

PETRUS PIRES MARQUES

Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio.

Dissertação de Mestrado a ser apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Elias Basile Tambourgi

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Marques, Petrus Pires

M348e Estudo da imobilização de lipase de Burkholderia cepacia em alginato de sódio / Petrus Pires Marques. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipase. 2. Enzimas imobilizadas. 3. Biotecnologia. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Burkholderia cepacia immobilization with sodium alginate

Palavras-chave em Inglês: Lipase, Enzyme immobilization, Biotechnology

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Giovana da Silva Padilha, Gabriela Alves Macedo

Data da defesa: 30-06-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado , defendida por Petrus Pires Marques, em 30 de junho de 2011 ,
e aprovada pela banca examinadora:



Dr. Elias Basile Tambourgi – orientador



Dra. Giovana da Silva Padilha



Dra. Gabriela Alves Macedo

Esta versão corresponde a final da Dissertação de Mestrado , defendida por Petrus Pires Marques em 30 de junho de 2011.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

Agradecimentos

Agradecimentos a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho. Agradecimento especial aos professores Elias Tambourgi e Ranulfo Monte Alegre, que possibilitaram, através de espaços físicos, reagentes e apoio, a realização da pesquisa e experimentos.

Resumo

A lipase é uma enzima de alto interesse comercial, com aplicabilidades diversas na indústria, desde aditivo de detergentes até ferramenta de síntese da indústria farmacêutica. O uso da enzima é limitado, no entanto, pelo alto custo de obtenção em nível de pureza adequado, de acordo com a finalidade. O objetivo desse trabalho foi imobilizar a lipase diretamente de seu extrato bruto, excluindo no processo outras proteínas, promovendo uma imobilização seletiva, atuando como extração, ou purificação de baixa resolução. A enzima foi produzida utilizando uma cepa de *Burkholderia cepacia* com óleo de oliva como indutor. O fermentado produzido pela bactéria foi caracterizado quanto à sua atividade lipolítica utilizando o *p*-npp como substrato. O extrato apresentou temperatura ótima de 50°C e pH ótimo 9,0. A enzima foi avaliada ainda quanto à sua afinidade pelo substrato utilizado, revelando um $K_m=18,4$ mM, com uma velocidade máxima de atividade de $5,56$ mM.min⁻¹. Através dos dados da cinética foi possível calcular a energia de ativação da enzima em 38 kJ.mol⁻¹.K⁻¹. O extrato enzimático foi utilizado em procedimento de imobilização utilizando alginato de sódio em solução. As já documentadas interações entre o alginato e lipases permitiram realizar um processo de imobilização seletiva por precipitação com cloreto de cálcio. Foram estudadas, com o auxílio de planejamento estatístico de experimentos, as seguintes variáveis atuantes no processo: pH e concentração da solução de alginato, concentração da solução de cloreto de cálcio, tamanho das esferas produzidas e relação volume alginato/volume solução enzimática. As melhores condições encontradas para o processo foram concentração de alginato de 2%, pH da solução 3,68 e concentração de cloreto de cálcio 200mM, com uma relação de 40% de volume alginato/60% solução enzimática, produzindo esferas de 2 mm de diâmetro. Com essas condições obteve-se uma taxa de imobilização de 168,07%, que representa uma concentração da proteína alvo em 1,68 vezes, e recuperação superior a 99% em um procedimento de etapa única.

Palavras-chave: Lipase, alginato, imobilização.

Abstract

Lipase is an enzyme of high commercial value, with several applications in industry, from detergent additive to pharmaceutical synthesis tool. Nevertheless, the lipase use is limited by the high cost of its production in the necessary purity grade according to its use. The objective of this work was to entrap lipase directly from its crude extract excluding contaminant proteins in the process, promoting a selective entrapment, acting as a pre-purification or extraction. The enzyme was produced using a strain of *Burkholderia cepacia* and olive oil as inducer. The crude extract was characterized according to its lipolytic activity using *p*-npp as substrate. The crude extract presented optimal temperature of 50 °C and optimal pH of 9.0. Lipase was also evaluated according to its affinity for the substrate, revealing a K_m of 18.4 mM and maximum velocity of 5.56 mM.min⁻¹. From the data obtained it was also possible to calculate the activation energy of the enzyme: 38 kJ.mol⁻¹.K⁻¹. This crude extract was used in the immobilization procedure using sodium alginate solution. The already published data about the affinity of lipases and alginate allowed a performance of a selective entrapment by precipitation with calcium chloride. Using statistical design of experiments the following variables were studied in the process: concentration and pH of alginate solution, concentration of calcium chloride solution, diameter of the produced beads and relation alginate volume/enzyme solution volume. The best conditions found were: alginate concentration 2% at pH 3.68, 200 mM calcium chloride concentration and a relation 40% alginate solution volume/60% enzyme solution, producing 2 mm diameter beads. In these conditions, it was possible to obtain a immobilization yield of 168.07%, which represents a concentration of 1.68 times of the target protein and an enzyme recovery superior to 99% in a single step procedure.

Keywords: Lipase, alginate, entrapment.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. Lipases.....	2
2.2. Aplicações biotecnológicas das lipases:	5
2.2.1. Detergentes	5
2.2.2. Indústria química e farmacêutica	6
2.2.3. Síntese de polímeros.....	6
2.2.4. Biodiesel	7
2.3. Imobilização enzimática	10
2.3.1. Adsorção	11
2.3.2. Ligação covalente.....	11
2.3.3. “Crosslinking” (ligações cruzadas).....	11
2.3.4. Encapsulamento	12
2.3.5. Imobilização da lipase	12
2.4. Alginato	13
2.5. Planejamento estatístico	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Microorganismos	19
4.2. Obtenção da enzima	19
4.3. Planejamento estatístico	20

4.4.	Alginato e imobilização.....	21
4.5.	Análises de resultados	21
4.5.1.	Proteínas	21
4.5.2.	Atividade lipolítica	22
4.5.3.	Cálculo das respostas	22
4.5.3.1.	Atividade específica	22
4.5.3.2.	Taxa de imobilização	23
4.5.3.3.	Recuperação da enzima	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1.	A lipase	24
5.1.1.	Produção.....	24
5.1.2.	Caracterização.....	26
5.2.	Imobilização da lipase	30
5.2.1.	Primeiro planejamento experimental	30
5.2.2.	Planejamento Central Composto Rotacional	34
6.	CONCLUSÕES.....	40
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	40
8.	REFERENCIAS	41
9.	APÊNDICES	49

Lista de figuras

- Figura 1-Representação esquemática do padrão de dobra α/β hidrolases: α -hélices representadas por um cilindro vermelho e folhas- β por setas azuis. Os círculos representam a posição relativa do trio de resíduos catalíticos.3*
- Figura 2 - Emissões médias de compostos por motores automotivos nas diversas concentrações de biodiesel (blends) em diesel mineral.8*
- Figura 3 - Reação de transesterificação utilizando álcool de cadeia curta (metanol) para converter triglicérido em glicerol e ésteres graxos de metila. (A) modelo de reação geral; (B) reação dividida em 3 etapas.9*
- Figura 4-Representação dos métodos de imobilização de enzimas: A- Adsorção; B- Ligação covalente; C- Ligações cruzadas; D- Encapsulamento..... 13*
- Figura 5-Estruturas dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico e sua estrutura secundária em blocos MM e GG. 14*
- Figura 6 - Correlação entre a concentração de células de *Burkholderia cepacia* e a absorvância medida em espectrofotômetro ($\lambda=600$ nm). Coeficiente de correlação $R^2=0,9838$24*
- Figura 7 - Atividade enzimática da lipase sob diferentes condições de pH.26*
- Figura 8 - Atividade enzimática da lipase sob diferentes condições de temperatura27*
- Figura 9 - Representação gráfica da equação de Arrhenius na atividade da lipase na faixa de temperatura entre 30 e 50 °C28*
- Figura 10 - Gráfico de Lineweaver-Burke utilizado para obter os valores de K_m e V_{max} da lipase.29*

Figura 11 - Gráfico de Pareto para a resposta “taxa de imobilização”: É possível observar através do gráfico que todas as variáveis testadas possuíram significância estatística ($p=0,5$) para a resposta estudada. 32

Figura 12 - Gráfico de Pareto para a resposta “recuperação da enzima”: É possível observar através do gráfico que nenhuma das variáveis testadas possuiu significância estatística ($p=0,5$) para a resposta estudada. 32

Figura 13 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “percentual de enzima no volume total da solução” e “tamanho das esferas de alginato”. 33

Figura 14 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio”. 33

Figura 16 - Gráfico de Pareto para a resposta “taxa de imobilização” onde pode-se visualizar o pH com maior influência dentre todas as variáveis independentes. 36

Figura 17 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio” em pH 5. 37

Figura 18 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio” em pH 3,68. 37

Lista de tabelas

<i>Tabela 1 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental 2^{5-1} para avaliar suas influências no encapsulamento da lipase.</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 2 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento composto rotacional 2^3 para determinação de valores ótimos no encapsulamento da lipase.</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 3 - Concentrações de células em suspensão e respectivas absorvâncias detectadas em espectrofotômetro ($\lambda=600$ nm).</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 4 - Níveis das variáveis testadas no planejamento experimental fracionado 2^{5-1}</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 5 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento central composto.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 6 - Valores obtidos de “immobilization yield” para cada experimento e os valores calculados pelo modelo obtido</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 7 - Confirmação do modelo obtido através de experimentos aleatórios dentro da faixa de níveis das variáveis pesquisadas</i>	<i>38</i>

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse industrial pelas enzimas incentiva as pesquisas em produção e obtenção desses biocatalisadores mundialmente. Estando entre as enzimas com maior interesse industrial, as lipases são alvo de diversos estudos de produção, purificação e imobilização.

A maior barreira para substituição de um catalisador químico por um biológico é certamente o preço, inerente da obtenção, na maioria dos casos, via microorganismos e muitas vezes em quantidades relativamente baixas, seguido de purificação em nível adequado. Além do custo de obtenção, após o uso não é possível recuperar as enzimas de maneira simples e barata, como numa destilação. A sensibilidade das proteínas às variações de temperaturas e outras condições do meio, como pH, torna o processo ainda mais complicado. Pesquisadores vêm se dedicando a encontrar maneiras mais eficientes de produzir moléculas de interesse, seja buscando microorganismos mais eficientes e utilizando-se de engenharia genética, ou estudando condições ideais de cultivo e reatores que apresentem melhor desempenho.

Como formas de driblar o problema de custo, além da tentativa de baratear ou tornar mais efetiva a produção das moléculas de interesse, os pesquisadores podem ainda focar os estudos em duas áreas: purificação e imobilização das enzimas. Os processos de purificação são responsáveis por ao menos 50% dos custos de obtenção de um produto biológico e pode se tornar ainda maior dependendo do grau de pureza desejado, de acordo com a finalidade do produto. Já com a imobilização, o catalisador homogêneo, facilmente perdido após a reação, torna-se um catalisador heterogêneo, facilmente separável do meio reacional e reutilizável por algumas ou diversas vezes. Essa possibilidade, além de permitir mais facilidade e conveniência em reatores de batelada permite usar a enzima como em reatores de fluxo contínuo, como recheio de coluna.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Lipases

As lipases constituem uma classe especial de esterases, sendo enzimas extracelulares de grande importância fisiológica que atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis promovendo sua hidrólise com a liberação de ácidos graxos e glicerol. Por esse motivo também são denominadas triglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3) (Jaeger, Dijkstra *et al.*, 1999)

Mais especificamente, em 1958, Sarda e Danuelle diferenciaram as lipases de outras esterases como sendo enzimas incapazes de agir lipoliticamente em uma solução verdadeira de monômeros de ésteres, isso é: são carboxilesterases que agem sobre substratos emulsificados. Isso implica dizer que a cinética enzimática não pode ser descrita pelo método de Michaelis-Menten, que são válidos apenas para fases homogêneas. Os substratos lipolíticos não mantêm uma homogeneidade, mas sim um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelares e emulsificados. (Verger, 1997; Jaeger e Reetz, 1998).

Estruturalmente, as lipases demonstram um padrão de dobramento α/β hidrolases (Figura 1), isso é: uma ordem definida de α -hélices e folhas- β que pode ser observada também em epóxido hidrolases e haloperoxidases (Grochulski, Li *et al.*, 1993; Bornscheuer, 2002). O sítio ativo das lipases é formado pelo trio de aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina e encontra-se frequentemente protegido por uma estrutura chamada “lid” (tampa) que precisa sofrer uma alteração conformacional para que o sítio ativo seja exposto, agindo realmente como uma tampa que protege o sítio ativo do meio. Essa alteração ocorre quando a enzima se encontra em uma área de interface água/lipídeo (Brady, Brzozowski *et al.*, 1990; Winkler, D'arcy *et al.*, 1990; Schrag, Li *et al.*, 1991).

Desde que foi descrita a capacidade de diversas bactérias de secretar lipases, por C. Eijkmann, e com a descoberta de que tais moléculas permanecem ativas mesmo em solventes orgânicos (Zaks e Klivanov, 1984), esta enzima se estabeleceu entre os

mais importantes grupos de biocatalisadores na biotecnologia. Dentre os motivos que tornam essa enzima tão atrativa, estão:

- alta disponibilidade: As lipases são disponíveis em grandes quantidades, já que muitas delas são produzidas em larga escala por diversas classes de fungos e bactérias;
- co-fatores: as lipases geralmente não utilizam co-fatores para catalisar suas reações, o que torna mais barato e simples utilizá-las;
- reações indesejadas: as lipases normalmente não promovem reações secundárias, o que torna mais prática sua aplicação e engenharia de processos (Jaeger e Eggert, 2002).

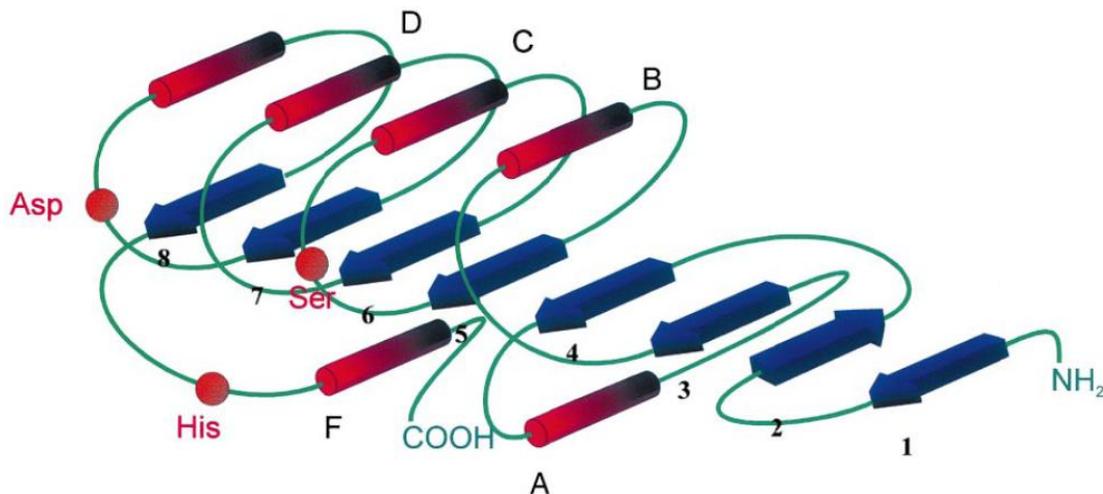


Figura 1-Representação esquemática do padrão de dobra α/β hidrolases: α -hélices representadas por um cilindro vermelho e folhas- β por setas azuis. Os círculos representam a posição relativa do trio de resíduos catalíticos.

As lipases podem ser observadas ou obtidas de diversas fontes diferentes, tanto animais e vegetais quanto microbianas: *Acinetobacter calcoaceticus* (Fischer e Kleber, 1987); *Aspergillus nidulans* (Mayordomo, Randez-Gil *et al.*, 1999); *Aspergillus oryzae* (Sharma, Chisti *et al.*, 2001); *Aspergillus niger* (Haridasan Namboodiri e Chattopadhyaya, 2000); *Bacillus cereus* (Dutta e Ray, 2009); *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* (Jaeger, Steinbuchel *et al.*, 1995); o nabo (Hills e Mukherjee, 1990); o girassol (Sagiroglu e Arabaci, 2005); e por diversos animais, como cavalos

(Berton, Sebban-Kreuzer *et al.*, 2007); galináceos (Nie, Fang *et al.*, 2009); camundongos (Kershaw, Hamm *et al.*, 2006) e os próprios seres humanos (Jocken, Smit *et al.*, 2008).

A variedade de lipases produzida por organismos diferentes se reflete nas características que essas enzimas podem apresentar. Uma lipase pode ser ácida, com pH ótimo em torno de 2,5, como no caso da lipase ácida de *Aspergillus niger* estudada por Mhetras *et al.* (2009). Podem ainda apresentar-se alcalinas, com maior atividade em pHs bastante elevados, como no caso da lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic, Masui *et al.*, 2006), ou a lipase encontrada no arroz, apresentando ambos pH ótimo de 11,0 (Bhardwaj, Raju *et al.*, 2001). Assim como as diferenças observadas nos pHs ótimos de atividades, os trabalhos de diversos pesquisadores puderam comprovar também a variedade de comportamento das lipases no que se refere à temperatura. Romero e colaboradores (2007) caracterizaram as propriedades catalíticas da lipase aderida ao micélio de *Aspergillus niger* e identificaram a temperatura ótima da enzima entre 4°C e 8°C, enquanto Salameh e Wiegel (2007) identificaram uma lipase termofílica em *Thermosyntropha lipolytica* com temperatura ótima de 96°C. Características tão diversificadas permitem o uso da enzima em diversas situações, para tal, bastaria, em teoria, obter a enzima de outra fonte. Logicamente há muitos outros fatores a ser considerados, como a viabilidade de obter de outra fonte específica e as diversas características bioquímicas inerentes a essa nova molécula, como a inibição por íons. A lipase produzida por *Burkholderia cepacia* foi caracterizada anteriormente, por outros pesquisadores, como possuindo um pH ótimo de 9,0 e 40°C como temperatura ótima para sua atividade, sendo classificada como uma lipase alcalina (Dalal, Singh *et al.*, 2008).

