a comprehensive physico-chemical characterization of Immobead 150, a hydrophobic support for the immobilization of lipases. *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) was immobilized on Immobead150 by multipoint covalent attachment (ImmTLL) and the morphological, textural, structural, thermal, and physico-chemical properties of the support surface, before and after enzyme immobilization, were investigated. Immobead 150 presents approximately 1,000 μmol of epoxy groups per gram of support, a high hydrophobicity, and good thermal stability. The spherical particles of Immobead 150 present average diameters of 155 μm , specific surface areas of 137 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ and pore volumes of 0.37 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, showing pores in the region of the micro and meso sizes. The immobilization process of TLL (150 mg g^{-1}) caused a decrease of the specific area and pore volumes, to 63 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ and 0.25 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, respectively, as a result of coating of the support surface by the enzyme molecule. However, the immobilization process did not affect the morphology of the support. The obtained biocatalyst was effective for the syntheses of fatty acid ethyl esters (biodiesel), and of aroma esters, showing yields of 68 % and 70 %, respectively, similar to commercial preparations used as controls.

Keywords: Immobead 150; Support characterization; Hydrophobic support; Lipase immobilization; Butyl butyrate; Fatty acid ethyl esters.

1. INTRODUCTION

Enzyme immobilization on solid supports is useful to produce biocatalysis for many fields of applications, such as biotransformations, organic chemistry, and biomedicine (DE ABREU *et al.*, 2014; POPPE *et al.*, 2015b). One of the most important aspects for the development of different supports for enzyme immobilization is their possible reuse in repeated batch cycles or in continuous process (MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014). Supports must present sufficient amount of functional groups on their surfaces, allowing interaction with enzyme molecules. Furthermore, supports should have mechanical and morphological properties that allow their use under industrial conditions, where shear force and temperature stresses are often present. Important aspects that need to be considered, usually interrelated, are the physico-chemical characteristics of the support (available chemical groups, hydrophobicity), and its structural characteristics, such as specific surface area and pore volume and size (BLANCO *et al.*, 2007; GALARNEAU *et al.*, 2006). Concerning the enzyme to be immobilized, the size of the molecule and the concentration of the protein supplied are of great importance for the immobilization protocol. Therefore, properties of immobilized preparations are dependent on both the properties of the enzyme and the support material. The interaction between them provides an immobilized enzyme system showing specific chemical, biochemical, mechanical, and kinetic properties (HOMAEI *et al.*, 2013).

A variety of matrixes have been used as support materials for enzyme immobilization (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014; KLEIN *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2011a; MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2011). Any solid material that contains cavities, channels, or interstices may be regarded as porous, which is a property of major importance for the practical applications of support materials (IUPAC, 1994). According to IUPAC recommendations (IUPAC, 1994), pores with free diameters

smaller than 2 nm are classified as micropores, those in the range of 2 to 50 nm are mesopores, and those larger than 50 nm, macropores. The pore size characterization is important because enzyme molecules having sizes equal to or larger than that of the support pore will produce low immobilization loadings and will simply adsorb on the external surface, creating a poorly operational biocatalyst. In contrast, small molecule enzymes, much smaller than the support porosity, will freely penetrate the pore support (TRAN e BALKUS, 2011). Bosley and Clayton (BOSLEY e CLAYTON, 1994) studied the adsorption of *Mucor miehei* lipase (approximately 5 nm) on controlled-pore glass of eight different pore sizes, functionalized with methyl groups. According to these authors, the pore diameter should be about 5-fold the protein diameter in order to prevent restrictions to the access of the enzyme. However, the immobilization efficiency is independent of pore diameter only for pore sizes bigger than 100 nm (BOSLEY e CLAYTON, 1994).

Another important property of immobilization supports is their hydrophobicity. Supports with more hydrophobic surfaces are very interesting for lipase immobilization because they facilitate enzyme activation on their hydrophobic interfaces (MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014) directing the enzyme approximation to support during the immobilization process (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014). Therefore, lipases recognize the hydrophobicity of the support in a similar way as they do in relation to their natural substrates, fatty acids (GALARNEAU *et al.*, 2006; GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

Supports containing epoxy groups on their surface are among the most widely used for lipase immobilization because these chemical groups are short spacer arms and can react with many nucleophilic groups present on the protein surface (e.g., Lys, Cys, His, Tyr), and, in less extension, with carboxylic groups. In addition, epoxy groups are very stable, making possible to perform long-term incubations of enzyme molecules

under alkaline conditions in order to get a multipoint covalent attachment (e.g., involving a number of Lys residues with a relatively high pK value) (MATEO *et al.*, 2007a). Covalent attachment is common for high surface area support matrixes with large pore diameters, where substrate and product can freely diffuse without enzyme leaching. Unfortunately, the covalent attachment of enzymes to support generally reduces the activity of the enzyme. While these immobilization strategies have their distinct advantages and disadvantages, they can be combined or modified to overcome their limitations to various degrees (TRAN e BALKUS, 2011).

The most common synthetic polymers used as support for enzyme immobilization are represented by acrylic resins, such as Eupergit®-C (HOMAEI *et al.*, 2013). They are macroporous copolymers of N,N'-methylene-bi-(methacrylamide), glycidyl methacrylate, allylglycidyl ether, and methacrylamide, showing average particle sizes around 170 μm and pore diameters of about 20–30 nm. These supports are hydrophilic and stable, both chemically and mechanically, over a large range of pH, and do not swell or shrink even upon exposure to drastic pH changes (HOMAEI *et al.*, 2013). On the other hand, Immobead 150 is a commercial support of methacrylate copolymers with epoxy functions, having an average particle size of 150-300 μm . Although some commercial enzymatic derivatives of this product are available, there are few reports dealing with the enzyme immobilization using this support. Immobead 150 has shown interesting characteristics such as the presence of epoxy groups and the stability of the immobilized enzyme when operated in a continuous-flow reactor (BABICH *et al.*, 2012). However, the morphological, textural, and physico-chemical characteristics of Immobead 150 and the biocatalyst system are not known. It has also been shown that the nature (internal morphology, hydrophobicity of the surface, etc.) of the support may importantly affect the final properties of the immobilized enzyme, such

as its activity, stability, selectivity, and specificity (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014). Therefore, more studies are needed to determine the characteristics and possible applications for this support.

In the light of these considerations, the main objective of this study was to investigate the morphological, textural, and physico-chemical characteristics of Immobead 150 before and after immobilization. We produced a new biocatalyst, where lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) was covalently immobilized on Immobead 150 mediated by the reaction between the surface epoxy groups on the support and Lys groups on the enzyme molecule. In addition, the obtained derivative biocatalyst was applied in two different reaction systems, for the synthesis of fatty acid ethyl esters (biodiesel) and aroma esters production.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Materials

Lipase from *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100 L, soluble form) and TLL immobilized on a silicate support (Lipozyme TL-IM) were kindly provided by Novozymes (Spain). Immobead 150, commercial derivative of TLL immobilized on Immobead 150 (ImmTLLc), ρ -nitrophenylpalmitate (ρ NPP), ρ -nitrophenol (ρ NP), and Rose Bengal were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Hydrolytic Activity of Lipase

The hydrolysis reaction was carried out using ρ NPP. Substrate solution was prepared mixing one volume of 10 mM solution of ρ NPP in 2-propanol with nine

volumes of 10 mM phosphate buffer solution pH 8.0 containing 0.44 % (mass fraction) Triton X-100 and 0.11 % (mass fraction) Arabic gum. The lipase activity was measured using 100 μ L of lipase solution or suspension and 900 μ L of the substrate solution (10 mM ρ NPP) at 55 °C for 2 min. The absorbance of ρ -nitrophenol released was spectrophotometrically monitored at 410 nm. One unit of lipase activity was expressed as the release of 1 μ mol ρ -nitrophenol per minute under the assay conditions. The calibration curve was prepared using ρ -nitrophenol as standard. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

2.3. Protein Determination

Soluble protein was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976) using bovine serum albumin as protein standard (BSA).

2.4. Immobilization multipoint on Immobead 150 with different ionic strengths

1 g of support was resuspended in 10 mL of enzyme solution in different molarities of sodium bicarbonate buffer pH 10.5 (0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.5, and 1 M) at 24 °C for 24 h, under gentle agitation on a roller mix, for multipoint attachment.

After immobilization, successive washings with 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7 was done to remove the excess of enzyme until no activity was detected in the washed fractions. To check the covalent binding, washings with NaCl (1 M) and ethylene glycol (30 % volume fraction) were performed to eliminate ionic and hydrophobic interactions between enzyme and support.

Immobilization efficiency and yields were followed by measuring the hydrolytic activities and the protein concentration in the supernatant solution for all experiments. Immobilization yield was calculated after determining the amount of

enzyme units (Eq. 1) that disappeared from the supernatant and comparing with the initial enzyme concentrations offered to reaction. Immobilization efficiency (Eq. 2) was calculated after determining the activity of the immobilized enzyme and comparing with total residual enzyme activity that remains in the enzyme solution after immobilization and by subtracting this activity from the total starting activity (SHELDON e VAN PELT, 2013).

$$\text{Immobilization yield} = \frac{(\text{total starting activity} - \text{total residual activity})}{\text{total starting activity}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Efficiency} = \frac{\text{observed activity}}{(\text{total starting activity} - \text{total residual activity})} \times 100 \quad (2)$$

2.5. Immobilization with different loads of TLL

The concentration protein per gram of support varied from 10 to 150 mg g⁻¹. 1 g of support was resuspended in 10 mL of enzyme solution in sodium bicarbonate buffer pH 10.5 (10 mM). After the immobilization process, the preparations were submitted to the same successive washings as described above.

2.6. Morphological and Textural Characterization

Images of the support were obtained by scanning electron microscopy (SEM; JEOL, model JSM 6060, Japan) operating at 10 kV. The size distribution was determined using the Quantikov software from the original image containing 294 particles. Textural characteristics of the samples were evaluated by N₂ adsorption-desorption isotherms at 77 K, using the Tristar II Krypton 3020 Micromeritics equipment. Samples were degassed at 40 and 120 °C under vacuum, for

48 and 10 h, respectively. The specific surface areas and pore volume were determined by using the BET (Brunauer–Emmett–Teller) method (LASTOSKIE *et al.*, 1993), whereas the pore size distribution was estimated using the BJH (Barrett-Joyner-Halenda) and DFT (Density Functional Theory) methods (GREGG e SING, 1982).

2.7. Thermal Properties

The thermogravimetric analysis (TGA) was performed using the Shimadzu thermal analyzer Model TA50, from 20 up to 600 °C under an argon atmosphere, at a heating rate of 10 °C min⁻¹.

2.8. Structural Characterization

Changes on the molecular structure of Immobead 150 and ImmTLL were determined by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with a Varian 640-IR spectrometer. Samples were analyzed using the ATR technique. The spectra were obtained at room temperature (25 °C) with 40 accumulative scans and 4 cm⁻¹ of resolution.

2.9. Hydrophobicity of the supports

The surface hydrophobicity of the support was estimated by determining the amount of hydrophobic dye Rose Bengal that was adsorbed on it (DOKTOROVOVA *et al.*, 2012; GUPTA e JABRAIL, 2006). To determine the hydrophobicity, a fixed amount of support (0.1 g) was mixed with 10 mL Rose Bengal solution (20 µg mL⁻¹), and kept under gentle agitation for 3 h. The amount of Rose Bengal adsorbed was then determined by absorbance ($\lambda_{max} = 548$ nm) of the solution after separating it from the

support. The adsorption of the dye was expressed as the relation between the adsorbed dye concentration and the mass of support used.

2.10. Determination of epoxy groups

Epoxy groups (oxirane) in the supports were determined according to the methodology described by Sundberg and Porath (SUNDBERG e PORATH, 1974), with small modifications. Support (0.1 g) was added to 10 mL of 1.3 M sodium thiosulphate solution pH 7.0 and the epoxy content was determined by titration using 0.1 M hydrochloric acid. The amount of epoxy groups was calculated using the amount of HCl that was required to maintain the neutrality of the suspension.

2.11. Reaction of esterification and analysis

Esterification reactions were carried out in 50 mL Erlenmeyer flask using n-hexane as organic solvent. Butyl butyrate was prepared by mixing 0.3 M n-butanol and 0.1 M butyric acid, followed by the addition of the immobilized lipase (40 % by substrate weight) and 2.5 % of water (volume fraction). The mixtures were incubated at 40 °C and 100 rpm for 4 h.

The progress of esterification was monitored by titration determining the residual acid content. Samples were withdrawn (0.5 mL) and diluted in 5 mL of ethanol as quenching agent, and titrated with 0.005 N NaOH using phenolphthalein as the end-point indicator. The amount of ester was calculated as being equivalent to the acid consumed.

2.12. Reaction of transesterification and analysis

In Erlenmeyer flasks, 1 g of soybean oil was mixed with ethanol (6:1 alcohol:soybean oil molar ratio) and 15 % of immobilized lipase, based on oil weight. The reactions were carried out in an orbital shaker at 100 rpm, 37 °C for 4 h. After reaction completion, 2 mL of distilled water was added, followed by centrifugation ($5000 \times g$, 5 min). The upper phase, containing esters, was analyzed by gas chromatography (Shimadzu, model GC-17A) equipped with a flame ionization detector (FID) and DB5 capillary column ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm id} \times 0.25 \text{ mM}$) (J&W Scientific). After samples were accurately weighted, an internal standard stock solution (methyl heptadecanoate in heptane) was added to the sample. The amount of sample injected was 1 μL . The chromatographic conditions were: initial column temperature of 50 °C, heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ until reaching a final temperature of 310 °C. The injector temperature was 300 °C, split ratio 1:30 and the FID detector temperature was 310 °C. The carrier gas used was nitrogen at a flow of 1.0 mL min^{-1} . A standard FAEE (Fatty Acid Ethyl Esters) mix (C4–C24) from Supelco was used to identify the peaks at different retention times and to correct the peak area using the response factors of the compound. The FAEE content was calculated using the compensated normalization method with internal standardization, based on the European standard DIN EN 14103 (STANDARDIZATION, 2001).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Multipoint Immobilization of TLL on Immobead 150 using different ionic strengths and different loads of enzyme.

The influences of the molarity of buffer on the immobilization yield and the efficiency of TLL preparations using 20 mg g^{-1} of protein on Immobead 150 are

presented in Figure 1. The increase in molarity caused a gradual decrease in immobilization efficiency. Therefore, the 10 mM buffer produced the best results in terms of efficiency, without causing any losses in yields of immobilization. According to Barbosa *et al.* (BARBOSA *et al.*, 2011), lipases are expected to be immobilized in low ionic strength environments involving the hydrophobic areas surrounding their active sites, which would allow the interfacial activation of the molecule. Moreover, at low ionic strengths, there is a reduction of lipase aggregation caused by reduced hydrophobic interactions, which allows better efficiency after immobilization (see Fig. S1 in the Supporting Information).

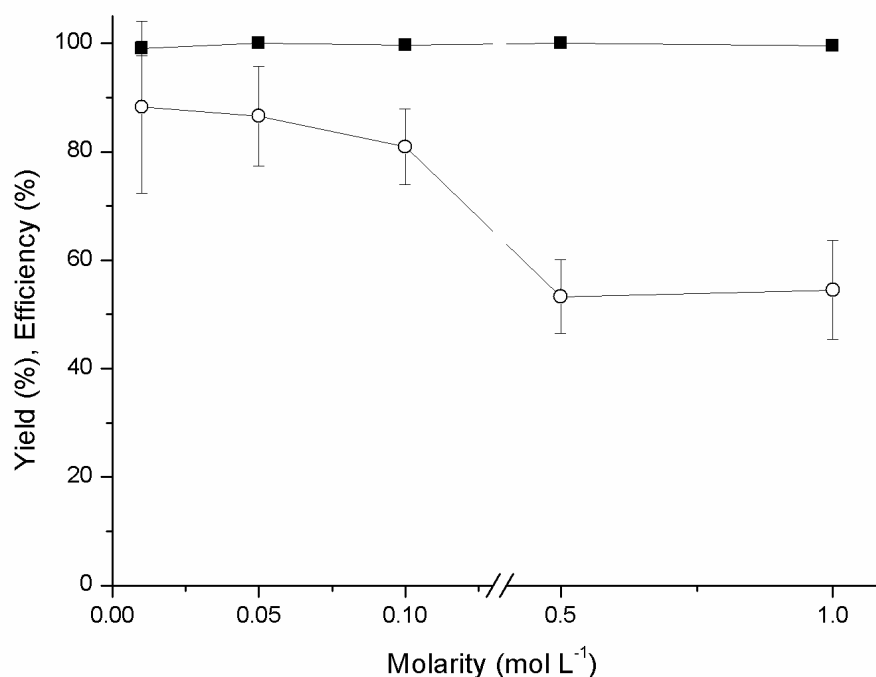


Figure 1. Variations of molarity of the immobilization buffer. Conditions: Immobead 150 and protein load of 20 mg g⁻¹ of TLL, sodium bicarbonate buffer pH 10.5 at 24 °C for 24 h (ImmTLL). Results are expressed in terms of percentages of yield (■), and efficiency (○). The results are the mean of triplicates.

