

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO PARA SER
UTILIZADO EM APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Tese de Doutorado

ROBERTA DA SILVA BUSSAMARA RODRIGUES

Porto Alegre, Maio de 2009.

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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
BIOCATALISADOR HETEROGÊNEO PARA SER
UTILIZADO EM APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

ROBERTA DA SILVA BUSSAMARA RODRIGUES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, Maio de 2009

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marilene Henning Vainstein, por todas as oportunidades e toda confiança depositada e por ser um exemplo de profissional e pessoa a qual admirarei e me espelharei sempre.

Ao Professor Dr. Augusto Schrank, por toda ajuda prestada para o meu desenvolvimento, pela confiança e tempo despendido.

Aos Professores Drs. Henrique Ferreira, Arnaldo Zaha e Irene Schrank, pelo auxílio e respeito depositados.

Ao Professor Dr. Adriano Brandelli, pelas sugestões.

À professora Kátia Flávia Fernandes e seus alunos Samantha, Flávio, Paula e Luiza, pela acolhida, pelo carinho e ensinamentos recebidos no estágio realizado em seu laboratório.

A todos os Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Ao Charley e a Livia, pela presteza, amizade e carinho.

À Walquiria e família, pela acolhida em sua casa durante meu estágio em Goiás.

A todos os colegas dos laboratórios 220, 217 e 222, que sempre me ajudaram em tudo que precisei. Agradeço o carinho, a paciência e os ensinamentos.

À Irina Lubeck, pela amizade sincera, pelas conversas e risadas e por todo apoio no laboratório.

Às amigas Letícia Goulart, Juliana Crestani, Josiane Faganelo e Márcia Polese, pelo carinho, sinceridade e confiança.

À minha iniciação científica Luisa Mercado, pelo respeito, perseverança, pela constante vontade de aprender e que continue sendo a profissional e pessoa maravilhosa que é.

À Luciane Dall’Agnol, por toda ajuda com os meus experimentos e por ser uma ótima profissional.

Aos meus amigos da FEI e de Jundiaí, que sempre estarão no meu coração.

A todas as pessoas do departamento de Química Inorgânica da UFRGS pela acolhida, pelo carinho e confiança.

Às amigas e professoras substitutas da Química Inorgânica, Jaqueline, Daniela, Suzana, Fernanda, Cristiane e Sílvia pela amizade sincera, por toda ajuda e todos os momentos de risada.

Ao Flávio, meu querido marido, por ser este companheiro maravilhoso, meu cúmplice, meu amor e por estar ao meu lado em todas as horas me apoiando e me motivando a ser uma pessoa sempre melhor.

À minha família por tudo, principalmente por terem me ensinado o valor do amor e se não fosse por esse amor eu não estaria aqui.

À Deus, por tantas oportunidades maravilhosas e pela chance de ter essa vida linda.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Enzimas como catalisadores em processos industriais.....	14
1.2. Enzimas imobilizadas como alternativa aos catalisadores químicos convencionais.....	15
1.3. Métodos de imobilização de enzimas.....	16
1.3.1. Imobilização de enzimas por captura da biomolécula	17
1.3.1.1. <u>Imobilização por confinamento em matrizes poliméricas geliformes ou membranas porosas</u>	18
1.3.2. Imobilização por oclusão em vesículas ou micelas	19
1.3.3. Imobilização da enzima em suporte sólido	20
1.3.3.1. <u>Imobilização por ligação covalente</u>	20
1.3.3.2. <u>Imobilização de enzima por ligação iônica</u>	24
1.3.3.3. <u>Imobilização de enzima por adsorção em suporte hidrofóbico</u>	24
1.4. Comparação entre as metodologias de imobilização de enzimas	26
1.5. Seleção de suporte apropriado para imobilização de enzimas.....	27
1.5.1. Ligação em suportes macroporosos.....	28
1.6. Vantagens e desvantagens da imobilização de enzimas	29
1.7. Modo de produção de enzimas imobilizadas em suportes sólidos.....	31
1.7.1. Processo por batelada.....	31
1.7.2. Processo contínuo utilizando reator de leito fixo.....	32
1.8. Lipases	33
1.9. Imobilização de lipases	38
1.9.1. Imobilização de lipase por adsorção em suporte hidrofóbico	38
1.10. Aplicação de lipases livres e imobilizadas na indústria	40
1.11. Aplicação de lipases imobilizadas na produção de biodiesel	43
1.12. Mercado de biodiesel no Brasil.....	47
1.13. Produção do biodiesel por transesterificação.	48
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo geral	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
PARTE I	55
PARTE II	92

PARTE III	139
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	140
4. RESULTADOS	144
5. DISCUSSÃO GERAL	146
6. CONCLUSÃO	166
7. PERSPECTIVAS	167
8. REFERÊNCIAS.....	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Métodos para imobilização de enzimas.....	17
Figura 2.	Confinamento das enzimas em uma matriz polimérica geliforme.....	19
Figura 3.	Imobilização de enzimas por oclusão em micelas reversas	20
Figura 4.	Fixação da enzima ao suporte por ligação covalente.....	21
Figura 5.	Imobilização da enzima por ligação covalente em suporte sólido.....	22
Figura 6.	Imobilização de uma enzima por cross-linking.....	23
Figura 7.	Fixação da enzima no suporte por ligação iônica.....	24
Figura 8.	Efeito do tipo de suporte (poroso ou não poroso) na estabilidade da enzima imobilizada frente a uma bolha de gás.....	29
Figura 9.	Reações catalisadas por lipases.....	34
Figura 10.	Estrutura de lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 11.	Mecanismo de catálise da lipase.....	37
Figura 12.	Esquema de uma cadeia de produção de biodiesel.....	44
Figura 13.	Estimativa de custo de produção do biodiesel por região em US\$/ L.....	48
Figura 14.	Etapas do processo de produção de biodiesel por transesterificação.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação das vantagens e desvantagens proporcionadas pelos processos de imobilização por adsorção, ligação covalente, oclusão e confinamento frente a algumas características de processo.....	27
Tabela 2.	Principais aplicações das lipases na indústria.....	42

RESUMO

Nesse trabalho foram produzidas lipases da levedura *Pseudozyma hubeiensis* (HB85A) em reator de 14 L. Após produção da enzima, a lipase foi imobilizada por adsorção em suporte hidrofóbico por processo contínuo em reator de leito fixo. As melhores condições de imobilização foram: tempo de imobilização de 2 h e 29 min., pH de 4,76 e quantidade de enzima livre adicionada por grama de suporte de 1282 U/ g de suporte, sendo que, a máxima atividade da lipase imobilizada obtida foi de 143 U/g de suporte. O sobrenadante contendo lipase e o biocatalisador heterogêneo foram caracterizados por planejamento fatorial. A máxima atividade da enzima imobilizada (71 U/g de suporte) foi obtida em pH 6,0 à temperatura de 52 °C. A imobilização da lipase resultou em um aumento na estabilidade dessa enzima em temperaturas altas, pH ácidos e neutros, presença de detergentes não-iônicos e altas concentrações de solventes orgânicos como iso-propanol, metanol e acetona. Foi possível a reutilização da lipase imobilizada por apenas uma vez na reação de hidrólise, havendo uma perda de 72 % da atividade após o primeiro reuso. Analisou-se ainda a estabilidade da lipase livre e imobilizada durante 40 dias de armazenamento a 4 °C. Durante o período de armazenamento, a lipase imobilizada manteve 50 % de sua atividade original e a lipase livre apresentou 80 %. O catalisador heterogêneo foi testado quanto a sua eficácia na produção de biodiesel. A reação de transesterificação foi realizada na ausência de co-solvente utilizando-se como matérias-primas metanol, etanol e iso-propanol e quatro fontes diferentes de triglicerídeo (óleo de soja, óleo de mamona, óleo residual de restaurante e a gordura bovina). A partir dos testes realizados, obteve-se um rendimento máximo quanto à produção de biodiesel de 3,15 % utilizando-se óleo de mamona e iso-propanol como matéria-prima pelo

período de 24 h. A produção de biodiesel utilizando diferentes quantidades de lipase imobilizada e também a lipase livre como catalisador foi testada na presença de hexano, iso-propanol e óleo de mamona pelo período de 24 h nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. No entanto, não houve produção de biodiesel nas condições analisadas.

Palavras-chave: *Pseudozyma hubeiensis*, imobilização de lipases, lipases, produção de biodiesel, produção de lipases, transesterificação, catalisador heterogêneo, catálise enzimática

ABSTRACT

In this work, lipases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A) were produced in a 14 L reactor. After lipase from yeast *P. hubeiensis* (strain HB85A) production, the enzyme was immobilized by adsorption in polystyrene divinylbenzene hydrophobic support in a packed bed column. The best conditions for lipase immobilization were: 2 h and 29 min. immobilizing time, pH 4.76 and rate of free enzyme added per gram of support equal to 1282 U/g. The maximum activity of immobilized lipase was reached of 143 U/g. The lipases of *P. hubeiensis* (HB85A) supernatant culture and the heterogeneous catalyst were characterized through response surface methodology by factorial design. The maximum activity of immobilized lipase was reached for a support rate of 71 U/g, with pH 6.0 and temperature of 52 °C. It was detected that lipase immobilization increased enzyme stability under high temperatures, neutral and acid pH levels, non-ionic detergent and high concentration of organic solvent like iso-propanol, methanol and acetone. The reuse of immobilized lipase was possible only once for hydrolysis reaction, with activity losses of 72 % after first re-use. Also, it was tested lipase stability in a period of 40 days, under 4 °C storage conditions. During storage period, immobilized lipase kept 50 % of its original activity. Free lipase kept 80 %. After the development of heterogeneous catalyst, its efficiency as catalyst for biodiesel production was analyzed in this study. The transesterification reaction was tested in co-solvent absence using as raw material three different sources of alcohols (methanol, ethanol and iso-propanol) and four different triglycerides source (soybean oil, castor oil, waste cooking oil and bovine fat) and as catalysts the immobilized lipase. Based in test results, the maximum biodiesel production yield was 3.15 % using castor oil and methanol as raw material for 24 h. The

biodiesel production was also tested with different amount of immobilized lipase and with free lipase as catalyts at the presence of methanol, castor oil and the co-solvent hexane for 24 h at 40, 50 e 60 °C. However there was no biodiesel production at the tested conditions.

Keywords: *Pseudozyma hubeiensis*, lipase immobilization, lipases, biodiesel production, lipases production, transesterification, heterogeneous catalyst, enzymatic reactions

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas como catalisadores em processos industriais

Enzimas são catalisadores protéicos que possuem uma série de características que as tornam mais vantajosas em um processo industrial quando comparadas à catálise química convencional (Ye *et al.*, 2007; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Entre essas vantagens, cabe salientar o alto grau de eficiência catalítica de uma enzima, muito superior a catálise química. Ressalta-se ainda, a alta especificidade de uma enzima na reação, o que permite não somente discriminação entre reações como também entre substratos (especificidade pelo substrato), entre partes similares de uma molécula (régio-especificidade) e entre isômeros ópticos (estéreo-especificidade) (Ye *et al.*, 2007; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Essas características das enzimas evitam a formação de subprodutos através de reações inespecíficas, aumentando o grau de pureza do produto final. Além disso, as enzimas operam em condições amenas de temperatura, pressão e pH enquanto os catalisadores químicos requerem condições críticas de operação. Isto proporciona substancial economia de energia em processos industriais e conseqüentemente redução no custo de produção (Hasan *et al.*, 2005; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009).

As enzimas podem ser obtidas a partir de animais, plantas e microrganismos. Entretanto, enzimas de microrganismos são melhores de serem utilizadas pela grande disponibilidade de uma variedade de atividades catalíticas, altos rendimentos, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular de enzimas, pois não dependem de flutuações sazonais, sendo que os

microrganismos podem apresentar um rápido crescimento em meios de baixo custo (Hasan *et al.*, 2005).

Até 1960, o mercado mundial de enzimas era estimado em poucos milhões de dólares anuais, porém, desde então o mercado tem crescido sensivelmente, atingindo o patamar de US\$ 2,3 bilhões, em 2007. Estima-se ainda que a demanda mundial por enzimas alcance a taxa de crescimento de 4 % ao ano, projetando um mercado de aproximadamente US\$ 2,7 bilhões em 2012 (Solazyme & Chevron, 2008).

As amilases lideram sendo responsáveis por 20 % do mercado de enzimas (Sharma *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2005). As carbohidrases e proteases são as principais enzimas utilizadas na indústria alimentícia e de ração animal. Proteases, amilases, lipases e celulases são amplamente utilizadas em sabão em pó, detergentes hospitalares, lavadores de louça e outros. As enzimas vêm sendo também bastantes utilizadas na fermentação de álcool, indústria têxtil e de couro. Os tipos de enzimas mais utilizadas neste segmento são a celulase e amilase (Hasan *et al.*, 2005). Geograficamente, os Estados Unidos ainda lideram o fornecimento mundial de enzimas industriais tendo sido responsáveis por 36 % deste mercado, em 2005 (Hasan *et al.*, 2005).

1.2. Enzimas imobilizadas como alternativa aos catalisadores químicos convencionais

Comparado aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas possuem muitas vantagens que tornam seu uso em aplicações industriais uma alternativa viável (Tumturk *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Entretanto, as enzimas não são plenamente utilizadas na escala industrial devido

ao seu alto custo, dificuldade de separação do meio reacional e instabilidade de suas estruturas ocasionada principalmente, pela crescente utilização desses biocatalisadores em aplicações que atuam em condições desnaturantes (pH e temperaturas extremas, forte agitação e presença de solventes orgânicos) (Tumturk *et al.*, 2007; Lei *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de métodos eficientes de fixação da enzima em matrizes sólidas que proporcionem maior estabilidade, melhor atividade catalítica, proteção em ambientes desnaturantes, diminuição da contaminação do produto, fácil separação e reutilização em aplicações industriais, poderá tornar possível o uso do biocatalisador em aplicações industriais (Laszlo & Evans, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Tumturk *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Miletic *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

1.3. Métodos de imobilização de enzimas

A imobilização de uma enzima consiste na transformação de um biocatalisador homogêneo em um catalisador heterogêneo através da ligação da enzima em um suporte sólido ou por oclusão em vesículas ou confinamento em membranas (Secundo *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Dizge *et al.*, 2009; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Como métodos de imobilização de enzimas podem ser citados a adsorção hidrofóbica; fixação da enzima por ligação covalente em superfície sólida ou por "cross linking"; oclusão em vesículas ou miscelas invertidas; ligação iônica e confinamento em poros de membranas e géis poliméricos (Figura 1) (Secundo *et al.*, 2008; Dizge *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2009; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Esta heterogeneidade pode ser estabelecida a partir da ligação entre duas moléculas ativas ("cross-linking",

pontes de hidrogênios intermoleculares), entre uma molécula de enzima e outra molécula cataliticamente inerte proveniente do suporte (ligação covalente, troca iônica, adsorção hidrofóbica) ou apenas por confinamento ou oclusão mecânica da enzima em um suporte) (Figura 1) (Dizge *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009).