Na natureza, as lipases desempenham um papel importante na fisiologia de animais, plantas e diversos microorganismos, sendo responsáveis pelo catabolismo dos lipídeos adquiridos através da dieta; agindo extracelularmente para absorção dos ácidos graxos do meio ou até mesmo no processo de germinação de sementes, onde os lipídeos são a fonte primária de energia. A disponibilidade de tal energia depende da ação da lipase, que lisa a molécula de triacilglicerol liberando o glicerol e ácidos graxos

livres. Nos humanos, lipase pancreática que atua nas primeiras porções do intestino delgado, lisa os triacilgliceróis em uma mistura de 2-monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (Harwood, 1997; Champe, Harvey *et al.*, 2005).

2.2. Aplicações biotecnológicas das lipases:

As lipases são capazes de executar diversas outras reações além da hidrólise dos triglicerídeos, como alcoólises, aminólises, esterificações, transesterificações (Patel, Nagarajan *et al.*, 1996), além disso, possuem alta especificidade quanto a enantiômeros e podem atuar em uma grande quantidade de substratos não naturais. Esses fatores possibilitam que sejam usadas em vários segmentos da indústria e pesquisas, dentre os quais se destacam:

2.2.1. Detergentes

Um dos problemas relacionados com a lavagem de roupas e outros materiais é a remoção de gorduras. Uma maneira de solucionar isso é o uso de altas temperaturas e alcalinização do meio durante a lavagem. No entanto, o uso desses recursos leva ao desgaste do material e gasto demorado de energia. A aplicação enzimática é uma alternativa (Gerritse, Hommes *et al.*, 1998).

Desde 1963 houve um surgimento de detergentes adicionados de enzimas, como proteases. As lipases só foram utilizadas mais recentemente e em 1987 foi introduzida no mercado a primeira lipase comercial produzida em larga escala para essa finalidade, a Lipolase™ (Malmos, 1990). Desde então, os estudos e produção de “detergentes biológicos” vêm avançando consideravelmente (Grant, Mwatha *et al.*, 1990). Já vêm sendo adicionadas, em detergentes, sabões em pó e em produtos detergentes industriais, várias classes de enzimas, como proteases, amilases, celulasas e lipases, onde a ação da última é a de remoção de gorduras e óleos.

As lipases utilizadas nos produtos detergentes precisam ser de alta estabilidade no meio alcalino e resistir às altas temperaturas, já que as condições de lavagem podem exceder os 40°C e a água de lavagem pode ainda estar em níveis de pH

elevados. Além disso, é ideal que possuam resistência à ação das próprias proteases adicionadas ao detergente. (Pandey, Benjamin *et al.*, 1999).

2.2.2. Indústria química e farmacêutica

Em diversos produtos farmacêuticos e agroquímicos os compostos intermediários de síntese são misturas de enantiômeros, mas apenas uma das formas é biologicamente ativa. A produção de enantiômeros únicos a partir de intermediários quirais vem ganhando, desde o século passado, importância nas indústrias farmacêutica e química (FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, 1992; Patel, 2001).

A enantiosseletividade da lipase possibilita o uso da enzima com a finalidade de isolar uma das formas isoméricas. A lipase de *Burkholderia cepacia* já foi bastante utilizada com a finalidade de resolver misturas racêmicas de ésteres de alcoóis secundários (Theil, 1995). Como exemplo desse tipo de aplicação, temos a produção de inseticidas, como o Indanofan, onde apenas uma das formas enantioméricas possui ação pesticida desejada e a mistura racêmica pode ser totalmente convertida para uma solução pura da forma (S)-Indanofan com uma combinação de técnicas químicas e resolução enzimática, utilizando lipase de *Penicillium roqueforti* (Tanaka, Yoshida *et al.*, 2002).

2.2.3. Síntese de polímeros

O interesse em utilizar enzimas para a síntese de polímeros emergiu com a necessidade de se realizar tal procedimento sem o uso de metais pesados e com um menor gasto de energia com temperatura empregada no processo. Além disso, a utilização de enzimas proporciona uma maior seletividade (Gross, Kalra *et al.*, 2001).

Desde 1987 que se têm relatos da utilização da lipase com a finalidade de produzir polímeros *in vitro*, mas com a formação de cadeias curtas (tetrâmeros e trímeros). Sabe-se hoje que as lipases são capazes de realizar reações de polimerização de ésteres racêmicos e diois aquirais (Margolin, Crenne *et al.*, 1987). As técnicas foram aperfeiçoadas gradualmente, e em 1992, Morrow and Wallace

conseguiram produzir cadeias poliméricas de 7,9 kDa (Morrow e Wallace, 1992). Hoje, utilizando-se a lipase de *Candida antarctica* já foi possível sintetizar cadeias poliméricas de diesters e dióis de 20 kDa (Kim e Dordick, 2001).

2.2.4. Biodiesel

O Biodiesel é um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável. É derivado de gorduras animais ou óleos vegetais e pode substituir total ou parcialmente o diesel de origem fóssil tanto no uso em motores de caminhões, tratores e automóveis convencionais quanto na produção de energia e calor no uso de caldeiras em indústrias. Quimicamente, o biodiesel consiste de ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos de cadeia longa, obtidos através da transesterificação dos triacilglicerídeos com os respectivos alcoóis (Anp - Agência Nacional De Petróleo, 2004; Costa e Hoeschl, 2006). Biodiesel pode ser produzido enzimaticamente a partir de óleos vegetais com o uso da lipase, através de uma reação de transesterificação. Essa reação permite obter os ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, que constituem o combustível (Brandão, Silva *et al.*, 2006).

A possibilidade de utilização de diversas fontes de triglicerídeos na obtenção desse combustível abre uma grande diversidade de opções na busca por alternativas para produção do biodiesel, cada vez mais interessantes dos pontos de vista econômico e socioambiental. Isso pode ser observado na grande quantidade de trabalhos recentes que visam produção desse biocombustível utilizando diversos óleos vegetais e gorduras animais como matéria-prima (Shimada, Watanabe *et al.*, 2002; De Sousa, Cavalcanti-Oliveira *et al.*, 2010; Zhao, Song *et al.*, 2010).

Comparativos podem ser realizados entre o biodiesel e o diesel mineral (petrodiesel) no que diz respeito às emissões de escape de veículos utilizando o diesel comum, “blends” (misturas) e biodiesel. Uma pesquisa realizada com veículos automotivos de diversos modelos e anos (E.P.A., 2002) mostrou que o aumento na proporção de biodiesel leva a quedas significativas nas emissões de hidrocarbonetos, CO₂ e material particulado. A pesquisa mostra ainda que apesar dos benefícios

notados, houve um pequeno aumento nas emissões de óxidos de nitrogênio. Utilizando B-20, o “blend” mais comum, a redução de material particulado e monóxido de carbono foi de pouco mais de 10% e 20% para hidrocarbonetos; o aumento nas emissões dos NO_x foi de 2% (Figura 2). Os resultados foram praticamente os mesmos para os modelos testados e os resultados não refletem exatamente as emissões reais de cada tipo combustível, já que os dados foram obtidos sem o uso de nenhum tipo de catalizador, material absorvedor de óxidos de nitrogênio ou captadores de materiais particulados, dessa forma os resultados podem ser ainda mais otimistas.

Um comparativo entre a biodegradabilidade do óleo diesel mineral, alguns tipos de biodiesel e “blends” classificou como “prontamente biodegradáveis” todos os tipos de biodieseis testados, atingindo níveis médios de degradação de 84% em ambiente aquático e 88% em solo úmido em pouco menos de um mês. O petrodiesel demonstrou cerca de 18% de degradação no mesmo período. Quando adicionado biodiesel ao diesel comum, foi percebida uma relação linear entre o teor adicionado e a capacidade de degradação no ambiente, podendo atingir um aumento nessa biodegradabilidade de 100% (Peterson, 2005).

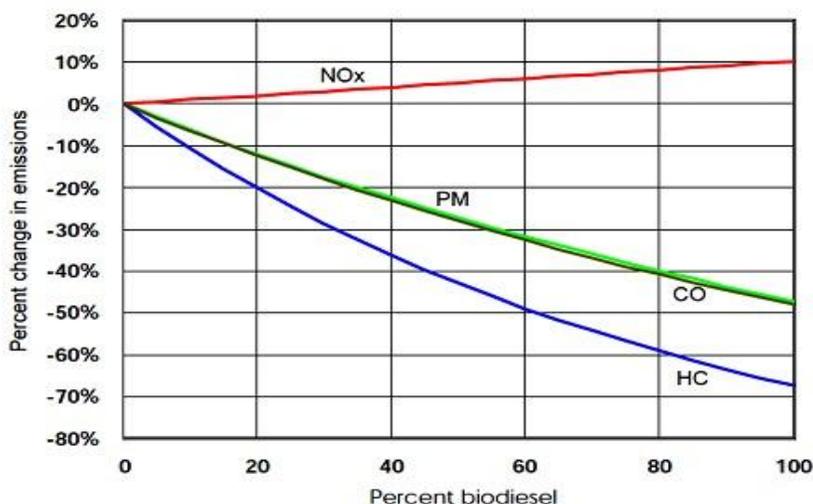


Figura 2 - Emissões médias de compostos por motores automotivos nas diversas concentrações de biodiesel (blends) em diesel mineral.

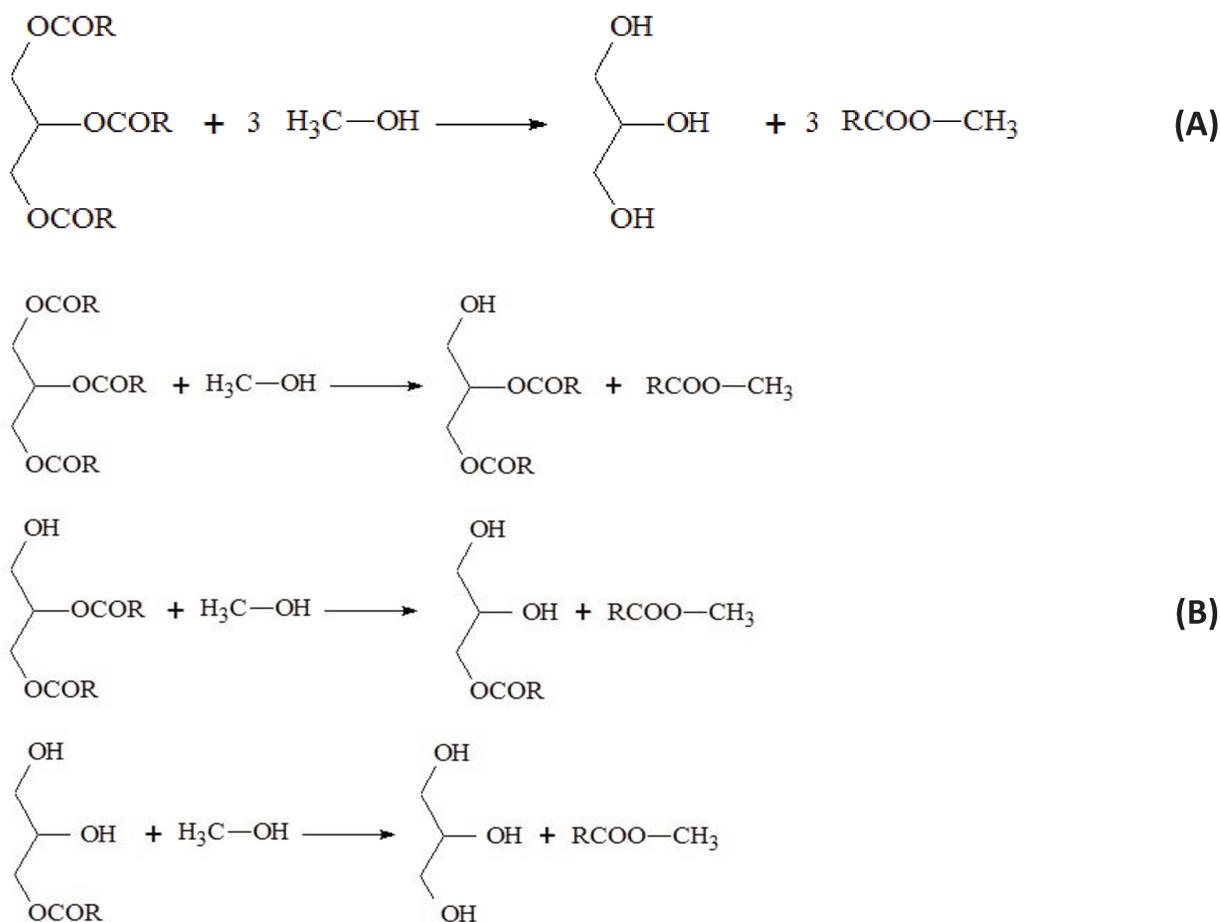


Figura 3 - Reação de transesterificação utilizando álcool de cadeia curta (metanol) para converter triglicerídeo em glicerol e ésteres graxos de metila. (A) modelo de reação geral; (B) reação dividida em 3 etapas.

A lipase, quando em meio alcoólico não promove a hidrólise dos lipídios, mas a alcoólise. Ou seja, quando na ausência de água, usa o álcool presente no meio para promover sua reação. A alcoólise é mais conhecida como transesterificação. A Figura 3 ilustra o processo de transesterificação de um triglicerídeo. A lipase transesterifica cada um dos ácidos graxos do lipídio, gerando, por molécula de triglicerídeo, três ésteres graxos do álcool utilizado como agente transesterificante, que geralmente é metanol ou etanol. Além disso, o procedimento gera outro produto de grande valor comercial, o glicerol.

A matéria prima do biodiesel é o óleo vegetal. Teoricamente também é possível utilizar gorduras animais, no entanto os processos industriais atualmente empregados, realizados com catalisadores químicos e com altas taxas de conversão, requerem

matéria prima de alta qualidade. Isso implica dizer que o óleo utilizado deve conter baixa acidez e ser considerado anidro. Se esses requerimentos não são atendidos, ou ainda a quantidade de catalisador usada é insuficiente, haverá baixa conversão e formação de sabão no reator, aumentando a viscosidade do produto final e dificultando a separação do biodiesel/glicerol (Meher, Vidya Sagar *et al.*, 2006). Diante desses fatores, apesar dos bons rendimentos obtidos atualmente com a transesterificação básica (98% em cerca de 30 minutos) há custos envolvidos na obtenção da fonte de ácidos graxos em grau de pureza apropriados. Há pré-tratamentos já descritos na literatura que reduzem os teores de ácidos graxos livres de até 20% para valores abaixo de 1%, facilitando o uso de materiais de menor qualidade. Mas esse pré-tratamento, em duas etapas, exige tempo e custos (Canakci e Van Gerpen, 2001).

A utilização de catalisador biológico, como a lipase, proporciona uma maior liberdade na utilização da matéria prima, pois a especificidade enzimática permite realização do processo mesmo na presença de ácidos graxos livres, que dificultam o processo químico (Shah, Sharma *et al.*, 2004). Além disso, a remoção do glicerol é facilitada pela não formação de sabões e não há necessidade de processos de purificação para remoção do catalisador (geralmente, o NaOH), além de tratamento para desalcalinização de águas residuais.

2.3. Imobilização enzimática

A imobilização de enzimas consiste em aderir ou aprisionar este catalisador em um suporte macroscópico insolúvel, separado do meio da reação, mas permitindo contato com a fase solúvel, onde o substrato, efetores e inibidores estão dispersos. Isso permite que a enzima possa ser reutilizada seguidamente, reduzindo significativamente os custos no processo industrial ou laboratorial. Dessa forma sua utilização nos mais diversos tipos de reatores fica simplificada, pois a reposição contínua da enzima não é necessária e se torna simples a sua remoção do meio reacional (Trevan e Grover, 1979; Blanch e Clark, 1996).

Idealmente, a imobilização vai fornecer à enzima uma estabilidade mais acentuada, por dificultar sua mobilidade e, conseqüentemente, mudanças

conformacionais. Além disso, seu sítio ativo não deve sofrer mudanças, de modo que a enzima continue exercendo sua atividade plenamente (Gandhi, Sawant *et al.*, 1997).

De modo geral, as enzimas sofrerão alterações no que se refere a suas características bioquímicas, e um dos fatores que irão influenciar essas alterações é o tipo de imobilização e de material do suporte. Assim, é possível classificar os diversos métodos de imobilização de enzimas nas seguintes categorias (Blanch e Clark, 1996; Mcaulge, Aehle *et al.*, 2007):

2.3.1. Adsorção

É o método mais simples de imobilização, consistindo na simples exposição da enzima ao suporte nas condições adequadas. Os suportes, ou matrizes, podem ser os mais diversos, como a quitina, terra diatomácea ou resinas de troca iônica. A facilidade de adsorção implica numa facilidade de dessorção, levando a uma fácil perda enzimática. Por outro lado, essa fácil dessorção pode ser vista como uma vantagem, uma vez que permite a fácil recuperação do suporte após desnaturação da enzima (Figura 4-A).

2.3.2. Ligação covalente

Esse tipo de imobilização funciona através da ligação covalente entre grupamentos presentes nas enzimas, como hidroxil, mercapto, ou amina e uma superfície ativada, como uma resina. A ligação covalente oferece uma alternativa à fraca ligação proporcionada pelos métodos de adsorção, no entanto, por envolver tratamento químico pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima (Figura 4-B).