The influence of the amount of protein loading on the yield and the efficiency of TLL preparations are shown in Figure 2. The results indicate that the highest immobilization yield and efficiency were observed using low protein concentrations,

but the efficiencies ($76 \pm 4 \%$) remained high up to a load of 150 mg protein. These results correlates well with previous reports on the literature (MATTE *et al.*, 2014), in which, using the same protocol but 1 M immobilization buffer and protein loads varying from 5 to 20 mg g^{-1} , it was observed a decrease in the efficiency inversely proportional to protein load. This loss of efficiency can be attributed to high ionic strength of the immobilization buffer, possibly causing the aggregation of the protein.

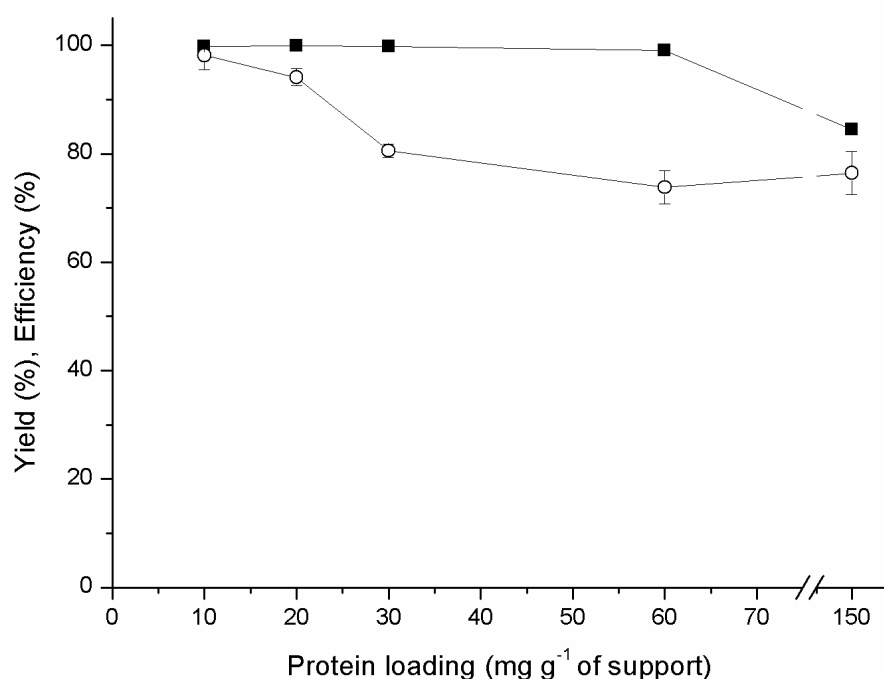


Figure 2. Effect of protein loading on ImmTLL. Results are expressed in terms of percentages of yield (■), and efficiency (○). The results are the mean of triplicates.

Therefore, the enzyme load of 150 mg enzyme per gram of support was selected for further experiments because of the higher activity of the immobilized derivative obtained by this condition.

3.2. Morphological and textural characterization

The SEM analysis highlights the morphology of Immobead 150 before and after immobilization (Figure 3A and 3B, respectively), showing that Immobead 150 has a spherical form and presents a scattered variation in particle sizes. The size distribution histogram is depicted in Figure 3C. The average estimated diameter was 155 μm , with a standard deviation of 37 μm , for Immobead 150 with or without enzyme. The morphology of the support was not changed either before or after the immobilization.

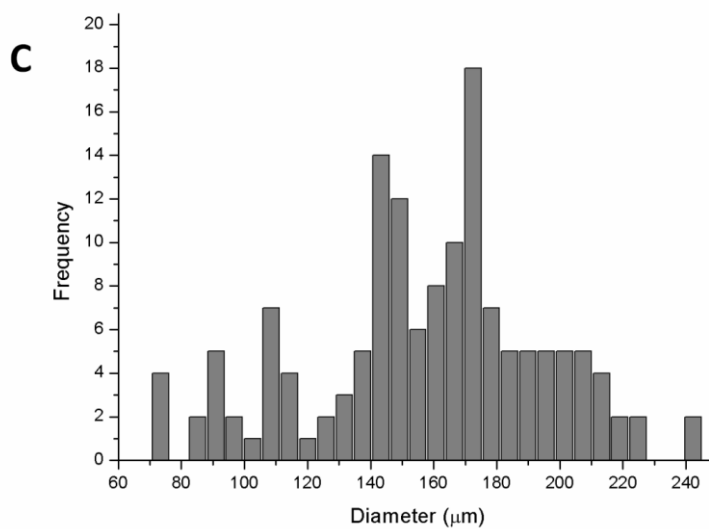
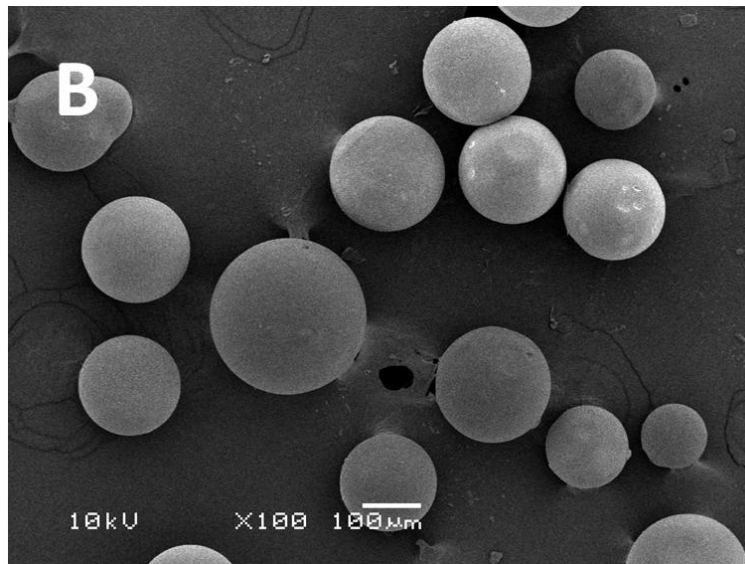
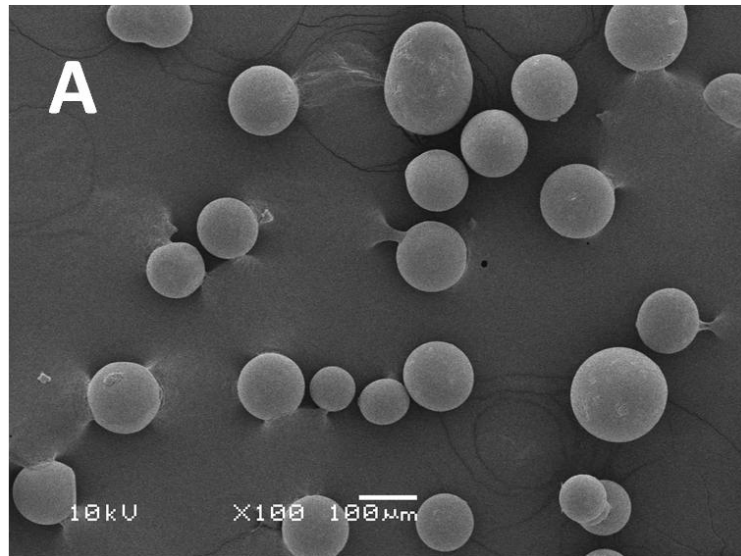


Figure 3. Morphological characterization of supports. Scanning electron micrograph (10 kV; 100×): (A) Immobead 150; (B) ImmTLL; (C) size distribution of Immobead 150.

The N₂ adsorption–desorption isotherms of Immo bead 150 are shown in Figure 4A. The isotherms are of type-IV, according to Brunauer *et al.* (BRUNAUER *et al.*, 1940), which corresponds to a mesoporous material. The immobilization process affected the specific surface area, which decreased from 137 ± 5 to 63 ± 5 m² g⁻¹. Although the adsorbed gases in the support were removed before analysis by degassing at 40 °C and 120 °C, the specific surface area results did not show differences between the samples at different temperatures of degassing. Sharma *et al.* (2014) (SHARMA *et al.*, 2014) investigated the specific area of Immo bead 150 and Immo bead 150-*Candida Antarctica* B lipase using degassing at 60 °C for 1 h, where they showed a surface area of around 218 and 118 m² g⁻¹, respectively. The differences between the results of their work and the values obtained by us suggest a non-uniformity of this commercial support.

The micropore size distribution curves (Figure 4B), calculated by DFT method, shows that the support has micropores in the region between 1.2 and 2 nm. The micropore size distribution curve shows a similar profile in the derivative after immobilization, but the number of pores and their volumes are reduced after the immobilization process. This support is a slightly porous material, as defined by the BJH assay, showing cumulative pore volume of 0.37 ± 0.01 cm³ g⁻¹ before immobilization and 0.25 ± 0.01 cm³ g⁻¹ after immobilization. Comparatively, silica MS-3030 presents a mean pore volume of 2.9 cm³ g⁻¹ (BLANCO *et al.*, 2004), polypropylene powder Accurel MP 1000 of 1.9 cm³ g⁻¹ (DUTRA MADALOZZO *et al.*, 2014) and macroporous polypropylene Accurel MP1004 of 2 cm³ g⁻¹ (SALIS *et al.*, 2008), both having higher porosities than Immo bead 150. On the other hand, meso-structured onion-like silica presents a pore volume of 0.2 cm³ g⁻¹ (JUN *et al.*, 2012) and

chitosan macroparticles only $0.1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (KLEIN *et al.*, 2012), very low porosities when compared to Immobead 150.

Diffusional restrictions of substrate may be influenced by particle size and pore diameter (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2008). A disordered network of pores and channels would only allow the smallest substrates to penetrate the biocatalyst, whereas bigger substrates would obstruct the channels, slowing down the reactions. Thus, a heterogeneous pore size distribution interferes not only with the enzyme load on the internal surfaces, but also with the diffusion of substrates and/or products (BLANCO *et al.*, 2004). Immobead 150 did not show a unique pore profile (Figure 4C), presenting pores throughout the mesoporous region, being more prominent the pores of smaller size. Thus, observing the textural data from the support before and after immobilization we can say that the most affected pores are those smaller than 20 nm, thus the enzyme should be immobilized preferably blocking the smaller pores of the support.

Serra *et al.* (SERRA *et al.*, 2008) investigated the immobilization of lipase from *Candida antarctica* B in mesoporous materials having different pore sizes. They found that, during the adsorption process, diffusion limitations occurred when the pore size was similar to the enzyme size, but these drawbacks disappeared when the pore diameter was around twice as large as the enzyme molecule dimension (SERRA *et al.*, 2008). According to the protein structure explorer (PDB, 1dt5) (BRZOWSKI *et al.*, 2000), the size of the *T. lanuginosus* lipase molecule is around 5 nm, and this molecular size can drastically reduce pore volume when the enzyme penetrates it, or even totally block the micropore and part of mesopore area. Therefore, comparing data from the literature with our results, we can suggest that increasing enzyme load will induce a

large amount of enzyme to penetrate the pores of the support, thus blocking them, causing a reduced efficiency of immobilization as shown in Figure 2.

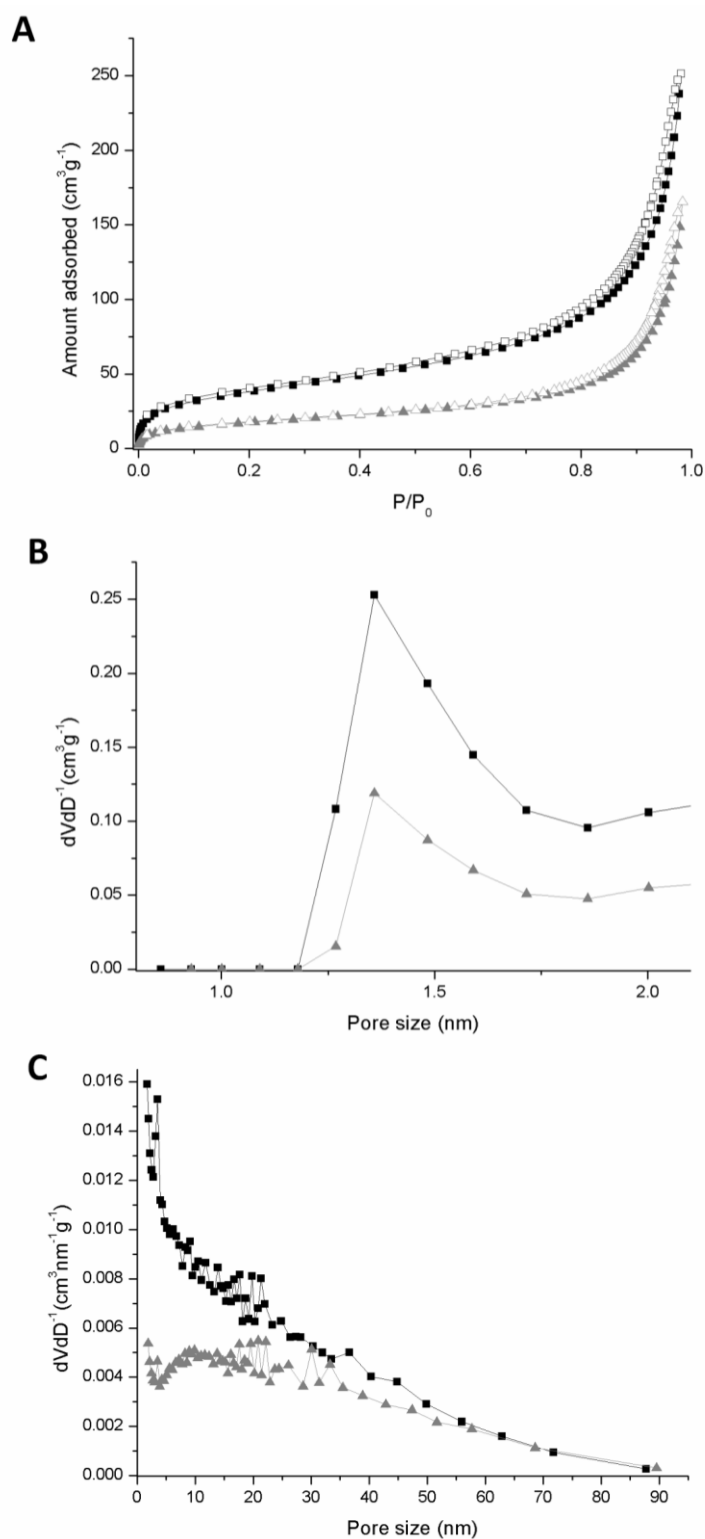


Figure 4. Textural characterization of supports: (A) N₂ adsorption (■,▲) and desorption (□,△) isotherms; (B) DFT micropore size distribution; (C) BJH pore size distribution; (■ and black line)

represents the support Immobead 150 before immobilization; (▲ and gray line) represents the derivative (ImmTLL).

3.3. Thermal Properties

The TGA analysis of the support, depicted in Figure 5A, showed that the particles were thermally stable at least up to 200 °C, which is much higher than the temperature used for most of enzymatic reactions. The weight loss of particles between 200 °C and 450 °C is related to the polymer (Immobead 150) decomposition.

It was observed a loss of weight around 5 % between 20 and 150 °C, probably caused by the water desorption from samples. The fact that this support has a small associated amount of water is remarkable in the sense that enzyme stability can be greatly enhanced when exposed to organic solvents and ionic liquids, as it was observed in a previous work (MATTE *et al.*, 2014). The control of water content on enzymatic synthesis reactions is important because this fact can affect the reaction either positively or negatively. Water acts as a ‘lubricant’, maintaining the enzyme in the active conformation. On the other hand, water can also promote the hydrolysis of the substrate, thus decreasing the yield of products (BABICH *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2008). These effects are dependent on the amount of water present in the reaction, as it has been demonstrated by Rodrigues *et al.* (RODRIGUES *et al.*, 2008), who showed that a small amount of water (6.5 % by weight of oil) presented a positive effect in the biodiesel synthesis.

3.4. Structural Characterization

FTIR spectra of Immobead 150 and ImmTLL are presented in Figure 5B. The broad band between 3,100 and 3,700 cm^{-1} is attributed to the O–H stretching vibration, mainly from water, which overlaps the amine stretching vibrations (N–H) in the same

region. The bands between 2,800 and 3,000 cm^{-1} are attributed to the C–H stretching vibration (Front Matter, 1990), whereas the strong sharp peak at 1,700 cm^{-1} corresponds to carbonyl group of the carboxylic acid functional group (SHARMA *et al.*, 2014). The peak at 1,500 cm^{-1} is for the bending vibration of free amine present in the enzyme and peaks ranging from 1,200 to 600 cm^{-1} indicate the finger print region and are characteristic of Immobead 150 (SHARMA *et al.*, 2014).