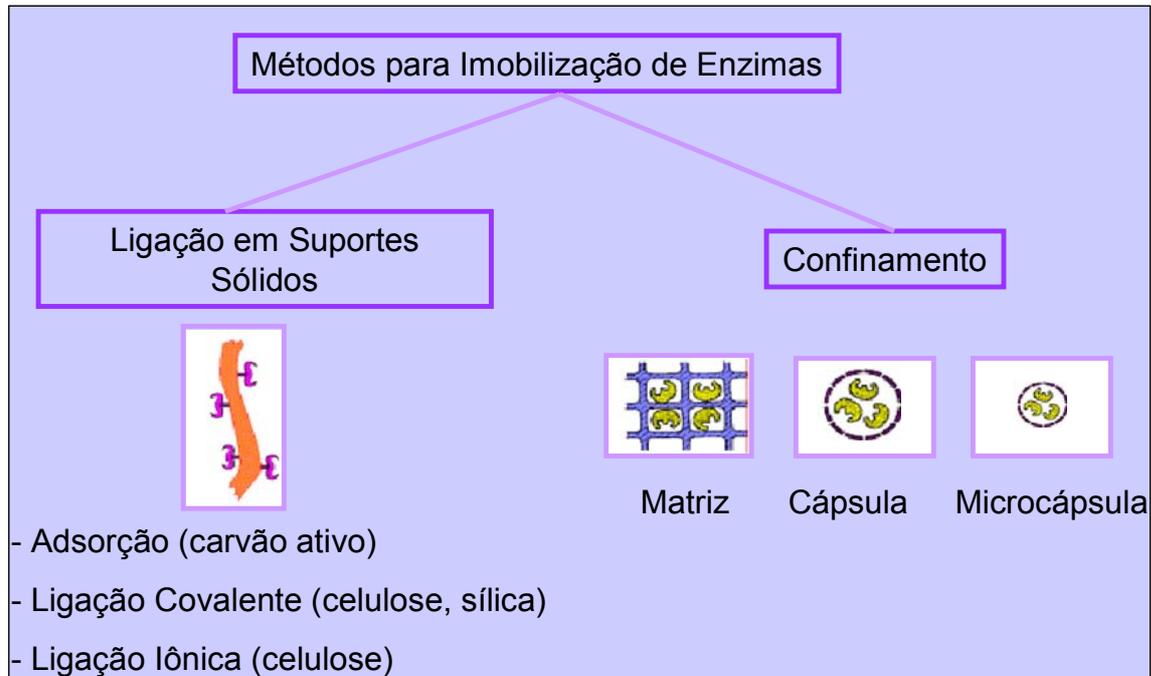


Figura 1: Métodos para imobilização de enzimas (www.enq.ufsc.br). A imobilização da enzima pode ser realizada por ligação química da mesma com o suporte (adsorção, ligação covalente e ligação iônica) ou por confinamento ou oclusão em matrizes, membranas e cápsulas.

1.3.1. Imobilização de enzimas por captura da biomolécula

Na imobilização de enzimas por captura não é estabelecida ligação química da enzima ao suporte. As biomoléculas são ocluídas no interior de vesículas ou micelas delimitadas por uma membrana semipermeável ou retidas em uma rede tridimensional de uma membrana ou polímero insolúvel na água onde substratos e produtos difundem-se através desses materiais (Dizge *et al.*, 2009).

Este método tem como vantagens ser uma simples ligação física entre enzima e suporte conservando, com isso, a integridade molecular; não se observam alterações estruturais ou interações com o sítio ativo (Dizge *et al.*, 2009). Tem-se como desvantagem a própria oclusão em membranas, vesículas ou géis poliméricos que pode na maioria das vezes, proporcionar problemas difusionais intensos tanto do substrato como do produto e ainda impedimentos estéricos dificultando o acesso do substrato ao sitio ativo da enzima (Chaubey *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Imobilização por confinamento em matrizes poliméricas geliformes ou membranas porosas

Este tipo de fixação da enzima consiste no confinamento das moléculas das enzimas entre as malhas de um polímero geliforme (técnica sol-gel) ou de uma membrana porosa. No caso da técnica sol-gel, a rede polimérica geliforme é formada na ocasião da imobilização da enzima (Figura 2) (Hara *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009; Macario *et al.*, 2009).

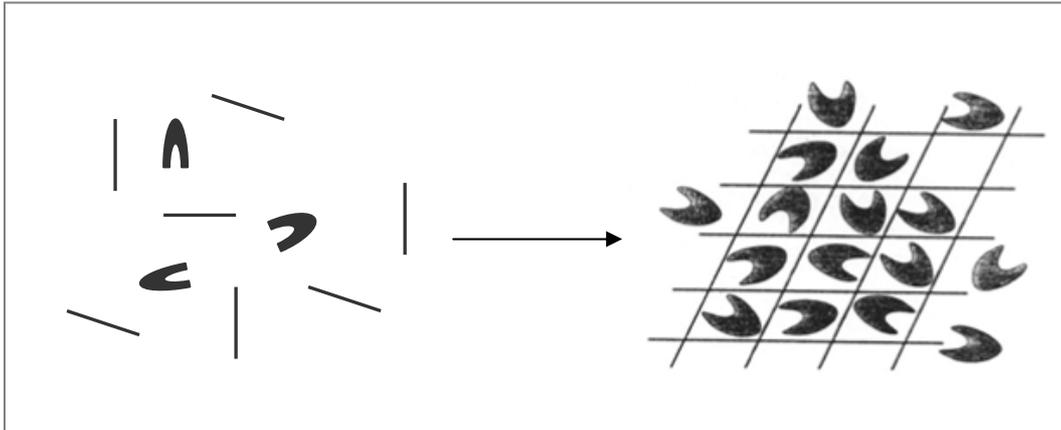


Figura 2: Confinamento das enzimas em uma matriz polimérica geliforme. Formação de uma rede polimérica a partir de precursores (—) contidos no meio reacional. Na ocasião da reticulação as biomoléculas (◐) são confinadas separando-as do meio.

Os tipos de suportes que podem ser utilizados nessa técnica são polímeros sintéticos como silanos, poliuretano; polissacarídeos como alginato, quitosana, pectina e proteínas como colágeno, albumina e outros (Cao *et al.*, 2009).

1.3.2. Imobilização por oclusão em vesículas ou micelas

Este método consiste no encapsulamento da enzima no interior de vesículas ou micelas, cujo envoltório é semipermeável (Figura 3).

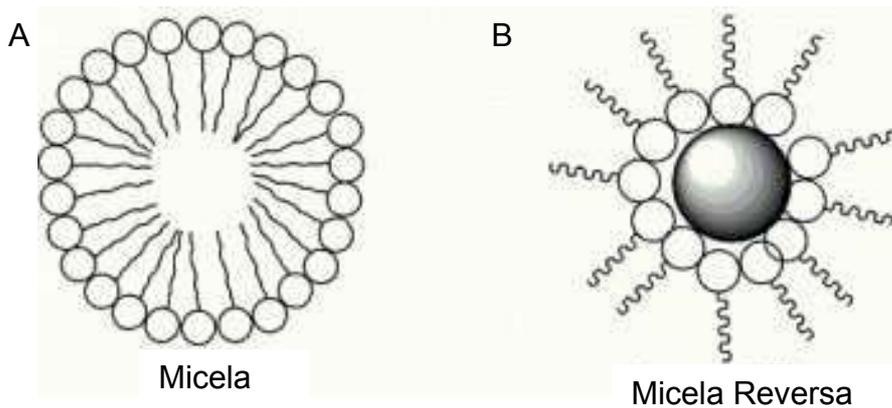


Figura 3: Imobilização de enzimas por oclusão em micelas reversas (www.guon.com.br). (A) micelas em meio polar, essas consistem em agregados quase esféricos constituídas por uma cauda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica; (B) micelas reversas, em meio apolar, circundando a enzima através de sua extremidade hidrofílica.

1.3.3. Imobilização da enzima em suporte sólido

1.3.3.1. Imobilização por ligação covalente

Este método consiste na fixação da enzima ao suporte através de ligações covalentes. Grupos químicos presentes na enzima interagem com grupos químicos do suporte insolúvel ou do braço espaçador ligados ao suporte (Figura 4) (Vaidya *et al.*, 2008; Ozyilmaz, 2009). Os grupos químicos da enzima que mais comumente se ligam ao suporte são $-SH$, $-OH$, $-NH_2$, sendo que a interação destes grupos com o suporte depende da reatividade e estado de protonação dos mesmos, bem como, da natureza dos grupos ativos do suporte (Vaidya *et al.*, 2008).

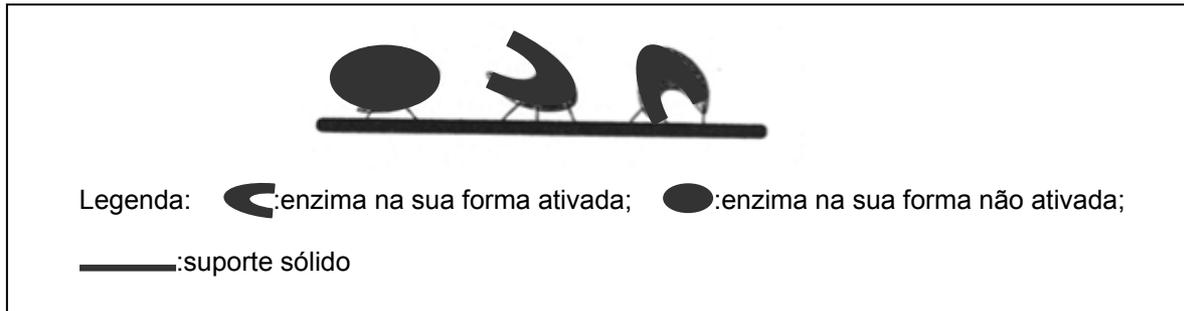


Figura 4: Fixação da enzima ao suporte por ligação covalente.

A força desta ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima proporcionando uma grande rigidez a estrutura da mesma. Esta rigidez pode manter inalterada a estrutura da enzima perante qualquer agente desnaturante como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros, fazendo com que o biocatalisador imobilizado seja mais eficiente, em processos industriais, que o biocatalisador livre (Mateo *et al.*, 2007; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Porém, ao se fixar uma enzima a um material inerte é razoável esperar algum tipo de efeito sobre sua estrutura e conseqüentemente sobre sua atividade catalítica (Macario *et al.*, 2009). Portanto, a forte fixação da biomolécula ao suporte pode dificultar a ativação da enzima caso a mesma possua conformações distintas quando ativada e não ativada (Mateo *et al.*, 2007). Há o fato, ainda, de que na imobilização da enzima por ligação covalente, o processo de interação da biomolécula com o suporte é quase sempre aleatório, podendo suceder que a região do sítio ativo se torne menos acessível ao substrato ocasionando um impedimento estérico, conforme ilustrado na Figura 5 (Mateo *et al.*, 2007).

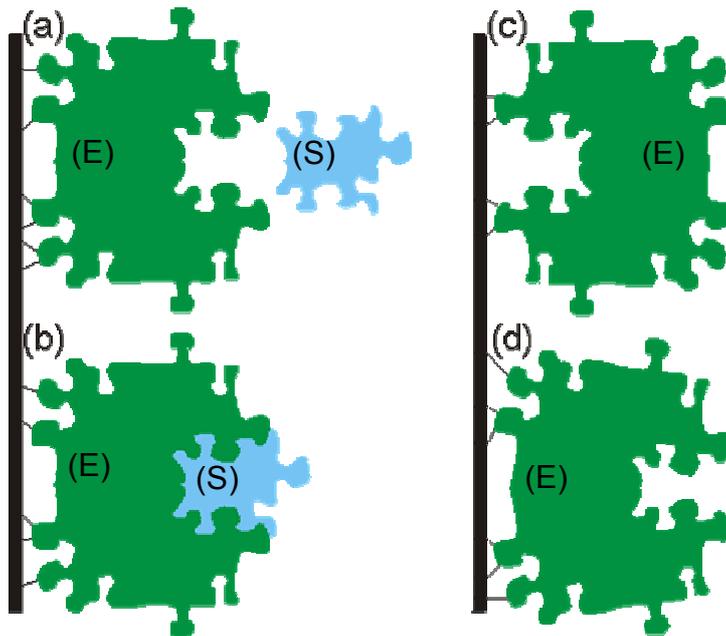


Figura 5: Imobilização da enzima por ligação covalente em suporte sólido (www.enq.ufsc.br). (a) e (b) Enzima imobilizada (E) com o sítio ativo inalterado e disponível para aceitar a molécula de substrato (S); (c) Enzima (E) ligada de modo não produtivo devido à inacessibilidade do substrato ao sítio ativo; (d) Distorção da conformação da enzima (E) impedindo a entrada do substrato.

Suportes que podem ser utilizados neste tipo de imobilização são agarose, esferas de vidro, sílicas, celulose, resinas epóxi e outros (Mateo *et al.*, 2007; (Chaubey *et al.*, 2009). Glutaraldeído é uma das moléculas que pode ser utilizada como braço espaçador em imobilizações por ligação covalente (Chaubey *et al.*, 2009). O glutaraldeído possui grupos funcionais em uma ponta de sua molécula que se ligam ao suporte e na outra ponta grupos que se ligam a enzima (Mateo *et al.*, 2007).

1.3.3.2. Imobilização de enzima por ligação iônica

Consiste na fixação da enzima ao suporte por interações iônicas (Figura 7). Trata-se de ligações relativamente fortes, portanto, proporcionam alta estabilidade em ambiente desnaturante, porém, este tipo de imobilização é muito suscetível à carga do meio (protonação) (Macário *et al.*, 2009). Ainda por se tratar de um processo de fixação aleatória da enzima, pode-se ocorrer perda de atividade devido a um impedimento estérico ou difusional do substrato à enzima. Os suportes mais utilizados são SP, CM, Q e DEAE sepharose.