2.3.3. “Crosslinking” (ligações cruzadas)

Um tipo especial de imobilização por ligação covalente é a imobilização por ligações cruzadas, ou crosslinking. Nesse método as enzimas são fortemente ligadas entre si, com a utilização de um composto multifuncional, como o glutaraldeído. A eficiência das ligações desse método permite que a perda enzimática no suporte seja desprezível. Algumas desvantagens associadas às ligações cruzadas são o custo e a

impossibilidade de regenerar o suporte. Além desses, pode ocorrer modificação conformacional na enzima devido às múltiplas ligações, o que leva a uma alteração na atividade (Figura 4-C).

2.3.4. Encapsulamento

Aprisionamento refere-se a envolver a enzima em membrana semipermeável ou microcápsula. Quando o aprisionamento se dá em cápsula polimérica, dá-se o nome encapsulamento. Essas membranas ou capsulas devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas (macromoléculas), mas oferecendo passagem livre aos produtos e substratos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande demais para passar pelos poros do material encapsulante (Figura 4-D).

2.3.5. Imobilização da lipase

Inúmeros trabalhos científicos reportam a imobilização de lipase para sua utilização biotecnológica e industrial. Desde a década de 70, pesquisadores vêm tentando, muitas vezes com sucesso, utilizar as lipases em suportes sólidos para exercerem tanto atividade lipolítica quanto sintética. Muitos desses artigos referem-se à bem sucedida imobilização da lipase por adsorção, utilizando-se ou não de aditivos para incrementar a capacidade adsortiva do suporte, que pode ser dos mais variados tipos, como nylon 6, polipropileno, polimetil-metacrilato, poliestireno, policloreto de vinila, quitosana, quitina, entre outros materiais (Dalla-Vecchia, Nascimento *et al.*, 2004).

Pesquisadores vêm obtendo sucesso também na imobilização da lipase por ligação covalente e em diferentes materiais orgânicos, como epóxi e sefarose e inorgânicos, como alumina e sílica ativados e até mesmo copolímeros de estireno-divinilbenzeno poli glutaraldeído (Arroyo, Sánchez-Montero *et al.*, 1999; Aybastier e Demir, 2010). Yücel (2011) obteve sucesso em imobilizar a lipase comercial Lipozyme

TL em uma matriz extremamente barata, o bagaço de azeitonas pulverizado, ativado com glutaraldeído, para garantir a retenção das enzimas. O processo conseguiu reter até 80% da atividade após 10 bateladas consecutivas, sendo utilizada na produção de biodiesel com o próprio óleo das azeitonas como matéria prima. No caso de imobilização por aprisionamento, têm-se exemplos bem sucedidos quando do uso de terra diatomácea (Meunier e Legge, 2010), alginato de cálcio (Won, Kim *et al.*, 2005), caulinita (Iso, Chen *et al.*, 2001), silicatos (Kawakami, Urakawa *et al.*, 2009) entre outros.

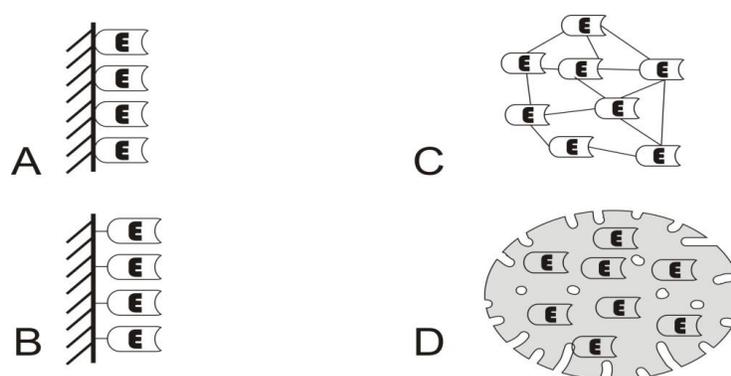


Figura 4-Representação dos métodos de imobilização de enzimas: A- Adsorção; B- Ligação covalente; C- Ligações cruzadas; D- Encapsulamento.

2.4. Alginato

O alginato é um polissacarídeo vegetal que desempenha papel estrutural nas células e espaço intercelular nas algas da classe Phaeophyceae (também conhecida como a classe das algas marrons). Sua constituição promove a essas algas rigidez e flexibilidade, compreendendo cerca de 40% de seu peso seco (Garcia-Cruz, Foggetti *et al.*, 2008).

É um polímero linear carregado negativamente, composto basicamente de ácido β -D-manurônico (blocos M) e α -L-gulurônico (blocos G) ligados por ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4. As proporções de blocos M e G no alginato dependerão de sua origem, que pode variar de acordo com a espécie ou com a parte da alga analisada (Haug, Larsen *et al.*, 1974) e conferem ao polímero características próprias, fazendo com que varie desde uma solução mais ou menos viscosa, até uma estrutura gelificada, quando na presença

de cátions divalentes. Tais cátions, como o Ca^{++} , agem ligando as estruturas secundárias M-M, M-G ou G-G. As estruturas formadas por blocos M-G, por exemplo, são mais flexíveis, enquanto as estruturas G-G formam estruturas rígidas (Ertesvåg e Valla, 1998; Remminghorst e Rehm, 2006).

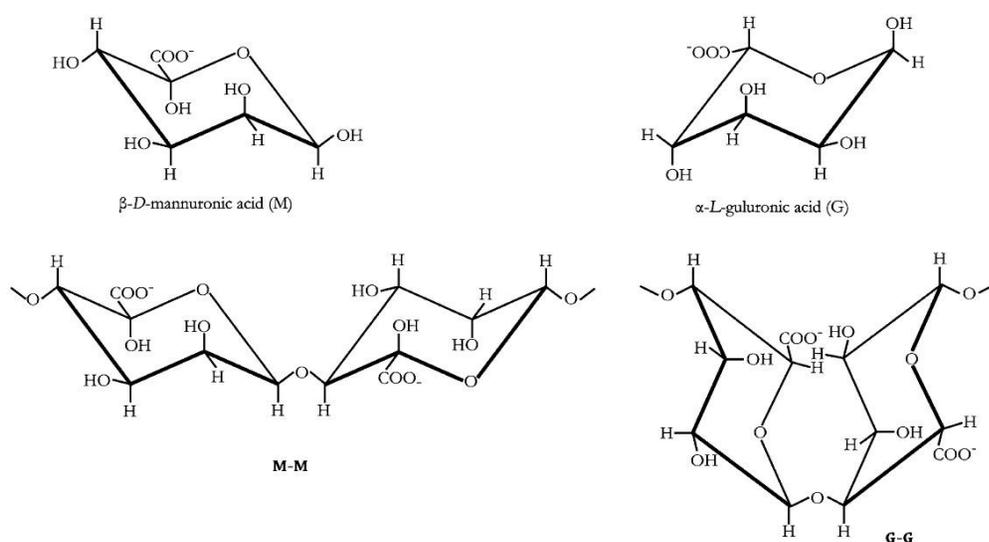


Figura 5-Estruturas dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico e sua estrutura secundária em blocos MM e GG.

O alginato pode ser obtido também de fontes bacterianas. Gêneros como *Pseudomonas* e *Azobacter* são capazes de produzir esse polímero extracelularmente durante sua fase vegetativa. Embora a estrutura seja semelhante, o papel biológico do alginato bacteriano difere do vegetal, atuando desde como película protetora (Moreno, Najera *et al.*, 1998) até fator de virulência em bactérias patogênicas. Quando da formação de grandes conglomerados bacterianos, auxilia na estruturação dos biofilmes, por sua característica mucóide (Costerton, 2001).

As características do alginato tornaram alvo de muitas pesquisas e aplicações industriais, principalmente biotecnológicas e alimentícias. Na indústria de alimentos são usadas como estabilizantes de maioneses e molhos, espessantes, emulsificantes e até mesmo na produção de imitações de cerejas, que são basicamente géis de alginato de cálcio com açúcar (Garcia-Cruz, Foggetti *et al.*, 2008). As aplicações biotecnológicas e pesquisas na área são extensas, e diversas publicações relatam o uso de alginato em

processos de extração (Sharma e Gupta, 2001; Won, Kim *et al.*, 2005), imobilização de enzimas ou células (Arroyo, Sánchez-Montero *et al.*, 1999; Mondal, Mehta *et al.*, 2006; Sacchetin, Moraes *et al.*, 2010) e até mesmo purificação por cromatografia (Roy, Jain *et al.*, 2004).

Wingender *et al.* (1987) publicaram um trabalho confirmando, através de diversos experimentos, as suspeitas levantadas por outros autores anteriormente, de que havia interações entre as moléculas de alginato e lipases. Além disso, mais recentemente outros pesquisadores já demonstraram que há afinidade do alginato com outras enzimas, como amilases (Sharma, Sharma *et al.*, 2000a) e fosfolipases (Sharma, Sharma *et al.*, 2000b).

A anteriormente mencionada propriedade de gelificar-se em um produto hidrofóbico quando exposto a certas condições específicas (no caso, quando na presença de cátions bivalentes), qualifica o alginato em um grupo dos chamados “smart polymers”, ou polímeros inteligentes (Galaev, Gupta *et al.*, 1996). Essa característica vem sendo utilizada biotecnologicamente na purificação de substâncias, que possuam afinidade com estes polímeros. O polímero forma um complexo com a proteína alvo quando em solução que, por uma mudança no ambiente, se insolubiliza. Graças à afinidade entre as moléculas, a proteína alvo co-precipita permitindo assim a sua fácil separação do meio inicial, onde se encontrava solubilizada (Mattiasson, Kumar *et al.*, 1998).

A afinidade que as lipases demonstram com o alginato possibilita que a chamada precipitação por afinidade seja usada como método de purificação, e já foi demonstrada por alguns autores (Sharma e Gupta, 2001; Mondal, Mehta *et al.*, 2006), onde a solução contendo lipase foi adicionada ao alginato a posteriormente precipitada com cálcio. A partir do precipitado formado foi possível recuperar a lipase com aumentos de atividade de até cinco vezes e grandes melhorias na estabilidade e afinidade da enzima pelo substrato.

2.5. Planejamento estatístico

O planejamento estatístico de experimentos, ou DOE (design of experiments) é uma ferramenta estatística largamente utilizada na otimização de diversos processos, incluindo a produção de substâncias por microorganismos e purificação de proteínas. (Kammoun, Naili et al., 2008; Khosravi-Darani e Zoghi, 2008; Porto, Medeiros E Silva et al., 2008). Os planejamentos estatísticos diferem de outros métodos clássicos de otimização porque esses métodos clássicos envolvem a variação de apenas um fator por vez, mantendo fixas as outras variáveis independentes. Isso faz com que os métodos clássicos não sejam muito adequados á otimização utilizando múltiplos fatores (Liu e Tzeng, 1998; Kammoun, Naili et al., 2008).

Além da clara vantagem de poder otimizar um processo interagindo as diferenças causadas por mais de uma variável ao mesmo tempo, o planejamento estatístico possibilita realizar experimentos com muito mais rapidez que os métodos tradicionais, requerendo um número pequeno de repetições para cada fator. Permite ainda a identificação das variáveis mais importantes em questão em um dado experimento. Uma vez que a variável é identificada ela pode ainda ser otimizada (Weuster-Botz, 2000). Fazendo uso dos planejamentos estatísticos, o pesquisador pode ainda decidir as direções mais promissoras para experimentos futuros (Lim e Lee, 2008).

O planejamento estatístico de experimentos, ou planejamento experimental, pode ser utilizado nas mais diversas áreas em que se deseja realizar uma avaliação estatística da significância de um determinado fator nas respostas escolhidas, além dos efeitos das interações entre as variáveis. Além de informar se a variável exerce significância no processo, informa ainda como se dá essa influência. Os trabalhos que vêm sendo realizados com o alginato e as lipases possuíam a finalidade de purificá-las do meio de onde foi obtido, separando-as das demais proteínas e impurezas através de precipitação por afinidade. Essa etapa seria seguida de eluição da enzima do precipitado, com intuito de avaliar os parâmetros necessários para confirmar a purificação da enzima. Outros ainda utilizam-se de lipase purificada em laboratório ou produtos comercialmente disponíveis para realizar a imobilização. O presente trabalho propõe a precipitação do alginato contendo meio de cultura microbiano rico em lipase diretamente em microesferas de alginato. O procedimento faria uso da já conhecida

afinidade entre o alginato e as lipases (Wingender, Volz *et al.*, 1987) com o intuito de imobilizar seletivamente a enzima diretamente de seu extrato bruto, pulando etapas nos processos de purificação e imobilização. Dessa forma, a intenção é obter um produto parcialmente purificado e imobilizado em suporte que pode ser utilizado como recheio de reator ou coluna, ou utilizado diretamente em procedimentos atuando como catalisador heterogêneo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio

3.2 Objetivos específicos

- Produzir laboratorialmente a lipase utilizando cepa de *Burkholderia cepacia* e caracterizá-la parcialmente;
- Avaliar fatores que influenciem na imobilização da enzima;
- Otimizar os níveis dos fatores apontados como significantes no processo;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microorganismos

O microorganismo utilizado nos trabalhos para obtenção da lipase foi a bactéria *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 adquirida do instituto André Toselo.

A cepa original foi armazenada em geladeira sob as condições de aquisição e a partir dela um repique foi realizado e utilizado posteriormente. A partir do novo repique os microorganismos foram armazenados em miçangas de vidro devidamente lavadas em água e sabão, hipoclorito de sódio e autoclavadas para esterilização. Após a limpeza, foram guardadas em Eppendorfs contendo cada um 25 miçangas. Sobre as miçangas, dentro dos eppendorfs, foram vertidos 0,5 ml de cultura líquida contendo a bactéria e 0,5 ml de glicerol 86%.

As bactérias foram então armazenadas em freezer (-18 °C) para posterior utilização. O glicerol protegeu as células bacterianas de danos causados pelas baixas temperaturas em que foram armazenadas e uma mesma geração de bactérias foi utilizada em todos os experimentos.

4.2. Obtenção da enzima

A obtenção da enzima foi realizada em duas etapas. O pré inóculo foi preparado com extrato de levedura (0,5%), peptona (0,5%) e óleo de soja (3%). O pré inóculo foi autoclavado e posteriormente foi adicionada assepticamente uma das miçangas contendo células bacterianas. Após um período de 24 horas, procedeu-se, a partir dessa etapa, o inóculo.

O meio para obtenção da lipase possuiu a seguinte composição: Peptona (0,5%), extrato de levedura (0,2%), extrato de carne (0,1%), NaCl (0,5%) e óleo de oliva (1,0%). O meio possuiu pH 7,0 e os microorganismos permaneceram inoculados sob temperatura de 30°C e 150 RPM de rotação por 48 horas (Dalal, Singh *et al.*, 2008). Para determinação da concentração celular a ser inoculada, o pré-inóculo foi avaliado em espectrofotômetro ($\lambda=600$ nm) e centrifugado a 3.000 RPM por 30 minutos. Após o

processo, houve nova leitura para avaliação da diferença de absorvância e calcular a quantidade a ser adicionada ao novo meio de cultura.

Após o período de fermentação, a suspensão foi centrifugada a 5000x g por dez minutos e filtrada, para remoção de células bacterianas. Esse extrato contendo lipase foi então utilizado nos experimentos.

4.3. Planejamento estatístico

Para avaliação de fatores atuando simultaneamente no encapsulamento da lipase, foram realizados planejamentos estatísticos experimentais. Inicialmente um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} foi realizado com as seguintes variáveis independentes: Concentração do alginato de sódio, concentração do cloreto de cálcio na solução precipitante, pH da solução de alginato, diâmetro das esferas de alginato e relação solução enzimática/solução de alginato utilizada (Tabela 1). Um segundo planejamento realizado em seguida, dessa vez um delineamento central composto rotacional 2^3 . Esse novo planejamento foi realizado avaliando as respostas de acordo com concentrações do alginato e cálcio e o pH da solução de alginato (Tabela 2).

Tabela 1 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento experimental 2^{5-1} para avaliar suas influências no encapsulamento da lipase.

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de alginato (%)	1	2	3
pH	5	7	9
Diâmetro da esfera (mm)	1	2	3
Concentração de CaCl ₂ (mM)	100	200	300
% solução enzimática/volume total	30	40	50

Tabela 2 - Níveis e variáveis utilizados no planejamento composto rotacional 2^3 para determinação de valores ótimos no encapsulamento da lipase.

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de alginato (%)	0,32	1	2	3	3,68
Concentração de CaCl_2 (mM)	32	100	200	300	368
pH	3,64	5	7	9	10,36

4.4. Alginato e imobilização

As soluções de alginato foram preparadas dissolvendo o alginato sólido em tampão de ampla faixa tamponante, na concentração desejada, em pH indicado para cada experimento. O tampão de ampla faixa tamponante (Carmody, 1961), foi utilizado para garantir que todos os experimentos fossem realizados em condições semelhantes, eliminando efeitos causados por íons. Extrato enzimático e solução de alginato foram misturadas em vórtex formando um volume total de oito mililitros. A mistura alginato/extrato enzimático foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio sob constante agitação com o uso de agitador magnético. As recém-formadas esferas de alginato permaneceram por mais 20 minutos na solução para garantir total solidificação das partículas, sendo em seguida separadas da solução de cálcio com o uso de papel de filtro e lavadas com 100 ml de solução tampão de acordo com o pH utilizado no experimento em questão. A solução de cálcio e lavagens foram reservadas e utilizadas para análises enzimáticas e conteúdo protéico (Won, Kim *et al.*, 2005).

4.5. Análises de resultados

4.5.1. Proteínas

O conteúdo de proteínas totais do filtrado e lavagens foi analisado através de método de Bradford (1976). O reagente de Bradford utilizado nas dosagens foi preparado da seguinte maneira: 100 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250 foi

dissolvido em 50 ml de etanol 95%. A essa solução foi adicionado 100 ml de ácido fosfórico 85%. A solução resultante foi diluída para um volume final de um litro. As concentrações finais dos reagentes são: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01% (m/v), etanol 4,7% (m/v), e ácido fosfórico 8,5% (w/v).