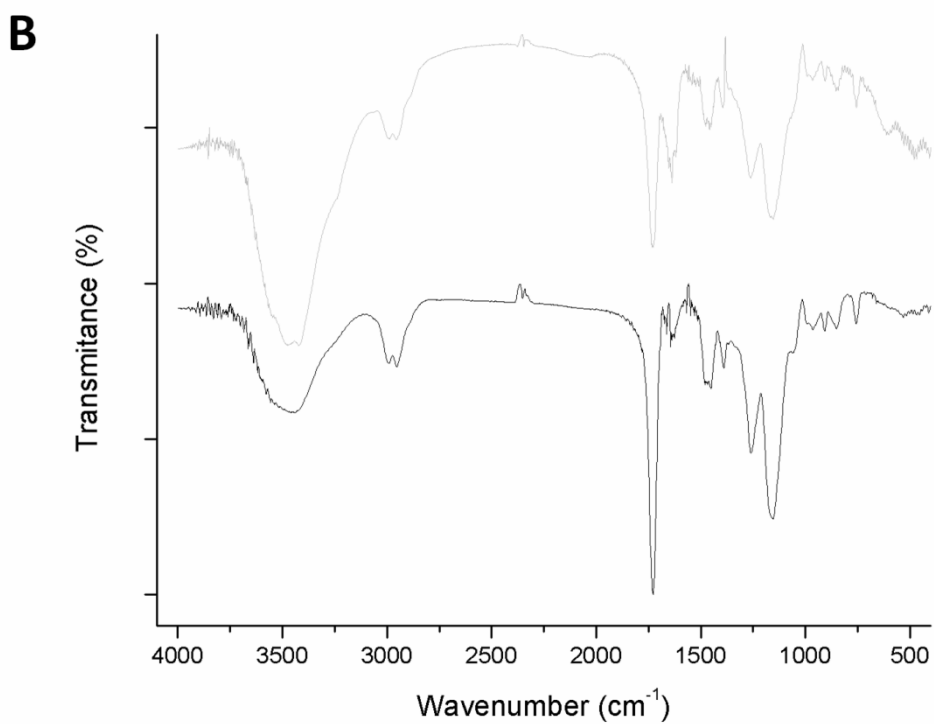
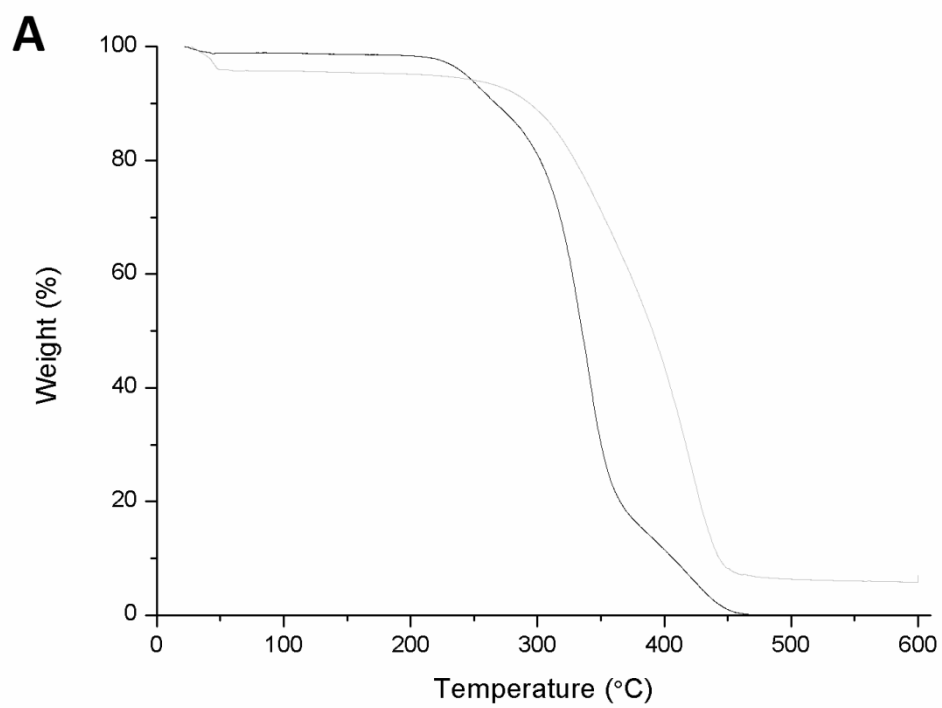


Figure 5. TGA curves (Figure A) and FTIR spectra (Figure B) of Immobead 150 (black line), and ImmTLL (gray line).

3.5. Determination of epoxy groups

The Immobead 150 presented about 1,000 μmol epoxy groups per gram of support. Bezbradica *et al.* (BEZBRADICA *et al.*, 2009) studied other commercial epoxy supports, Eupergit® and Eupergit C 250L, which presented around 600 and 250 $\mu\text{mol g}^{-1}$, respectively. We can observe in Figure 6 that the immobilization of 150 mg g^{-1} of TLL in Immobead 150 (ImmTLL) reduced about 50 % of the available epoxy groups. Concerning the use of glycine, the reagent was capable of blocking the epoxy groups, thus the support presented properties similar to those of the commercial control (ImmTLLc) (MATEO *et al.*, 2002).

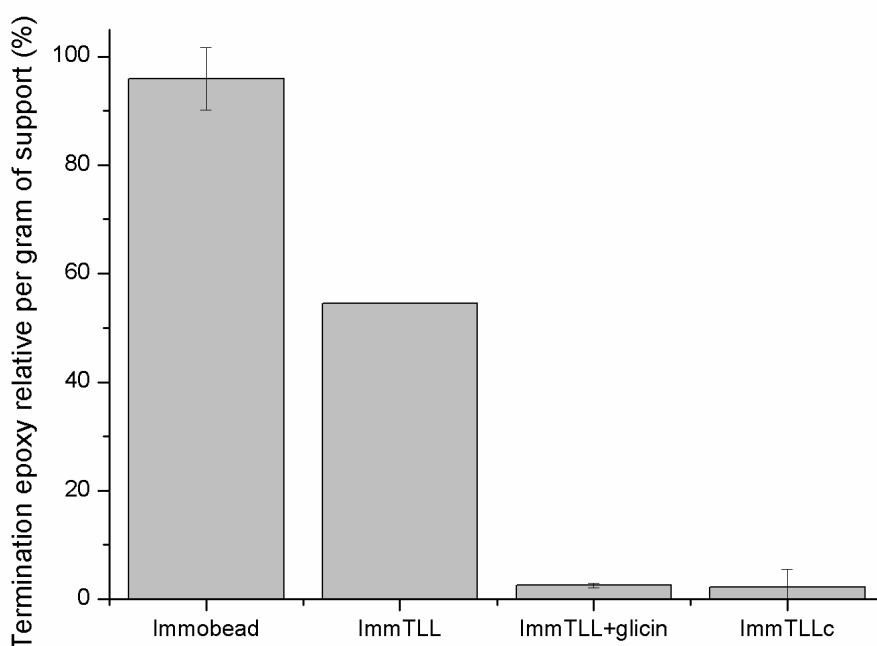


Figure 6. Relative comparison of the number of epoxy groups on the surface of Immobead 150. Results are the mean of triplicates.

3.6. Hydrophobicity of the supports

The immobilization caused only a small decrease in the original hydrophobicity of the support, differently of the commercial derivative of Immobead 150 (ImmTLLc), which presented a reduction in hydrophobicity of almost eight times

(Figure 7). We also compared the hydrophobicity with other commercial supports widely studied for the immobilization of lipases, such as Octyl Sepharose and styrene-divinylbenzene beads (MCI GEL CHP 20P, Supelco). Compared to them, the Immobead 150 presented the highest hydrophobicity (Figure 7).

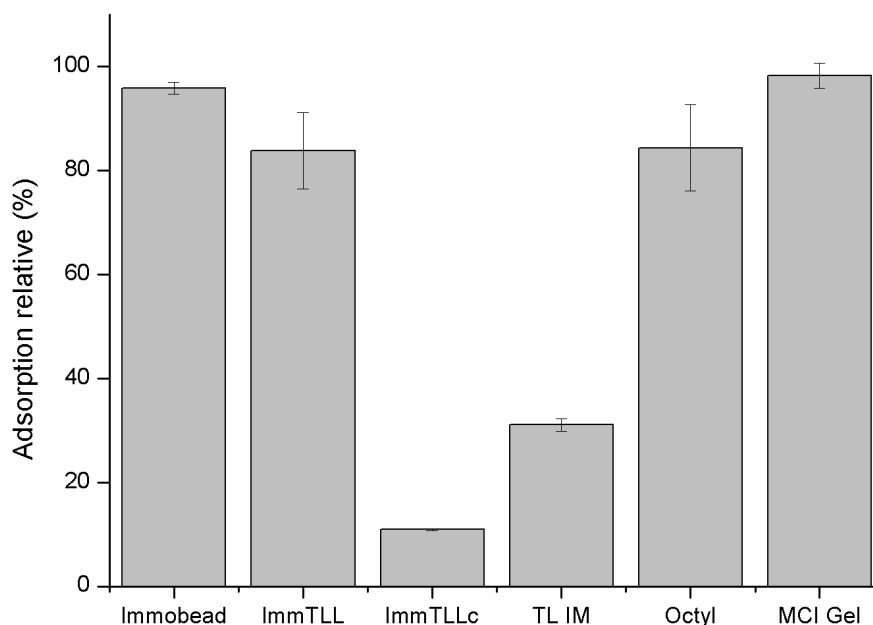


Figure 7. Relative adsorption of hydrophobic marker Rose Bengal by supports. Results are the mean of triplicates.

The effects caused by the hydrophobicity of supports on the activity recovery, after immobilization, of different enzymes vary considerably. Enzymes such as β -galactosidase from *A. oryzae* and epoxide hydrolase from *A. niger*, when immobilized on hydrophobic epoxy supports, were fully inactivated or retained only 30 % of their activities, respectively (MATEO *et al.*, 2007a).

Although high hydrophobicity of the support generally enhances activity recovery in the immobilization process of lipases, it presented a problem in the case of meso- and macroporous supports. This is because the buffered aqueous solution containing the enzyme should reach the whole surface of the support, both the external

as well as the inner surface of the pore channels. The access to the internal structure can be limited by the wettability of the support, thus for very hydrophobic surfaces the aqueous phase could not diffuse into the pores, reaching only the external part of the channel (BLANCO *et al.*, 2007). Thus, this property has a significant influence on the distribution of enzyme molecules in the support. In this case, the biocatalyst particle would only contain enzyme molecules in the outside surface, whereas the inner channels would remain empty, as confirmed by results of morphological and textural characterization.

3.7. Reactions of esterification and transesterification

In order to test the new biocatalyst prepared in this work, we applied the immobilized lipase in Immobead 150 for the synthesis of aroma esters and fatty acid ethyl esters (biodiesel), and compared the results for commercial enzymes (Figure 8A and B). The synthesis of aroma esters such as butyl butyrate (pineapple flavor) was chosen as a study model because of its importance in the food industry.

ImmTLL was compared with the commercial TLL preparations as Lipozyme TL-IM and commercial derivative of Immobead 150 (ImmTLLc) for the synthesis of butyl butyrate (Figure 8A) and fatty acid ethyl esters (Figure 8B). Results show that all preparations presented similar performances, producing approximately 70 % yield of synthesis in the short reaction time of 4 h. Under optimized conditions, the commercial Lipozyme TL-IM and the MCI Gel CHP20P support immobilized with 120 mg g⁻¹ of TLL, showed yields around 60 and 80 % of butyl butyrate after 4 h, respectively (MARTINS *et al.*, 2013). Commercial Lipozyme TL-IM derivative showed lower than 20 % fatty acid ethyl esters yields when used with olive and palm oil (TOFTGAARD PEDERSEN *et al.*, 2014). These results demonstrate the potential applicability of the

support Immobead 150 with TLL immobilized via multipoint attachment for esterification and transesterification reactions.

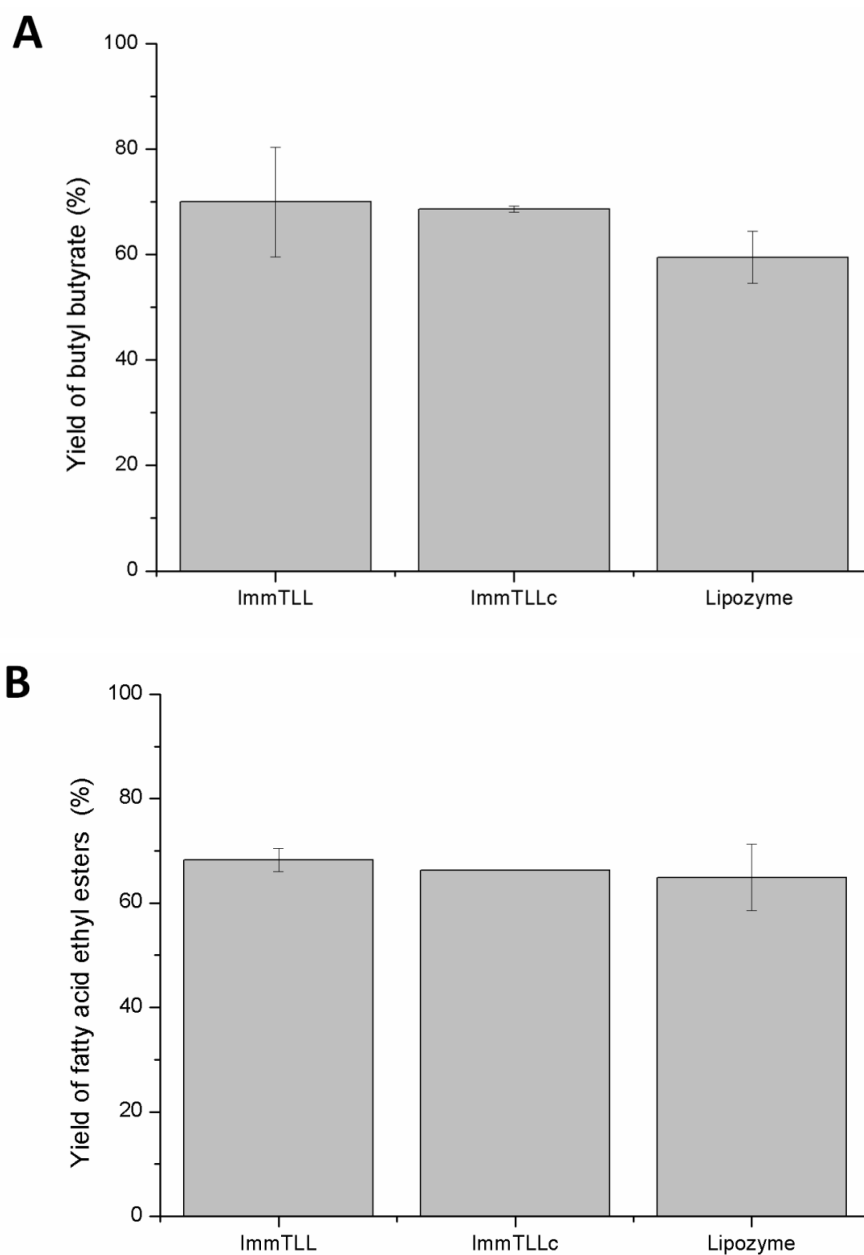


Figure 8. Butyl butyrate synthesis and fatty acid ethyl esters synthesis. Controls: commercial TLL immobilized in supports Immobead 150 and Lipozyme TL IM. Results are the mean of duplicates.

4. CONCLUSIONS

One of the most common methods for optimizing the use of enzymes in several applications is the immobilization technique, which allows their reuse and eases the

recovery of the biocatalyst and products. Immobilization depends upon the choice of the enzyme and support, and the methods used for the immobilization itself. It is, therefore, of fundamental importance to understand the characteristics of the support in order to develop appropriate immobilization techniques. In this work, the morphological and physico-chemical characteristics of Immobead 150 were elucidated using different techniques. The spherical particles of Immobead 150 presented wide pore size range, showing pores in the region of micro and mesopores. The Immobead 150 support appears to be very interesting for the immobilization of lipases, especially because of its epoxy groups, high hydrophobicity, and thermal stability. Using multipoint attachment through external Lys residues of TLL and epoxy groups of Immobead 150, we produced a biocatalyst possessing similar properties of commercial derivatives concerning the synthesis of aromas and fatty acid ethyl esters. Further studies are granted to evaluate the reuse of this biocatalyst system, as for instance in enzymatic continuous reactors, for these and other applications.

Supporting Information:

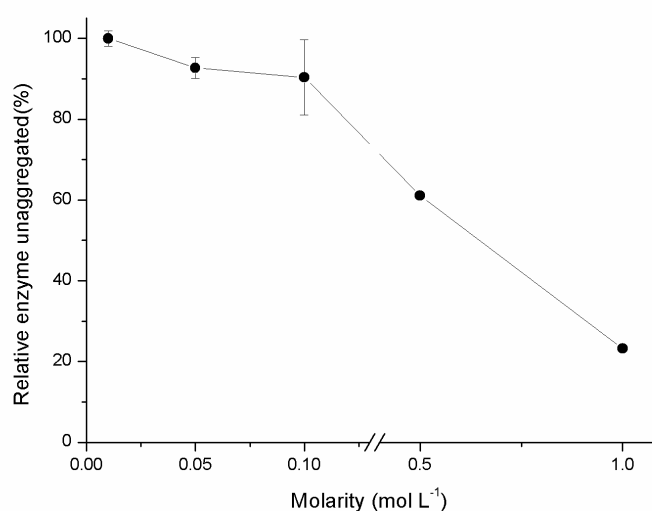


Figure S1. Activity of the enzyme solution submitted to centrifugation at $3,000 \times g$, 5 min, 4 °C using an ultrafiltration device (Amicon 50 kDa) in different immobilization buffers. The results are the mean of duplicates.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). The first author acknowledges the scholarship from CNPq.

Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150

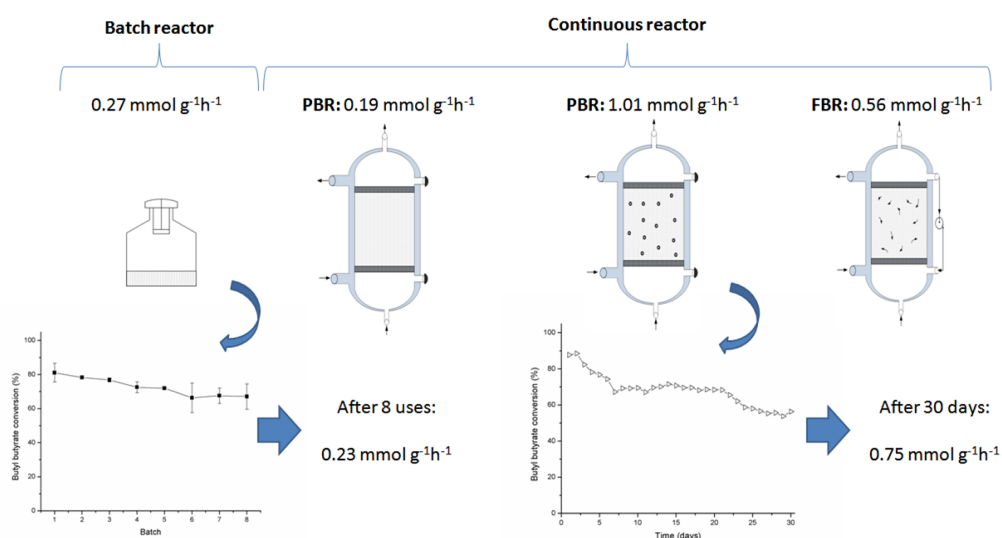
Carla R. Matte¹, Carolina Bordinhão¹, Jakeline K. Poppe¹, Rafael C. Rodrigues¹, Plinho F. Hertz¹, Marco A. Z. Ayub^{1*}

¹ Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil;

*Corresponding author. Food Science & Technology Institute (ICTA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa-Postal: 15095, CEP91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Phone: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.

E-mail address: mazayub@ufrgs.br

Website: www.ufrgs.br/bbb



Scheme 3. Graphical abstract

ABSTRACT

Thermomyces lanuginosus lipase (TLL) was covalently immobilized on Immobead 150 (ImmTLL) via epoxy groups of the support and the lysine of the enzyme to be used in the synthesis of butyl butyrate. The optimization of the esterification reaction parameters was carried out by central composite design and response surface methodology, having product yield as target, with all tested variables showing to be statistically significant on the conversion. The optimal conditions for butyl butyrate synthesis were: temperature of 40 °C, substrate molar ratio of 3:1 butanol:butiric acid, 40 % of enzyme amount in relation to substrate weight, and 2.5 % of water (volume fraction of reaction), using hexane as solvent. Under these conditions, over 84 % of conversion was obtained after 4 h of reaction in a batch reactor, with a productivity of 0.27 mmol g⁻¹ h⁻¹ per gram of derivative. The butyl butyrate synthesis was also evaluated in a continuous reactor, using two configurations: packed-bed reactor (PBR) and fluidized-bed reactor (FBR). The highest productivity per gram of derivative in the continuous process was 1.01 mmol g⁻¹ h⁻¹, reached using the PBR containing 1.5 g of ImmTLL and glass beads. The biocatalyst presented operational stability at 40 °C, maintaining 83 % of its initial conversion capacity after 8 cycles of reuse in batch reactor and 63 % after 30 days of continuous operation in the PBR, using a flow rate of 0.02 mL min⁻¹. These results suggest that this immobilized system can be successfully used to produce butyl butyrate for food, cosmetics, and for pharmaceutical applications.

Keywords: Immobilized lipase; Butyl butyrate synthesis; Batch reactor; Continuous Packed-bed and Fluidized-bed reactors; Comparison of different reactor systems.

1. INTRODUCTION

Flavor esters are the enzyme-mediated reaction product of short-chains alcohols and carboxylic acids, usually present in natural sources, such as fruits, flowers, and fermented products. Butyrate esters are components of fruit flavor esters, such as butyl butyrate, the prevalent ester present in pineapple flavor (LORENZONI *et al.*, 2012). Fruit flavor esters are important aromas used in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries and their commercial productions and applications are growing (BERGER, 2009).

Flavor esters can be obtained directly from their natural sources, a technique that is relatively expensive when extracted from plants or produced by fermentation. Their chemical synthesis, on the other hand, is cheaper and faster, and it is commonly used for commercial purposes (ESCANDELL *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2001). However, the investigation of alternative flavor esters production technologies, which could be more sustainable and cheaper, is increasing (ESCANDELL *et al.*, 2015). Enzymatic biocatalysis reactions for flavor synthesis have gained special attention, mainly because of the high specificity of the enzymes, being the lipases the most adequate esterification biocatalysts for various processes (DOUKYU e OGINO, 2010; ESCANDELL *et al.*, 2015).

Lipases (EC 3.1.1.3) are enzymes showing high catalytic activity, mainly produced by several microorganisms. In particular, the lipase produced by the fungus *Thermomyces lanuginosus* (TLL) is obtained in industrial scale and commercialized in soluble form by Novozymes (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). There are alternatives to improve the catalytic activity and operational stability of these industrial enzymes, in order to make the enzymatic processes cost-competitive with the chemical technology, among them, one of the most successful has been the immobilization of the enzyme. This

process is known to allow better operational control, easier product recovery, flexibility of reactor design, and, in some cases, to enhance operational, thermal, and conformational enzyme stability (DAMNJANOVIĆ *et al.*, 2012; PIRES-CABRAL *et al.*, 2010; ROMDHANE *et al.*, 2013). The interaction of molecules depending on the immobilization protocol, the characteristics of the support, and the type of chemical bond between the enzyme and the support, will provide a complex immobilized enzyme (the derivative) having specific properties (BARBOSA *et al.*, 2015; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015). An important characteristic of lipases is their mechanism of interfacial activation, where in the presence of a hydrophobic interface, the lid moves exposing the active center of the lipase to the medium, and this open form becomes adsorbed to the hydrophobic surface (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000). The use of this mechanism has been proposed as a way to obtain immobilized lipases on hydrophobic supports using low ionic strength in the immobilization (DE ABREU *et al.*, 2014; PALOMO *et al.*, 2002).

A variety of matrices have been used as support materials for lipase immobilization (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014; MIHAILOVIĆ *et al.*, 2014). Immobead 150 has been used as support for the covalent immobilization of the enzyme (MATTE *et al.*, 2014). We have shown that this support presents approximately 1,000 μmol of epoxy groups per gram of support, has a high hydrophobicity, and is remarkably thermal stable. The spherical particles of Immobead 150 present a diameter of around 155 μm , a specific surface area of 137 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ and pore volumes of 0.37 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, showing pores in the region of the micro and meso sizes (MATTE, 2015).

The use of immobilized lipase facilitates the development of industrial scale processes, favoring biotechnological processes in which the reactions can be carried out with increased productivity (POPPE *et al.*, 2015a). There are basically four

configurations of enzymatic reactors described in the literature. These are the batch reactors; the packed-bed column reactors (PBR); the fluidized-bed column reactor (FBR); and basket reactors (GUISAN, 2006). The selection of an appropriate reactor configuration, along with the operating conditions are important aspects allowing industrial enzymatic syntheses to obtain high productive results (SAPONJIĆ *et al.*, 2010).

Batch reactors are the most commonly technology used in enzymatic processes. The batch reactor is a simple bioreactor configuration, basically a tank equipped with temperature control, and a stirring system allowing the biocatalyst particles to be dispersed in the solution of substrate (POPPE *et al.*, 2015a). Moreover, some studies have shown that the use of immobilized lipases in continuous reactors significantly reduce the impact of catalyst costs on the product (SÉVERAC *et al.*, 2011). One of the commonest continuous reactor used in biotechnology is the PBR, in which the immobilized enzymes are packed in a column through which a reactant solution is pumped. In addition to its ease operation, scaling up, and high bed volume, PBRs have the advantage of lowering the shear stress on the immobilized enzymes, generally leading to long-term enzyme stability (HAMA *et al.*, 2011). On the other hand, FBR consists of particles within a column that are kept in movement (fluidization). In comparison to PBRs, FBRs are less susceptible to column clogging, formation of preferential flow paths, and column compressions (LORENZONI *et al.*, 2015).

Several types of reactors have been studied with immobilized lipases (DAHLAN *et al.*, 2005; ESCANDELL *et al.*, 2015; HAMA *et al.*, 2011; HAMA *et al.*, 2013; SÉVERAC *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011). Notwithstanding, information on reactor applications for ester synthesis is underexplored in the literature (DAMNJANOVIĆ *et al.*, 2012). In this context, the aim of this work was to optimize

the synthesis of butyl butyrate catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase covalently immobilized on Immobead 150 (ImmTLL). The experimental approach was to use the central composite design and the response surface methodology analysis to find out the best reaction conditions. The reaction parameters, including temperature, substrate molar ratio, enzyme concentration, and water content, were analyzed to establish the relationship among them and the reaction yield. Finally, it was evaluated the best reactor design to be used, by comparing batch reactor, PBR, and FBR, and relating the reaction flow, yield, and productivity. In addition to these comparisons, we also investigated the operational stability of the biocatalyst in continuous reactions and repeated batches.

2. METHODS

2.1 Materials

Lipase from *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100 L, soluble form) was purchased from Novozymes (Brazil). The support Immobead 150, butyric acid, n-butanol, p-nitrophenyl palmitate (pNPP) and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Multipoint immobilization of TLL on Immobead 150

For the enzyme immobilization, 1 g of Immobead 150 support was resuspended into 10 mL of enzyme solution containing 150 mg of total protein (measured by the Bradford method) in 10 mM sodium bicarbonate buffer pH 10.5, and incubated at 24 °C for 24 h, under gentle agitation on a roller mix, according to the methodology described in a previous work (MATTE *et al.*, 2014). To check the covalent binding, washings with NaCl (1 M) and ethylene glycol (30 % volume fraction) were carried out.

After the immobilization process, the immobilized enzyme was separated from the medium by vacuum filtration using a sintered glass funnel and dried in refrigerator at 8 °C. This preparation was named ImmTLL. The lipolytic activities of the supernatant and the enzymatic derivative were determined using the pNPP assay for calculation of yield and efficiency (MATTE *et al.*, 2014).

2.3 Reaction of esterification and products assay

Esterification reactions using ImmTLL were carried out in 50 mL Erlenmeyer flask using hexane as the organic solvent in a reaction volume of 10 mL. The reaction of enzymatic synthesis of butyl butyrate was prepared by mixing n-butanol 0.3 M with butyric acid 0.1 M, 0.5 mL of water, followed by the addition of the immobilized lipase (30 % by substrate weight). The mixtures were incubated at 45 °C for 6 h at 150 rpm. This reaction conditions were optimized using central composite designs (CCD).

The progress of esterification was monitored by titration, determining the residual acid content. Samples (0.5 mL) were withdrawn and diluted in 5 mL of ethanol as quenching agent, and titrated using 0.005 M NaOH having phenolphthalein as the end-point indicator. The amount of ester was calculated as being equivalent to the consumed acid.

The efficiency of esterification (in percentage) was calculated from the concentration of acid consumed in the reaction mixture, and determined from the values obtained in the titration for both the blank (control) and test sample, using equation 1:

$$\text{Esterification yield (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

Where C_0 represents the concentration of free fatty acid residues at 0 h and C the concentration of free fatty acid residues after time t .

The enzymatic productivity, P_{ImmTLL} , was defined as the total amount of butyl butyrate produced per h per g of ImmTLL. P_{ImmTLL} of the enzyme was calculated using Eq. (2):

$$P_{\text{ImmTLL}} = \frac{[BB] \times V_R}{t \times m_d} \quad (2)$$

where [BB] is the total concentration of butyl butyrate produced in mmol L^{-1} ; V_R is the reactor volume (L); t is the reaction time (h); and m_d is the mass of derivative used (g).

2.4 Effect of different organic solvents and substrate molarities

Solvents with different log P, acetonitrile (-0.33), acetone (-0.23), iso-propanol (0.8), hexane (3.5), heptane (4.0), and iso-octane (4.5) (LAANE *et al.*, 1987), were tested concerning their effects on the esterification reaction. The reactions were carried out by mixing 9.38 mL of the tested solvent with 0.3 M n-butanol, 0.1 M butyric acid, 0.25 mL of water, followed by the addition of the ImmTLL (30 % by substrate weight), to a final reaction volume of 10 mL. The mixtures were incubated at 45 °C for 6 h at 150 rpm. The degree of esterification followed the same procedure described in item 2.3.

In order to test the effect of substrate molarities (acid and alcohol) in the conversion of butyl butyrate were varied the concentration from 25 to 1,750 mM, using the same reaction conditions of esterification with hexane as solvent. Initial reaction rates were measured by sampling the reaction mixture during the first hour and determining the slope from curve of product versus time.

2.5 Reaction optimization

A central composite design (CCD) with four independent variables was carried out in order to obtain the optimal conditions for esterification reactions. The variables and their coded and uncoded values are presented in Table 1. In Table 2 are presented the 28 treatments of the four variables, each at five levels. The design was constructed of 16 factorial points, eight axial points (two axial points on the axis of design variable), and four replicas of the central point. The yields of conversion for esterification of butyl butyrate were determined.

Table 1. Process variables and their levels used in CCD

Variable	Name	Coded level				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	Temperature (°C)	30	37.5	45	52.5	60
X ₂	Substrate molar ratio					
	(butyric acid:butanol)	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
X ₃	Enzyme content					
	(% by weight of substrate)	10	20	30	40	50
X ₄	Added water (%)	0	2.5	5	7.5	1.0

Table 2. Experimental design and results of CCD

Treatment	X₁	X₂	X₃	X₄	Conversion (%)
1	-1	-1	-1	-1	43.9
2	-1	-1	-1	1	35.6
3	-1	-1	1	-1	70.2
4	-1	-1	1	1	70.6
5	-1	1	-1	-1	41.3
6	-1	1	-1	1	44.8
7	-1	1	1	-1	67.6
8	-1	1	1	1	65.1
9	1	-1	-1	-1	5.0
10	1	-1	-1	1	0.0
11	1	-1	1	-1	55.8
12	1	-1	1	1	50.9
13	1	1	-1	-1	3.5
14	1	1	-1	1	1.7
15	1	1	1	-1	4.4
16	1	1	1	1	10.2
17	-2	0	0	0	64.8
18	2	0	0	0	8.3
19	0	-2	0	0	58.2
20	0	2	0	0	65.3
21	0	0	-2	0	20.3
22	0	0	2	0	86.2
23	0	0	0	-2	88.5
24	0	0	0	2	66.4
25	0	0	0	0	74.6
26	0	0	0	0	74.8
27	0	0	0	0	74.9
28	0	0	0	0	74.9

The second-order polynomial equation for the variables was given by equation (3):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (3)$$

Where Y is the dependent variable (response variable), β_0 the constant, β_i , β_{ii} , and β_{ij} are the coefficients for the linear, quadratic, and for the interaction effects, respectively, and X_i and X_j the coded level of variables x_i and x_j , respectively. The above quadratic equation was used to plot surfaces for all variables. The experimental design and analysis of results were carried out using the software Statistica12 (Statsoft, USA). The variance explained by model was given by the multiple determination coefficients, R^2 . The quadratic models were represented as contour plots (2D).

2.6 Reuse of ImmTLL in repeated batches

ImmTLL was tested in repeated batches under the optimal reaction conditions (temperature, 40 °C; substrate molar ratio, 1:3; enzyme amount, 40 %; and initial added water, 2.5 %; using hexane as solvent). Successive reuses were performed. At the end of each batch, the biocatalyst was washed using 10 mL of n-hexane (three times) in order to remove any product and unreacted material (LORENZONI *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2011). After this, the biocatalyst was used in a new reaction.

2.7 System setup of continuous reactors for synthesis of butyl butyrate

For the study of continuous reactors operations, we designed and constructed reactors consisting of a glass tube with 65 mm of high and 10 mm of inner diameter, equipped with water-jacket for temperature control (at 40 °C). Two operation modes were tested by controlling the flow rate: packed-bed reactor (PBR) and fluidized-bed

reactor (FBR). The composition of feed substrate was kept the same obtained in the optimization (acid to butanol molar ratio 1: 3, at 1.5 mol L⁻¹ and 2.5 % water using hexane as solvent). To determine the effect of the flow rate, the substrate solution was pumped into the column at different flow rates (0.02 up to 1.3 mL min⁻¹). The column reactor was fed from bottom to top. A sintered glass disk retained the particles within the column. Because of the reduced size particle of ImmTLL, glass beads (about 3 mm diameter) were mixed with the immobilized enzyme in the PBR in order to avoid the bed compaction. The FBR was equipped with a pump for external liquid recirculation. This design enables fluidization of the biocatalysts independent of the residence time. Schematics of reactors configurations are illustrated in Figure 1.