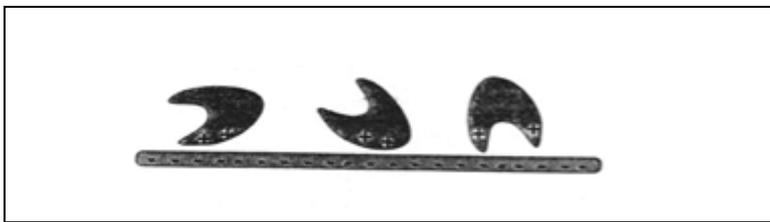


Figura 7: Fixação da enzima no suporte por ligação iônica. Neste caso, o suporte sólido (—) possui grupos funcionais com cargas negativas fazendo com que grupos químicos da enzima () que estejam positivamente carregados se liguem ao suporte por ligação iônica. Como não há uma região específica da enzima com carga residual positiva, as biomoléculas podem se ligar de forma aleatória ao suporte.

1.3.3.3. Imobilização de enzima por adsorção em suporte hidrofóbico

A imobilização por adsorção consiste na união entre a enzima e um suporte sólido através de adsorção física, ligações hidrofóbicas e forças atrativas de Van der Waals (Secundo *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). A fixação da enzima ao suporte efetua-se por simples mistura da biomolécula com o suporte, em

condições de pH e força iônica adequadas e em seguida lavam-se as biomoléculas que não ficaram ligadas (Secundo *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

Trata-se de um processo simples, de baixo custo e aplicabilidade generalizada (Zhou *et al.*, 2009; Kovalenko *et al.*, 2009). Sua utilização é recomendada quando o biocatalisador possui duas formas distintas de conformação quando ativado e não ativado, pois a ligação entre a enzima e o suporte não é rígida, portanto não prejudica a ativação da mesma (Secundo *et al.*, 2008). O emprego de enzimas imobilizadas em suportes hidrofóbicos faz-se indicada para atuação em meios contendo solventes orgânicos, por propiciar uma melhor difusão do substrato ao sítio ativo da biomolécula (Mateo *et al.*, 2007).

Todavia, neste método de imobilização as enzimas são altamente dependentes de pH, solventes, substrato e temperatura podendo ser facilmente desadsorvidas do suporte com a alteração destes parâmetros (Secundo *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Contudo, esse princípio de reversibilidade na adsorção da lipase pode ser controlado desde que haja um planejamento químico da força das interações envolvidas na imobilização e do meio onde a enzima imobilizada irá atuar. Ademais, a desadsorção constitui grande vantagem quando se tem por objetivo aplicações industriais em larga escala, pois permite a renovação do biocatalisador no reator somente com a remoção da enzima que perdeu sua atividade ao longo do uso repetido e recarga de um novo lote de enzimas (Secundo *et al.*, 2008). Esta operação em sistemas contendo enzimas imobilizadas covalentemente envolve, na maioria das vezes, o descarte do suporte juntamente com a enzima inativa.

Os suportes que podem ser utilizados são octil-agarose, vidro, sílica, alumina, poliestireno e divinilbenzeno (Zhou *et al.*, 2009; Abramian & El-Rassy, 2009).

1.4. Comparação entre as metodologias de imobilização de enzimas

Visto que as enzimas são um grupo com características biológicas muito diversas, não há um método universal de imobilização (Secundo *et al.*, 2008; Dizge *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2009; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). A metodologia para a imobilização de uma biomolécula deve considerar cuidadosamente a característica biológica da mesma para que, depois de imobilizada, ela mantenha ou melhore sua atividade e estabilidade, acrescentando melhores características físicas como resistência mecânica viabilizando, com isso, sua utilização em larga escala (Mateo *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2009; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009).

Tabela 1: Comparação das vantagens e desvantagens proporcionadas pelos processos de imobilização por adsorção, ligação covalente, oclusão e confinamento frente a algumas características de processo.

Características	Adsorção	Ligação Covalente	Oclusão em vesículas ou micelas	Confinamento em membrana ou polímero gelificado
Preparação	Simples	Difícil	Difícil	Moderado
Custo	Baixo	Elevado	Moderado	Elevado
Força da ligação	Variável	Forte	Fraca	Fraca
Perda da enzima	Sim	Não	Não	Não
Aplicabilidade	Vasta	Seletiva	Vasta	Vasta
Barreira difusional	Baixa	Baixa	Elevada	Elevada

1.5. Seleção de suporte apropriado para imobilização de enzimas

Existem inúmeros materiais inertes que podem ser utilizados. A natureza física desses suportes pode variar desde materiais geliformes até superfícies sólidas recobertas com substâncias capazes de interagir com a enzima (Miletic *et al.*, 2009). A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá,

essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (Miletic *et al.*, 2009).

De modo geral, o suporte deve apresentar grande superfície interna a fim de se obter uma boa interação da enzima na superfície. Se o suporte tiver superfície menor que a enzima, dificilmente se conseguirá uma intensa interação entre o suporte e a biomolécula (Mateo *et al.*, 2007).

O suporte deve ter uma alta densidade de grupos ativos presentes na superfície do mesmo, sendo que esses grupos devem ser capazes de interagir com grupos freqüentemente encontrados em proteínas. Os grupos químicos envolvidos na imobilização devem ser estáveis o suficiente para permitir que a enzima permaneça imobilizada no suporte mesmo em longos períodos de reação (Mateo *et al.*, 2007).

1.5.1. *Ligação em suportes macroporosos*

A imobilização de enzimas em estruturas sólidas macroporosas permite que as moléculas de enzima interajam e se fixem no interior destes poros. A fixação de enzimas no interior de poros de suportes sólidos proporciona uma maior proteção da molécula à interação com alguma substância do extrato aquoso, bem como, à desnaturação pelo contato com solventes orgânicos, previne sua agregação, autólise, proteólise por proteases e torna-as mais resistentes a ação de bolhas de gases e forte agitação (Mateo *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Miletic *et al.*, 2009). Bolhas de gases podem provocar a desnaturação da enzima solúvel no meio, porém não na imobilizada em sólidos porosos (Figura 8) (Mateo *et al.*, 2007).

Portanto, qualquer método de imobilização de enzimas que se baseie na fixação dessas biomoléculas em suportes sólidos porosos irá proporcionar a estabilização operacional deste biocatalisador sem realmente ter atuado e afetado a estabilidade estrutural da enzima, simplesmente esta estabilidade é alterada pelo mecanismo usado (Mateo *et al.*, 2007).

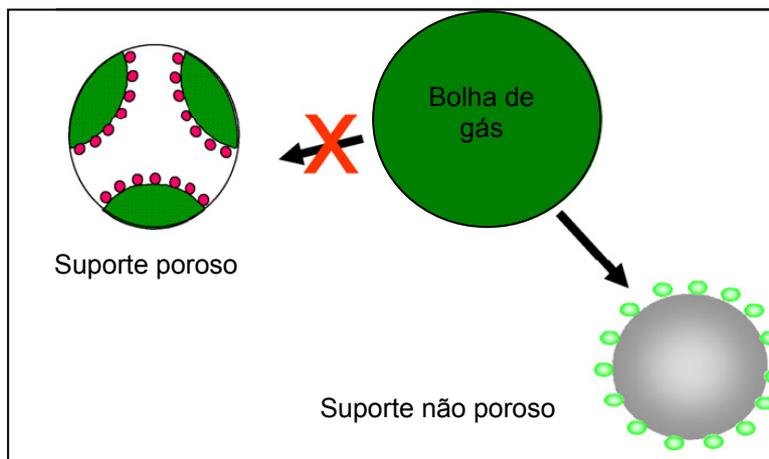


Figura 8. Efeito do tipo de suporte (poroso ou não poroso) na estabilidade da enzima imobilizada frente a uma bolha de gás (Mateo *et al.*, 2007). Os pontos vermelhos representam as biomoléculas fixadas no interior dos poros de um suporte sólido. Essas por encontrarem-se protegidas dentro do poro, não sofrem a ação desnaturante da bolha de gás. Os pontos verdes representam as biomoléculas fixadas na superfície externa de um suporte sólido não poroso que, por se encontrarem expostas ao meio, sofrem a ação desnaturante da bolha.

1.6. Vantagens e desvantagens da imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas tem como desvantagens a possibilidade de que efeitos nocivos causados pelo microambiente gerado neste processo afetem os valores dos parâmetros cinéticos da enzima, pois a biomolécula fica sujeita a uma

circunvizinhança diferente da que se encontrava quando livre (Ozyilmaz, 2009). Esta desvantagem se bem administrada pode se tornar uma vantagem, pois no processo de imobilização, podemos criar um microambiente que favoreça a atuação da enzima na aplicação industrial almejada.

Outra desvantagem consiste na possibilidade da ocorrência de problemas difusionais tanto do substrato para dentro do sítio ativo da enzima como do produto para fora do mesmo (Kovalenko *et al.*, 2009). Quando a enzima encontra-se fixada em um suporte, ocluída em uma vesícula ou micela ou confinada em matrizes ou membranas, o substrato deve se difundir do meio reacional até o sítio ativo da molécula para que a formação do produto ocorra. Se a velocidade de difusão do substrato é menor que a velocidade de transformação deste em produto, a velocidade observada é mais baixa do que a esperada, sendo que provavelmente nem todas as moléculas de substrato conseguirão entrar em contato com a enzima.

Por outro lado, a imobilização de enzima propicia uma série de vantagens. Este processo aumenta a estabilidade da enzima, principalmente em condições consideradas desnaturantes; proporciona o desenvolvimento de processos químicos contínuos; propicia a fácil separação do biocatalisador do meio reacional por filtração ou centrifugação proporcionando uma maior pureza ao produto final reduzindo, com isso, a carga de efluentes gerada pelas lavagens do produto para sua purificação (Laszlo & Evans, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Turturk *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Miletic *et al.*, 2009). A separação do catalisador do meio reacional permite ainda, a possibilidade da sua reutilização em uma nova reação. Estas vantagens fornecem uma relação ótima de custo/benefício fazendo com que a utilização de biocatalisadores se torne

viável economicamente em aplicações industriais (Laszlo & Evans, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Tunturk *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Miletic *et al.*, 2009).

1.7. Modo de produção de enzimas imobilizadas em suportes sólidos

O procedimento para imobilização de uma determinada enzima pode ser realizado por batelada ou processo contínuo (Ciftci *et al.*, 2009).

1.7.1. Processo por batelada

O processo de imobilização da enzima mais empregado é o por batelada. Trata-se, normalmente, de um processo com várias etapas de manipulação do suporte contendo a enzima, envolvendo a utilização de mais de um equipamento. Cada processo de imobilização possui características e condições próprias para ser desenvolvido, mas basicamente a imobilização da enzima por batelada consiste na alimentação do reator com as matérias-primas (suporte pré-tratado, enzima e tampão) mantendo as matérias-primas sob condições específicas de tempo, temperatura e agitação mecânica. Posteriormente, retira-se a mistura do reator, transportando-a a um filtro para separação do suporte imobilizado do meio reacional (Dizge *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Após a separação, transporta-se o suporte imobilizado ao reator onde são realizadas lavagens para retirada de proteínas não fixadas no suporte, finalizando o processo com a filtração do suporte imobilizado para retirada da solução de lavagem (Dizge *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009). Contudo, com o passar dos anos, verificou-se que este tipo de processo podia gerar gasto de mão de obra, perdas de material durante o

transporte e dificuldade na imobilização de enzimas dentro dos poros do suporte (Ciftci *et al.*, 2009). Portanto, começou-se a desenvolver processos que permitissem demover essas dificuldades.

1.7.2. Processo contínuo utilizando reator de leito fixo

O emprego de reatores de leito fixo tem sido o melhor processo e o mais freqüentemente utilizado quando se deseja trabalhar com processos contínuos que visem diminuir as desvantagens detectadas no processo por batelada (Chang *et al.*, 2007; Halim *et al.*, 2009). A imobilização de enzimas por processo contínuo trata-se de um processo com várias etapas envolvendo, porém, a utilização de apenas um equipamento. O processo consiste no confinamento do suporte sólido em um reator formando um leito fixo. O confinamento consiste no empacotamento das partículas sólidas a fim de formar uma coluna homogênea contendo o suporte. Posteriormente, na maioria das vezes, através de uma bomba peristáltica, adiciona-se a amostra contendo a enzima a uma determinada vazão na parte superior do reator. Essa amostra é então “forçada” atravessar o suporte, por diferença de pressão exercida através da bomba peristáltica, e sair na parte inferior do reator. Normalmente, mantém-se recirculando esta amostra dentro do reator a uma determinada temperatura, vazão e tempo, a fim de, permitir suficiente contato da enzima com o suporte. Após o tempo de recirculação, drena-se o meio líquido mantendo o suporte imobilizado confinado dentro do reator. Para finalizar o processo, realiza-se a lavagem do suporte imobilizado adicionando a solução de lavagem, de maneira similar à adição da enzima, drenando-se esta solução na parte inferior do reator.

Este tipo de processo tem demonstrado maiores vantagens para utilização em escala industrial, visto que permite sua reutilização sem necessidade de prévia separação. Trata-se de um processo fácil de operar, permite um maior contato entre a enzima e o suporte, reduzindo o tempo necessário para a imobilização da enzima e evita possíveis cisalhamentos da enzima causados pela agitação magnética no processo de batelada (Chang *et al.*, 2007; Ciftci *et al.*, 2009; Halim *et al.*, 2009).

Trata-se, portanto, de um processo rápido, pois além de reduzir o tempo de reação, não necessita de parada para transporte de material entre as etapas do processo, diminuindo, com isso, a perda de material, gasto com mão-de-obra e equipamentos sendo, um processo mais econômico que o de batelada (Chang *et al.*, 2007; Ciftci *et al.*, 2009; Halim *et al.*, 2009).

1.8. Lipases

Lipases (triacilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que podem tanto catalisar reações de hidrólise de ésteres de ácidos graxos em mono, digliceróis e ácidos graxos livres em meios contendo água, como realizar reações de síntese como esterificação, transesterificação, interesterificação e acidólise em meio com solventes orgânicos apolares (Figura 9) (Ghamgui *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2007; Laszlo & Evans, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009; Secundo *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Ozyilmaz, 2009).

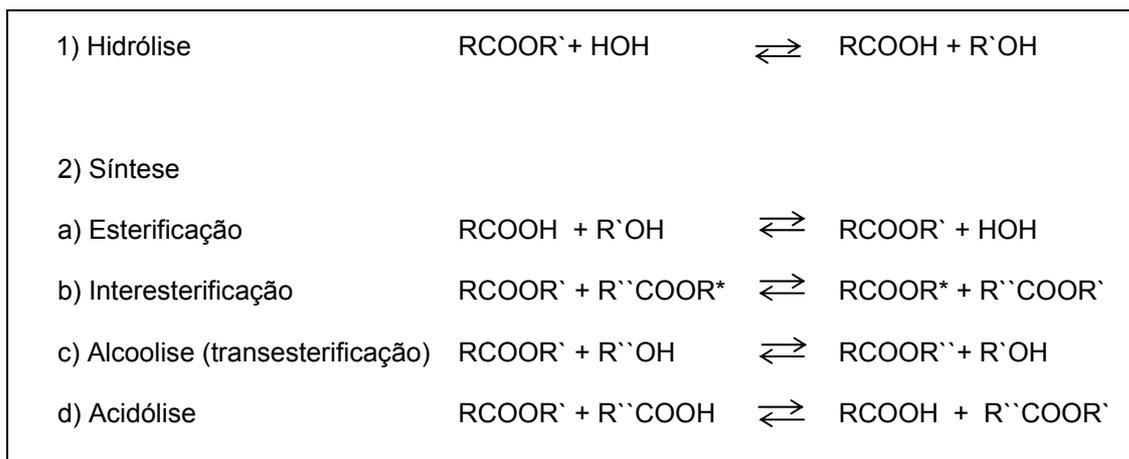


Figura 9. Reações catalisadas por lipases (Reis *et al.*, 2009).