O ensaio foi realizado adicionando-se 0,1 ml de solução protéica a 1,0 ml de reagente de Bradford. A mistura reage por cerca de 10 minutos e a absorbância é avaliada em espectrofotômetro a 595 nm contra um branco constituído de reagente e água. A conversão de absorbância em valores de concentração de proteínas (mg/ml) foi realizada através de curva padrão usando BSA como padrão de proteína.

4.5.2. Atividade lipolítica

A atividade lipolítica das soluções foi medida através da conversão do *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) em nitrofenol. O ensaio é composto de 1,8 ml de solução tampão, pH 9,0 contendo Triton X-100 0,5% e cloreto de sódio 0,15M, 0,2 ml de solução enzimática e 20 µl de solução de *p*-NPP 10 µM em acetonitrila. A mistura reage em banho-maria em tubos de ensaio por um período de tempo determinado sob a temperatura adequada. O tubo contendo a mistura reacional é levado a forno de micro-ondas e irradiado a 2,45 GHz para, parar a reação, por 30 segundos em um béquer contendo água suficiente para formar um volume de 100 mL evitando superaquecimento. A solução tem a sua absorbância medida em espectrofotômetro a 410 nm contra um branco que não contém substrato (Jain, Jain *et al.*, 2005).

4.5.3. Cálculo das respostas

4.5.3.1. Atividade específica

Para melhor avaliação dos aspectos relacionados à imobilização e pureza enzimática, faz-se necessário o uso do cálculo da atividade específica. A atividade específica relaciona a atividade da enzima por massa de proteínas totais contida na solução avaliada.

$$\textit{Atividade específica}(A_e) = \frac{A}{P_t} (U/mg)$$

4.5.3.2. Taxa de imobilização

Relação entre atividade específica da enzima encapsulada e atividade específica no extrato bruto enzimático usado na imobilização, representando o quanto de enzima foi concentrada no imobilizado.

$$\text{Taxa de imobilização (\%)} = \frac{A_{e(imm)}}{A_{e(free)}} (x100)$$

4.5.3.3. Recuperação da enzima

Relaciona a atividade lipolítica da enzima imobilizada com a atividade do extrato bruto, fornecendo a quantidade de enzima que foi recuperada da solução no processo.

$$\text{Recuperação} = \frac{A_{imm}}{A_{eb}}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. A lipase

5.1.1. Produção

A primeira etapa do processo foi a produção da enzima a ser utilizada a partir de fermentação de *Burkholderia cepacia* usando óleo de oliva (azeite) como indutor. As condições de fermentação utilizadas foram aquelas já descritas, publicadas por Dalal et al. em 2008. No entanto, num esforço de manter todas as fermentações em condições semelhantes, a quantidade de células inoculadas foi quantificada e padronizada.

Uma cultivo da bactéria foi realizado utilizando meio composto de extrato de levedura 5g.l^{-1} , peptona 5g.l^{-1} e óleo de oliva, como indutor, a 3% e inoculado com alça bacteriológica a partir do cultivo original. O meio permaneceu em agitador orbital por 48 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 RPM. Após centrifugação, o centrifugado foi lavado com água destilada e centrifugado duas vezes. As células foram suspensas em água destilada e uma série de diluições a partir dessa suspensão origina para análise das células em espectrofotômetro ($\lambda=600\text{ nm}$).

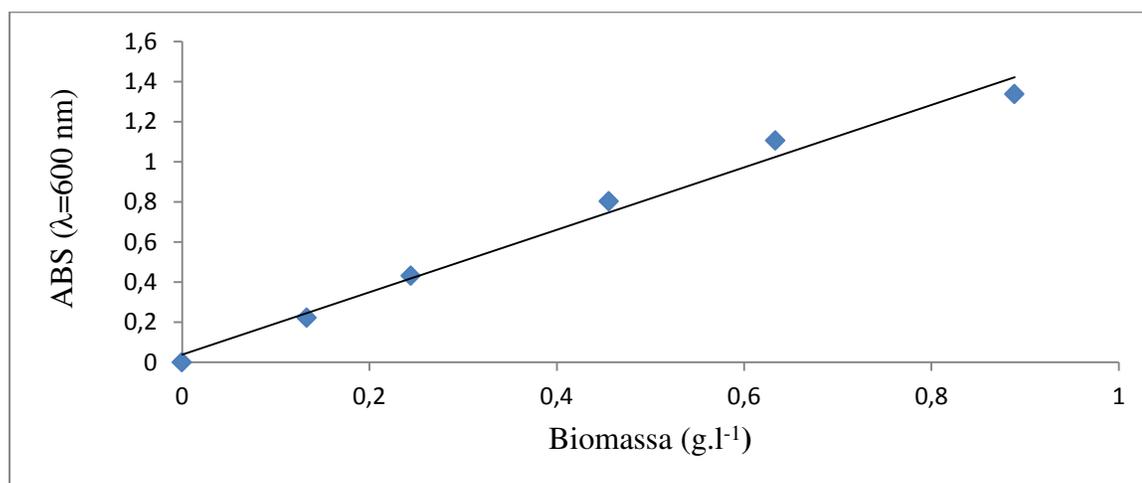


Figura 6 - Correlação entre a concentração de células de *Burkholderia cepacia* e a absorvância medida em espectrofotômetro ($\lambda=600\text{ nm}$). Coeficiente de correlação $R^2=0,9838$.

Após medição das absorvâncias, as suspensões com diferentes concentrações de células foram levadas à estufa à vácuo para secagem por 24 horas e pesadas em balança de precisão. A tabela 3 contém os valores de pesagem da massa seca bacteriana e as respectivas concentrações celulares calculadas de cada diluição. A Figura 6 é o gráfico da correlação obtida entre a concentração calculada de células bacterianas pela absorção espectrofotométrica 600 nm. Através desses dados foi possível padronizar todos os futuros inóculos de fermentações com uma mesma quantidade de células: 0,6 mg de massa celular para cada 50 ml de meio de cultura.

Tabela 3 - Concentrações de células em suspensão e respectivas absorvâncias detectadas em espectrofotômetro ($\lambda=600$ nm).

Experimento	Rec. + massa seca (g)	Recipiente (g)	Massa seca (g)	Diluição	Conc. De células (g/l)	Abs média
1	0,2076	0,2051	0,0025	1	0,888889	1,337333
2	0,2227	0,2199	0,0028			
3	0,1897	0,1870	0,0027			
4	0,1529	0,1509	0,002	2	0,633333	1,104667
5	0,2367	0,2347	0,002			
6	0,1515	0,1498	0,0017			
7	0,1860	0,1846	0,0014	3	0,455556	0,8015
8	0,2119	0,2105	0,0014			
9	0,2177	0,2164	0,0013			
10	0,1927	0,1921	0,0006	4	0,244444	0,430333
11	0,1594	0,1587	0,0007			
12	0,1774	0,1765	0,0009			
13	0,1610	0,1607	0,0003	5	0,133333	0,221667
14	0,1420	0,1415	0,0005			
15	0,1174	0,117	0,0004			

Para fins de padronização da enzima obtida, e conseqüente padronização dos dados obtidos, a cultura inicial de *Burkholderia cepacia* foi mantida armazenada congelada em miçangas de vidro. Todos os inóculos foram então realizados a partir dessa cultura, garantindo que todas as fermentações fossem realizadas utilizando uma mesma geração de microorganismos.

5.1.2. Caracterização

Antes de ser imobilizada, a lipase obtida de *Burkholderia cepacia* teve alguns parâmetros cinéticos determinados. A temperatura e pH ótimos da enzima foram determinados experimentalmente usando o *p*-npp como substrato enzimático. A Figura 7 ilustra as atividades lipolíticas determinadas experimentalmente em diferentes pHs utilizando tampão de ampla faixa tamponante (Carmody, 1961).

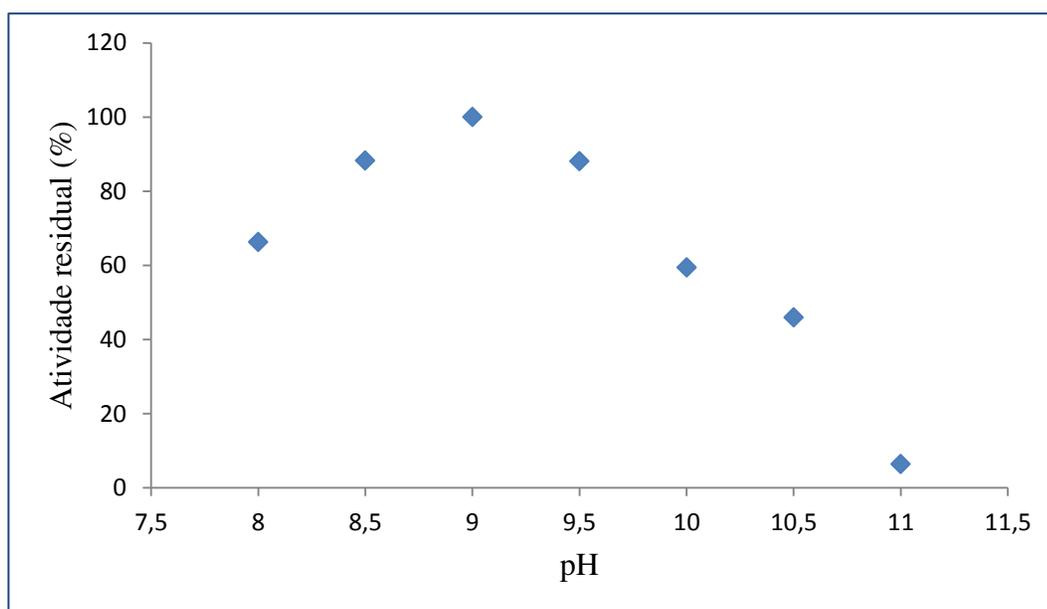


Figura 7 - Atividade enzimática da lipase sob diferentes condições de pH.

O pH ótimo encontrado para a enzima foi de 9,0. A enzima manteve boa atividade entre os pHs 8,5 e 9,5 (acima de 80%). No entanto, em pH 8,0 e acima de 9,5 a atividade já é reduzida consideravelmente, caindo para cerca de 66%. O mesmo resultado foi obtido para a lipase de mesma fonte usando o mesmo substrato sintético (Dalal, Singh *et al.*, 2008). Padilha, utilizando o mesmo extrato enzimático do mesmo microorganismo encontrou valores diferentes de pH e temperatura ótimos utilizando um

método diferente de dosagem, com óleo de oliva como substrato. O pH ótimo encontrado foi menos alcalino, 8,0. Além da diferença no pH, pôde ser observada também diferença no perfil de atividades, pois usando o substrato natural, a atividade se manteve acima de 60% até mesmo em pH 2,0 (Padilha, 2010). O mesmo valor de pH já foi apresentado anteriormente por outros pesquisadores quando utilizando a lipase sob o mesmo tipo de ensaio, tanto produzida por *B.cepacia* (Dalal, Singh *et al.*, 2008) quanto por *B. multivorans* (Gupta, Rathi *et al.*, 2005).

A temperatura ótima da enzima também foi analisada. A atividade foi medida como já descrito, sob diferentes condições de temperatura numa faixa entre 25 e 60 °C. A enzima apresentou máxima atividade a 50 °C, mantendo considerável atividade em temperaturas mais elevadas. Entre 40 e 60 °C aproximadamente, ainda pôde ser detectado cerca de 75% de atividade.

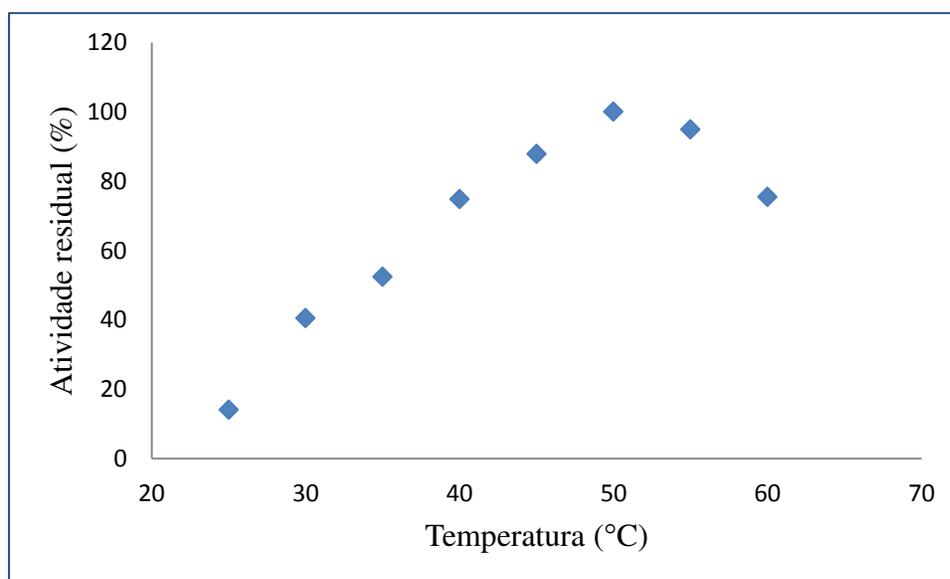


Figura 8 - Atividade enzimática da lipase sob diferentes condições de temperatura

A temperatura ótima dessa mesma enzima usando o óleo de oliva como substrato é de 37 °C, com boa tolerância térmica a temperaturas mais elevadas, perdendo apenas 10% de atividade a 50 °C (Padilha, 2010). Dalal (2008), no entanto, usando as mesmas condições, encontrou um valor 10 graus mais baixo do que o apresentado nesse trabalho. Um possível motivo para a diferença é que a enzima utilizada pelo autor não se encontrava em um estrato bruto, mas passou por etapas de

purificação antes de ser avaliada. A presença de contaminantes e demais proteínas no extrato enzimático pode influenciar nos resultados experimentais.

Através dos dados de influência da temperatura na atividade enzimática foi possível calcular a energia de ativação (E_a) da reação catalisada pela enzima. Utilizando o gráfico de Arrhenius, que avalia o logaritmo natural da constante de velocidade da reação (velocidade da reação enzimática) com o inverso da temperatura absoluta. A reação foi avaliada segundo esse aspecto em uma faixa de temperatura de 30 à 50 °C, faixa em que a reação apresenta acréscimo de atividade com o incremento da temperatura. Acima desse valor os efeitos da temperatura são opostos devido à inativação térmica do biocatalisador.

Pela equação de Arrhenius ($\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$) a inclinação da reta, ilustrada na Figura 9, é igual à razão entre a energia de ativação e a constante dos gases ideais em J/mol.K. Desse modo, foi possível calcular graficamente a energia de ativação da lipase, numa faixa entre 30 e 50 °C, utilizando *p*-npp como substrato, em 38 kJ/mol.K. A energia de ativação calculada para a lipase utilizando óleo de oliva foi 10,09 kJ/mol.K, em uma faixa de temperatura entre 25 e 37°C. A maior energia de ativação obtida neste trabalho indica uma maior dependência e influência da temperatura na velocidade da reação.

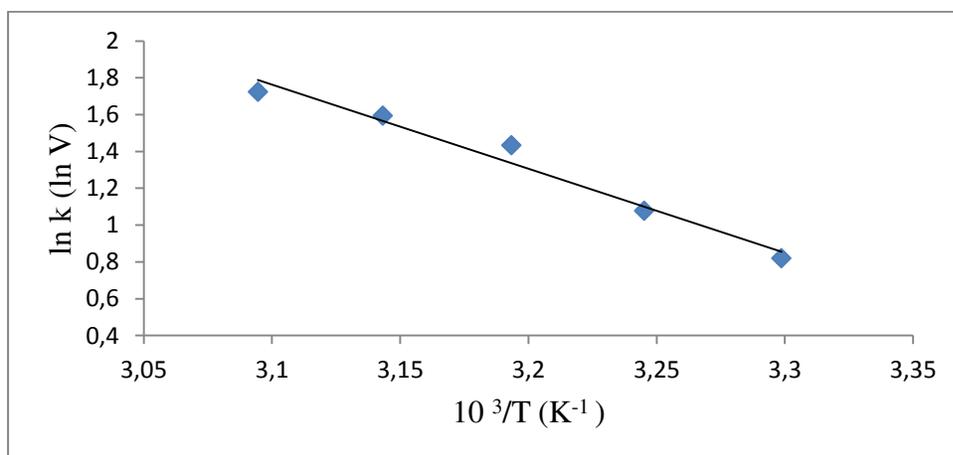


Figura 9 - Representação gráfica da equação de Arrhenius na atividade da lipase na faixa de temperatura entre 30 e 50 °C

Alguns parâmetros cinéticos da enzima foram calculados a partir de dados experimentais. A constante de Michaelis-Menten (K_m) enzimático foi obtida experimentalmente através da medição da atividade enzimática em concentração constante sob diferentes concentrações de substrato. A Figura 10 é o gráfico de Lineweaver-Burke, que contém os inversos dos valores de atividade enzimática ($1/V$) para cada valor do inverso da concentração enzimática utilizada no respectivo ensaio, medido em mMols.

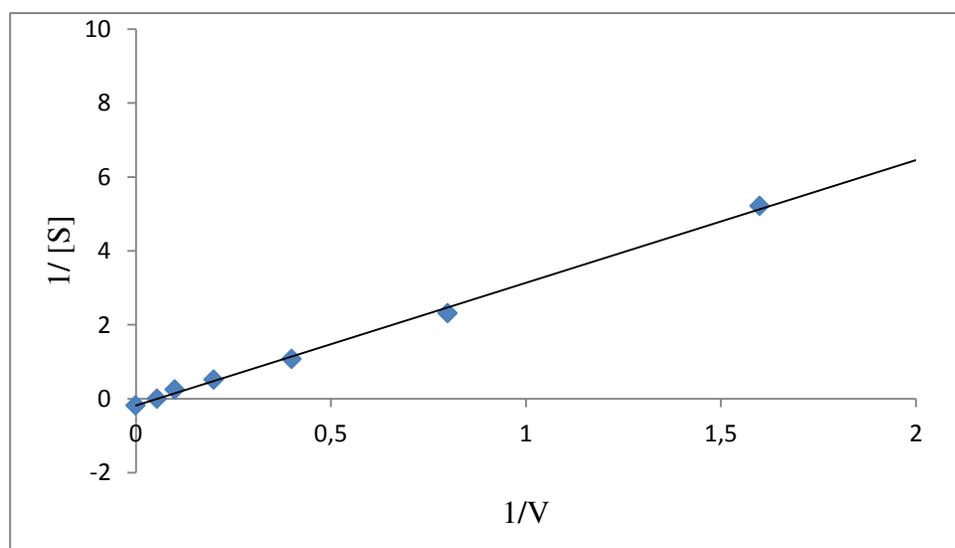


Figura 10 - Gráfico de Lineweaver-Burke utilizado para obter os valores de K_m e V_{max} da lipase.