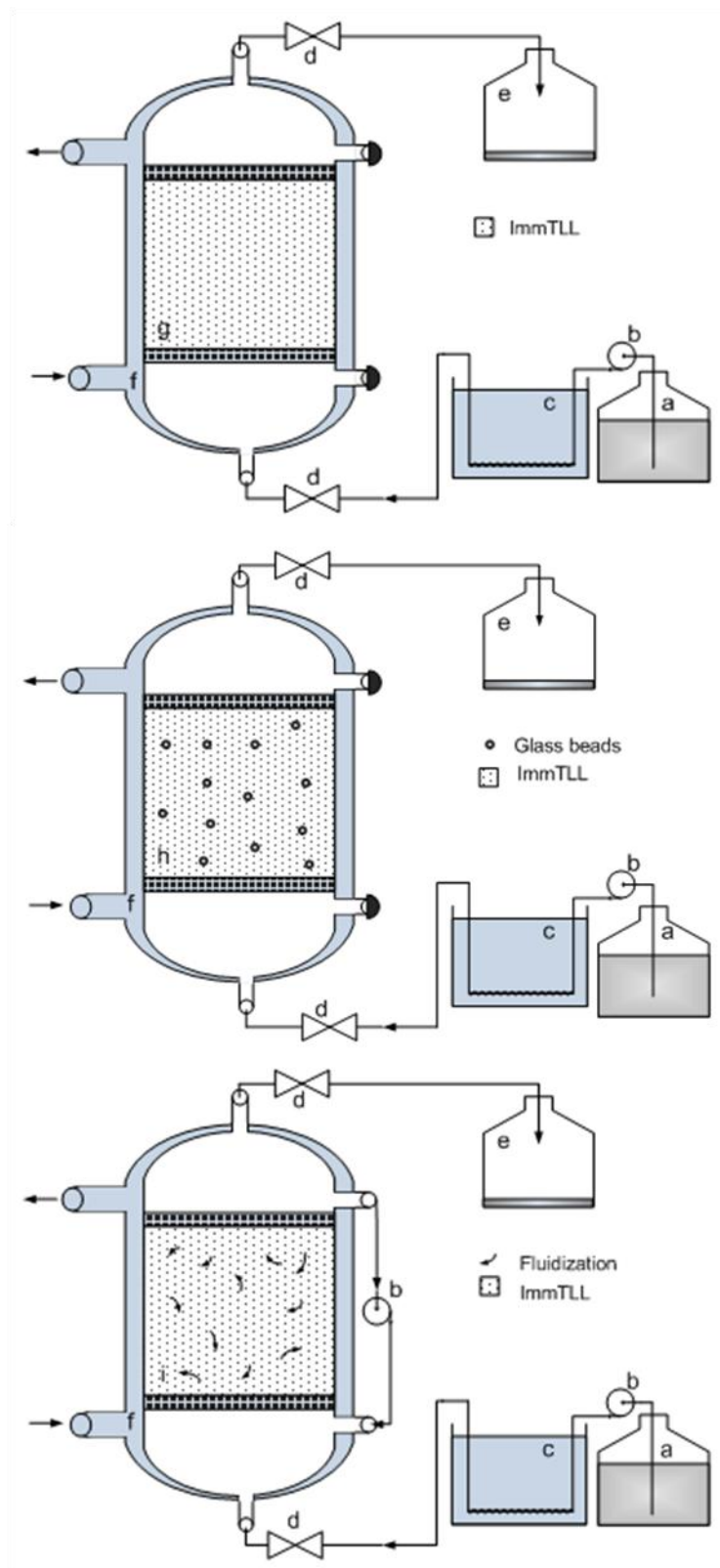


Figure 1. Schematic representation of the reactor system. (a) Reaction mixture (substrate). (b) Peristaltic pump. (c) Reservoir of temperature control equipped with glass serpentine. (d) Sampling valve. (e) Reaction mixture removed from reactor (product). (f) Water jacket with cooling water. (g) packed-bed reactor with 1.85 g of ImmTLL. (h) packed-bed reactor with 1.50 g of ImmTLL and glass beads. (i) fluidized-bed reactor with 1.50 g of ImmTLL.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Immobilization process

The immobilization process was carried out as described in a previous work (MATTE *et al.*, 2014). Epoxy support is a very useful matrix for enzyme immobilization, with several applications (BARBOSA *et al.*, 2013). Initially, the immobilization took place by a hydrophobic adsorption of the enzyme in the hydrophobic matrix of Immobead 150, and proceeded by covalent linkages between the epoxy groups of the support and the enzyme amino terminal and the ϵ -amino groups from Lys.

The immobilization yield was approximately 84 % and ImmTLL derivative showed a catalytic efficiency of 76 %. TLL presents only seven Lys groups on the its molecule surface, thus, intense multipoint covalent attachment may be difficult to be achieved when using this enzyme (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). However, washings with NaCl and ethylene glycol ensured that ionic and hydrophobic interactions between enzyme and support were eliminated.

3.2 Effect of different organic solvents on the enzymatic reactions

The effect of using solvents on the enzymatic reactions is an important aspect in the case of non-aqueous media, such as the one in our work. Each organic solvent has a particular ability to distort the active conformation of the enzyme and to remove the essential water layer around the lipase molecule, which would cause the loss of activity (ROMDHANE *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2011). Therefore, based on the influence of the hydrophobic or hydrophilic character of the solvent,

measured as its log P, a screening of six solvents was performed by relating the percentage of esterification and their respective log P, with results depicted in Figure 2.

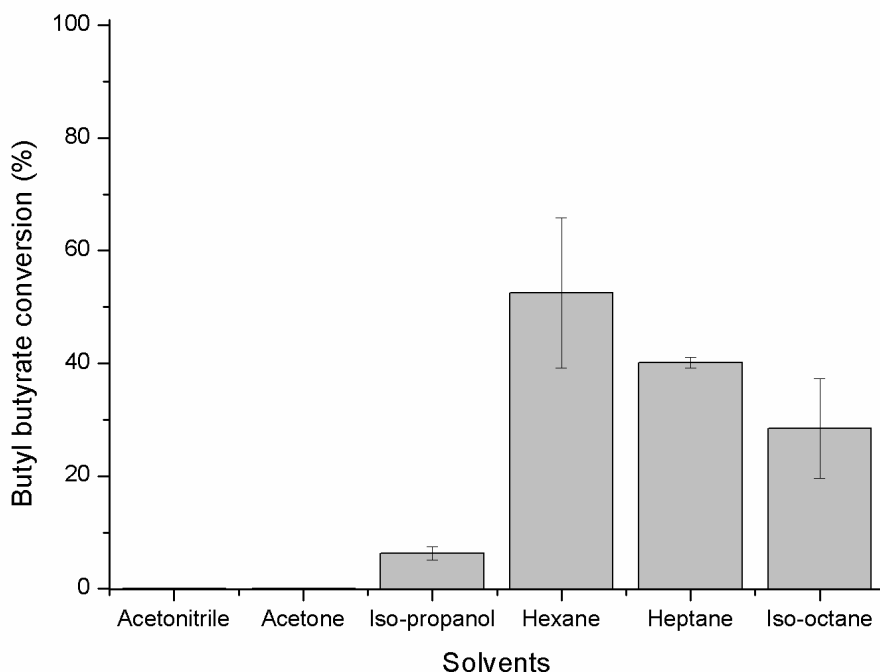


Figure 2. Synthesis of butyl butyrate using ImmTLL incubated in solvents with different *log P* values. Results represent the mean of triplicates.

Results clearly show that the biocatalyst in hydrophobic solvents with high *log P* value had stronger activities compared to solvents with low *log P* value. Catalytic activity in solvents with high *log P* (hydrophobic) are usually superior to hydrophilic ones because the latter are more likely to strip tightly bound water, essential for catalytic activity, from the enzyme molecules (LAANE *et al.*, 1987). When using hydrophobic solvents, such as n-hexane with a *log P* 3.5, the ImmTLL presented the best esterification results for butyl butyrate (52 % of yield). Based on these results, our next experiments were carried out using n-hexane as a solvent. Moreover, the results showed a gradual decrease in the conversion for *log P* > 3.5. This observation might be attributed to the molecular structure of the solvents, which also plays an important role

in affecting the enzyme activity, in addition to their polarity (WU *et al.*, 2002). Indeed, some studies demonstrated that a unique parameter, as log P, could not predict the enzyme activity in organic media (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2012).

3.3 Experimental design for best conditions of butyl butyrate synthesis

The temperature, the substrate molar ratio, the amount of biocatalyst, and the initial amount of added water of reaction were evaluated to establish the best possible conditions to carry out this esterification. The reaction time for the analyses was 6 h. Results obtained for flavor ester synthesis are presented in Table 2.

The determination coefficient ($R^2=0.84$) suggests a satisfactory representation of the process models and good correlation between experimental results and theoretical values predicted by the model equation. Therefore, the second-order polynomial model can be represented by equation (4):

$$\begin{aligned}
 Y = & 74.80 - 17.52X_1 - 3.30X_2 + 14.61X_3 - 2.37X_4 - 13.16X_1X_1 - \\
 & 6.68X_2X_2 - 8.98 X_3X_3 - 2.93 X_4X_4 - 5.65X_1X_2 + 0.20X_1X_3 - 6.68X_2X_3 + \\
 & 1.43X_2X_4 + 0.65X_4
 \end{aligned} \quad (4)$$

Results shown in Table 3 predict that the temperature and the amount of biocatalyst were the variables presenting the highest effect over the reaction. The relation between these variables can be observed in the contour plot of Figure 3. The high and positive effect of enzyme content was expected because the amount of enzyme is directly related to the reaction rate, i.e., increasing the biocatalyst content will increase the reaction yield, until reaching a limit where the addition of enzyme will not present further effects. Although TLL being recognized as a lipase obtained from a

thermophile, thus suggesting the enzyme being thermo resistant, the temperature showed negative linear effect, meaning that high temperatures negatively affect the enzyme activity, confirming results from a previous work (MARTINS *et al.*, 2014).

Table 3. Statistical analysis of CCD

Variable	Effect	Standard error	p-value
Mean	74.80	0.070711	0.000000*
Linear			
X ₁	-35.05	0.057735	0.000000*
X ₂	-6.60	0.057735	0.000001*
X ₃	29.23	0.057735	0.000000*
X ₄	-4.74	0.053258	0.000004*
Quadratic			
X ₁ X ₁	-26.32	0.053258	0.000000*
X ₂ X ₂	-13.72	0.053258	0.000000*
X ₃ X ₃	-17.99	0.053258	0.000000*
X ₄ X ₄	-5.87	0.053258	0.000002*
Interactions			
X ₁ X ₂	-11.30	0.070711	0.000001*
X ₁ X ₃	0.40	0.070711	0.010938*
X ₁ X ₄	0.12	0.070711	0.175259
X ₂ X ₃	-13.37	0.070711	0.000000*
X ₂ X ₄	2.85	0.070711	0.000034*
X ₃ X ₄	1.30	0.070711	0.000351*

*Statistically significant at 95% confidence level.

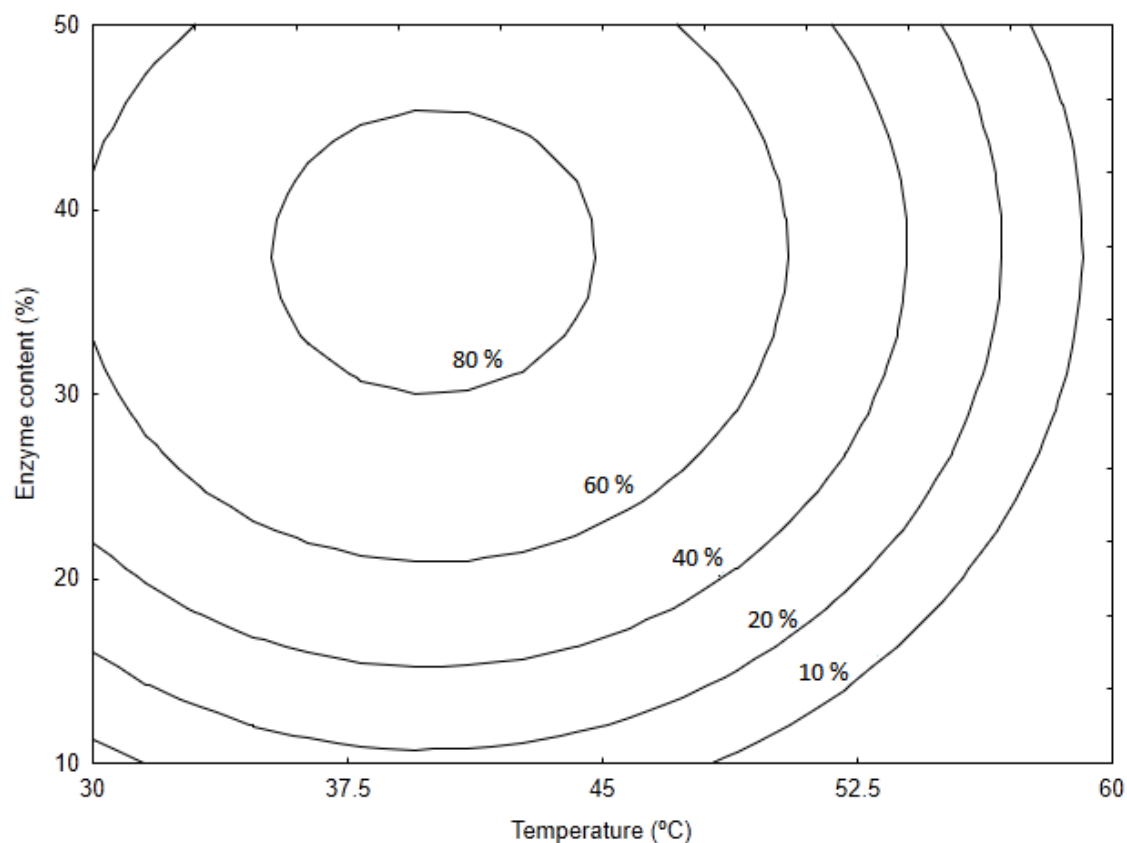


Figure 3. Contour plot of reaction rates catalyzed by ImmTLL: effects of temperature versus enzyme content. The substrate molar ratio and added water were fixed at the central point (0) and -1, respectively.

The optimal conditions for the synthesis were determined by the response desirability profile, calculated using the Statistica 12 software, where the best values were: temperature, 40 °C; substrate molar ratio, 1:3; enzyme amount, 40 %; and initial added water, 2.5 %; using hexane as solvent. In order to validate the prediction model (83.4 %), experiments were carried out at the optimal conditions, and the reaction kinetic of this experiment is presented in Figure 4. Under these conditions, the yield of esterification increases from 60 to 84 %, and the reaction time decreases to 4 h. The conversions obtained in this work were similar to those reported for the synthesis of butyl butyrate using MCI-TLL (TLL immobilized on styrene–divinylbenzene beads), which showed around 80 % of synthesis after 4h, under the optimized conditions (MARTINS *et al.*, 2013). Comparatively, a commercial derivative (Lipozyme TL-IM),

produced 55 % of conversion in 4 h of reaction under optimal conditions (MARTINS *et al.*, 2013).

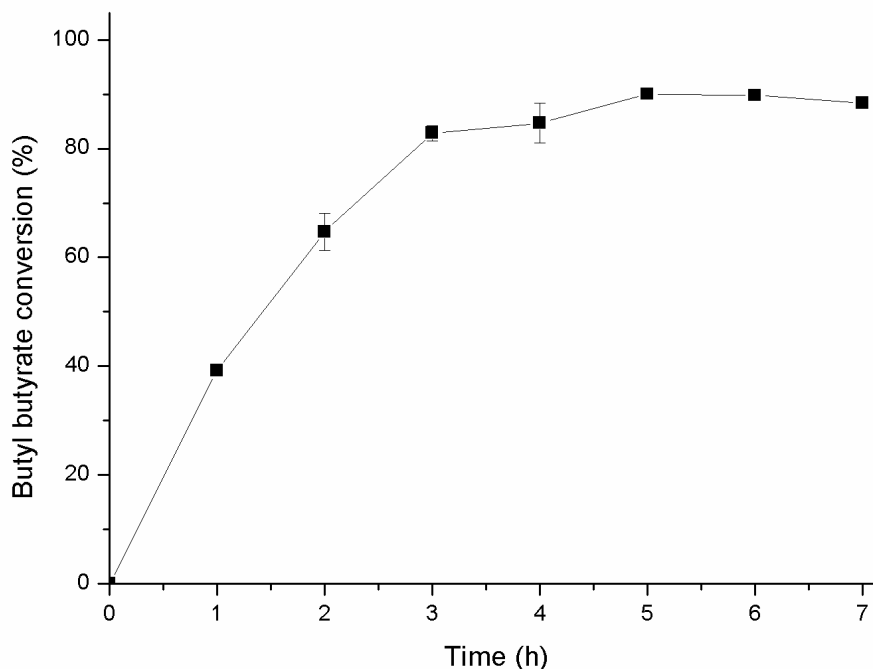


Figure 4. Kinetic of butyl butyrate synthesis under the optimal conditions: temperature, 40 °C; substrate molar ratio, 1:3; enzyme content, (40 % by weight of substrate); water, 0.25mL; stirring, 150 rpm). Results represent the mean of duplicates.

3.4 Effect of molarity of substrate on the synthesis of butyl butyrate

It is assumed that the amount of ester obtained increases proportionally with substrate concentration (both for acid and alcohol) in the lipase-mediated reaction medium (FRIEDRICH *et al.*, 2013). Therefore, it would be important to know what concentration of substrate could be used to reach the maximum enzymatic activity, specially because a high acid concentration might influence the scaling up of the process (LORENZONI *et al.*, 2012), increasing productivity up to a point in which the high concentration of acid hinders the reaction by inhibiting or degrading the enzyme. Therefore, we investigated the effect of substrate concentration in the conversion, varying its amount from 25 to 1,750 mM, and presented the results of this test in Figure

5 A. Indeed, we observed the leveling of yields of butyl butyrate synthesis above 1,500 mM. Results of initial reaction rate (V_0) as a function of substrate concentration are shown in Figure 5 B, showing proportionality between the increase in the concentration of the substrate (acid/alcohol) and the initial reaction rate. However, the yield of butyl butyrate synthesis remained practically the same. The best ratio between initial rate and yield reaction was observed when using 1,500 mM. Based on these set findings, the substrate concentration we used in the following experiments was fixed at 1,500 mM. The optimal concentration of butyric acid achieved in this work is higher than that reported by many authors who used butyric acid (maximum used 1,000 mM) as substrate for the esterification reaction (FRIEDRICH *et al.*, 2013; LORENZONI *et al.*, 2012; SHU *et al.*, 2011). Possible explanations could be the increased enzyme stability promoted by the covalent immobilization or the high hydrophobicity of the support, which allows using a higher substrate concentration (MARTINS *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015).