Desde muitos anos, foi reconhecido que as lipases apresentam ínfima atividade quando em soluções aquosas contendo o substrato (triglicerídeos) dissolvido nesta mistura homogênea (Reis *et al.*, 2009). Porém, esta atividade adquire grandes proporções quando o substrato encontra-se em grande quantidade no meio aquoso formando agregados micelares ou emulsões (interfaces) (Reis *et al.*, 2009).

As lipases exibem um fenômeno denominado ativação interfacial, no qual a ativação da enzima ocorre durante o contato com a interface água-óleo de uma mistura (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009). A teoria sobre a ativação interfacial da lipase pode ser suportada pela resolução da estrutura cristalina da lipase de fungos e humanos que revelaram que o sítio ativo é coberto por um loop formado por uma estrutura α -hélice (Figura 10), isto é, o sítio ativo é coberto por uma “tampa” que o isola do substrato (Reis *et al.*, 2009).

Essa enzima é classificada como serina hidrolases e grande parte das lipases com seqüência de aminoácidos conhecida apresenta sua tríade catalítica composta pela serina; histidina; glutamina ou ácido aspártico (Figura 10) (Reis *et*

al., 2009). Esta serina catalítica é ocluída pela "tampa" oligopeptídica na estrutura nativa da enzima que impede o acesso do substrato ao sítio ativo, em meio aquoso. A abertura desta "tampa" induz uma reestruturação conformacional da lipase criando uma região eletrofílica (cavidade oxianiônica) em volta do resíduo de serina (Reis *et al.*, 2009). O lado hidrofílico da "tampa" helicoidal, exposto à mistura em sua estrutura nativa, torna-se parcialmente preso à cavidade polar das moléculas de água e, simultaneamente, o lado hidrofóbico da "tampa" fica completamente exposto, aumentando imensamente a superfície não polar em volta do sítio ativo. O mecanismo da catálise da lipase está ilustrado na Figura 11. Primeiramente, a serina é ativada por deprotonação sendo que para tal a histidina e o ácido aspártico são necessários (Figura 11a). Consequentemente, a nucleofilicidade do resíduo hidroxil da serina aumenta interagindo com o grupo carbonil do substrato. Um tetraedro intermediário acil-enzima é formado durante o estado de transição do substrato, sendo o mesmo estabilizado na cavidade oxianiônica (Figura 11b). Posteriormente, a desacilação é controlada pela eletronegatividade das moléculas da interface. Neste processo um nucleófilo interage com composto intermediário proporcionando o desligamento da enzima e liberação do produto, regenerando-se o sítio ativo (Figura 11c) (Reis *et al.*, 2009).

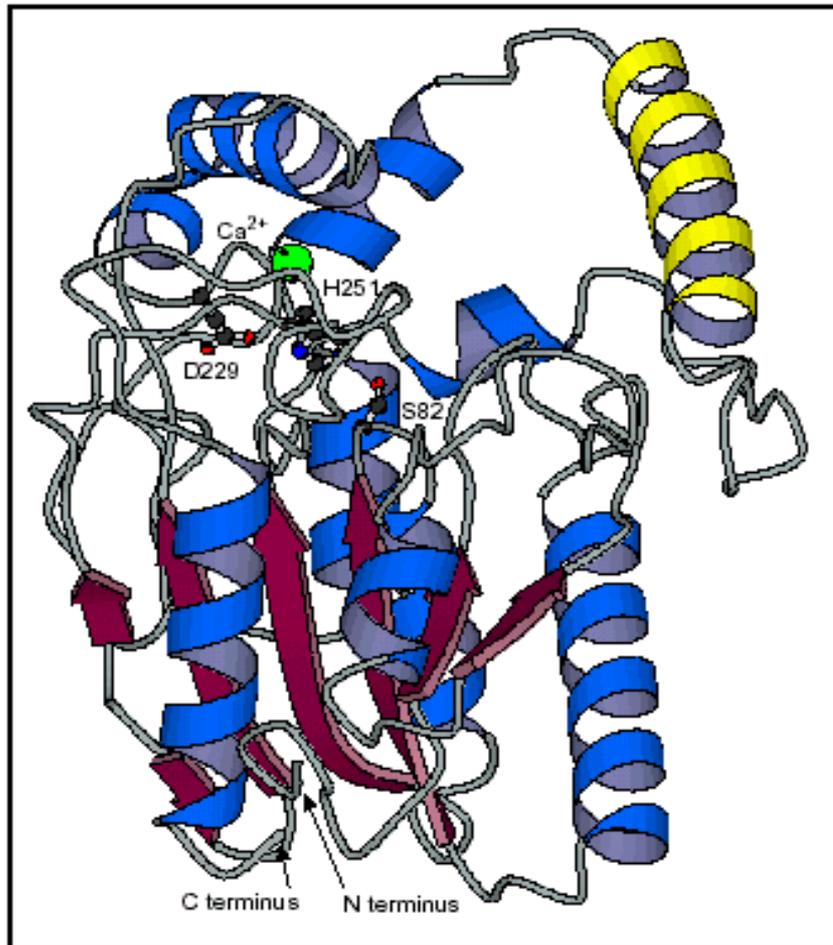


Figura 10. Estrutura de lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger & Reetz, 1998). A estrutura do tipo β -folha encontra-se representada em vermelho e a do tipo α -hélice encontra-se representada em azul ou amarelo, a estrutura representada em amarelo pode formar uma tampa sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio catalítico, S82 (serina), D229 (ácido aspártico) e H251 (histidina) encontram-se indicados.

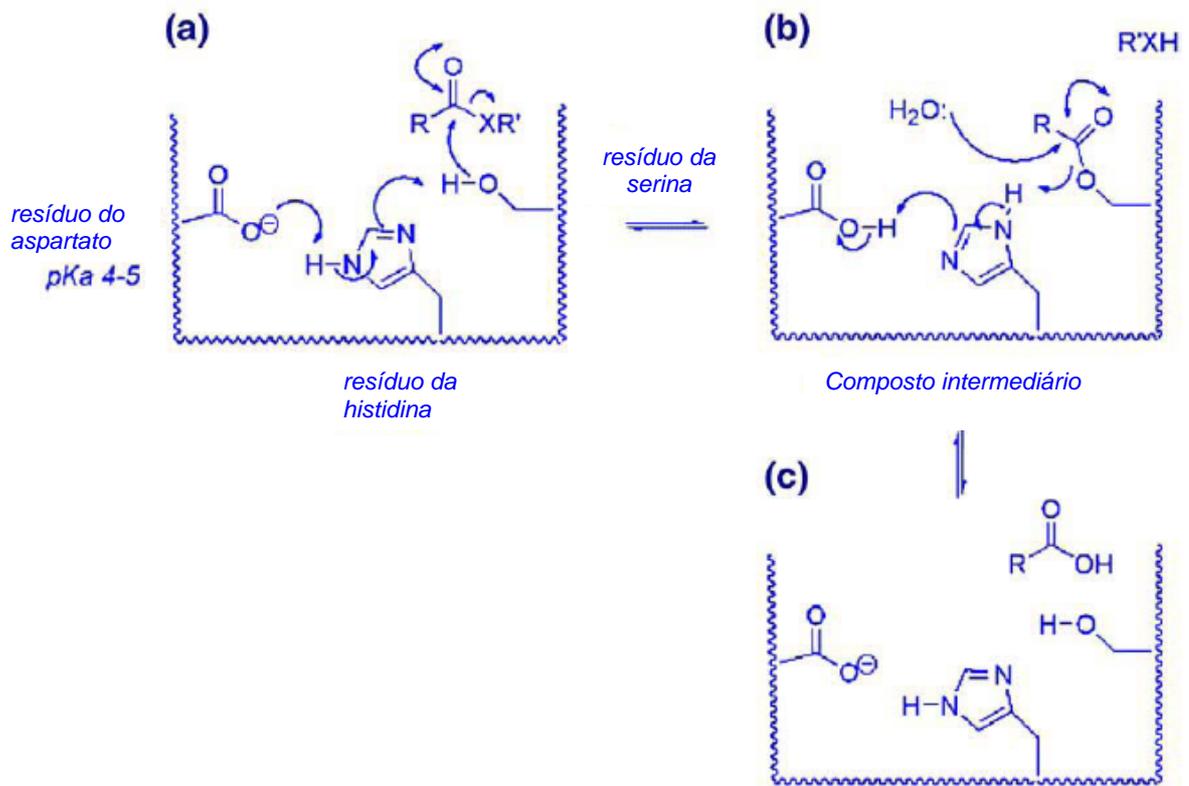


Figura 11. Mecanismo de catálise da lipase (Reis *et al.*, 2009).

Lipases podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos onde desempenham um papel importante no metabolismo de lipídeos (Reis *et al.*, 2009; Vaidya *et al.*, 2008). Como outras enzimas, as lipases possuem alta seletividade e especificidade ao substrato, que permite a fabricação de produtos de alto valor agregado. Além disso, as lipases não requerem cofatores e apresentam eficiência catalítica, necessitando pouca energia de ativação e condições brandas de operação (pH e temperatura), o que reduz o consumo de energia e problemas termoquímicos nos produtos da reação (Mateo *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009). Ademais, a utilização das lipases em aplicações industriais se tornou atrativa devido a sua atuação em reações de síntese em meio orgânicos e na catálise quiral através de reações de acil transferência a fim de se produzir

compostos enanteopuros difíceis de serem preparados através de métodos químicos convencionais (Hara *et al.*, 2007; Othman *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

1.9. Imobilização de lipases

1.9.1. Imobilização de lipase por adsorção em suporte hidrofóbico

A imobilização da lipase por adsorção refere-se a ligar a enzima, via forças de ligação fracas, a um suporte inerte que não é, preliminarmente, objeto de derivações químicas (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2008; Secundo *et al.*, 2008; Macário *et al.*, 2009). Utilizando-se um suporte hidrofóbico com grande superfície específica e, considerando-se a hipótese de que a lipase reconhece a superfície hidrofóbica de forma similar à superfície das partículas do substrato natural, espera-se que a lipase comece seletivamente a se imobilizar no suporte por ligações fracas de Van der Waals (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2008; Secundo *et al.*, 2008). Espera-se que grande parte da adsorção seja feita por interações hidrofóbicas, não somente devido ao fato da enzima ser ativada quando em contato com uma interface hidrofóbica, mas também pela lipase apresentar alto grau de hidrofobicidade em comparação com outras enzimas, quando em contatos com tais interfaces (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2008; Secundo *et al.*, 2008).

A adsorção envolve apenas a área hidrofóbica em volta do sítio ativo e a parte interna da "tampa" do mesmo. Com isso, ocorre a exposição do sítio ativo, sem seu envolvimento no processo de adsorção. A lipase adsorvida se encontrará na forma ativa, permitindo o acesso do substrato ao seu sítio ativo (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009).

Acredita-se que se considerando a hipótese do mecanismo de ativação interfacial (mencionada acima), todas as lipases imobilizadas provavelmente se apresentarão em sua forma ativa, proporcionando um significativo aumento de atividade em comparação as mesmas lipases quando em solução aquosa, pois nessa última poderão ser encontradas tanto enzimas em sua forma ativa, como na forma inativa (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007). Ademais, alguns estudos demonstram que a lipase é capaz de se fixar por adsorção em suportes hidrofóbicos em condições que outras enzimas não conseguiriam permitindo um significativo aumento na pureza do catalisador diminuindo, com isso, custos adicionais com a purificação da enzima (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Macário *et al.*, 2009).

Devido ao exposto acima, para as lipases, dentre os vários tipos de imobilização que podem ser realizados, a por adsorção tem sido a estratégia mais popular em aplicações de larga escala principalmente para utilização em meios contendo solventes orgânicos (Al-Zuhair *et al.*, 2009). Dentre todos os tipos de imobilização, a por adsorção é simples, de baixo custo e efetiva, mantendo inalteradas a especificidade e seletividade da enzima na reação (Ghamgui *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Ye, *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009). A imobilização por adsorção permite ainda que o suporte possa ser reutilizado no processo. A menor força de interação entre a enzima e o suporte possibilita que, com a perda de atividade do biocatalisador, seja possível desadsorver a enzima inativa e utilizar o suporte para uma nova imobilização, reduzindo, com isso, o preço final do biocatalisador, bem como, a geração de resíduos (Ozturk *et al.*, 2007).

Porém, este tipo de imobilização funciona melhor em meio apolar. A imobilização da lipase por adsorção cria um ambiente altamente hidrofóbico em volta do sítio ativo da enzima, impedindo a proximidade do substrato hidrofílico a esse sítio ativo, impedindo sua atuação (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007).

1.10. Aplicação de lipases livres e imobilizadas na indústria

O interesse na produção de lipases microbianas tem crescido nas últimas décadas devido ao seu largo potencial em aplicações industriais (Hasan *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Macario *et al.*, 2009; Ozyilmaz, 2009). Como cada aplicação requer uma propriedade única da enzima com respeito à especificidade, estabilidade, dependência de temperatura e pH, a seleção de microrganismos com atividade

lipolítica pode facilitar a descoberta de novas lipases aumentando, com isso, o número de aplicações.

Seguida pelas proteases e carbohidrases, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo baseado no total de volume de vendas. O uso comercial de lipase totaliza um valor de US\$ 1 bilhão e engloba uma variedade de aplicações (Hasan *et al.*, 2005). A maioria destas enzimas comercializadas é de origem microbiana e produzidas por fermentação aeróbica submersa o que permite um fino controle das condições de crescimento quando comparada com o estado sólido (Hasan *et al.*, 2005). As lipases vêm recebendo maior atenção nestes últimos anos por atuar em condições amenas de reação, ser altamente estáveis na presença de solventes orgânicos, e comumente demonstra alta régio- e estereoespecificidade (Hasan *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2008; Macario *et al.*, 2009; Miletic *et al.*, 2009).