O valor calculado de K_m foi 18,4 mM e a velocidade máxima calculada para a enzima $5,56 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Os valores dessas constantes publicados na literatura utilizando um substrato natural, óleo de oliva, foram respectivamente 49,73 mM e $0,86 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Essa diferença demonstra uma aparente maior afinidade da enzima pelo substrato sintético que pelo óleo natural em que mais de 2,5 vezes a quantidade de moléculas é necessária para se atingir metade da velocidade máxima de reação enzimática, que também é significativamente menor.

Poucos são os dados encontrados na literatura reportando valores de afinidade da lipase para o óleo de oliva, e os encontrados são altamente variados, indo de 5 mM da lipase de *Staphylococcus xylosus* até 534 mM da lipase pancreática de *Sus scrofa* (Paula, Urioste *et al.*, 2007). De modo geral, os valores publicados de K_m para óleo de

oliva são mais elevados que aqueles para substratos sintéticos, como o *p*-npp. Uma possível explicação para isso é o meio reacional utilizado para dosar a enzima em cada um dos casos. Os triglicerídeos de cadeia longa, que constituem o óleo de oliva, são insolúveis em água, de modo que a reação ocorre em meio emulsificado, onde a enzima atua na interface água/óleo, tornando menos efetivo o contato entre a enzima e substrato. A baixa solubilidade do *p*-npp em meio aquoso é aumentada com a adição de acetonitrila, em que estava anteriormente dissolvido e do tensoativo (Triton X-100) abaixo da concentração micelar crítica. Isso permite que o substrato solubilize-se no meio, promovendo uma interação mais intensa entre a lipase e o substrato. Outra explicação para o fato pode estar no tamanho das moléculas. O *p*-npp possui uma massa molar de 377,52 g/mol, enquanto um triglicerídeo pode facilmente ter massa molecular três vezes maior. Dessa forma, um fator estérico pode influenciar o contato entre as moléculas de forma apropriada, que levaria à formação do complexo enzima-substrato e à conseqüente formação de produtos.

5.2. Imobilização da lipase

5.2.1. Primeiro planejamento experimental

O primeiro planejamento estatístico realizado para avaliação do encapsulamento da lipase foi um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com as variáveis e fatores demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Níveis das variáveis testadas no planejamento experimental fracionado 2^{5-1}

Variável	Níveis		
	Baixo	Central	Alto
Concentração de alginato (%)	1	2	3
pH	5	7	9
Diâmetro da esfera (mm)	2	3	4
Concentração de CaCl ₂ (mM)	100	200	300
% solução enzimática/volume total	30	40	50

Os dados coletados permitiram a construção dos gráficos de Pareto (Figuras 11 e 12). Esse gráfico de barras indica quando as variáveis envolvidas no processo apresentam significância estatística ($p=0,05$). Dentre todas as variáveis testadas nenhuma apresentou, na faixa testada pelo experimento, significância para a resposta recuperação da enzima. Enquanto isso, todas foram consideradas significantes para a taxa de imobilização.

Foi possível observar ainda, através do gráfico de Pareto, que a concentração de alginato de sódio exerceu influência negativa na taxa de imobilização, o que demonstraria tendência a uma diminuição no valor da resposta com o aumento da concentração, dentro da faixa testada no experimento. Já na recuperação da enzima a influência foi positiva, no entanto, não houve evidência estatística de que essa influência seja significativa para o processo.

A concentração de cloreto de cálcio na solução precipitante apresentou, ao contrário do alginato, influência positiva para a taxa de imobilização. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Won (2005), em que o alginato e cálcio apresentam comportamentos semelhantes aos descritos aqui. No entanto, na publicação citada, a concentração de cloreto de cálcio na solução precipitante não foi considerada como estatisticamente significativa. Porém, os experimentos de Won foram realizados variando fatores isoladamente, enquanto se mantinham os demais fixos em um único ponto (OVAT - One Variable At Time). Esse método, ao contrário dos planejamentos experimentais, ignora a relação entre os fatores e pode levar a resultados menos precisos.

O tamanho das partículas apresentou, assim como a concentração do alginato, influência negativa na resposta em que houve significância, indicando melhores condições quando as partículas de alginato são formadas em tamanho reduzido. É possível que o maior contato entre a solução precipitante e a solução enzima/alginato tenha favorecido a separação de proteínas contaminantes durante o tempo de solidificação do polímero, levando a um resultado maior de “immobilization yield”.

Nenhuma das variáveis testadas se apresentou significativa com relação à recuperação da lipase (Figura 12). Apesar dos bons resultados obtidos nos experimentos, que apresentaram um valor médio de 97,07% de recuperação e valor máximo obtido de 99,85%, não foi possível verificar uma tendência ou direção para futuros estudos para otimização dessa resposta.

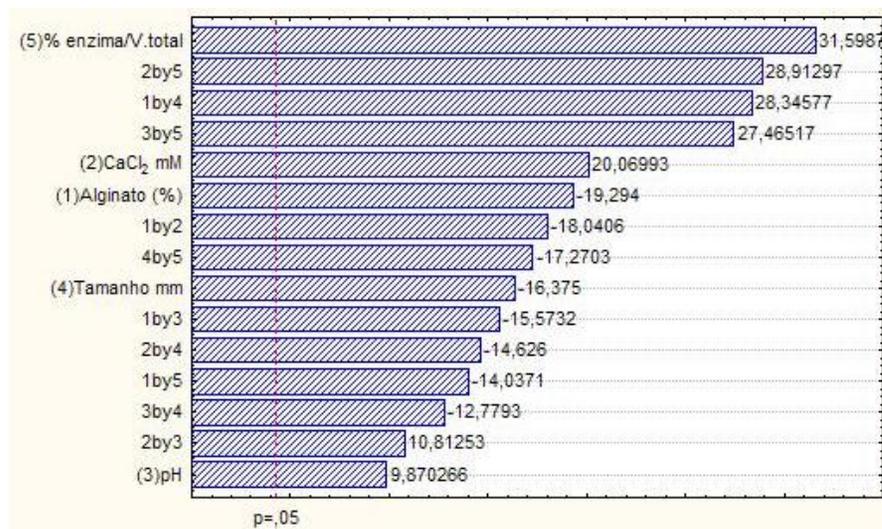


Figura 11 - Gráfico de Pareto para a resposta “taxa de imobilização”: É possível observar através do gráfico que todas as variáveis testadas possuíram significância estatística ($p=0,5$) para a resposta estudada.

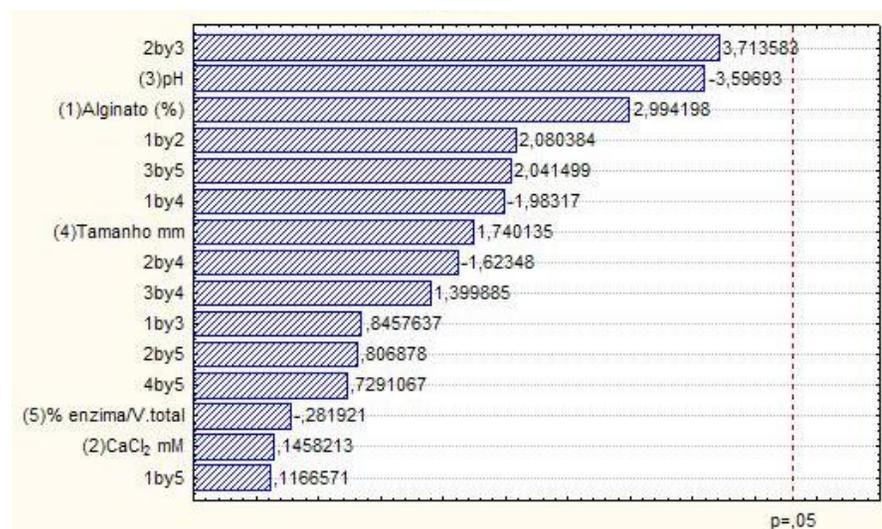


Figura 12 - Gráfico de Pareto para a resposta “recuperação da enzima”: É possível observar através do gráfico que nenhuma das variáveis testadas possuiu significância estatística ($p=0,5$) para a resposta estudada.

As superfícies de resposta apresentadas abaixo representam tridimensionalmente os dados apresentados no gráfico de Pareto. As Figuras 13 e 14, indicam a tendência da taxa de imobilização quando relacionadas às variáveis independente “% de enzima total/volume total” e “tamanho das esferas” (Figura 12) e “concentração de alginato” e “concentração de cloreto de cálcio” (Figura 13).

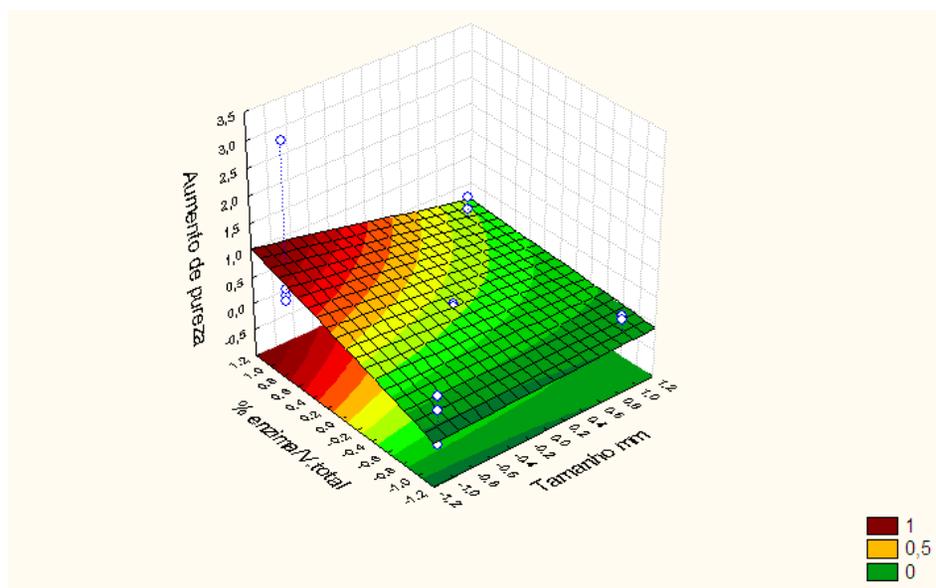


Figura 13 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “percentual de enzima no volume total da solução” e “tamanho das esferas de alginato”.

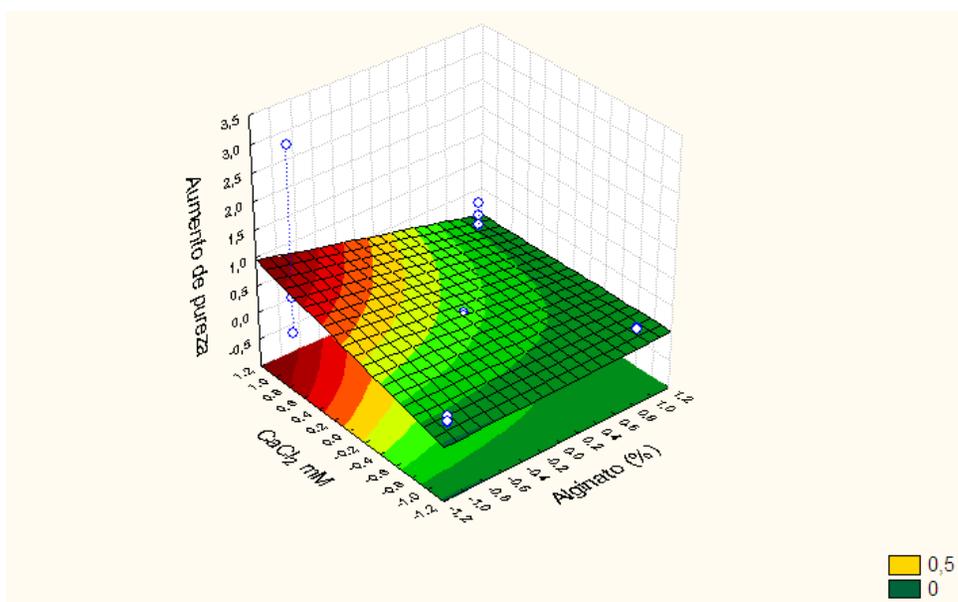


Figura 14 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio”.

5.2.2. Planejamento Central Composto Rotacional

Baseando-se nos dados do primeiro planejamento experimental, algumas das variáveis testadas foram selecionadas para otimização do processo através de delineamento central composto rotacional (DCCR). As variáveis selecionadas foram as concentrações de alginato e cloreto de cálcio e o pH da solução de alginato (Tabela 5).

Tabela 5 - Níveis das variáveis utilizadas no planejamento central composto.

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de alginato (%)	0,32	1	2	3	3,68
pH	3,64	5	7	9	10,36
Concentração de CaCl ₂ (mM)	32	100	200	300	368

A variável “tamanho da esfera” foi mantida em seu nível mais efetivo segundo o planejamento anterior. Uma vez que o tamanho das esferas teve influência negativa na taxa de imobilização (quanto menores, maior o valor da resposta), ela foi mantida no menor tamanho utilizado previamente. Para tamanhos menores que dois milímetro de diâmetro, seria difícil controlar o tamanho das esferas e também o manuseio, por isso não foram reduzidos ainda mais. O outro fator que se manteve fixo foi a proporção entre o volume de solução enzimática e solução de alginato. A influência positiva dessa variável indicou que uma menor quantidade de solução de alginato no volume total levaria à melhores resultados de concentração da enzima com relação a outras proteínas, mas a contrapartida no aumento do valor dessa relação é que a mistura, mais pobre em alginato, leva mais tempo para solidificar-se ocasionando em perda de forma e “quebra” do material na solução precipitante. O valor selecionado, portanto, foi o de 40%.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos experimentalmente de *immobilization yield* e as características de cada repetição de experimento realizado. O valor médio obtido foi de 113,69 (concentração da enzima alvo de 1,13), com um valor máximo de 168,07. Com os resultados obtidos foi possível construir uma equação que descreve o

comportamento da imobilização da enzima de acordo com a variação dos fatores testados:

$$\text{taxa de imobilização} = 2,58441 - 0,372404 * A + 0,00220011 * B - 0,0725566 * C + 0,0164179 * A * A - 0,00000512709 * B * B - 0,0586075 * C * C + 0,00000757451 * A * B + 0,038474 * A * C - 0,0000414533 * B * C$$

Onde A= pH; B= Concentração de CaCl₂ (mM); C= Concentração de alginato (%)

Tabela 6 - Valores obtidos de “immobilization yield” para cada experimento e os valores calculados pelo modelo obtido

Experimento	Alginato	CaCl ₂	pH	Imm. yield	
				Observado	Esperado
1	-1	-1	-1	136.11	136.24
2	-1	-1	+1	101.73	94.92
3	-1	+1	-1	137.51	139.15
4	-1	+1	+1	104.13	98.44
5	+1	-1	-1	103.29	112.50
6	+1	-1	+1	100.08	101.96
7	+1	+1	-1	103.42	113.75
8	+1	+1	+1	100.43	103.82
9	0	0	- α	168.07	157.10
10	0	0	+α	107.99	113.99
11	0	- α	0	101.45	100.53
12	0	+ α	0	108.60	104.55
13	- α	0	0	100.12	108.19
14	+ α	0	0	105.79	92.75
15	0	0	0	118.23	117.00
16	0	0	0	117.94	117.00
17	0	0	0	116.31	117.00
18	0	0	0	115.23	117.00

Na mesma tabela estão exibidos os resultados de *immobilization yield* preditos pelo modelo gerado. O coeficiente de correlação do modelo com o aumento da concentração da enzima é de aproximadamente 87%. Isso significa que o modelo explica 87% da variação total na imobilização da lipase com relação à resposta. Tal valor de coeficiente de correlação é considerado estatisticamente satisfatório e não foi maior possivelmente devido às dificuldades de se trabalhar com um material tão viscoso. Mesmo em baixos percentuais, o alginato de sódio apresenta-se, em solução, como uma substância bastante viscosa e isso torna-se pior com o aumento da

concentração. Tal característica influi na homogeneização das soluções, no momento da mistura com a solução enzimática, e em perda de material durante a manipulação, levando a pequenos erros nos ensaios experimentais.

Com relação à recuperação, nenhuma predição pôde ser realizada, uma vez que as variáveis testadas não exibiram, estatisticamente, influência significativa que justificasse as alterações nos resultados. No entanto, mais uma vez, os resultados de recuperação foram satisfatórios, com uma média geral de 99,53%, variando entre 99,23% e 99,94%.

A Figura 16 é o gráfico de Pareto demonstrando a influência das variáveis utilizadas no planejamento estatístico tendo a taxa de imobilização como resposta. É possível observar que todas as variáveis utilizadas no processo demonstraram significância com um valor de $p=0,05$, como já esperado pelo experimento anterior. A maior influência observada é a do valor de pH, o que é constatado ao se observar as diferenças nos resultados. Uma alteração de pH da solução de alginato de 9 para 3,6, segundo o modelo gerado, levaria a uma diferença na taxa de imobilização de 111% para 158% (concentração da lipase de 1,11 e 1,58 respectivamente).