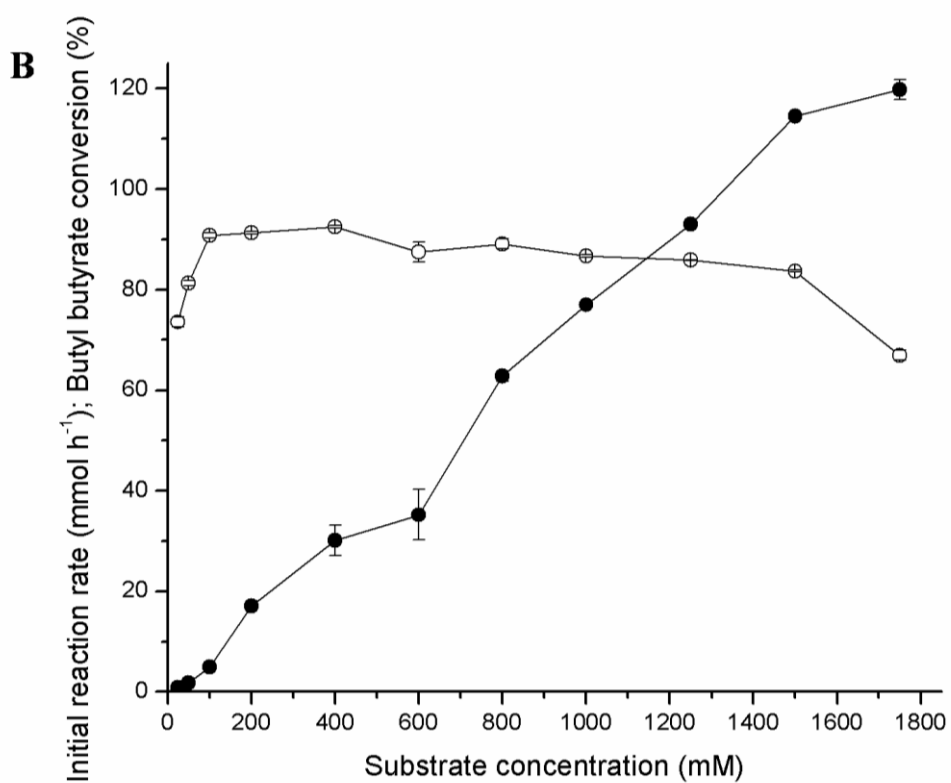
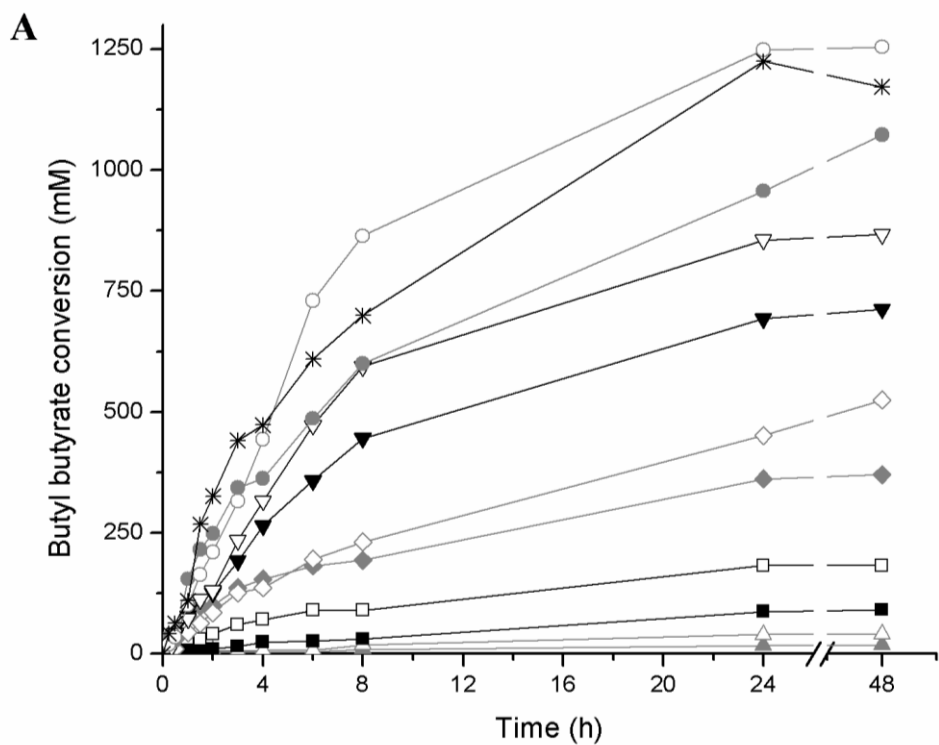


Figure 5. Effects of substrate concentrations. In (A) is shown the reaction along time (\blacktriangle , 25 mM; \triangle , 50 mM, \blacksquare , 100 mM; \square , 200 mM; \blacklozenge , 400 mM; \lozenge , 600 mM; \blacktriangledown , 800 mM; \triangledown , 1000 mM; \bullet , 1250 mM; \circ , 1500 mM; $*$, 1750 mM); and in (B) is shown the initial rate of reaction (\bullet) and the conversion (point at 48 h) of synthesis for each concentration. All reactions were carried out under the optimal conditions. All results represent the mean of duplicates.

3.5 Batch reactor

One of the most characteristic properties of immobilized enzymes – hence their importance - is the possibility of recovering and reusing the biocatalyst. Therefore, we tested the recycling of ImmTLL in batch reactor and present the results in Figure 6, showing the operational stability of ImmTLL after multiple batches. We observed that ImmTLL retained 86 % of its initial activity after 8 reuses. The batch reactor operated in batch mode has a low throughput because of the need to unload, decontaminate, and reload the reactor before starting a new batch. Perhaps the observed maximum productivity of $0.27 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ per gram of derivative in the batch reactor could be improved in a continuous process, using continuous PBR or FBR.

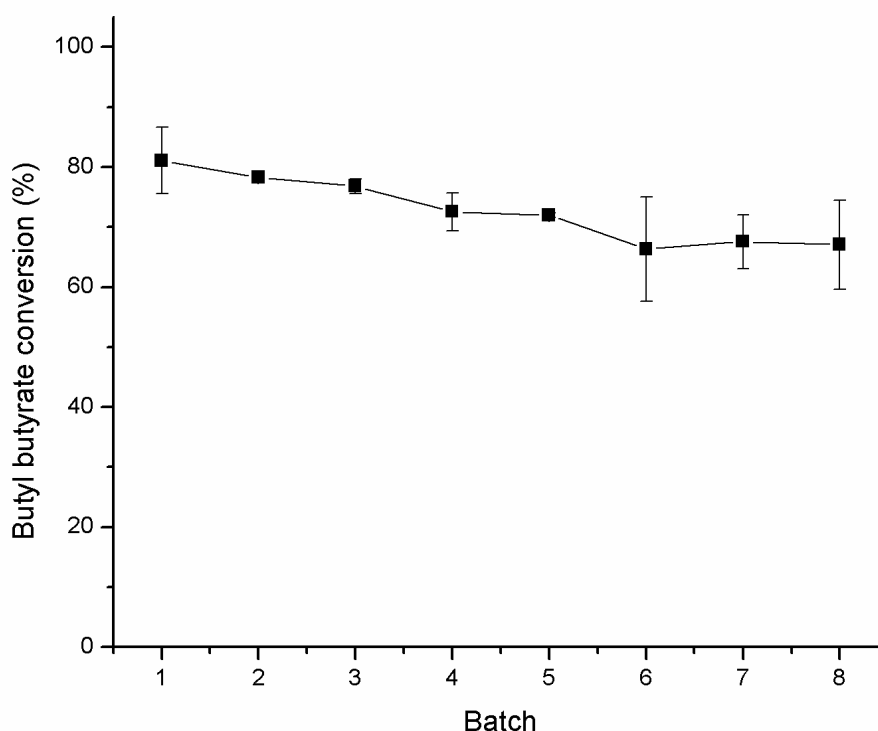


Figure 6. Operational stability of the ImmTLL over repeated batches. All reactions were carried out at the optimal conditions. Results represent the mean of duplicates.

3.6 Continuous synthesis and operational stability

The technology of reactions under continuous flow can be characterized by the use of a range of various configurations of tubular reactors. In this case, the reaction time is determined by the flow rate and the reactor volume, characterizing the residence time (POPPE *et al.*, 2015a). Here, we investigated the effects of the flow rate on the synthesis of butyl butyrate using PBR, FBR, and PBR loaded with the addition of glass beads to avoid column obstruction (Figure 7 A). The substrate mixture was fed from the bottom of the column at flow rates between 0.02 and 1.3 mL min⁻¹. At low flow rate (0.02 mL min⁻¹), the conversion rate was higher probably because of increased residence time in the reactor.

We first tested the PBR using 1.85 g ImmTLL (reactor column filled with ImmTLL), without glass beads. In this test, we observed a conversion of 21 %, representing a productivity, per gram of derivative, of approximately 0.19 mmol g⁻¹h⁻¹ at the flow rate of 0.02 mL min⁻¹. The ImmTLL derivative showed increased particle size caused by the swelling of the beads mediated by the drastic pH changes (HOMAEI *et al.*, 2013), by using the substrate at acidic pH. This swelling caused an excessive compacting of the reactor bed, resulting in the low yields observed. This difficulty was overcome with the introduction of inert glass beads to fill part of the reactor volume, facilitating the flow of substrate. In this second configuration, we used 1.5 g of ImmTLL mixed with 23 glass beads with an average diameter of 2.7 mm, representing approximately 20 % of the total volume of the reactor. This configuration produced 85 % of conversion in the ester synthesis, which represents productivity of 1.01 mmol g⁻¹ h⁻¹, per gram of derivative, at the flow rate 0.02 mL min⁻¹.

In the literature, the mass transfer mechanisms in FBRs are generally described as better than in PBRs, where the substrate solution is bottom-fed at flow rates high enough to lift the particles (POPPE *et al.*, 2015a). However, there is a technical cost by which the residence time necessary to fluidize the bed, mediated by the flow rates, may result in lower yields (FERNANDES, 2010; POPPE *et al.*, 2015a). To verify the behavior of FBR in comparison with the PBR configuration, we set up the experiments using the FBR approach, using 1.5 g of ImmTLL in the column bed. Fluidization was assisted with a peristaltic pump, not causing any changes in the residence time. The FBR produced 60 % of conversion, reaching a maximum productivity of 0.56 mmol g⁻¹ h⁻¹ per gram of derivative at the lowest flow rate tested (0.02 mL min⁻¹). The comparison of all three reactors configuration showed then that the highest productivity of butyl butyrate is obtained when using the PBR system using glass beads to avoid column clogging.

The PBR with glass beads was used to study the continuous operational stability of a continuous esterification along time. This is one of the most interesting possibilities of using a continuous system to obtain ester in a industrial scale. Results of these experiments are presented in Figure 7 B. After 30 days of operation, no column clogging or preferential flows were detected on the PBR. A high operational stability was observed, even after 30 days of continuous operation, with higher than 60 % of the original activity remaining in the system, with productivity at 0.75 mmol g⁻¹h⁻¹.

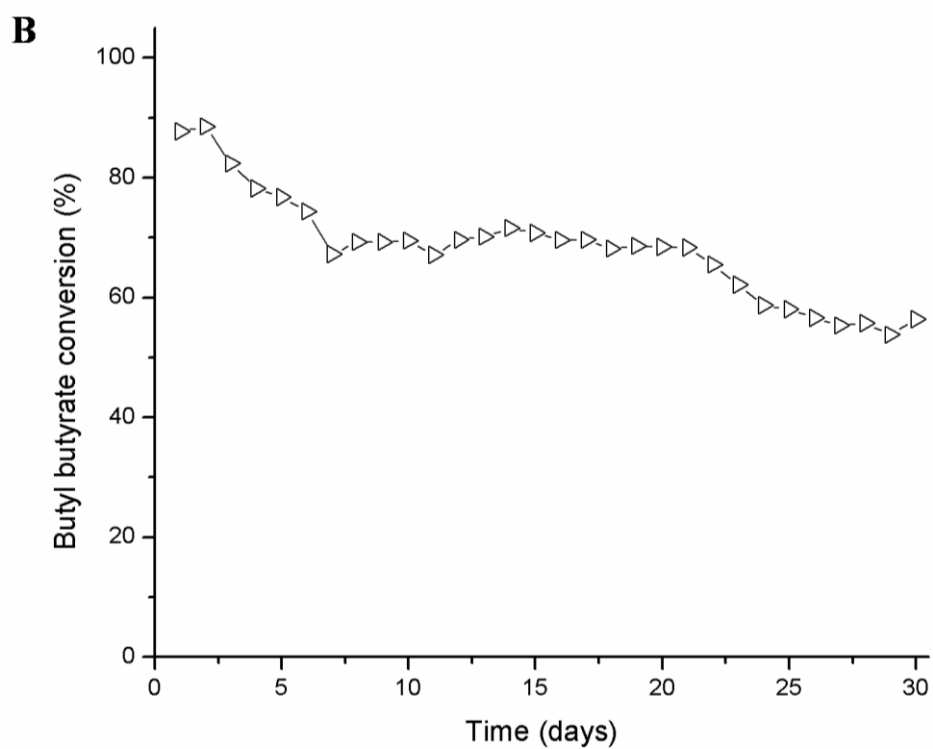
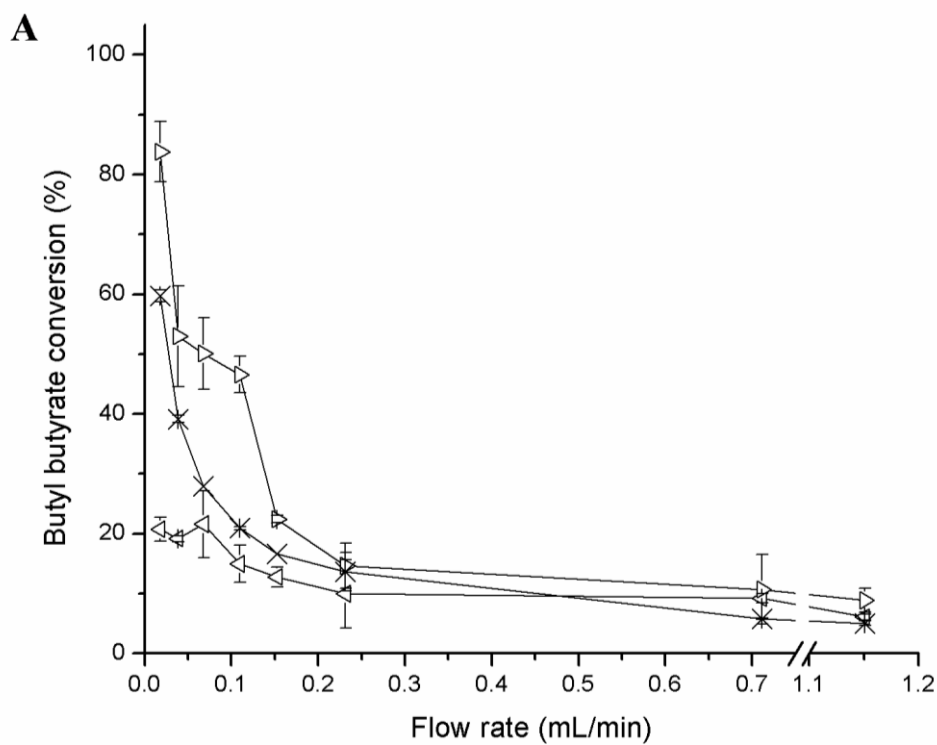


Figure 7. Butyl butyrate synthesis in the enzymatic reactor. (A) Effect of the substrate flow rate on three different reactor settings. Results represent the mean of duplicates. (B) Operational stability of packed-bed reactor with 1.50 g of ImmTLL and glass beads using flow rate of 0.02 mL min^{-1} . Symbols: (\triangleleft) continuous packed-bed with 1.85 g of derivative; (\triangleright) packed-bed with 1.5 g of derivative and glass beads; (\times) fluidized-bed with 1.5 g of derivative. The substrate concentration was fixed at 1:3 (alcohol:acid) molar ratio (1,500 mM), 2.5 % of water, using hexane as solvent, and temperature at $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

On the study of Ha et al., a model reaction for the continuous production of butyl laurate mediated by Novozym 435 in a PBR, was proposed, using an in situ separation system with ionic liquid (1-methyl-3-octylimidazolium trifluoromethanesulfonate). Results showed that continuous ester production was stable (around 2.7 mol L⁻¹ of butyl laurate) for at least 5 days when using a substrate flow rate of 0.006 mL min⁻¹. However, with a slightly higher substrate flow rate (0.008 mL min⁻¹), the synthesis decreased to 1 mol L⁻¹ in 2 days (HA *et al.*, 2010). An integrated production/separation process might be highly dependent of flow rate and the system can only operate under low rates.