Além disso, muitos processos industriais baseados na utilização de lipases como catalisadores vêm sendo estabelecidos (Tabela 2) (Ozyilmaz, 2009). A exploração das lipases na modificação de gorduras e óleos em meios orgânicos permitiu que matérias-primas de baixo custo fossem transformadas em valiosos produtos (Hasan *et al.*, 2005; Ozyilmaz, 2009).

Tabela 2. Principais aplicações das lipases na indústria.

Segmento Industrial	Aplicação das Lipases
Detergentes	Utilizada na hidrólise de gorduras para remoção de manchas de óleos em tecidos
Combustíveis	Produção de biocombustíveis biodegradáveis, não tóxicos e não poluentes (exemplo – biodiesel) através da transesterificação de matérias-primas renováveis como óleo vegetal e gordura animal
Laticínios	Atua na hidrólise da gordura do leite, maturação do queijo e modificação da gordura da manteiga para o desenvolvimento de agentes aromatizantes
Padarias	Promove a melhora do sabor e da qualidade e prolongação do tempo de prateleira
Bebidas	Atua na melhora do aroma em bebidas
Molhos para alimentos	Proporciona um aumento da qualidade de maioneses, molhos e cremes
Alimentos saudáveis	Modificam o tipo de ésteres presentes nos alimentos através de transesterificação, tornando-os mais saudáveis
Carne e peixes	Atuam no desenvolvimento de aroma e remoção de gorduras
Indústrias de gorduras e óleos	Promovem a hidrólise ou transesterificação de ésteres na produção de manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos
Químicos e farmacêutico	Atua enantioseletivamente promovendo a síntese de compostos quirais puros
Cosméticos	Síntese de emulsificantes e hidratantes
Couro	Desengordurante da pele dos animais
Papel	Sua atuação proporciona a fabricação de um papel de melhor qualidade
Limpeza	Remoção de gorduras

1.11. Aplicação de lipases imobilizadas na produção de biodiesel

A *American Society for Testing and Materials* (ASTM) define o biodiesel como um monoalquil éster de ácidos graxos de cadeias longas derivados de uma fonte lipídica renovável como óleo vegetal e gordura animal (www.biodiesel.gov.br; Arzamendi *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Hernandez-Martin & Otero, 2008; Ranganathan *et al.*, 2008).

Este monoalquil éster pode ser obtido de óleos vegetais como soja, palma, canola, dendê, amendoim, milho, girassol, algodão, pinhão manso, mamona, ou outras fontes de triglicerídeos, tais como, gordura animal, óleo residual proveniente de restaurantes e ambientes domésticos e de óleos produzidos por microrganismos como algas e fungos (Parente, 2003; Chisti, 2008; Ranganathan *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Estas fontes de triglicerídeo juntamente com álcoois de cadeia curta e catalisadores, formam como produto o glicerol e uma mistura de ésteres (biodiesel) que apresenta as mesmas características físico-químicas que o diesel mineral com a vantagem de ser ecologicamente correto (Figura 12) (Bouaid *et al.*, 2009).

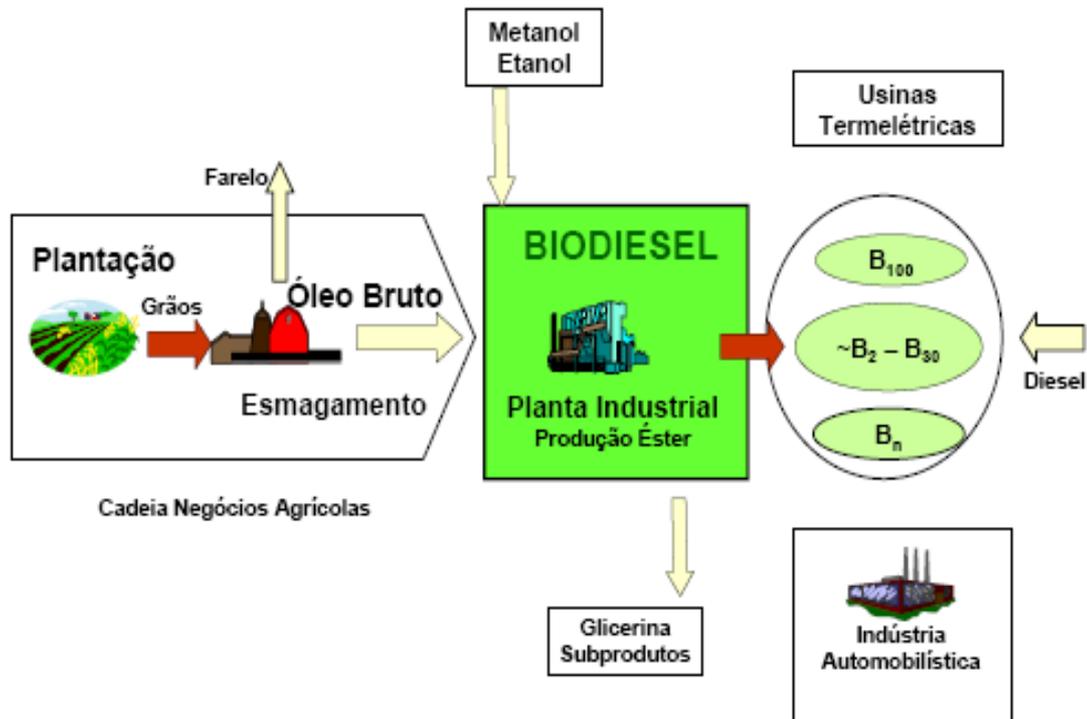


Figura 12: Esquema de uma cadeia de produção de biodiesel (www.biodiesel.gov.br). Óleo bruto obtido através do plantio de oleaginosas é adquirido pela planta de biodiesel que juntamente com álcool (metanol ou etanol) e catalisadores formam, através da reação de transesterificação, uma mistura de ésteres (biodiesel) que pura (B100) ou misturada ao diesel de petróleo (Bn) pode ser utilizado em motores a ciclo diesel.

Porém, antes da utilização do biodiesel obtido pelo processo mencionado acima, tentou-se a utilização direta de óleos vegetais como combustível (Parente, 2003; Ranganathan *et al.*, 2008). Estes eram misturados no diesel de petróleo em uma determinada proporção. No entanto, quando testados em motores à diesel se mostraram estáveis apenas por um curto intervalo de tempo. Isto se deve ao fato de que as altas viscosidades dos triglicerídeos, juntamente com seu alto teor ácido e liberação de ácidos graxos propiciavam, em longo prazo, a formação de

gomas, desgaste do motor e entupimento dos bicos injetores tornando seu uso insatisfatório e impraticável (Parente, 2003; Ranganathan *et al.*, 2008).

A partir do momento em que os triglicerídeos começaram a ser processados a fim de diminuir a viscosidade e melhorar outras propriedades necessárias, se tornaram similar ao diesel, podendo ser utilizado diretamente em motores a ciclo diesel disponíveis no mercado (Parente, 2003; Ranganathan *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009).

Atualmente, este biocombustível pode ser adicionado como aditivo ou substituir completamente o diesel em motores do ciclo diesel, além de apresentar uma série de vantagens sócio-econômicas e ambientais em relação ao diesel de petróleo, que justificam a sua produção e comercialização (www.biodiesel.gov.br, Arzamendi *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Hernandez-Martin & Otero, 2008; Ranganathan *et al.*, 2008).

As vantagens do biodiesel consistem em: a) ser uma energia limpa e renovável sendo que, no Brasil, há muitas terras cultiváveis que podem produzir uma enorme variedade de oleaginosas, principalmente nos solos menos produtivos, com um baixo custo de produção; b) ser constituído de carbono neutro, pois as plantas capturam todo o CO₂ emitido pela queima do biodiesel e separam-no em carbono e oxigênio, neutralizando suas emissões; c) contribuir para a geração de empregos no setor primário, que no Brasil é de suma importância para o desenvolvimento social. Fixando o trabalhador no campo, reduz-se o inchaço das grandes cidades favorecendo o ciclo da economia auto-sustentável essencial para a autonomia do país; d) a maior parte dos veículos da indústria de transporte e da agricultura usa atualmente o diesel; e) proporcionar ganho ambiental para todo o planeta, pois colabora para diminuir a poluição e o

efeito estufa, devido à menor ou ausente emissão de sulfurosos, hidrocarbonetos e monóxido de carbono em comparação aos combustíveis derivados do petróleo; f) reduzir a exportação de divisas e permitir a redução de custo desse insumo; g) viabilizar a sua utilização direta nos motores a ciclo diesel, não necessitando adaptação em caminhões, tratores ou máquinas (Bouaid *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2008; Bouaid *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

No Brasil, foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e cujo principal objetivo é garantir a viabilidade econômica da produção de biodiesel, realizar inclusão social e desenvolvimento regional. Em 13 de janeiro de 2005 foi publicada a Lei 11.097, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, altera Leis afins e dá outras providências (www.biodiesel.gov.br).

Nesta lei fica introduzido o biodiesel na matriz energética brasileira, sendo fixado em 5 % (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. O prazo para aplicação do disposto no caput deste artigo é de oito anos após a publicação desta Lei, sendo de três anos o período, após essa publicação, para se utilizar um percentual mínimo obrigatório intermediário de 2 %, em volume (www.biodiesel.gov.br). Fica instituída a Agência Nacional de Petróleo (ANP), entidade integrante da Administração Federal Indireta, como órgão regulador da indústria do petróleo, gás natural, seus derivados e biocombustíveis, vinculada ao Ministério de Minas e Energia (www.biodiesel.gov.br).

Devido à grande biodiversidade, diversidade climática e condições do solo, o Brasil possui grandes fontes de óleo vegetal como óleo de soja, de algodão, de palma, coco, canola, dendê, mamona, pinhão manso e outros. Indubitavelmente, pelo fato do Brasil ser, atualmente, o segundo maior produtor mundial de soja e ter uma indústria de processamento dessa oleaginosa muito bem desenvolvida, esta fonte de óleo ocupou uma posição proeminente no desenvolvimento do Biodiesel (Parente, 2003; Pousa *et al.*, 2007).

1.12. Mercado de biodiesel no Brasil

O atual consumo de diesel no Brasil é de aproximadamente 43 bilhões de litros por ano (ANP, 2008), com isso, o mercado de biodiesel considerando a mistura de 3 % de biodiesel ao diesel obrigatório a partir de Julho de 2008, segundo resolução ANP nº 7 de Março de 2008 é de 1,3 bilhões de litros tendo um mercado estimado até 2013 de 2,5 bilhões de litros ano (www.anp.gov.br).

Quanto à produção de biodiesel (B100), em 2006 foram produzidos 69 milhões de litros do biocombustível, aumentando para 402 milhões de litros em 2007 e 920 milhões de litros em 2008 (www.anp.gov.br).

Os custos da produção de biodiesel dependem da matéria-prima utilizada (óleo de soja, dendê, mamona, algodão, girasol) e da região do país onde ocorre a produção do biocombustível (Figura 13). O preço negociado no último leilão de biodiesel, em 2009, foi de R\$ 2,40 (www.biodieselbr.com).

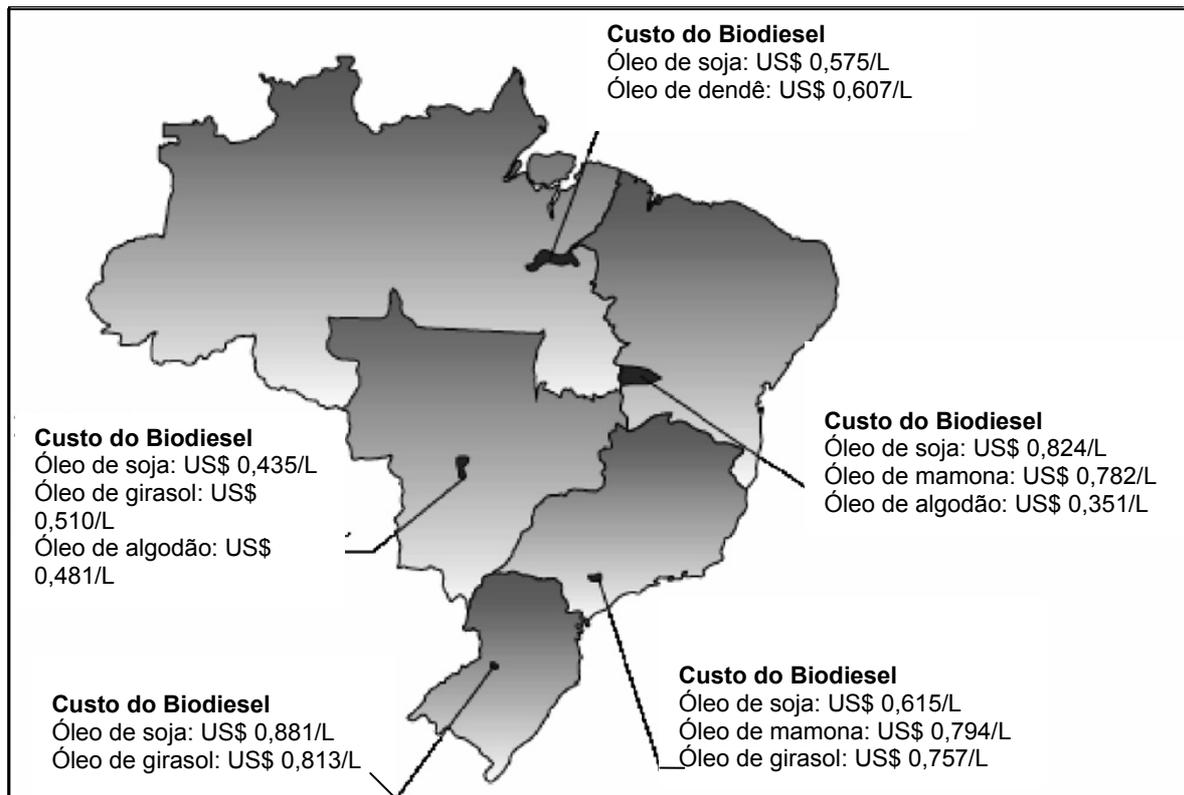


Figura 13: Estimativa de custo de produção do biodiesel por região em US\$/ L (Pousa *et al.*, 2007).

1.13. Produção do biodiesel por transesterificação.

A transesterificação requer 3 mol de álcool para cada mol de triglicerídeo, produzindo 1 mol de glicerol e 3 mol de ésteres de ácidos graxos, sendo que, por se tratar de um equilíbrio químico, industrialmente o álcool é utilizado em excesso, na quantidade de 6 mol para 1 mol de triglicerídeo. O catalisador mais utilizado industrialmente trata-se de uma base (hidróxido de potássio ou de sódio), usado na concentração de 1 % por peso de óleo (Yazdani & Gonzalez, 2007; Easterling *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2009). O processo de transesterificação pode ainda ser realizado sem catalisadores onde o álcool encontra-se em estado

supercrítico (Wen *et al.*, 2009). O glicerol resultante do processo é denominado glicerol bruto e contém uma mistura de álcool, água, sais inorgânicos e ésteres, entre outros (Yazdani & Gonzalez, 2007; Easterling *et al.*, 2008).