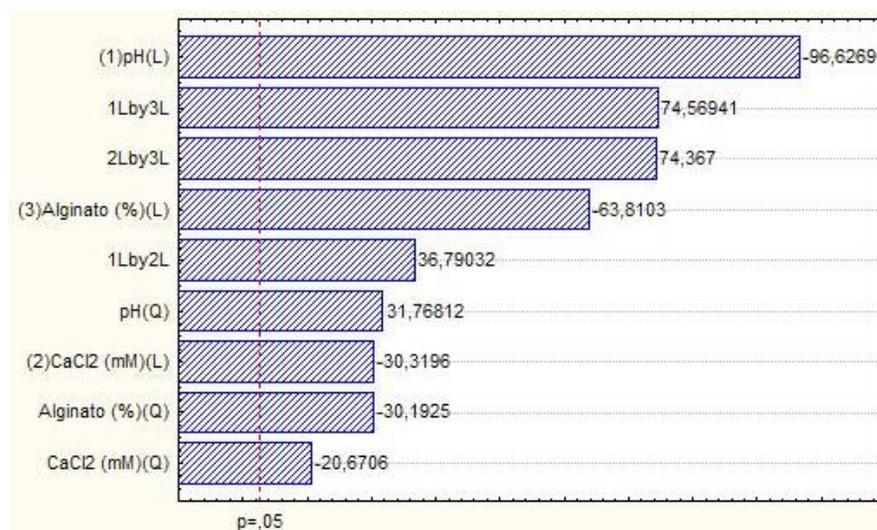


Figura 15 - Gráfico de Pareto para a resposta “taxa de imobilização” onde pode-se visualizar o pH com maior influência dentre todas as variáveis independentes.

Nas figuras 17 e 18 é possível observar a diferença entre as superfícies de resposta utilizando-se diferentes pHs. A Figura 17 mostra como resposta a taxa de

imobilização tendo as concentrações de alginato e cloreto de cálcio como eixos x e y a um pH fixo de 5. A Figura 18 tem como única diferença nas variáveis independentes o valor de pH, que é 3,68. A diferença nos valores obtidos pode ser observada através da escala de cores.

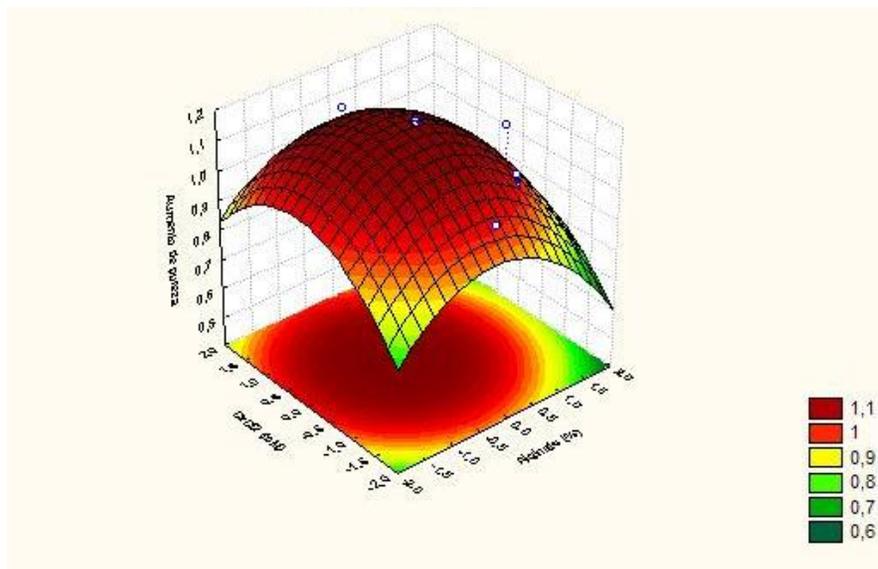


Figura 16 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio” em pH 5.

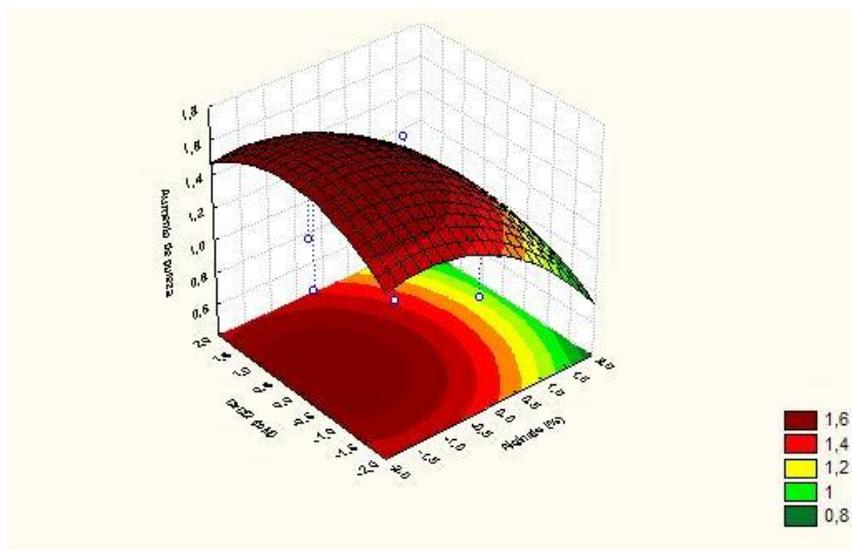


Figura 17 - Superfície de resposta demonstrando os valores de “taxa de imobilização” de acordo com a variação dos fatores das variáveis “concentração da solução de alginato de sódio” e “concentração de cloreto de cálcio” em pH 3,68.

Para finalizar, uma série de experimentos aleatórios foi realizado para validação do modelo gerado. Na Tabela 8 podem ser observados os valores obtidos experimentalmente e os esperados pelo modelo.

Tabela 7 - Confirmação do modelo obtido através de experimentos aleatórios dentro da faixa de níveis das variáveis pesquisadas

Experimento	Alginato (%)	CaCl ₂	pH	Imm. yield	
				Observado	Esperado
1	2	368	7	101,04	104,54
2	2	100	5	128,12	130,22
3	1	300	9	99,26	98,43
4	3,68	200	5	97,38	99,20
5	3	200	7	108,76	106,55

É possível notar que os valores observados no conjunto de cinco experimentos aleatórios realizados se aproximam bastante dos resultados esperados, de forma que o modelo foi considerado satisfatoriamente validado.

Resultados muito semelhantes foram apresentados por Bhushan (2008), em que os parâmetros ótimos na imobilização da lipase de *Acinobacter* foram 1,5% de alginato e tamanho médio de esferas de aproximadamente um milímetro. Nesses experimentos, no entanto o fermentado contendo lipase foi imobilizado juntamente com células bacterianas inteiras.

Utilizando lipases comerciais de *Pseudomonas sp.*, pesquisadores obtiveram 95,2% de “immobilization efficiency”, que usa a mesma base da “recuperação enzimática” utilizada no presente trabalho: relação entre as atividades hidrolíticas da lipase no extrato bruto e nos filtrados e lavagens. As condições utilizadas no trabalho foram de 2% de concentração de solução de alginato e concentração de solução precipitante de 200mM com tamanho médio de esferas de 2mm (Jeamjounkhaw, H-Kittikun *et al.*, 2007).

Um trabalho foi realizado recentemente com o intuito de baratear o uso da lipase. Yücel (2011) trabalhou na imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* com a

finalidade de produzir biodiesel. Embora usando lipase comercial, houve um intuito claro de redução de custos no processo, que foi buscado através dos materiais empregados na imobilização. A enzima foi imobilizada em bagaço de azeitona, e o próprio azeite foi utilizado como material graxo na síntese. Embora parâmetros numéricos comprovando a imobilização não tenham sido calculados, houve estudos de variáveis influenciando o processo, como pH e concentração da enzima, que foram evidenciados pela atividade residual da enzima após o processo.

6. CONCLUSÕES

Com uma recuperação enzimática de mais de 99%, a precipitação com alginato de sódio se mostrou um método eficiente de imobilização da lipase, proporcionando uma imobilização seletiva por encapsulamento. A lipase foi extraída do fermentado com um aumento de pureza de 1,68, num procedimento simples, de etapa única, utilizando poucos reagentes. Esse trabalho representa mais um passo em direção a um melhor aproveitamento das propriedades das lipases na indústria e meio acadêmico, trabalhando na problemática do uso dispendioso da enzima em sua forma solúvel.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de aspectos cinéticos e bioquímicos da enzima imobilizada

- Aplicação de tratamentos pós-imobilização, como a aplicação de silicatos ou polímeros

- Aplicação da enzima imobilizada em sistemas reacionais, com finalidades diversas, como:
 - obtenção de monoacil gliceróis (MAG) de interesse industrial;
 - obtenção de ácidos glicerol pela hidrólise de triacil gliceróis;
 - produção de biodiesel

8. REFERENCIAS

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, G. N. E. B. Regulamento Técnico, n.º 04/ 2004. Brasília. Diário Oficial da União. 2004.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 1-2, p. 3-12, 1999.

AYBASTIER, Ö.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 63, n. 3-4, p. 170-178, 2010.

BERTON, A.; SEBBAN-KREUZER, C.; CRENON, I. Role of the structural domains in the functional properties of pancreatic lipase-related protein 2. *FEBS Journal*, v. 274, n. 22, p. 6011-6023, 2007.

BHARDWAJ, K.; RAJU, A.; RAJASEKHARAN, R. Identification, Purification, and Characterization of a Thermally Stable Lipase from Rice Bran. A New Member of the (Phospho) Lipase Family. *Plant Physiol.*, v. 127, n. 4, p. 1728-1738, December 1, 2001 2001.

BHUSHAN, I. et al. Immobilization of Lipase by Entrapment in Ca-alginate Beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 23, n. 6, p. 552-562, November 1, 2008 2008.

BLANCH, H.; CLARK, D. *Biochemical Engineering*. Berkeley: Marcel Dekker, Inc., 1996. 702

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

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

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

BRANDÃO, K. S. R. et al. Produção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Soja com Misturas de Metanol-Etanol. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Brasília 2006.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. St. Joseph, MI, ETATS-UNIS: American Society of Agricultural Engineers, 2001.

CARMODY, W. R. Easily prepared wide range buffer series. *Journal of Chemical Education*, v. 38, n. 11, p. 559-564, 1961.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 534

COSTA, F. C. D.; HOESCHL, H. C. Gestão do conhecimento na cadeia produtiva do biodiesel. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Brasília 2006.

COSTERTON, J. W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 50-52, 2001.

DALAL, S. et al. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 051, n. 1, p. 23-31, September 1, 2008 2008.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 65, n. 1-4, p. 133-137, 2010.

DUTTA, S.; RAY, L. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 159, n. 1, p. 142-154, 2009.

United States Environmental Protection Agency, A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions, Draft Technical Report. EPA420-P-02-001, 2002

ERTESVÅG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, n. 1-3, p. 85-91, 1998.

FDA'S policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*, v. 4, n. 5, p. 338-340, 1992.

FISCHER, B. E.; KLEBER, H.-P. Isolation and characterization of the extracellular lipase of *Acinetobacter calcoaceticus* 69 V. *Journal of Basic Microbiology*, v. 27, n. 8, p. 427-432, 1987.

- GALAEV, I. Y.; GUPTA, M. N.; MATTIASSON, B. Use smart polymers for bioseparations. CHEMTECH, v. 26, n. 12, p. 19-25, 1996.
- GANDHI, N. N. et al. Deactivation of immobilized Lipozyme: Effect of butanol, temperature and water content. Chemical Engineering Journal, v. 65, n. 3, p. 159-164, 1997.
- GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. D. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. Química Nova, v. 31, p. 1800-1806, 2008.
- GERRITSE, G.; HOMMES, R. W. J.; QUAX, W. J. Development of a Lipase Fermentation Process That Uses a Recombinant *Pseudomonas alcaligenes* Strain. Appl. Environ. Microbiol., v. 64, n. 7, p. 2644-2651, July 1, 1998 1998.
- GRANT, W. D.; MWATHA, W. E.; JONES, B. E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. FEMS Microbiology Reviews, v. 75, n. 2-3, p. 255-269, 1990.
- GROCHULSKI, P. et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 17, p. 12843-12847, June 15, 1993 1993.
- GROSS, R. A.; KALRA, B.; KUMAR, A. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 55, n. 6, p. 655-660, 2001.
- GUPTA, N. et al. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 67, n. 5, p. 648-653, 2005.
- HARIDASAN NAMBOODIRI, V.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. Lipids, v. 35, n. 5, p. 495-502, 2000.
- HARWOOD, J. L. Plant Lipid Metabolism. In: DEY, P. M. e HARBORN, J. B. (Ed.). Plant Biochemistry. San Diego: Academic Press, 1997. cap. 6,
- HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. Carbohydrate Research, v. 32, n. 2, p. 217-225, 1974.
- HILLS, M.; MUKHERJEE, K. Triacylglycerol lipase from rape (*Brassica napus* L.) suitable for biotechnological purposes. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1990.
- ISO, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Application of Lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

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.; STEINBUCHER, A.; JENDROSSEK, D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(ω -hydroxyalkanoates). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 3113-3118, 1995.

JAIN, P.; JAIN, S.; GUPTA, M. N. A microwave-assisted microassay for lipases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 381, n. 7, p. 1480-1482, 2005.

JEAMJOUNKHAW, P.; H-KITTIKUN, A.; CHEIRSILP, B. Optimization of lipase entrapment in alginate gel bead for palm olein hydrolysis. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 29, n. SUPPL. 2, p. 261-267, 2007.

JOCKEN, J. et al. Adipose triglyceride lipase (ATGL) expression in human skeletal muscle is type I (oxidative) fiber specific. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 129, n. 4, p. 535-538, 2008.

KARADZIC, I. et al. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 102, n. 2, p. 82-89, 2006.

KAWAKAMI, K. et al. Activation of lipase by sol-gel coating with hydrophobic alkyl-substituted silicates in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, n. 9, p. 1412-1417, 2009.

KERSHAW, E. E. et al. Adipose triglyceride lipase: Function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, v. 55, n. 1, p. 148-157, 2006.

KIM, D.-Y.; DORDICK, J. S. Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 76, n. 3, p. 200-206, 2001.

- MALMOS, H. Enzymes for detergents. Chemistry and Industry (London), n. 6, p. 183-186, 1990.
- MARGOLIN, A. L.; CRENNE, J.-Y.; KLIBANOV, A. M. Stereoselective oligomerizations catalyzed by lipases in organic solvents. Tetrahedron Letters, v. 28, n. 15, p. 1607-1609, 1987.
- MATTIASSON, B.; KUMAR, A.; GALAEV, I. Y. Affinity precipitation of proteins: design criteria for an efficient polymer. Journal of Molecular Recognition, v. 11, n. 1-6, p. 211-216, 1998.
- MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETO, J. A. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 1, p. 105-109, 1999.
- MCAULGE, J. C. et al. Industrial Enzymes and Biocatalysis. In: KENT, J. (Ed.). Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology: Springer Science+Business Media, v.1, 2007. cap. 31,
- MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- MEUNIER, S. M.; LEGGE, R. L. Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 62, n. 1, p. 53-57, 2010.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. Bioresource Technology, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009.
- MONDAL, K. et al. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, v. 1764, n. 6, p. 1080-1086, 2006.
- MORENO, S. et al. Role of Alternative sigma Factor AlgU in Encystment of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., v. 180, n. 10, p. 2766-2769, May 15, 1998 1998.
- MORROW, C. J.; WALLACE, J. S. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. Estados Unidos 1992.
- NIE, Q. et al. cDNA cloning, characterization, and variation analysis of chicken adipose triglyceride lipase (ATGL) gene. Molecular and Cellular Biochemistry, v. 320, n. 1, p. 67-74, 2009.
- PADILHA, G. **Caracterização, purificação e encapsulamento de *Burkholderia cepacia***. 2010. (Doctor). Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

- PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 119-131, 1999.
- PATEL, M. T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: A review. *Chemical Engineering Communications*, v. 152-53, p. 365-404, 1996.
- PATEL, RAMESH N. Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 343, n. 6-7, p. 527-546, 2001.
- PAULA, A. V. et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 281-288, 2007.
- PETERSON, C. L., MÖLLER, G. . Biodiesel fuels: Biodegradability, biological and chemical oxygen demand, and toxicity. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V., *et al* (Ed.). *The Biodiesel Handbook*. Champaign: AOCS, 2005.
- REMMINGHORST, U.; REHM, B. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 21, p. 1701-1712, 2006.
- ROMERO, C.; BAIGORI, M.; PERA, L. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, n. 4, p. 861-866, 2007.
- ROY, I. et al. Evaluation of microbeads of calcium alginate as a fluidized bed medium for affinity chromatography of *Aspergillus niger* pectinase. *Biotechnology Progress*, v. 20, n. 5, p. 1490-1495, 2004.
- SACCHETIN, P. S. C. et al. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Química Nova*, v. 33, p. 263-268, 2010.
- SAGIROGLU, A.; ARABACI, N. Sunflower seed lipase: Extraction, purification, and characterization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 35, n. 1, p. 37 - 51, 2005.
- SALAMEH, M. D. A.; WIEGEL, J. Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, n. 23, p. 7725-7731, December 1, 2007 2007.
- SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, v. 351, n. 6329, p. 761-764, 1991.

- SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. *Energy & Fuels*, v. 18, n. 1, p. 154-159, 2004.
- SHARMA, A.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Purification of Wheat Germ Amylase by Precipitation. *Protein Expression and Purification*, v. 18, n. 1, p. 111-114, 2000a.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases. v. 33, n. Pt 3, p. 161-165, Jun , 2001 2001.
- SHARMA, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. One step purification of peanut phospholipase D by precipitation with alginate. *Bioseparation*, v. 9, n. 2, p. 93-98, 2000b.
- SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.
- TANAKA, K. et al. Practical Asymmetric Synthesis of the Herbicide (S)-Indanofan via Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of a Diol and Stereoselective Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Chiral Epoxide. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 67, n. 9, p. 3131-3133, 2002.
- THEIL, F. Lipase-Supported Synthesis of Biologically Active Compounds. *Chemical Reviews*, v. 95, n. 6, p. 2203-2227, 1995.
- TREVAN, M. D.; GROVER, S. Relationship of the enzymic activity of polyacrylamide-gel-entrapped trypsin to pH [proceedings]. *Biochemical Society Transactions*, v. 7, n. 1, p. 28-30, 1979.
- VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.
- WINGENDER, J.; VOLZ, S.; WINKLER, U. K. Interaction of extracellular Pseudomonas lipase with alginate and its potential use in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 139-145, 1987.
- WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, v. 343, n. 6260, p. 771-774, 1990.

WON, K. et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 6, p. 2149-2154, 2005.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 4, p. 3977-3980, 2011.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science*, v. 224, n. 4654, p. 1249-1251, 1984.

ZHAO, H. et al. New Ether-Functionalized Ionic Liquids for Lipase-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 1, p. 13-23, 2010.

9. APÊNDICES

Lipase selective entrapment in alginate from *Burkholderia cepacia* crude extract

Petrus Pires Marques, Ranulfo Monte Alegre, Elias Basile Tambourgi¹.

Department of Engineering of Chemical Systems, School of Chemical Engineering, State University of Campinas (UNICAMP)
University Campus Zeferino Vaz, Av. Albert Einstein, 500, Campinas, Brazil.
e-mail: petruspm@gmail.com

Considered one of the most important enzymes for the biotechnology industries, lipase is a very versatile biocatalyst been target of several researches and review papers and used in many different industrial applications, such as household detergent additive, chemicals and pharmaceutical compounds synthesis, biodiesel production and others. Lipase produced by *Burkholderia cepacia* was entrapped by addition of the crude extract and alginate solution in Ca⁺⁺ hardening solution. Using factorial design of experiments, the procedure conditions were studied: alginate solution concentration, Ca⁺⁺ concentration, ph of solution, bead size and crude extract/alginate solution proportions. In a second step of the work, the alginate solution concentration, calcium concentration and Ph were evaluated against responses relating to entrapment of the lipase and purification of the biocatalyst using a surface response methodology. In a single-step procedure it was possible to entrap lipase directly from crude achieving purification factors of 1.68 (168.07 % immobilization yield) with activity recoveries around 99%.

1. Introduction

Triacylglycerol acyl hydrolases (EC 3.1.1.3), more commonly known as lipases, are biocatalysts which promote esterification, and transesterification reactions with wide industrial applications (Dalla-Vecchia et al., 2004). Ubiquitous in nature, these enzymes are produced from bacteria to animals. In 1958, Sarda and Danuelle determined the difference between a lipase from other esterases as enzymes unable to act lipolytically in a real monomer ester solution, i.e. they are carboxilesterases that act above the solubility limit, on emulsified substrates (Jaeger and Reetz, 1998, Verger, 1997). *Burkholderia cepacia* lipase

was previously classified as an alkaline lipase, with an optimal pH of 9.0 and temperature of 40 °C (Dalal et al., 2008).

Regardless the fact that the use of enzymes in industrial or laboratorial processes reveals several advantages over the chemical ones, the costs involving its use can still be a barrier. One possible solution is immobilization, which would allow the sequential use of an enzyme several times, for it is now a heterogeneous catalyst. Since the 70's, researchers have been able to immobilize lipases in diverse supports. More recently the enzyme has been successfully covalently immobilized in sepharose, alumina and styrene-divinylbenzene copolymer (Arroyo et al., 1999, Aybastier and Demir, 2010).

Immobilization by entrapment is another used technique, where the lipase can be confined in different materials, such as sodium alginate (Won et al., 2005), kaolinite (Iso et al., 2001), silicates (Kawakami et al., 2009) and others.

Although the immobilization processes are a great achievement towards the viability of the enzyme in the industry, in most of the analyzed papers, the lipase was either purified prior to immobilization or bought commercially available purified grade. The main objective of this paper was to make use of the already known affinity between the alginate and lipases (Wingender et al., 1987), immobilizing the target molecule directly from a crude extract, skipping the purification processes.

2. Materials and methods

i. Lipase obtaining

The lipase rich crude extract was obtained through *Burkholderia cepacia* fermentation. The growing media was composed by peptone (0.5%), yeast extract (0.3%), meat extract (0.1%), NaCl (0.5%) and 1% olive oil as inducer (Dalal et al., 2008). The fermentation process lasted 48 hours at 30 °C and 150 revolutions per minute. The extract was centrifuged for 10 minutes at 6000 g in order to remove bacterial cells.

ii. Encapsulation

Lipase extract and alginate solution were mixed thoroughly in graduated tubes ensuring total mixture of the components in a total volume of 8 ml. With the help of a peristaltic pump the enzyme/alginate solution was poured dropwise in 50 ml CaCl₂ solution under

constant rotation. The drops were kept in the calcium hardening solution for twenty minutes to assure its complete hardening. The drop sizes were controlled using different or adapted pipette tips or needles. The alginate spheres were collected and submitted to a double wash in 50 ml of glycine/NaOH buffer 0.05M, pH 9.0. Both calcium solution and washes were collected to protein and enzyme content analysis (Won et al., 2005).

iii. Protein and enzyme content

The protein content was estimated using dye-binding method, using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976). Lipase activity was determined according to the Winkler and Stuckmann method modified (Jain et al., 2005). One enzyme unit was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of p-nitrophenol per minute using p-nitrophenyl palmitate (pNPP) as substrate under assay conditions.

iv. Responses calculations

Two parameters were used as responses: Immobilization yield and enzyme recovery, according to Equations (1) and (2):

$$\text{Immobilization yield (\%)} = \left(\frac{a_{e(\text{imm})}}{a_{e(\text{free})}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Recovery} = \left(\frac{a_{\text{imm}}}{a_{\text{free}}} \right) \quad (2)$$

The specific activity (a_e) is the relation between lipase activity and total protein content.

v. Experimental design

The experimental designs were composed and analyzed using Statsoft Statistica 7.0. The response surface methodology was applied to evaluate the influences of already previously known variables that could possibly modify the enzyme entrapment, so a Central Composite Rotatable Design (CCRD) was designed. The influence and interaction of the factors were studied in five different levels, as can be seen in Table 1.

Table 1: Variables and its levels used in the 2³ a Central a Central Composite Rotatable Design

Variables	levels				
	-α	-1	0	+1	+α
Alginate concentration - %	0.32	1	2	3	3.68
CaCl ₂ solution - mM	32	100	200	300	368
pH	3.64	5	7	9	10.36

3. Results and Discussion

In order to evaluate the effect of parameters in the immobilization it was used a statistical design of experiments (DOE). Contrarily to the One-Variable-At-a-Time (OVAT) method which involves single factor variation keeping the other factors constant, DOE is more suitable for multifactor optimization not only because it is less time-consuming, requiring a relatively small number of runs per factor (Giovanni, 1983), but also such designs permit the identification of the most important variables and its optimum ranges indicates a promising direction for further experimentation (Weuster-Botz, 2000).

A fractional experimental design was used as a first approach for a latter optimization using a CCRD (results not shown). The results obtained in this first step indicated what levels of the variables should be tested and what variables would be kept fixed. All the experiments in this set were performed using a proportion of enzyme extract/alginate solution of 0.4 and alginate beads diameters of 2 mm.

The analysis of the CCRD yielded the Equation 3:

$$\begin{aligned} \text{Immobilization yield} = & (2,58441 - 0,372404 * A + 0,00220011 * B - 0,0725566 * C + 0,0164179 * A^2 - \\ & 0,00000512709 * B^2 - 0,0586075 * C^2 + 0,00000757451 * A * B + \\ & 0,038474 * A * C - 0,0000414533 * B * C) \times 100 \end{aligned} \quad (3)$$

Where A= pH; B= CaCl₂ concentration (mM); C= alginate concentration (%).

The obtained coefficient of correlation was 87%. This explains 87 % R² of the total variation in the lipase immobilization yield, which is a good result, considering the experimental

difficulties in reproducibility associated with the handling a so viscous substance as alginate solution.

Won (2005) studied the influence of calcium hardening solution and alginate solution concentrations in the yield using an OVAT approach and only the alginate showed to be statistically significant to the process. Similarly alginate was found to exert a negative influence in the same range tested and the linear effect of the calcium concentration showed no linear influence at all. However when associated with other factors, calcium concentration in the hardening solution exhibited a negative influence over the yield. Such effect could only be perceived with the use of DOE. Variations in the response by a factor may not be perceptible at fixed points of others variables. However, these same changes in the factor levels can display huge differences when exposed to different ranges of the other controllable experimental characteristics. The pH exhibited large negative effect over the immobilization yield, i.e. the response grows significantly as the pH is reduced. The mean value of the Immobilization yield obtained was 113.69 and a maximum of 168.07 in the central points of the alginate and CaCl_2 concentrations with the lower pH level.

Table 2 displays the results of the experiments having immobilization yield as response along with the results predicted by the model generated. A response surface was designed demonstrating the optimal levels of the alginate and CaCl_2 concentrations. Figure 1-A displays the yield values for alginate and calcium concentrations at pH 7.0 and Figure 1-B the same variables at the lowest pH level, in which the best results were achieved (3.64). It is easy to notice that the point where the best immobilization yield was achieved is at the central point of both alginate solution and calcium chloride solution concentrations at neutral pH. The decrease of the pH, although relocated the optimal value of alginate concentration to 1%. Among the variables levels tested, in the factorial design and the central composite rotatable design, it was not possible to observe any statistical significance in the enzyme recovery results. Therefore no model could be constructed to the response. Nonetheless in all the experiments the lipase recovery was high, with a mean value of 0.99531 and maximum obtained 0.99949. These results clearly show that in all the cases the enzyme, independently of other proteins, interacted strongly with the

polymer (Wingender et al., 1987). In order to validate the model generated (Equation 3) a random set of experiments was performed and the results are exhibited in Table 3.

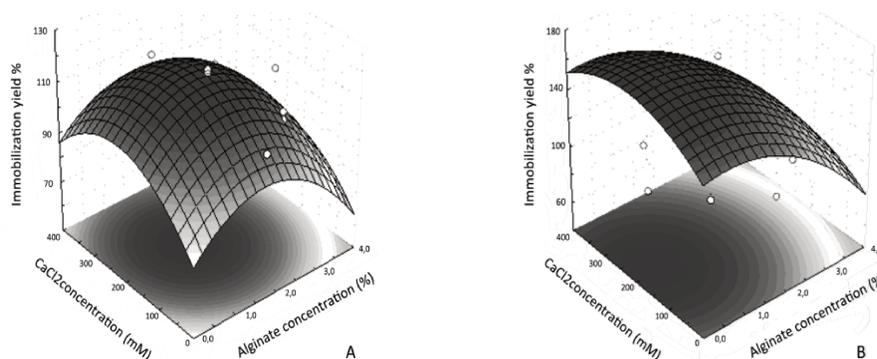


Figure 1- Results of immobilization yield having alginate concentration and calcium chloride concentration as variables. 1-A contains the results for neutral pH; 1-B the results for pH 3,64.

Table 2: Results of the CCRD with the observed and predicted responses for each run with Immobilization yield as response.

Run	Alginate (%)	CaCl ₂ solution (mM)	pH	Imm. yield	
				Actual	Predicted
1	-1	-1	-1	136.11	136.24
2	-1	-1	+1	101.73	94.92
3	-1	+1	-1	137.51	139.15
4	-1	+1	+1	104.13	98.44
5	+1	-1	-1	103.29	112.50
6	+1	-1	+1	100.08	101.96
7	+1	+1	-1	103.42	113.75
8	+1	+1	+1	100.43	103.82
9	0	0	- α	168.07	157.10
10	0	0	+ α	107.99	113.99
11	0	- α	0	101.45	100.53
12	0	+ α	0	108.60	104.55
13	- α	0	0	100.12	108.19
14	+ α	0	0	105.79	92.75
15	0	0	0	118.23	117.00
16	0	0	0	117.94	117.00
17	0	0	0	116.31	117.00
18	0	0	0	115.23	117.00

Table 3: Results of the experiments for validation of the model (Equation 3) with the observed and predicted responses with Immobilization yield as response.

Run	Alginate (%)	CaCl ₂ solution (mM)	pH	Imm. Yield	
				Actual	Predicted
1	2	368	7	101.04	104.54
2	2	100	5	128.12	130.22
3	1	300	9	99.26	98.43
4	3.68	200	5	97.38	99.20
5	3	200	7	108.76	106.55

The observed values of this new experiment set are very close to the predicted ones, hence, successfully validating the model.

4. Conclusions

Through these experiments it was possible to build a suitable model to describe the behavior of lipase when submitted to immobilization in sodium alginate. The enzyme recovery was very high (more than 99% in all experiment set) and the best immobilization yield achieved was predicted to be 168.74%, corresponding to a purification factor of 1.68 with alginate concentration of 1% (at pH 3.64) and calcium hardening solution concentration of 200 mM. These are very good results considering the fact that the lipase was selectively entrapped directly from its crude extract, in a single step procedure.

References

- Arroyo, M., Sánchez-Montero, J. M. & Sinisterra, J. V., (1999), Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 3-12.
- Aybastier, Ö. & Demir, C., (2010), Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surface methodology, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63, 170-178.
- Bradford, M. M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S. & Gupta, M. N., (2008), Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 051, 23-31.

- Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. D. G. & Soldi, V., (2004), Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros, *Química Nova*, 27, 623-630.
- Giovanni, M., (1983), Response surface methodology and product optimisation., *Food Technology*, 37, 41-45.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T. & Shrestha, S., (2001), Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 53-58.
- Jaeger, K.-E. & Reetz, M. T., (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.
- Jain, P., Jain, S. & Gupta, M. N., (2005), A microwave-assisted microassay for lipases, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1480-1482.
- Kawakami, K., Urakawa, T., Oda, Y. & Iwai, Y., (2009), Activation of lipase by sol-gel coating with hydrophobic alkyl-substituted silicates in supercritical carbon dioxide, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84, 1412-1417.
- Verger, R., (1997), 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts, *Trends in Biotechnology*, 15, 32-38.
- Weuster-Botz, D., (2000), Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search?, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 473-483.
- Wingender, J., Volz, S. & Winkler, U. K., (1987), Interaction of extracellular *Pseudomonas* lipase with alginate and its potential use in biotechnology, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 139-145.
- Won, K., Kim, S., Kim, K.-J., Park, H. W. & Moon, S.-J., (2005), Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, *Process Biochemistry*, 40, 2149-2154.

Characterization Comparison Of Alkaline Lipase From *Burkholderia Cepacia* Using Two Different Substrates

Petrus Pires Marques¹, Giovana da Silva Padilha¹, Ranulfo Monte Alegre², Elias Basile Tambourgi¹

^{1*} Department of Engineering of Chemical Systems, School of Chemical Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), University Campus “Zeferino Vaz”, Av. Albert Einstein, 500, Post Cod 6066, Zip Code: 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Corresponding author, e-mail: petruspm@gmail.com. ²Department of Food Engineering, School of Food Engineering, State University of Campinas, University Campus “Zeferino Vaz”, Av. Albert Einstein 500, Postal Code: 6121, Barão Geraldo, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

A comparison between the optimal conditions of lipase extracted from *Burkholderia cepacia* crude extract was performed aiming to identify possible differences in the enzyme performance facing the use of different substrates. Along an unpublished brief characterization of this enzyme using olive oil (a natural substrate) a commonly used synthetic substrate was used and differences were found when alternating them. The optimal temperatures when using the oil and the *p*-npp were respectively 37°C and 50°C; the best activities were observed at pHs 8.0 and 9.0. The studied lipase presented significantly more affinity for the synthetic substrate ($K_m = 18.4$ mM) than for the natural one ($K_m = 49.73$ mM). The maximum velocity of the biocatalyst using olive oil was also smaller than the calculated value for the *p*-npp. The calculated activation energies were 38 and 10.1 kJ.mol⁻¹.K⁻¹ when using *p*-npp and olive oil respectively.

Key words: Lipase; characterization; olive oil; *p*-npp.

INTRODUCTION

The industrial and laboratorial applications of the enzymes are undeniable and amongst the most used enzymes in biotechnology are the triacylglycerol hydrolases (3.1.1.3.). The lipases, as these catalysts are commonly referred to, act over ester bonds and are therefore classified as esterases (Jaeger, Dijkstra et al. 1999). In 1954 Sarda and Danuelle

classified the lipases as a distinct group of esterases which unable to act lipolitically in a true ester monomer solution, but in the interface between the aqueous and lipidic mixture, where the substrate is in equilibrium between the monomeric, miscelar and emulsified states (Verger 1997; Jaeger and Reetz 1998). Ubiquitous in nature, these enzymes cleave lipids molecules in free fatty acids and glycerol, when in aqueous environment. Although, some lipases were reported to withstand organic environment, and in the absence of water and presence of alcohol, the hydrolysis reaction is replaced by alcoholysis, known as transesterification reaction (Zaks and Klibanov 1984).

Beyond the cited properties, the lipase are also known by the non-necessity of co-factors; the high disponibility, since they can be largely produced by several groups of fungi and bacteria; high enantioselectivity; and the usual not production of secondary reactions. All these combined characteristics led the use of lipases in a series of studies and industrial applications, such as detergent additive (Gerritse, Hommes et al. 1998; Pandey, Benjamin et al. 1999), chemical and pharmaceutical industries resolving racemic mixtures (Patel 2001), polymer synthesis (Morrow and Wallace 1992; Kim and Dordick 2001) and biodiesel production from fats and short chain alcohols (Shah, Sharma et al. 2004; Zhao, Song et al. 2010).