In another study, citronellyl butyrate was produced in a PBR using lipase from *Candida rugosa* that was immobilized on Celite 545 diatomaceous earth, under different reactor configurations (reactor containing or not molecular-sieve particles). The molecular sieves are able to remove the formed water in the reaction mixture. The highest conversion was achieved using the PBR in presence of molecular-sieve, which produced 93 % of conversion, but the experimental set up was not practical and required extensive work for enzyme regeneration, and the conversion rate decreased sharply to less than 50 % after only 18 h of continuous operation (DAHLAN *et al.*, 2005).

The combined use of ultrasound technology and molecular sieves seems to be a promising alternative for the synthesis of flavor esters catalyzed by lipases. The ultrasound has emerged as an alternative to homogenizing the reaction with potential applications in enzymatic reaction. Ultrasound acts increasing homogeneity and mass transfer rate of the system, reducing process time when compared with other conventional mixing techniques (KWIATKOWSKA *et al.*, 2011; PALUDO *et al.*, 2015). Further research aiming at determining different settings of continuous reactors,

combining the use of ultrasound technology and molecular sieves, seems to be a promising alternative for the synthesis of flavor esters catalyzed by lipases.

4. CONCLUSIONS

Bioreactor processes to obtain butyl butyrate using TLL immobilized on Immobead 150 by covalent attachment has been successfully developed using different configurations – batch reactor, PBR, and FBR. The PBR configuration, in which an inert column filling (glass beads) was used, produced the best results in terms of conversion, being an interesting choice for the synthesis of this product. The addition of glass beads in the reactor bed improved flow conditions by reducing the packing factor throughout operation. No column clogging or preferential flows were detected on the packed bed reactor after 30 days of operation for butyl butyrate production. The immobilized TLL showed a high operational stability and productivity, suggesting that ImmTLL is a robust and versatile derivative for aroma ester production under continuous operations.

Acknowledgments

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), for the scholarships of the first author. This work was funded by the CNPq and by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

4. CONSIDERAÇÕES E DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho visou o desenvolvimento de um derivado enzimático imobilizado altamente estável e com elevado rendimento em reações de síntese através de catálise por lipases. Como fator importante para o desenvolvimento de derivados enzimáticos realizou-se também estudos das principais características dos biocatalisadores que norteiam o processo de imobilização como as morfológicas, texturais e químicas, tanto para o suporte inerte (Immobead 150) como para o derivado construído com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (ImmTLL). Também fez-se um estudo de aplicabilidade em reatores de batelada e contínuos. Assim buscou-se estudar, de uma forma sistêmica, desde a produção, passando pela caracterização até a aplicação em escala laboratorial. Ressalta-se que o derivado enzimático produzido pode servir como modelo para futuras imobilizações, não necessariamente utilizando o mesmo suporte, desde que considerando suas características e propriedades.

No início da pesquisa, a escolha do suporte Immobead 150 foi devido ao fácil acesso, por ser comercial, e por ser recentemente lançado no mercado, sem nenhuma literatura científica. As únicas informações disponíveis eram a composição da matriz (polímero de metacrilato com grupamentos epóxi) e tamanho médio de partícula de 0,15 a 0,30 mm. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi escolhida pela sua maior estabilidade térmica devido a sua fonte (microrganismo termófilo).

O projeto inicialmente planejado incluía o processo de imobilização em líquidos iônicos. Apesar do ImmTLL demonstrar ser estável em todos os solventes testados (capítulo 1), os testes com imobilização direta nestes mesmos líquidos iônicos não apresentaram eficiência catalítica que fosse promissora (dados não mostrados).

- Imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* por diferentes técnicas em suporte Immobead 150: caracterização e aplicações

Na primeira fase do trabalho, o principal objeto de estudo foi o processo de imobilização e suas influências na estabilidade da enzima imobilizada. O processo de imobilização que apresentou maior estabilidade foi o realizado através de ligações múltiplas entre a enzima e o suporte, utilizando os resíduos de lisina da enzima (reativos em pH próximo de 10,7) e os grupos epóxi do suporte (derivado Emulti). Quando estes grupos do suporte foram hidrolisados a grupos aldeídos, todos os derivados com o mesmo tipo de ligação apresentaram diminuição na estabilidade térmica.

Reações de síntese de aromas frutados (butirato de butila e de iso-amila) foram realizadas com o derivado desenvolvido Emulti e um derivado comercial TL-IM (como controle) a fim de avaliar seus desempenhos nas reações de síntese. Os derivados testados apresentaram uma conversão que variou entre 60 e 70 % para ambos os aromas. Estes resultados similares ao controle evidenciaram que o Emulti possuía potencial para mais estudos, para assim se compreender melhor sua estrutura e buscar uma melhoria na sua aplicabilidade nas reações de síntese de ésteres.

- Caracterização físico-química do Immobead 150 e aplicações para imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*

Este trabalho teve início com algumas alterações no processo de imobilização do Emulti. Estabeleceu-se a força iônica do tampão de imobilização e da carga proteica

de melhor conversão no processo de síntese, sendo 10 mM e 150 mg g⁻¹ suporte, respectivamente. Com estas alterações no modo de preparo do derivado, este passou a ser denominado ImmTLL.

O foco principal desta etapa foi a caracterização do Immobead 150 e do seu derivado ImmTLL, comparando ambos a fim de compreender as alterações do suporte com a imobilização. O suporte Immobead 150 foi classificado como mesoporoso, não constituindo um perfil único de tamanho de poro. O processo de imobilização provocou uma diminuição do volume de poros e da área superficial específica, confirmando o revestimento da superfície do suporte pela enzima imobilizada. Entretanto a sua morfologia não foi afetada, sendo que as partículas esféricas se mantiveram com um diâmetro médio de 155 µm, sem quebras ou rachaduras após o processo de imobilização. O Immobead 150 se manteve sem degradação até 200 °C, indicando que as temperaturas usadas em reações enzimáticas não afetarão a estrutura do suporte.

O Immobead 150 apresentou cerca de 1.000 µmol de grupos epóxi por grama de suporte e elevada hidrofobicidade. Com a imobilização, recobriu-se cerca de 50 % dos grupamentos disponíveis no suporte e teve-se apenas uma pequena diminuição da hidrofobicidade, indicando que os grupos epóxi da superfície não são a única fonte de hidrofobicidade do suporte.

Neste capítulo, além da síntese de aromas, foi avaliada a aplicabilidade do derivado ImmTLL na síntese de biodiesel. A comparação controle foi realizada com dois derivados comerciais (IM-TL e ImmTLLc) e as sínteses de aromas e biodiesel se mostraram levemente superiores. Assim, frente a todas estas propriedades interessantes para a imobilização de lipases, percebeu-se a necessidade de buscar formas alternativas de reação, estudadas na próxima etapa.

- Síntese de butirato de butila em reatores enzimáticos de batelada e contínuo usando lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150

Esta etapa tem seu enfoque na síntese de butirato de butila, compreendendo a otimização das condições de reação em batelada e os estudos comparativos com processos contínuos.

As condições ótimas para a síntese de butirato de butila foram uma temperatura de 40 °C, razão molar do substrato de 3:1 (butanol: ácido butírico), teor de enzima de 40% (em relação ao peso do substrato) e 2,5% de água (fração volumétrica), usando hexano como solvente.

Com a reação otimizada, estudou-se a produtividade em diferentes configurações de reatores, sendo elas em batelada, através de tanque agitado, e contínuos, com o uso de leito fixo e leito-fluidizado. Com o uso de reator em batelada obteve-se 84 % de conversão de síntese, equivalendo a 270,3 mmol L⁻¹ h⁻¹ para cada grama de derivado.

Ao iniciar o estudo do processo contínuo, para fins comparativos, utilizou-se sempre a vazão de 0,02 mL min⁻¹. Obteve-se uma conversão baixa (21 %) ao se preencher o volume da coluna com 1,85 g de derivado ImmTLL. Nestas condições, a produtividade para cada grama de ImmTLL foi de 194.3 mmol L⁻¹ h⁻¹. Atribuiu-se esse baixo rendimento ao empacotamento do derivado. Como alternativa, parte do volume ocupado por ImmTLL no reator anterior foi substituída por esferas de vidro, para assim facilitar o escoamento entres as esferas de vidro e de suporte. Neste caso, utilizou-se 1,5 g de ImmTLL e a adição de 23 esferas de vidro. Obteve-se sucesso com esta estratégia, resultando em uma conversão de 85 % e 1015,6 mmol L⁻¹ h⁻¹ para cada grama de ImmTLL. Outra alternativa foi a de utilizar o processo com leito fluidizado. Para que a

fluidização ocorresse de forma contínua e estável utilizou-se 1.5 g de ImmTLL e o auxílio de uma bomba peristáltica recirculando o substrato na coluna. Obteve-se uma conversão de 60 % de butirato de butila, inferior a conversão obtida na configuração anterior, que também utilizava 1,5 g de derivado. Normalizando a produtividade por grama de suporte, obteve-se $556,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Assim, comparando-se as produtividades alcançadas nos processos contínuos, o de leito fixo com utilização de esferas de vidro foi o de maior destaque, com quase o dobro da produtividade.

Na sequência, avaliou-se também a estabilidade operacional do processo em batelada e contínuo, com leito fixo. O derivado apresentou estabilidade operacional mantendo 83 % da sua capacidade de conversão inicial após ter sido usado por 8 ciclos. Em processo contínuo, 63 % da conversão inicial foi mantida após 30 dias ininterruptos no leito fixo com esferas. Assim, demonstrou-se que o ImmTLL é um derivado robusto para a síntese de éster de aromas.

CONCLUSÕES

Um dos métodos mais comuns para otimizar a utilização de enzimas em várias aplicações é a técnica de imobilização, que permite a sua reutilização e facilita a recuperação do biocatalisador e produtos. O sucesso da imobilização depende da escolha da enzima, do suporte, dos métodos utilizados para a imobilização e, posteriormente, da forma de utilização.

Este trabalho abordou vários aspectos da tecnologia enzimática com lipases, partindo de diferentes tipos de imobilização da enzima de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), no suporte comercial Immobead 150, a caracterização do suporte e do derivado e sua aplicação em diferentes reatores.

A ligação covalente multipontual entre os resíduos de lisina da TLL e os grupamentos epóxi do Immobead 150 demonstraram ter o melhor desempenho quanto à estabilidade a solventes e estabilidade térmica, sendo 30 vezes mais estável a 70 °C em relação à lipase solúvel.

As partículas esféricas de Immobead 150 apresentaram um perfil variado de tamanho de poro, predominantemente na região de mesoporos. O suporte demonstra ser muito interessante para a imobilização de lipases, especialmente devido aos grupamentos epóxi e elevada hidrofobicidade. O derivado produzido (ImmTLL) apresentou capacidade catalítica semelhante a derivados comerciais, tanto na síntese de aromas como biodiesel.

Diferentes tipos de reatores podem ser utilizados para a síntese enzimática com derivados imobilizados. A comparação entre as configurações de reatores para a produção de butirato de butila sugeriu que o reator de leito fixo é a melhor escolha para a síntese deste produto. A adição de esferas de vidro no leito do reator reduz o

empacotamento durante o seu uso, que após 30 dias de operação manteve 63 % da sua atividade inicial. Assim, pode-se afirmar que o ImmTLL é um derivado robusto operacionalmente, estável termicamente e em meio não-aquoso, versátil para a síntese de ésteres e com alta produtividade.

PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados obtidos nesta pesquisa, e das observações científicas apreendidas ao longo do trabalho prático, poderíamos sugerir as seguintes perspectivas para futuros desenvolvimentos:

- aumentar a escala de síntese de ésteres de aroma, utilizando reatores de maior volume;
- verificar a síntese de biodiesel, utilizando reatores, com óleo de soja e óleo residual de fritura;
- imobilizar outras lipases no suporte estudado (Immobead 150);
- identificar outros suportes com as propriedades similares ao Immobead 150.

REFERENCIAS

ADAK, S.; DATTA, S.; BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, R. Imidazolium based ionic liquid type surfactant improves activity and thermal stability of lipase of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 12-17, 2015.

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170-2179, 2008.

ALVES, J. S.; VIEIRA, N. S.; CUNHA, A. S.; SILVA, A. M.; ZACHIA AYUB, M. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, n. 14, p. 6863-6868, 2014.

ANP, B. Boletim Mensal do Biodiesel. 2015. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>. Acesso em: 06/10/2015.

ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 2148-2156, 2011.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. D. M. Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais. **Química Nova**, v. 32, p. 2268-2272, 2009.

ARAI, S.; NAKASHIMA, K.; TANINO, T.; OGINO, C.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 51-55, 2010.

BABICH, L.; HARTOG, A. F.; VAN DER HORST, M. A.; WEVER, R. Continuous-flow reactor-based enzymatic synthesis of phosphorylated compounds on a large scale. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 21, p. 6604-6609, 2012.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435-456, 2015 Sep-Oct 2015.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3-4, p. 124-132, 2011.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433-2462, 2013.

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 Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.

BATISTELLA, L.; USTRA, M.; RICHETTI, A.; PERGHER, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.; LERIN, L.; DE OLIVEIRA, D. Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 3, p. 351-358, 2012.

BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

BCC, R. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. 2014. Disponível em: < <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html> >. Acesso em: 01/10/2015.

BEN AKACHA, N.; GARGOURI, M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food and Bioprocess Processing**, v. 94, p. 675-706, 2015.

BERGER, R. Biotechnology of flavours—the next generation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1651-1659, 2009.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; MIHAILOVIĆ, M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® supports. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 11, p. 1642-1648, 2009.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 2, p. 83-93, 2004.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUÑOZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 1-2, p. 13-20, 2007.

BOLIVAR, J. M.; HIDALGO, A.; SÁNCHEZ-RUILOBA, L.; BERENQUER, J.; GUISÁN, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F. Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 4, p. 412-420, 2011.

BOSLEY, J. A.; CLAYTON, J. C. Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 10, p. 934-938, 1994.

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

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639-1650, 2009.

BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; DEMING, W. E.; TELLER, E. On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 7, p. 1723-1732, 1940.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multi molecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

BRZOZOWSKI, A. M.; SAVAGE, H.; VERMA, C. S.; TURKENBURG, J. P.; LAWSON, D. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Structural Origins of the Interfacial Activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* Lipase†. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071-15082, 2000.

BUSSAMARA, R.; EBERHARDT, D.; FEIL, A. F.; MIGOWSKI, P.; WENDER, H.; DE MORAES, D. P.; MACHADO, G.; PAPALEO, R. M.; TEIXEIRA, S. R.; DUPONT, J. Sputtering deposition of magnetic Ni nanoparticles directly onto an enzyme surface: a novel method to obtain a magnetic biocatalyst. **Chemical Communications**, v. 49, n. 13, p. 1273-1275, 2013.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S. D.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 268-275, 2010.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 171-176, 2009.

CAMPÁS, M.; MARTY, J.-L. Encapsulation of Enzymes Using Polymers and Sol-Gel Techniques. In: GUIBAN, J. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, v.22, 2006. cap. 7, p.77-85. (Methods in Biotechnology™). ISBN 978-1-58829-290-2.

CAO, L. Enzyme Encapsulation. In: (Ed.). **Carrier-bound Immobilized Enzymes**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. p.397-448. ISBN 9783527607662.

CASSOL, C. C.; EBELING, G.; FERRERA, B.; DUPONT, J. A simple and practical method for the preparation and purity determination of halide-free imidazolium ionic liquids. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 1-2, p. 243-248, 2006.

CHOWDARY, G. V.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 331-339, 2000.

DAHLAN, I.; KAMARUDDIN, A. H.; NAJAFPOUR, G. D. Cytronellyl butyrate synthesis in non-conventional media using packed-bed immobilized *Candida rugosa* lipase reactor. **International Journal of Engineering**, v. 18, n. 2, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAMNJANOVIĆ, J. J.; ŽUŽA, M. G.; SAVANOVIĆ, J. K.; BEZBRADICA, D. I.; MIJIN, D. Ž.; BOŠKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DE ABREU, L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51-55, 2014.

DE BARROS, D. P. C.; AZEVEDO, A. M.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Optimization of flavor esters synthesis by *Fusarium solani* pisi cutinase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 275-284, 2012.

DE DIEGO, T.; LOZANO, P.; ABAD, M. A.; STEFFENSKY, K.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. **Journal of Biotechnology**, v. 140, n. 3-4, p. 234-241, 2009.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D.; BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, n. 2, p. 71-83, 2013.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1983-1991, 2009.

DOKTOROVOVA, S.; SHEGOKAR, R.; MARTINS-LOPES, P.; SILVA, A. M.; LOPES, C. M.; MÜLLER, R. H.; SOUTO, E. B. Modified Rose Bengal assay for surface hydrophobicity evaluation of cationic solid lipid nanoparticles (cSLN). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 5, p. 606-612, 2012.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270-282, 2010.

DUPONT, J.; DE SOUZA, R. F.; SUAREZ, P. A. Z. Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 10, p. 3667-3691, 2002.

DUTRA MADALOZZO, A.; SANVIDO MUNIZ, L.; BARON, A. M.; PIOVAN, L.; ALEXANDER MITCHELL, D.; KRIEGER, N. Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 13-19, 2014.

EIJNSINK, V. G. H.; BJØRK, A.; GÅSEIDNES, S.; SIREVÅG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B. V. D.; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, n. 1-3, p. 105-120, 2004.