Após o término da reação o produto de alta viscosidade que é o glicerol é então retirado. A maior parte do catalisador se mistura ao glicerol, sendo retirado com o mesmo. Parte do glicerol, catalisador, álcool, sabão e outros contaminantes permanecem na mistura de álcool-ésteres sendo necessária a realização de lavagens desta mistura para purificação do biocombustível (Briggs & Pearson, 2005, Ranganathan *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2009).

PROCESSO EM ESCALA INDUSTRIAL

De todos os processos mencionados neste trabalho, o único utilizado para a produção do biodiesel em escala industrial é o que se utiliza da catálise alcalina (Soriano *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2009). Até o momento, foi o método que se mostrou com menor custo e mais eficiente. No entanto, os problemas gerados pela catálise alcalina tais como: (i) elevado consumo energético; (ii) necessidade de remoção de sais inorgânicos provenientes da neutralização desses catalisadores; (iii) dificuldade na remoção do glicerol, pois o sabão diminui a tensão superficial na interface biodiesel e glicerol; (iv) formação de sabão na catálise básica devido a quebra inespecífica do triglicerídeo resultando na liberação de ácidos graxos livres, os quais em conjunto com a água e catalisados pelas bases KOH ou NaOH reagem formando sabão, bem como a (v) reação incompleta do triglicerídeo deixando diglicerídeos e monoglicerídeos sem reagir permitindo a formação de sólidos brancos quando o combustível encontra-se a temperatura ambiente; (vi) os catalisadores alcalinos utilizados são extremamente

agressivos ao meio ambiente, bem como, aos seres humanos devendo-se tomar uma série de precauções na sua utilização, assim como realizar o tratamento deste efluente para descarte, vêm preocupando (Arzamendi *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2009, Soriano *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2009).

A fim de demover as desvantagens ocasionadas pelo uso de catalisadores químicos na produção de biodiesel, catalisadores biológicos vem sendo testados (Ranganathan *et al.*, 2008). Mais recentemente foram analisadas lipases como catalisadores na transesterificação. A utilização da enzima lipase como catalisador, proporcionou altos rendimentos em baixas temperaturas de reação, alta especificidade na reação, aumentando o grau de pureza do produto final; economia no custo com tratamento de efluentes e redução no consumo de energia (Yagiz *et al.*, 2007; Hernandez-Martin & Otero, 2008; Secundo *et al.*, 2008). Porém, o alto preço desses catalisadores dificulta a sua utilização na indústria.

Na Figura 14 segue um esquema de uma operação de produção de biodiesel por transesterificação a partir da catálise alcalina e enzimática heterogênea.

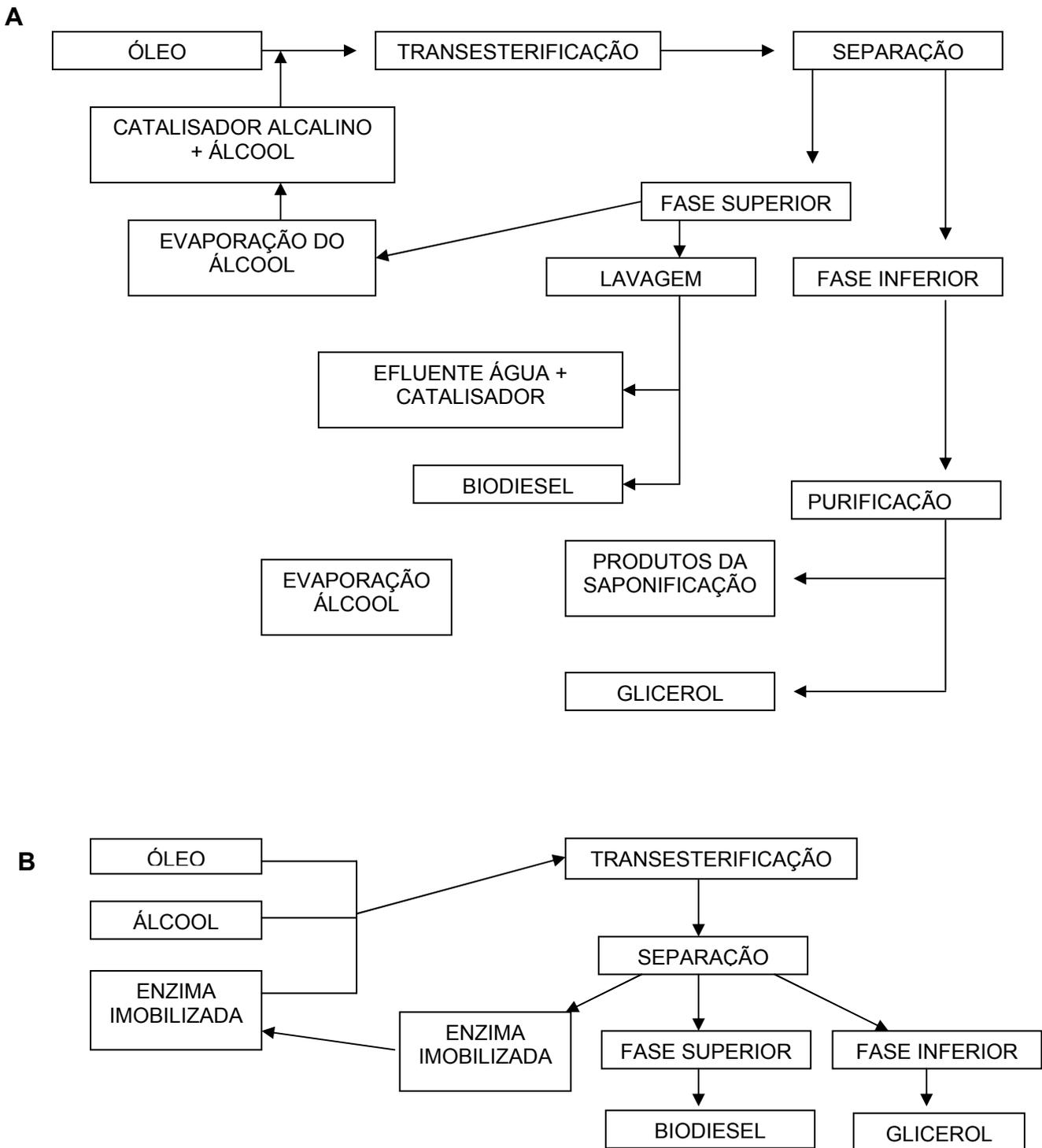


Figura 14: Etapas do processo de produção de biodiesel por transesterificação (Ranganathan *et al.*, 2008). (A) produção de biodiesel por catálise alcalina; (B) produção de biodiesel por catálise enzimática heterogênea.

Pode-se observar na Figura 14 a diminuição de etapas do processo de produção do biodiesel quando se utiliza da catálise enzimática heterogênea. Com isso a solução pode consistir na utilização de lipase imobilizada como catalisador heterogêneo eliminando a desvantagem do processo alcalino, proporcionando alta especificidade na reação, aumentando o grau de pureza do produto final com menos ou nenhuma etapa de purificação do biocombustível; economia no custo com tratamento de efluentes; redução no consumo de energia; fácil recuperação do catalisador enzimático; e possibilidade de sua reutilização no processo (Yagiz *et al.*, 2007; Hernandez-Martin & Otero, 2008; Secundo *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). No entanto, o processo ainda não foi implementado industrialmente devido a alguns problemas, tais como inibição da enzima na presença de metanol e etanol, redução na atividade enzimática com o tempo e alto custo (Ranganathan *et al.*, 2008; Guan *et al.*, 2009). Para tanto, a seleção de novos microrganismos produtores de lipase e enzimas mais resistentes a ação de alcoóis se tornam eminentes a fim de conseguir contribuir ao esforço geral da implementação da catálise enzimática em escala industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Imobilizar a lipase da levedura *Pseudozyma hubeiensis* (HB85A) em suporte sólido por processo contínuo e caracterizar a lipase imobilizada comparando com a lipase livre.

2.2. Objetivos específicos

- Produzir lipase em reator de 14 L;
- Caracterizar a lipase produzida (pH e temperatura ótimos, estabilidade a temperatura, pH e solventes orgânicos, efeito de compostos químicos, detergentes);
- Otimizar o processo de imobilização da lipase da levedura selecionada (tempo e pH de imobilização e quantidade de enzima livre por g de suporte);
- Caracterizar a lipase imobilizada (pH e temperatura ótimos, estabilidade a temperatura, pH e solventes orgânicos, efeito de compostos químicos, detergentes);
- Verificação do tempo máximo de reutilização da enzima imobilizada em reações de hidrólise;
- Determinar tempo de estocagem da lipase livre e imobilizada à 4 C;
- Produzir biodiesel em escala de laboratório utilizando-se como fontes de triglicerídeo o óleo de soja, óleo de mamona, gordura bovina e óleo residual de restaurante e como fontes de álcool o metanol, iso-propanol e etanol;

- Verificar a produção de biodiesel em escala de laboratório utilizando-se a lipase imobilizada e livre como catalisador em diferentes temperaturas.

PARTE I

Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation

Artigo aceito, em 16 de Outubro de 2008, para publicação na revista

Bioresource Technology

Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation

Roberta Bussamara ^a, Alexandre Meneghello Fuentefria ^a, Eder Silva de Oliveira ^a
Leonardo Broetto ^a, Michaela Simcikova ^b, Patrícia Valente ^c, Augusto Schrank ^{a,d},
Marilene Henning Vainstein ^{a,c,*}

^a *Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil*

^b *Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, Technicka 5, 166 28, Prague 6, Czech Republic*

^c *Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil*

^d *Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil*

*Corresponding author. Marilene Henning Vainstein

Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43421 – Campus do Vale/UFRGS,

CxP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS – Brasil

Tel.: +55-51-3308-6060; 3308-6086; fax: +55-51-3308-7309

E-mail address: mhv@cbiot.ufrgs.br

Homepage: www.ufrgs.br/cbiot

Abstract

The production of lipase by twenty-nine yeasts isolated from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* was evaluated. The highest lipase producers were *Pseudozyma hubeiensis* HB85A, *Debaryomyces occidentalis*-like HB83 and *Cryptococcus* sp. HB80. *P. hubeiensis* HB85A batch fermentations were carried out in a bioreactor and lipase production improved 3.2-fold as compared to flask submerged cultures. The production process was significantly reduced from 48 h (in flasks) to 18 h (in the bioreactor). The better hydrolytic activity was achieved with C16 *p*-nitrophenyl ester. Maximal activity was observed at pH 7.0, the optimum temperature was 50 °C at pH 7.0 and the enzyme was stable at 30 °C and 40 °C. The lipolytic activity was stimulated by Mg²⁺, K⁺ and Ba²⁺ salts and EDTA and slightly inhibited by Ca²⁺ salts. Non-ionic detergents such as Triton X-100, Tween 80 and Tween 20 strongly stimulated lipase activity, whereas SDS inhibited it. The lipase was stable in iso-octane and hexane at 80 %.

Keywords: Batch processing; Biocatalysis; Lipase production; *Pseudozyma hubeiensis*; Fermentation

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) have been defined as carboxylesterases which catalyse the hydrolysis of acylglycerides with acyl chains with more than ten carbon atoms. Under certain conditions, they also catalyse the reverse reaction, producing glycerides from glycerol and fatty acids. The physiologic role of lipases is to hydrolyse triglycerides into diglycerides, monoglycerides, fatty acids and glycerol. They act at the interface between a substrate phase and an aqueous phase, in which the enzyme is dissolved. Lipases are also able to catalyse interesterification, transesterification and enantioselective reactions in non-aqueous media (Saxena et al., 2003; Schmid and Verger, 1998; Sharma et al., 2001). They constitute the most important group of biocatalysts for biotechnological applications and are very relevant enzymes from both physiological and biotechnological points of view.

Lipolytic enzymes currently attract a considerable amount of attention because of their unique characteristics: substrate specificity, regio-specificity and chiral selectivity (Castro-Ochoa et al., 2005). Because of these characteristics, novel biotechnological applications have been successfully established using lipases in the synthesis of biopolymers and the production of biodiesel, enantiopure pharmaceuticals, agrochemicals, biosensors and flavour compounds (Bornscheuer et al., 2002; Castro-Ochoa et al., 2005; Jaeger and Eggert, 2002; Kim et al., 2004; Linko et al., 1998; Sharma et al., 2001). Industrially useful lipases produced by yeasts are mainly obtained from *Candida rugosa* (CRL) and *Candida antarctica* (CAL). Commercial preparations are composed of a mixture of isoenzymes with different characteristics and substrate preferences (Akoh et al., 2004; Chang et al., 2006; de Maria et al., 2006; Ferrer et al., 2001; Kose et al.,

2002; Qian and Lutz, 2005; Xin et al., 2002). Although most yeast lipase studies deal with the above-mentioned species, there are some emerging lipase-producing yeasts that represent a hope for biotechnological innovation in this area (Ciardini et al., 2006; Fernandez et al., 2006; Kim and Hou, 2006).

A useful approach for obtaining novel biocatalysts is the isolation of microorganisms from natural sources, followed by functional screening assays in the search for the desired enzymatic capability, and selection of the best performers (Schäfer et al., 2007). Until the 1980s, only about 2% of the world's microorganisms had been tested as enzyme sources. More recently, several thousand microbial samples isolated from soil were tested for the production of lipases, revealing that 20% were lipase producers, including filamentous fungi and yeasts (Cardenas et al., 2001; Schäfer et al., 2007).

The purpose of the present study was the bioprospection of lipase-producing yeasts from an unexplored natural substrate aiming at the attainment of a novel lipase for industrial applications. The phylloplane habitat was chosen for the isolation of microorganisms because the leaf cuticle is mainly composed of lipidic components; therefore, it is an appropriate substrate for the screening of lipase-producing microorganisms in the search for novelties in this area.