Since lipases can be produced by a huge number of different organisms, it is possible to find big differences amongst lipases varying according to the source. The characterizations made by researchers have shown the lipases can be as diverse as the organisms from which they can be obtained. Mhetras (2009), characterized in an acidic lipase produced by an *Aspergillus niger* strain with a optimum pH of 2.5. In contrast, researchers were able to identify a different lipase, extracted from the rice (*Oryza sativa*) bran, which activity is expressed more intently at pH 11.0. Beyond these two extreme examples it is also possible to find researches with the description of several other optimal pHs for different lipases, like pH 4.0 for a *Candida rugosa* produced lipase (Chang, Lee et al. 2006); pH 6.0 from *Pseudomona aeruginosa* (Ogino, Mimitsuka et al. 2004); pH 8.0 from common wheat (Kapranchikov, Zherebtsov et al. 2004) and pH 10.0 from *Bacillus subtilis* (Hasan, Shah et al. 2007).

The difference of behavior found in the pH of different lipases is also observed when analyzing the maximum activity temperatures of these enzymes. The variations observed go from optimal temperatures as low as 4°C, in mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* (Romero, Baigori et al. 2007) to 96°C observed in the enzyme produced by *Thermosyntropha lipolytica* (Salameh and Wiegel 2007).

Such differences are important when choosing a specific lipase according to the process planned. Even thou, since these enzymes are commonly used to perform a series of other reactions different from the simple lipolysis (alcoholisis, esterification, aminolysis) it is important to notice that a activity study using one kind of reaction or substrate may not be adequate to other substrates. This work had as objective to perform two simple activity characterizations using the same lipase against two of the most commons substrates used laboratorially: vegetal oil and p-nitrophenyl palmitate.

MATERIALS AND METHODS

Lipase obtaining

Lipase was obtained through *Burkholderia cepacia* fermentation using olive oil as inducer. The culture media had the composition found as optimal by Dalal et al. (2008) as it follows: peptone (0.5%), yeast extract (0.2%), meat extract (0.1%), NaCl (0.5%) and olive oil (1.0%). The bacteria was inoculated and kept for 48 hours under orbital agitation of 200 rpm and 30°C. After this, the broth was centrifuged to separation cells and debris and the lipase rich supernatant was used afterwards.

Enzyme assay

The enzyme was tested with two different substrates: olive oil and *p*-npp (para-nitrophenyl palmitate). When olive oil was used, the assay was performed according to Macedo et al. (1997). The activity over the *p*-npp was assayed according to the Kilcawley method modified (Jain, Jain et al. 2005).

Influence of temperature on activity

The temperatures on each of the assays were controlled differently. In the assays using olive oil the temperature was maintained in an orbital agitator incubator, where the reactions took place, varying from 25°C to 50°C. The lipolytic assay when using *p*-npp had the temperature controlled using a water bath with a temperature range from 25°C to 60°C. Except from the temperature difference, all the runs were performed equally for each assay method.

Influence of pH on activity

In the study of pH influence on activity buffer solutions were used to keep the pH along the assay. Using olive oil, the buffers pH varied from 3.0 to 11.0, using citrate, phosphate and carbonate-bicarbonate buffers. Once the enzyme overall behavior was already known, the assays using *p*-npp were performed from pH 8.0 to 11.0 using a long range buffer described by Carmody (Carmody 1961).

Kinetic parameters

The Michaelis-Menten constant and maximum speed of reaction, were experimentally obtained through the running of lipolytic activity assays with crescent substrate concentration. The results obtained were plotted in the Lineweaver-Burk graphic ($1/[S] \times 1/V$). The values interception in the axis revealed K_m and V_{max} .

RESULTS AND DISCUSSION

The experiments designed and executed by the group allowed to observe some differences in the behavior of the lipase activity when natural and synthetic substrates are used. Previous works have tested lipases for these parameters so far no paper found

tested the same enzyme, from the exact same source. By doing so, the authors excluded the possibility of differences in the species or even strains to be the cause of possible divergences detected.

The optimal temperature found in the lipolytic activity using olive oil was 37°C. The enzyme showed a good temperature tolerance above its optimal point, with a loss of only 10% at 50°C, as can be seen in Figure 1. Major activity loss occurred at lower temperatures, below 30°C. This was not found by the authors to be already reported in literature, but similar results were already found by other researchers using lipases from different microorganisms. Saisubramanian et al. (2008) characterized a lipase from *Acinobacter* species with the same optimal temperature of 37°C. Not equal, but very similar temperatures were obtained by Kim (2002) when analyzing lipase extracted from *Bacillus pumilus*.

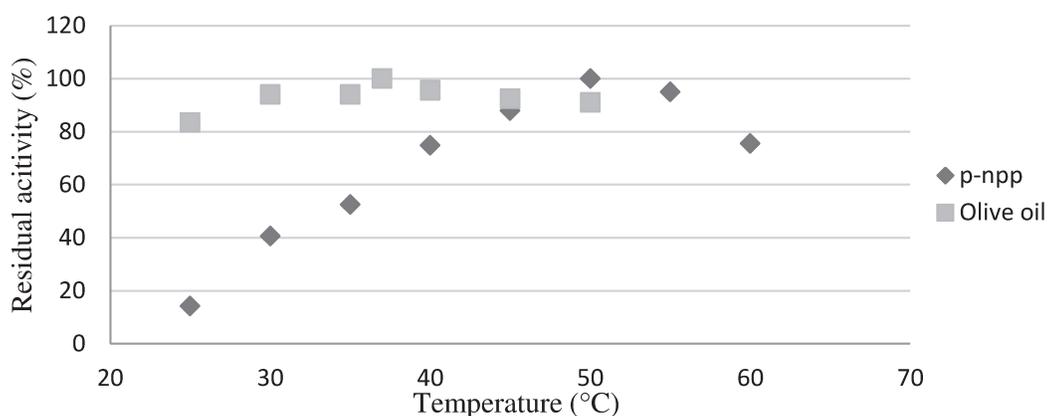


Figure 1 - Lipases relative activities using two different substrates in different temperatures.

When using the *p*-npp the influence on the temperature changed in the values, but the behavior remained the same. The maximum activity was observed at 50°C, but the lipase sustained its catalytic activity at high temperatures with a significant loss (i.e. around 50%) below 40°C. Close to 75% of the maximum activity still remained in the temperatures between 40°C and 60°C. The closest result found for a lipase extracted from *Burkholderia cepacia* under the same conditions, had a optimal temperature of 40°C (Dalal, Singh et al. 2008). The difference observed could possibly be due to the purification steps which the later lipase was submitted, even though the ideal pH was the same in both.

As previously stated, no characterization of the Lipase extracted from *Burkholderia cepacia* (using olive oil as substrate) was found by the authors. The optimum pH found in was 8.0. The enzyme demonstrated little variation in most acidic reaction media with a sudden decrease after the optimal point (see Figure 2). When using *p*-npp as substrate, the higher activity occurred at pH 9.0 and the behavior detected was different as well. Even thou the sudden decrease after the better point was also detected, the enzyme did not maintained high activity values on less alkaline pHs: meanwhile the lipolytic activity remained above the 60% at pH 2.0 using olive oil, the hydrolyses of *p*-npp dropped to around 66% at pH 8.0. The studied biocatalyst was characterized before with the same optimal pH and 10 degrees less of optimal temperature, using the same synthetic substrate (Dalal, Singh et al. 2008), and similarly same pH result was obtained for *Burkholderia multivorans*' lipase. The analysis of the kinetic parameters of the studied lipase yielded a Michaelis-Menten constant of 49.73 mM and a maximum velocity of 0,86 U.min⁻¹. These results were, again, not found in published data by the authors leading to the belief that these are inedited data. The great diversity of lipases is also evidenced when analyzing published numbers on the matter. Although very few results have been reported for lipases kinetics using olive oil, the

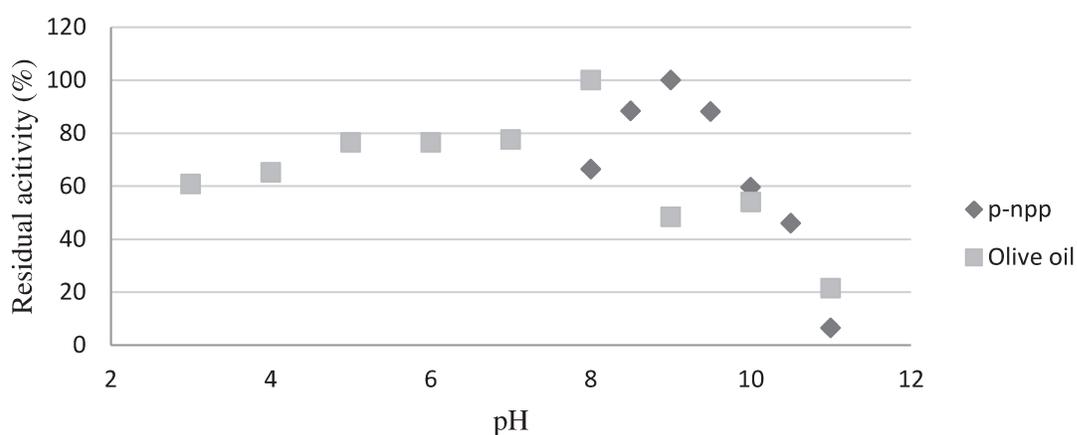


Figure 2 - Lipases relative activities using two different substrates in different pHs.

range of values is very wide and the K_m is usually much higher than those studies using *p*-npp. Published data about the affinity of lipases on olive oil goes from 5 mM (*Staphylococcus xylosus*) to 534 mM (*Sus scrofa*) (Paula, Urioste et al. 2007).

The para-nitrophenyl palmitate, contrarily to the olive oil, is a synthetic substrate. Nevertheless its K_m to the lipases seems to be generally smaller, indicating a bigger affinity. In the experiments conducted the results obtained were of a K_m equal to 18.4 mM and the enzyme could reach a maximum velocity of 5.56 U.min⁻¹. The difference in the values indicates that more than 2.5 times the amount of substrate is needed to reach half of the maximum velocity of the enzyme.

One possible explanation for the reason why the lipase exhibits a lower affinity for the natural substrate may be the medium conditions in which each substrate is placed to assay the enzyme. The long-chain triglycerides, such as olive oil, is insoluble in water and therefore the assay must be performed in emulsified media, making difficult the contact between the hydrophilic enzyme and its substrate, which must happen in the interfacial area. The low solubility of the *p*-npp in aqueous medium is increased with the addition of an anionic tensoactive below its micelle critic concentration allowing a much intense interaction between lipase and the substrate for it is now in a true solution. This phenomenon could also be observed when analyzing the difference between the K_m of *Sus scrofa*. While using olive oil, the free enzyme showed a value of 534 mM. Using 1-caprin as substrate (a much smaller molecule) the value dropped to 1.17 mM (Tsuzuki, Ue et al. 2004; Paula, Urioste et al. 2007).

Using the data obtained in the temperature studies the activation energies of the lipase were calculated. The data was obtained graphically using the Arrhenius plot, which evaluates the behavior of the natural logarithm of the reaction velocity according to the variations in the inverse of the absolute temperature (data not shown). The values obtained were, as expected, different for the different substrate used. In a temperature range varying from 30 to 50 °C, the activation energy calculated to lipase in the hydrolysis of *p*-npp was 38 kJ.mol⁻¹.K⁻¹. The hydrolysis of the triglycerides composing the olive oil had a value calculated of 10.1 kJ.mol⁻¹.K⁻¹.

The smaller value obtained for the olive oil demonstrates that less energy is required to start the reaction when compared to the synthetic substrate and the smaller influence of the temperature in the variations of the reaction velocity in this case. It could be thought that a smaller value of activation energy would lead to greater velocities of enzyme activity, although the opposite happens in this case. Since the Collisions Theory admits that not only the reagents must collide with more energy than the activation energy in order to react, but must collide in a specific orientation (Nelson and Cox 2008), a steric effect may be avoiding the increase in the maximum velocity of the hydrolysis of the natural oil which molecules are very big comparing the the synthetic substrate molecules. The molecular weight of the *p*-npp is 377,52 g/mol and the triglyceride weight can be three times bigger. Such molecular weight associated to viscosity in a substrate that reacts with the enzyme only in an interfacial media can make the enzyme act slowly due to mass transfer issues of substrates and products released. It means the diffusion on the oily media can be a limiting factor to the maximum velocity of the lipase.

CONCLUSIONS

As the importance of lipases increases in the industries and laboratories, it is already known that pervious data may not be accurate to the use of a novel enzyme. The present paper could emphasize that even when using the same enzyme the characteristics employed to the proper use of lipase as a catalyst, previous data should be take carefully. Adapting a new substrate using data from other previously studied ones may yield significantly different results in the kinetic properties leading to an underestimation of the catalytic power of the lipase in question. This emphasizes the necessity of previously studying the enzyme in hands prior to further applications. In this specific case, we discovered that although the activation energy of the studied lipase for the natural substrate is significantly smaller, the interaction enzyme-substrate may create a limitation to the catalytic velocity, leading to think that the enzyme has more affinity to a synthetic substrate. Differences in temperature and pH behaviors were also found when changing the substrate used in the assays.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support necessary to the development of the experimental sets here presented.

RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo entre as condições ótimas de atividade da lipase produzida por *Burkholderia cepacia* em extrato bruto buscando identificar possíveis diferenças entre o uso de diferentes substratos. Juntamente com uma breve caracterização ainda não publicada dessa enzima utilizando óleo de oliva, que é um substrato natural, um substrato sintético amplamente utilizado (*p*-npp) e diferenças emergiram na comparação. A temperatura ótima de atividade quando da utilização do óleo de oliva e *p*-npp foram respectivamente 37°C e 50°C. Já os pHs considerados ótimos para atividade enzimática foram 8,0 e 9,0 para os mesmos substratos. A lipase estudada apresentou significativamente mais afinidade pelo substrato sintético ($K_m = 18,4$ mM) que pelo natural ($K_m = 49,73$ mM). A velocidade máxima de conversão utilizando o óleo também foi menor que aquela calculada para o *p*-npp. Através dos dados obtidos experimentalmente, foram calculadas as energias de ativação para o *p*-npp ($38 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) e para o óleo de oliva ($10,1 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).

REFERENCES

- Carmody, W. R. (1961). Easily prepared wide range buffer series. *J. Chem. Educ.* **38**(11): 559-564.
- Chang, S.-W., G.-C. Lee, et al. (2006). Efficient Production of Active Recombinant *Candida rugosa* LIP3 Lipase in *Pichia pastoris* and Biochemical Characterization of the Purified Enzyme. *J. Agr. Food. Chem.* **54**(16): 5831-5838.
- Dalal, S., P. K. Singh, et al. (2008). Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **051**(1): 23-31.
- Gerritse, G., R. W. J. Hommes, et al. (1998). Development of a Lipase Fermentation Process That Uses a Recombinant *Pseudomonas alcaligenes* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(7): 2644-2651.

- Hasan, F., A. Shah, et al. (2007). Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH. *Acta Biol. Hung.* **58**(1): 115-132.
- Jaeger, K.-E., B. W. Dijkstra, et al. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Application of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.
- Jaeger, K.-E. and M. T. Reetz (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**(9): 396-403.
- Jain, P., S. Jain, et al. (2005). A microwave-assisted microassay for lipases. *Anal. and Bioanal. Chem.* **381**(7): 1480-1482.
- Kapranchikov, V. S., N. A. Zhrebtssov, et al. (2004). Purification and Characterization of Lipase from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germ. *Appl. Biochem. Biotech.* **40**(1): 84-88.
- Kim, D.-Y. and J. S. Dordick (2001). Combinatorial array-based enzymatic polyester synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **76**(3): 200-206.
- Kim, H. K., H. J. Choi, et al. (2002). Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* **1583**(2): 205-212.
- Macedo, G. A., Y. K. Park, et al. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Rev. Microbiol.* **28**(2): 90-95.
- Mhetras, N. C., K. B. Bastawde, et al. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technol.* **100**(3): 1486-1490.
- Morrow, C. J. and J. S. Wallace (1992). Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. Estados Unidos.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2008). *Lehninger - Principles of Biochemistry*. ed. W H. Freeman and Company, New York.
- Ogino, H., T. Mimitsuka, et al. (2004). Cloning, Expression, and Characterization of a Lipolytic Enzyme Gene (*lip8*) from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Mol. Microb. Biotech.* **7**(4): 212-223.
- Pandey, A., S. Benjamin, et al. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. and Appl Biochem.* **29**(2): 119-131.
- Patel, Ramesh N. (2001). Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development. *Adv. Synth. Catal.* **343**(6-7): 527-546.
- Paula, A. V., D. Urioste, et al. (2007). Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Chem. Technol. Biot.* **82**(3): 281-288.
- Romero, C., M. Baigori, et al. (2007). Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. *Appl. Microbiol. Biot.* **76**(4): 861-866.
- Saisubramanian, N., S. Sivasubramanian, et al. (2008). Two Step Purification of *Acinetobacter* sp. Lipase and Its Evaluation as a Detergent Additive at Low Temperatures. *Appl. Biochem. Biotech.* **150**(2): 139-156.

- Salameh, M. d. A. and J. Wiegel (2007). Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(23): 7725-7731.
- Shah, S., S. Sharma, et al. (2004). Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. *Energ. Fuel* **18**(1): 154-159.
- Tsuzuki, W., A. Ue, et al. (2004). Inhibitory effect of lysophosphatidylcholine on pancreatic lipase-mediated hydrolysis in lipid emulsion. *BBA-Mol. Cell. Biol. L.* **1684**(1-3): 1-7.
- Verger, R. (1997). Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**(1): 32-38.
- Zaks, A. and A. M. Klibanov (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. *Science* **224**(4654): 1249-1251.
- Zhao, H., Z. Song, et al. (2010). "New Ether-Functionalized Ionic Liquids for Lipase-Catalyzed Synthesis of Biodiesel." *Appl. Biochem. Biotech.* **162**(1): 13-23.