ESCANDELL, J.; WURM, D. J.; BELLEVILLE, M. P.; SANCHEZ, J.; HARASEK, M.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D. Enzymatic synthesis of butyl acetate in a packed bed reactor under liquid and supercritical conditions. **Catalysis Today**, v. 255, p. 3-9, 2015.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 1, p. 43-49, 2004.

FERNANDES, P. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 862537, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; M. GUISÁN, J. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 7, p. 546-550, 1993.

FERNÁNDEZ, O.; DÍAZ, I.; TORRES, C. F.; TOBAJAS, M.; TEJEDOR, V.; BLANCO, R. M. Hybrid composites octyl-silica-methacrylate agglomerates as enzyme supports. **Applied Catalysis A: General**, v. 450, p. 204-210, 2013.

FIGUEIREDO, É. V. D. C. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila**. 2013. 122 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FRIEDRICH, J. L. R.; PEÑA, F. P.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1089-1095, 2013.

Front Matter. In: COLTHUP, N. B.; DALY, L. H., *et al* (Ed.). **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy** San Diego: Academic Press, 1990. ISBN 978-0-12-182554-6.

FU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

GALARNEAU, A.; MURESEANU, M.; ATGER, S.; RENARD, G.; FAJULA, F. Immobilization of lipase on silicas. Relevance of textural and interfacial properties on activity and selectivity. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 562-571, 2006.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; HERNANDEZ, K.; SANTOS, J.; RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629-7645, 2014.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. 2nd. London: Academic Press, 1982.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2008.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2-3, p. 137-143, 2010.

GUILLÉN, M.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, n. 0, p. 1-9, 2012.

GUIBAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

GUIBAN, J. M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana, v.22: Methods in biotechnology, 2006. cap. 1, p.1-13.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 1-21, 2011.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 43-54, 2006.

HA, S. H.; MAI, N. L.; KOO, Y. M. Continuous production and in situ separation of fatty acid ester in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 1-2, p. 6-10, 2010.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 66-71, 2011.

HAMA, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; NODA, H.; KONDO, A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 417-421, 2013.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELATORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3-4, p. 136-142, 2009.

HOMAEI, A.; SARIRI, R.; VIANELLO, F.; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185-205, 2013.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004/07/01 2004.

IUBMB, E. N. L.-. Triacylglycerol lipase. 1961. Disponível em: <http://www.enzyme-database.org/class.php?c=3&sc=1&ssc=*&sh=1>. Acesso em: 01/10/2015.

IUPAC. **Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)**. International Union of Pure and Applied Chemistry. Plymouth, UK, p.1739-1758. 1994

IUPAC. **Classification and Chemical Characteristics of Immobilized Enzymes (Technical Report)** International Union of Pure and Applied Chemistry. Plymouth, UK, p.597-600. 1995

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-359, 1999.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, p. 1-21, 2014.

JUN, S.-H.; LEE, J.; KIM, B. C.; LEE, J. E.; JOO, J.; PARK, H.; LEE, J. H.; LEE, S.-M.; LEE, D.; KIM, S.; KOO, Y.-M.; SHIN, C. H.; KIM, S. W.; HYEON, T.; KIM, J. Highly Efficient Enzyme Immobilization and Stabilization within Meso-Structured Onion-Like Silica for Biodiesel Production. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 5, p. 924-929, 2012.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 157-176, 2000.

KAZLAUSKAS, R. J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 195-201, 2005.

KLEIN, M. P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, R. C.; BENVENUTTI, E. V.; COSTA, T. M. H.; HERTZ, P. F.; NINOW, J. L. Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2456-2464, 2012.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241-246, 2001.

KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J.; AKUNNA, J.; WALKER, G. M.; BREMNER, D. H. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 768-780, 2011.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.

LASTOSKIE, C.; GUBBINS, K. E.; QUIRKE, N. Pore size distribution analysis of microporous carbons: a density functional theory approach. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 18, p. 4786-4796, 1993.

LERIN, L.; CENI, G.; RICHETT, A.; KUBIAK, G.; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Successive cycles of utilization of novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 181-188, 2011.

LI, N.; ZONG, M.-H.; MA, D. Thermomyces lanuginosus lipase-catalyzed regioselective acylation of nucleosides: Enzyme substrate recognition. **Journal of Biotechnology**, v. 140, n. 3-4, p. 250-253, 2009.

LI, Z.; DENG, L.; LU, J.; GUO, X.; YANG, Z.; TAN, T. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Crude Rice Bran Oil with Immobilized *Candida sp.* 99–125. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 5, p. 870-875, 2010.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70-75, 2005.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51-55, 2015.

LORENZONI, A. S. G.; GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ZÁCHIA AYUB, M. A.; RODRIGUES, R. C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p. 196-200, 2012.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213-6222, 2013.

MARTINS, A. B.; DA SILVA, A. M.; SCHEIN, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; ZÁCHIA AYUB, M. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of

different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, n. 0, p. 18-25, 2014.

MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. L. R.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, n. 0, p. 417-422, 2013.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311-2316, 2011.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PEDROCHE, J.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 629-634, 2002.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J. M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1022-1033, 2007a.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007b.

MATEO, C.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; LOPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; ALONSO-MORALES, N.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Very strong but reversible immobilization of enzymes on supports coated with ionic polymers. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana, v.22: Methods in biotechnology, 2006. cap. 18, p.205-216.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003.

MATTE, C. R. **Studies of immobilization of Lipase of *Thermomyces lanuginosus* on Immobead 150, characterization of the derivatives and their applications in batch and continuous reactors for the synthesis of butyl butyrate and biodiesel**. 2015. (Doctorate). Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

MATTE, C. R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different

Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-14, 2014.

MATTE, C. R.; NUNES, M. R.; BENVENUTTI, E. V.; SCHÖFFER, J. D. N.; AYUB, M. A. Z.; HERTZ, P. F. Characterization of cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on silica microspheres via aminopropyltrimethoxysilane as a “spacer arm”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, n. 0, p. 51-56, 2012.

MENDES, A.; DE CASTRO, H.; DE S. RODRIGUES, D.; ADRIANO, W.; TARDIOLI, P.; MAMMARELLA, E.; DE C. GIORDANO, R.; DE L. C. GIORDANO, R. 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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011a.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011b.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MIHAILOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; BANJANAC, K.; CAREVIĆ, M.; PRLAINOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; BEZBRADICA, D. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 637-646, 2014.

NEVES PETERSEN, M. T.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 115-147, 2001.

NOVOZYMES. Lipases. 2014. Disponível em: <
http://www.novozymes.com/en/solutions/biopharma/Brochures/Documents/2014-12478-01_Biocatalysis-Product-Sheet_Lipases-1.pdf>. Acesso em: 06/10/2015.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 279-286, 2002.

PALUDO, N.; ALVES, J. S.; ALTMANN, C.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89-94, 2015.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p. 93-99, 2006.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F. D.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PEREIRA, S. C.; BUSSAMARA, R.; MARIN, G.; GIORDANO, R. L. C.; DUPONT, J.; GIORDANO, R. D. C. Enzymatic synthesis of amoxicillin by penicillin G acylase in the presence of ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3146-3156, 2012.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilised in polyurethane foams. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 2, p. 148-158, 2007.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 327-332, 2009.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 246-252, 2010.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015a.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. D. C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, n. 0, p. 50-56, 2015b.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. D.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 16, 2011.

RODRIGUES, J. V.; RUIVO, D.; RODRIGUEZ, A.; DEIVE, F. J.; ESPERANCA, J. M. S. S.; MARRUCHO, I. M.; GOMES, C. M.; REBELO, L. P. N. Structural-functional evaluation of ionic liquid libraries for the design of co-solvents in lipase-catalysed reactions. **Green Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 4520-4523, 2014.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682-688, 2011.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963-968, 2009.

RODRIGUES, R. C.; KAREL, H.; OVEIMAR, B.; NAZZOLY, R.; CRISTINA, G.-G.; JOSE, C. S. D. S.; ANGEL, B.-M.; ROBERTO, F.-L. Immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 1707-1718, 2015.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, 2013.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; WADA, K. Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 849-854, 2008.

ROMDHANE, I.-B.; ROMDHANE, Z.; BOUZID, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Application of a Chitosan-Immobilized *Talaromyces thermophilus* Lipase to a Batch Biodiesel Production from Waste Frying Oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-17, 2013.

ROMDHANE, I. B.-B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 3-4, p. 230-239, 2011.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 269-277, 2007.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SANTOS, J. C. S. D.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413-2432, 2015.

SAPONJIĆ, S.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D.; BEZBRADICA, D. I.; ZUZA, M. G.; SAIED, O. A.; BOSKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N.; MIJIN, D. Z. Use of *Candida rugosa* lipase immobilized on sepabeads for the amyl caprylate synthesis: Batch and fluidized bed reactor study. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, 2010.

- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30 n. 3, p. 513-521, 1959.
- SASSO, F.; KULSCHEWSKI, T.; SECUNDO, F.; LOTTI, M.; PLEISS, J. The effect of thermodynamic properties of solvent mixtures explains the difference between methanol and ethanol in *C. antarctica* lipase B catalyzed alcoholysis. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 1-8, 2015.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.
- SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 463-472, 2004.
- SEBRÃO, D.; SILVA, V. D.; NASCIMENTO, M. D. G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, v. 30, p. 1182-1187, 2007.
- SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6250-6261, 2013.
- SERRA, E.; MAYORAL, Á.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 114, n. 1-3, p. 201-213, 2008.
- SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 193-198, 2005.
- SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J.-S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 61-70, 2011.
- SHANGGUAN, J.-J.; LIU, Y.-Q.; WANG, F.-J.; ZHAO, J.; FAN, L.-Q.; LI, S.-X.; XU, J.-H. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 949-962, 2011.
- SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Non-selective hydrolysis of tuna fish oil for producing free fatty acids containing docosahexaenoic acid. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 92, n. 2, p. 344-354, 2014.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review. **Biotechnology Advances**, v. 10, p. 23-40, 2011.

- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- SHELDON, R.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: GUI SAN, J. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**: Humana Press, v.22, 2006. cap. 3, p.31-45. (Methods in Biotechnology™). ISBN 978-1-58829-290-2.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, 2013.
- SHU, C.; CAI, J.; HUANG, L.; ZHU, X.; XU, Z. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 139-144, 2011.
- SILVA, W. C.; TEIXEIRA, L. F.; CARVALHO, A. K. F.; MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 881-886, 2014.
- SILVA, W. S. D.; LAPIS, A. A. M.; SUAREZ, P. A. Z.; NETO, B. A. D. Enzyme-mediated epoxidation of methyl oleate supported by imidazolium-based ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 98-103, 2011.
- SING, K. S. W. **Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity**. p.603-619. 1985
- STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.
- STANDARDIZATION, E. C. F. **DIN EN 14103: Fat and Oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of esters and linolenic acid methyl esters content**. 2001.
- STEPANKOVA, V.; BIDMANOVA, S.; KOUDELAKOVA, T.; PROKOP, Z.; CHALOUPKOVA, R.; DAMBORSKY, J. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823-2836, 2013.
- SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, p. 768-775, 2009.
- SUNDBERG, L.; PORATH, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography : I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. **Journal of Chromatography A**, v. 90, n. 1, p. 87-98, 1974.

SZCZĘSNA ANTCZAK, M.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In: FESSNER, W.-D.; ARCHELAS, A., *et al* (Ed.). **Biocatalysis - From Discovery to Application**: Springer Berlin Heidelberg, v.200, 1999. cap. 4, p.95-126. (Topics in Current Chemistry). ISBN 978-3-540-64942-7.

TOFTGAARD PEDERSEN, A.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, n. 0, p. 89-94, 2014.

TORRES-SALAS, P.; DEL MONTE-MARTINEZ, A.; CUTINO-AVILA, B.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. **Advanced Materials**, v. 23, n. 44, p. 5275-5282, 2011.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 8, p. 956-968, 2011.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. A. Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 790-792, 1994.

VILLO, L.; METSALA, A.; TAMP, S.; PARVE, J.; VALLIKIVI, I.; JÄRVING, I.; SAMEL, N.; LILLE, Ü.; PEHK, T.; PARVE, O. *Thermomyces lanuginosus* Lipase with Closed Lid Catalyzes Elimination of Acetic Acid from 11-Acetyl-Prostaglandin E2. **ChemCatChem**, v. 6, n. 7, p. 1998-2010, 2014.

WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6352-6355, 2011.

WILLERDING, A.; #233; LUIS; OLIVEIRA, L. A. D.; MOREIRA, F. W.; GERMANO, M. G.; CHAGAS, A.; #237; FREITAS, S. Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 5, 2011.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WU, J.-C.; SONG, B.-D.; XING, A.-H.; HAYASHI, Y.; TALUKDER, M. M. R.; WANG, S.-C. Esterification reactions catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1229-1233, 2002.

XU, K.; KLIBANOV, A. M. pH Control of the Catalytic Activity of Cross-Linked Enzyme Crystals in Organic Solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 41, p. 9815-9819, 1996.

YANG, C.; WANG, F.; LAN, D.; WHITELEY, C.; YANG, B.; WANG, Y. Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 533-537, 2012.

YUCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1496-1501, 2011.

ZHANG, D.-H.; LV, Y.-Q.; ZHI, G.-Y.; YUWEN, L.-X. Kinetic biosynthesis of l-ascorbyl acetate by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase (Lipozyme TLIM). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 9, p. 1163-1168, 2011.

ZHAO, H.; BAKER, G. A. Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 3-12, 2013.

ZHAO, T.; NO, D. S.; KIM, Y.; KIM, Y. S.; KIM, I.-H. Novel strategy for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 17-22, 2014.

ANEXOS

Os anexos estão listados conforme abaixo:

Anexo A Participação em Congressos

Anexo B Cooperação em projetos de pesquisa e trabalhos publicados

ANEXO A

Durante o período do doutorado participou-se do Enzitec - X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (2012), em Blumenau/SC. Neste evento apresentou-se 2 trabalhos:

- **MATTE, C. R.;** SOUZA, K. B.; HERTZ, P. F.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Avaliação da estabilidade térmica da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada por diferentes técnicas.
- **MATTE, C. R.;** SOUZA, K. B.; HERTZ, P. F.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Avaliação da estabilidade a solventes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada por ligação covalente multipontual em Immobead 150.

A bolsista de iniciação científica Carolina Bordinhão, estudante de Engenharia Química (UFRGS) foi vinculada a este projeto de janeiro de 2013 a junho de 2015. Neste período foram apresentadas em dois anos consecutivos no Salão de Iniciação Científica (SIC UFRGS) e no Congresso Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEC IC):

- BORDINHÃO, C. Otimização da síntese de butirato de butila catalisado pela lipase de *Thermomyces lanuginosa*. SIC, 2013;
- BORDINHÃO, C. Estudo das Condições de Transesterificação Enzimática do Óleo de Soja. SIC, 2014.
- BORDINHÃO, C.; **MATTE, C. R.;** POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Estudo das condições de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* para a produção de biodiesel. COBEC IC, 2015.

ANEXO B

No ano de 2013 foi aprovado na Chamada MCTI/CNPq N°40/2013 o projeto “Desenvolvimento de reator de coluna com lipases imobilizadas para a síntese de biodiesel a partir de óleo vegetal residual”, coordenado pelo professor Marco Antônio Záchia Ayub. Até o momento, dois trabalhos colaborativos já foram publicados:

- POPPE, J. K.; GARCIA-GALAN, C.; **MATTE, C. R.**; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida Antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 94, p. 51-56, 2013.
- POPPE, J. K.; **MATTE, C. R.**; PERALBA, M. C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. *Applied Catalysis. A, General*, v. 490, p. 50-56, 2014.

A FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) em 2013 aprovou o projeto “Desenvolvimento de novos suportes para a imobilização de enzimas usadas no processamento e na conservação de alimentos”, coordenado pelo professor Plinho Francisco Hertz. Este projeto possibilitou a consolidação da parceria com o Laboratório de Sólidos e Superfícies (Instituto de Química – UFRGS).

O estudo realizado no projeto de qualificação deste doutorado, denominado “Produção de polímeros biodegradáveis ativos”, foi apresentado ao PPGBCM em julho de 2013. Este estudo possibilitou uma nova parceria com o Laboratório de Compostos

Bioativos (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFRGS) através do projeto de pesquisa “Desenvolvimento de embalagens ativas a partir de grãos funcionais”, coordenado pela professora Simone Hickmann Flores.

Com base no protocolo desenvolvido no projeto de qualificação, realizou-se a quantificação de atividade antimicrobiana nos seguintes estudos:

- PAGNO, C. H.; COSTA, T. H.; DE MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V.; HERTZ, P. F.; **MATTE, C. R.**; TOSATI, J. V.; MONTEIRO, A. R.; RIOS, A. O.; FLÔRES, S. H. Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 173, p. 755-762, 2015.
- SCHNEID, A. C.; PEREIRA, M. B.; HOROWITZ, F.; MAULER, R. S.; **MATTE, C. R.**; KLEIN, M. P.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. H.; MENEZES, E. W.; BENVENUTTI, E. V. Silver Nanoparticle Thin Films Deposited on Glass Surface Using an Ionic Silsesquioxane as Stabilizer and as Crosslinking Agent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, p. 1004-1012, 2015.

De maneira geral, a participação nas discussões e execuções destes projetos de pesquisa, contribuiu de forma significativa na evolução deste trabalho de doutorado.