2. Methods

2.1. Selection of lipase-producing yeasts using Tween 20 as the growth substrate

Yeasts and yeast-like strains were isolated from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* (Farroupilha Park, Porto Alegre, RS, Brazil) by leaf imprinting on YEPG agar plates with the following composition (g/l): yeast extract 5.0, peptone 10.0, glucose 20.0 and agar 20.0. After incubation at 22–25 °C for 3–5 days,

representative colonies of each morphological type were isolated and purified in YEPG agar medium. The strains were maintained in GYMP medium (g/L): glucose 20.0, yeast extract 5.0, malt extract 20.0, monobasic sodium phosphate 2.0 and agar 20.0, covered with a layer of sterile mineral oil, and kept at 4 °C. Yeasts were phenotypically characterized by standard morphological and physiological tests (Yarrow, 1998), and the identification was performed according to Barnett et al. (2000) and to the computer program YEASTCOMPARE (Ciriello C and Lachance MA, copyright © 1999–2001). Identification of *Pseudozyma hubeiensis* strain HB85A was confirmed by sequencing of the D1/D2 region of the 26S rDNA, according to Kurtzman and Robnett (1998).

Selection of lipase producers was performed in tubes containing Yeast Nitrogen Base and 0.5% of Tween 20 (Von Tigerstrom and Stelmaschuk, 1989). Isolated microorganisms had previously been grown in YEPG agar plates at 22–25 °C for 2 days, and inoculated in distilled water for 24 h in order to exhaust their endogenous nutritional resources. Growth in the Tween 20 test tubes for up to 7 days indicated the presence of enzyme activity. Selected strains were further tested with low cost raw materials (soy oil or bovine fat) for enzyme production.

2.2. Induction of lipase secretion with bovine fat and/or soy oil in liquid cultures

The basal medium containing glucose (2.0 g/L), peptone (5.0 g/L), MgSO₄ (0.1 g/L) and K₂HPO₄ (1.0 g/L) was supplemented with soybean oil (20.0 g/L) or bovine fat (20.0 g/L) for the induction of lipase. The medium was sterilized for 30 min at 120 °C, except for the soy oil and the bovine fat, which were sterilized separately by dry heat (180 °C for 60 min) and aseptically added to the medium before inoculation.

For the preparation of the inoculum, cultures were grown at 28 °C for 16 h in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of GYMP broth. Erlenmeyer flasks containing 20 mL of basal medium added to 20.0 g/L soy oil or bovine fat were inoculated with 2 mL of the yeast inoculum and incubated at 28 °C for 48 h on an orbital shaker (200 rpm). Only the 10 best lipase producers with bovine fat were tested with soy oil. Cells were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, and culture supernatants were evaluated for enzyme activity.

2.3. Pilot-plant scale batch fermentations

For the preparation of the inoculum, cultures were grown at 28 °C for 16 h in 1000 ml Erlenmeyer flasks containing 250 mL of GYMP broth. Batch fermentations were carried out in a 14 l New Brunswick MF 14 Fermenter containing an axis with spades for agitation. As previously described, 10 l of basal medium with 20.0 g/L of soy oil was prepared. The medium was sterilized in the fermenter for 30 min at 120 °C, and the dry-heat sterilized soy oil was aseptically added to the medium before inoculation. The reactor was inoculated with 250 ml of inoculum. Standard operation conditions were: agitation rate 200 rpm, temperature 28 °C, air-flow rate 1 vvm and fermentation time 24 h, without pH control. Samples (20 mL) were taken at regular intervals, cells were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, and the culture supernatants were evaluated for enzyme activity. Batch fermentation was repeated to check the reproducibility, with each sample analyzed in triplicate. The values reported in figures represent the average of the measurements. Biomass concentration was measured by turbidimetry at 600 nm in a visible spectrophotometer (Ultrospec 2000).

2.4. Analytical methods

The lipase assay was performed by measuring the increase in the absorbance at 410 nm in a visible spectrophotometer (Ultrospec 2000) caused by the release of *p*-nitrophenol after hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) at 37 °C for 30 min at pH 8.0, with reference to an enzyme-free control. To initialize the reaction, 0.1 mL of the cell-free culture supernatant was added to 0.9 mL of substrate solution containing 3 mg of pNPP dissolved in 1 mL isopropanol and 9 mL of the following solution: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 plus 40 mg of Triton X-100 and 10 mg of arabic gum (Maia et al., 2001; Silva et al., 2005; Winkler & Stuckmann, 1979). One unit of lipase (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol *p*-nitrophenol per min, in the assay conditions described above. The calibration curve was prepared using *p*-nitrophenol as standard. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

Protease activity was determined by measuring the increase in the absorbance at 400 nm in a visible spectrophotometer (Ultrospec 2000) caused by the hydrolysis of azocasein at 50 °C for 1 h. Aliquots of 0.1 mL of azocasein solution (20 g/L) and 0.2 mL of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.9) were mixed with 0.1 ml of the cell-free culture supernatants (Sangorrín et al., 2001). After incubation for 15 min at 50 °C, 0.8 mL of trichloroacetic acid 20 % was added in order to stop the reaction. After centrifugation (5 min/10,000 rpm), the absorbance of the supernatant was read at 400 nm in a visible spectrophotometer. One unit of protease (U) was defined as the absorbance variation in the assay conditions described above. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

Protein determination was performed according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

2.5. Lipase characterization

Lipase characterization was performed using as an enzyme source the culture supernatants from the bioreactor culture. Conditions for lipase activity evaluation were the same as described above, unless stated otherwise.

The *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) substrate was used for most lipase activity determinations in this work. Activity tests were also performed with other esters of *p*-nitrophenol (pNP), namely *p*-nitrophenyl acetate (pNPA), *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) and *p*-nitrophenyl myristate (pNPM). One unit of lipase (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol *p*-nitrophenol per min at 37 °C and pH 8.0.

The optimal pH was determined using pNPP as the substrate in buffer solutions of pH values ranging 3.0 to 9.0 (50 mM citrate–phosphate pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0; 50 mM Tris–HCl pH 8.0 and 9.0). The optimal temperature for lipase activity was determined using pNPP as a substrate at different temperatures (30–70 °C) with 50 mM citrate–phosphate buffer at pH 7.0. The lipase temperature stability was determined by incubating 0.1 mL of the culture supernatants for 20 min, 40 min and 1 h at 30, 40, 50 and 60 °C in the absence of a substrate. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay at 50 °C and pH 7.0. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

To test the effect of detergents and other chemicals on lipase activity, culture supernatants (0.1 ml) were incubated for 1 h at 40 °C in the presence of 1 % (v/v) of the detergents (Triton X-100, Tween 80, Tween 20 and SDS) and 20 mM of BaCl₂, CaCl₂, MgCl₂, KCl and EDTA. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay at 50 °C and pH 7.0. Values are given as mean ± standard deviation in triplicate for each point.

To test the lipase stability in the presence of organic solvents, culture supernatants (0.1 mL) were incubated in 0.1 mL of acetone, methanol, ethanol, 2-propanol, n-butanol, iso-octane and hexane at different concentrations (20, 50 and 80 %) for 1 h at 40 °C. For control, 0.1 mL of culture supernatant was incubated with distilled water for 1 h at 40 °C. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay using 0.1 mL of the incubation mixture at 50 °C and pH 7.0. Values are given as mean ± standard deviation in triplicate for each point.

2.6. Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate and statistical analysis was performed by SPSS 13.0 software. Analysis of variance was carried out using the ANOVA procedure by the Turkey multiple comparison procedure to determine significant differences between the means.

3. Results and discussion

A total of 84 yeast and yeast-like colonies isolated from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* were randomly chosen and purified. Strains identified with the name of the species and the suffix "-like" mean that they differ slightly from the

standard description of the species. Some lineages were identified only at the genus level. Screening on Tween 20 liquid culture allowed us to select 29 isolates which had a good growth on this substrate (Table 1). These 29 isolates were further screened for lipase production with bovine fat; and, among them, the ten best lipase secretors were further screened using soy oil as the carbon source (Table 2). These substrates were chosen because they are low-cost raw materials for enzyme production. The best lipase producers in both bovine fat and soy oil were *P. hubeiensis* strain HB85A (610 U/L in bovine fat and 386 U/L in soy oil), *D. occidentalis*-like strain HB83 (306 U/L in bovine fat and 352 U/L in soy oil) and *Cryptococcus* sp. strain HB80 (293 U/L in bovine fat and 350 U/L in soy oil). *S. salmonicolor*-like strain HB75, *Cryptococcus* sp.2 HB87 and black yeast fermenter HB49 did not present lipolytic activity in soy oil, although their activity in bovine fat was good.

Table 1

Isolates selected as lipase producers in Tween 20

Yeast strains	Yeast strains
<i>Candida</i> spp. strain HB53	<i>Cryptococcus</i> sp ₂ strain HB87
<i>Candida</i> spp. strain HB60A	<i>Cryptococcus humicola</i> -like strain HB76A
<i>Candida robusta</i> strain HB60B	<i>Cryptococcus laurentii</i> strain HB18
<i>Candida santjacobensis</i> -like strain HB10	<i>Filobasidium floriforme</i> -like strain HB26B
<i>Debaryomyces occidentalis</i> -like strain HB83	<i>Pseudozyma</i> spp. strain HB27A
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB68A	<i>Pseudozyma</i> spp. strain HB27B
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB68B	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> strain HB85A
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB70	<i>Rhodotorula glutinis</i> -like strain HB21
<i>Kodamaea ohmeri</i> strain HB55	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> -like strain HB75
<i>Kodamaea ohmeri</i> strain HB88	<i>Sporidiobolus pararoseus</i> strain HB63
<i>Pichia scolyti</i> -like strain HB66	<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB07
<i>Pichia scolyti</i> -like strain HB62A	<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB41
<i>Bullera alba</i> strain HB78C	<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB47
<i>Cryptococcus</i> sp ₁ strain HB80	<i>Aureobasidium pullulans</i> strain HB64
Black fermenter yeast strain HB49	

Growth in the Tween 20 test tubes for up to 7 days indicated the presence of enzyme activity

Table 2

Lipase activity of yeasts and yeast-like fungi obtained from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis*.

Yeast strains	Lipase activity (U/l) in basal medium with bovine fat*	Lipase activity (U/l) in basal medium with soy oil*
<i>Kodamaea ohmeri</i> strains HB88	0 ^a	-
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> strain HB63	0.05 ± 0.044 ^a	-
<i>Pichia scolyti</i> -like strain HB66	2.23 ± 0.27 ^{a,b}	-
<i>Cryptococcus humicola</i> -like strain HB76A	3.24 ± 0.15 ^{a,b}	-
<i>Kodamaea ohmeri</i> strain HB55	3.24 ± 0.10 ^{a,b}	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> strain HB64	5.36 ± 0.04 ^{a,b}	-
<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB41	5.93 ± 0.38 ^{a,b}	-
<i>Candida santjacobensis</i> -like strain HB10	7.32 ± 0.10 ^{a,b}	-
<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB47	7.58 ± 0.20 ^{a,b}	-
<i>Candida robusta</i> strain HB60B	8.16 ± 0.84 ^{a,b}	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB70	9.88 ± 0.16 ^{a,b}	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB68B	11.49 ± 0.91 ^{a,b,c}	-
<i>Candida</i> spp. strain HB60A	12.44 ± 0.14 ^{a,b,c}	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> -like strain HB21	12.52 ± 0.18 ^{a,b,c}	-
<i>Debaryomyces polymorphus</i> strain HB68A	12.97 ± 1.65 ^{a,b,c}	-
<i>Pichia scolyti</i> -like strain HB62A	13.98 ± 0.45 ^{a,b,c}	-
<i>Pseudozyma</i> spp. strain HB27A	20.00 ± 1.43 ^{a,b,c}	-

<i>Bullera alba</i> strain HB78C	20.59 ± 0.35 ^{a,b,c}	-
<i>Candida</i> spp. strain HB53	26.83 ± 0.18 ^{b,c}	-
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> -like strain HB75	37.11 ± 1.11 ^c	0 ^a
<i>Pseudozyma</i> spp. strain HB27B	66.10 ± 0.23 ^d	328.53 ± 10.6 ^b
<i>Filobasidium floriforme</i> -like strain HB26B	78.91 ± 5.64 ^{d,e}	18.33 ± 1.6 ^a
<i>Cryptococcus laurentii</i> strain HB18	85.75 ± 0.16 ^{d,e}	33.93 ± 3.1 ^a
<i>Aureobasidium</i> sp. strain HB07	90.48 ± 4.30 ^{d,e}	1.15 ± 0.1 ^a
<i>Cryptococcus</i> sp ₂ strain HB87	96.18 ± 0.04 ^e	0 ^a
<i>Cryptococcus</i> sp ₁ strain HB80	292.67 ± 22.91 ^f	350.5 ± 30.5 ^{b,c}
Black fermenter yeast strain HB49	298.75 ± 15.41 ^f	0 ^a
<i>Debaryomyces occidentalis</i> -like strain HB83	305.85 ± 20.48 ^f	352.2 ± 19.6 ^{b,c}
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> strain HB85A	610.40 ± 15.55 ^g	385.6 ± 21.7 ^c

Culture conditions: basal medium supplemented with bovine fat or soy oil

incubated at 28 °C for 48 h in an orbital shaker operating at 200 rpm. Values are given as mean ± standard deviation in triplicate for each point.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

Lipases are mostly inducible enzymes and their inducers, such as oils, are necessary for enzyme production (Sharma et al., 2001). For pilot-plant scale batch fermentation, soy oil was chosen as the carbon and inducer source. The yeast selected for pilot-plant scale fermentation was *P. hubeiensis* strain HB85A because it had the best lipase activity on both bovine fat and soy oil. *P. hubeiensis* strain HB85A identification was confirmed by sequencing of the D1/D2 region of the 26S rDNA (GenBank access number DQ123912).

Yeast growth was observed during all fermentation periods with a constant pH (Fig. 1A). There was a peak in lipase activity (1232 U/L) at 18 h fermentation time, followed by a short decrease that remained constant until 22 h, while the peak in specific activity was at 16 h to 18 h, with 4.8×10^{-2} U of lipase/ μ g of total protein (Fig. 1B). This corresponds to the mid-exponential growth phase. Thus, as several other microorganisms, like *Candida rugosa* (Valero et al., 1991) and *Aspergillus terreus* (Gulati et al., 2000), lipase production by *P. hubeiensis* strain HB85A was a growth-associated phenomenon. In contrast to this, lipase production by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Chartrain et al., 1993) was not growth associated, since lipase was induced only in the late exponential phase and reached a peak in the late stationary phase.

Comparing the batch fermentation process in the 14 L bioreactor (soybean oil, 28 °C and agitation rate 200 rpm) to the earlier studies in Erlenmeyer flasks under the same conditions, lipase production was enhanced from 386 U/L to 1232 U/L in the reactor and, most importantly, the duration of the production process was significantly reduced from 48 h to 18 h. This behavior was also observed during lipase production by *A. terreus* in a 10 L batch fermentation (Gulati et al., 2000) with a lipase activity 10 % higher in the reactor than in shake flasks, and a

significant decrease in the duration of fermentation, from 96 h to 54 h. Gulati et al. (2000) suggested that both the increase in lipase production as well as the reduction in fermentation time were due to higher oxygen transfer rates caused by the increased agitation. Therefore, the enhancement in the lipase production rate by *P. hubeiensis* HB85A in the reactor was probably due to the amount of oxygen continuously injected through the system, while oxygen only diffused into the Erlenmeyer flask. This argument is in agreement with the investigations performed by Dominguez et al. (2005) and Li et al. (2005), who reported that lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 and *Acinetobacter radioresistens* only occurred when air was continuously supplied to the bioreactor. Other consequences of the agitation system that could explain the increase in lipase production were the increased contact of the medium components with microorganisms and the better oil dispersion in the medium. These parameters make possible a higher and faster lipase production.

It is possible that other proteins might influence lipase activity during fermentation, especially proteases. Batches were also evaluated for the protease content in the medium (Fig. 1B). Proteases appeared in the broth after 19 h of fermentation (2.33 U/mL.h) and its concentration remained constant until 21 h. At 22 h and 23 h of fermentation, there was a decrease in protease activity (1.8 U/mL.h and 1.2 U/mL.h, respectively). As lipase activity reduced in 19 h, it is possible that protease was one of the factors responsible for lipase activity reduction during the fermentation. A reduction in the lipase activity probably due to protease activity was also observed in *C. rugosa* lipase production in 2.0 L batch fermentation (Puthli et al., 2006).

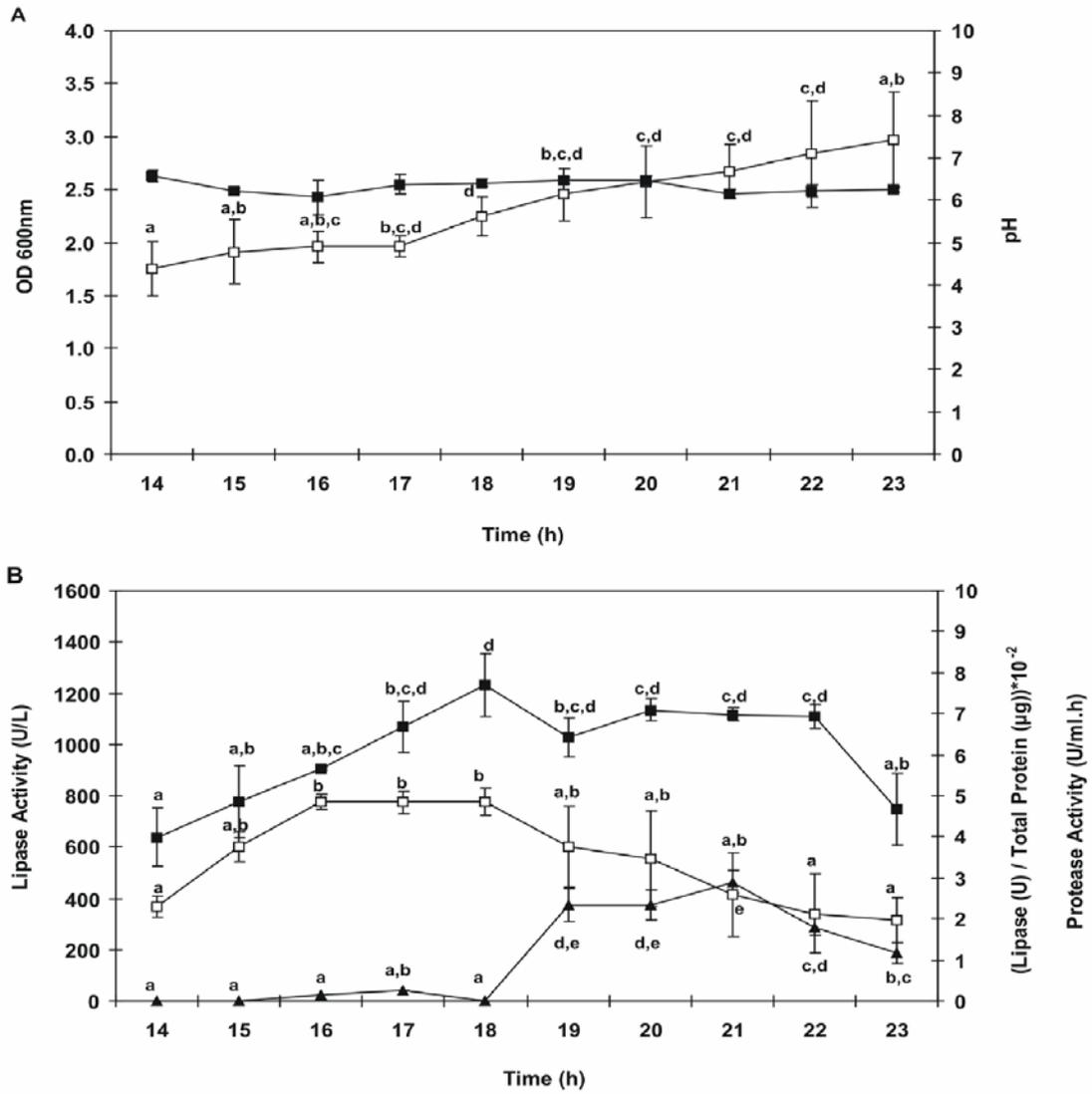


Fig. 1. *Pseudozyma hubeiensis* HB85A growth and enzyme production in a reactor of 14 L capacity in basal medium supplemented with soy oil, at 28 °C and 200 rpm. (A) Growth OD_{600nm} (□) and pH** (■). (B) Lipase activity (■), Lipase specific activity (□) and Protease activity (▲). Values are given as mean ± standard deviation in triplicate for each point.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

** pH values do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

The enzyme produced was studied with *p*-nitrophenyl esters of different alkyl chain lengths (Table 3). The highest hydrolytic activity was obtained with C16 *p*-nitrophenyl ester, indicating a clear lipase preference for long alkyl chains. Recent works have suggested the use of synthetic long-chain substrates, such as pNPP to characterize the activity of “true” lipases (Lima et al., 2004). Under this definition, the crude extract from *P. hubeiensis* (strain HB85A) could be said to contain “true” lipases since this lipase showed a notable preference for pNPP (C16). As pNPP was the best substrate, it was chosen for all other tests aiming at the characterization of the enzyme.

Table 3

Lipase activity on various pNP esters

Substrate	Lipase activity (U/ml)*	Residual activity (%)
pNPA (C2)	1.44 ± 0.130 ^b	27
pNPB (C4)	2.42 ± 0.130 ^c	45
pNPM (C14)	0.60 ± 0.096 ^a	11
pNPP (C16)	5.33 ± 0.150 ^d	100

Lipase activity was determined by the spectrophotometer assay at 37 °C in 50 mM Tris–HCl buffer pH 8.0. Lipase activities are also expressed as the percentage related to *p*-nitrophenyl palmitate (C16), which was taken as 100 %.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

The *P. hubeiensis* (strain HB85A) lipase showed high activity in a pH range of 3.0–7.0 (Fig. 2A). Maximal activity was observed at pH 7.0 (60 U/ml), dropping off rapidly at pH values above 7.0, remaining about 3.8 % of the residual activity at pH 8.0 (2.3 U/ml), and at pH 9.0 no lipase activity was observed. Thus, pH 7.0 was used in all other tests aiming at the characterization of the enzyme. Activity determinations beyond pH 9.0 were not performed because of the difficulties in rate estimation caused by the spontaneous hydrolysis of pNPP at pH values above 9.0. Most lipases reported in the literature have optimal activity at neutral or slightly basic pH values (Aryee et al., 2007; Castro-Ochoa et al., 2005; Lima et al., 2004; Segura et al., 2006). The *P. hubeiensis* (strain HB85A) lipase presented a good activity in neutral pH (pH 7.0) and also in acidic pH (pH values 3.0 and 4.0).

Preference for acidic conditions was also noted for the lipase from *Kurtzmanomyces* sp. (Kakugawa et al., 2002). An acidic lipase can open a new range of applications to be developed using this enzyme as a catalyst.

The lipase activity increased with temperature from 30 °C up to 50 °C. The highest activity was observed at 50 °C (45.3 U/ml) and at 60 °C and 70 °C there was a decrease in lipase activity (38.7 residual activity and 10.6 residual activity, respectively) (Fig. 2B). The high activity obtained at 50 °C for the lipase from *P. hubeiensis* HB85A is also similar to lipases from other microorganisms, such as *P. aurantiogriseum* (Lima et al., 2004) and *Bacillus termoleovorans* (Castro-Ochoa et al., 2005). As the highest activity of *P. hubeiensis* lipase was at 50 °C, this temperature was used in the lipolytic spectrophotometric assays from this experiment onwards. The results observed for the lipase from *P. hubeiensis* HB85A suggest that this enzyme can be used in applications with labile substances and low boiling-point compounds at a low temperature.

The thermal stability of the lipase from *P. hubeiensis* HB85A was tested after incubation at different temperatures for 20 min, 40 min and 60 min at pH 7.0 (Fig. 2C). Although there was no significant loss in the residual activity during incubation for up to 60 min at 30 °C and 40 °C, after incubation at 50 °C for 20 min there was only 15 % residual activity, and the enzyme lost its activity completely after incubation at 60 °C for 20 min, demonstrating that this enzyme is not particularly stable at high temperatures (Fig. 2C). In view of this, although the optimum activity of the lipase from *P. hubeiensis* HB85A was at 50 °C, we suggest the best temperature to be considered for utilization of this crude lipase in industrial processes is 40 °C. Low stability at high temperatures was also observed for the lipases from *P. aurantiogriseum*, which presented 32 % residual

activity after 30 min of incubation at 50 °C (Lima et al., 2004). The lipase from *Kurtzmanomyces* sp., on the contrary, presented good stability at 70 °C (Kakugawa et al., 2002).

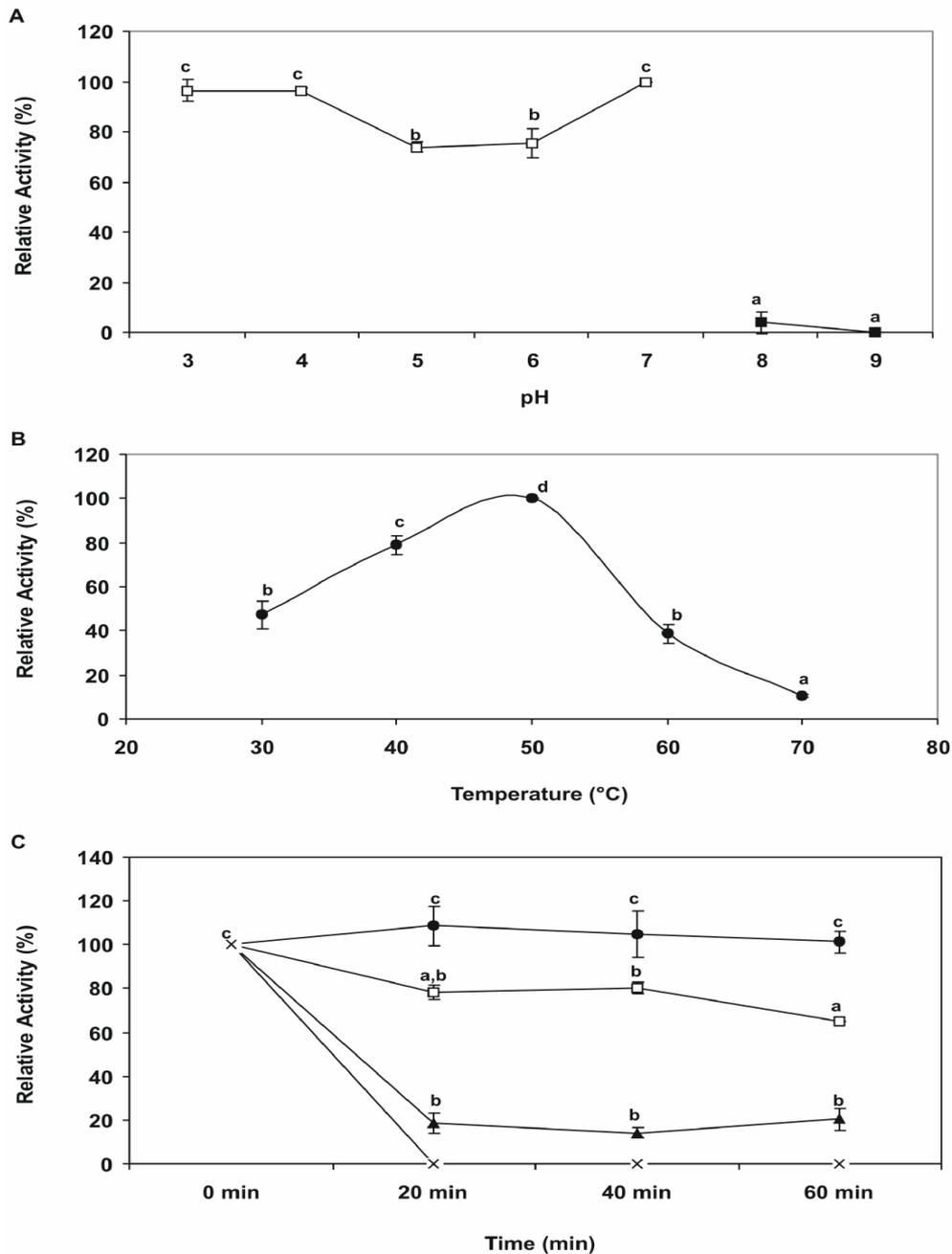


Fig. 2. Characterization of the *Pseudozyma hubeiensis* strain HB85A lipase obtained from the 14 L bioreactor fermentation. (A) Effect of pH on the lipolytic activity of the culture supernatant at 37 °C and 0.05 M citrate–phosphate buffer 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 (□) and 0.05 M Tris–HCl buffer pH 8.0 and 9.0 (■). (B) Effect of temperature on the lipolytic activity of the culture supernatant at pH 7.0. (C) Temperature stability of the lipolytic culture supernatant by incubating the enzyme solution at 30 °C (●), 40 °C (□), 50 °C (▲) and 60 °C ** (x) for 20 min, 40

min and 1h. Lipase activity was determined by the spectrophotometric assay using pNPP as the substrate. Values are given as mean \pm standard deviation in triplicate for each point.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test ($p=0.01$).

** Temperature stability at 60 °C do not statistically differ from each time by the ANOVA Tukey test ($p=0.01$).

Surfactants are frequently used in the preparation of the emulsion in lipolytic assays and also in the purification and characterization of lipases. They can potentially cause denaturation of the enzyme by disrupting its tertiary structure. On the other hand, they can prevent aggregation of the enzyme and, consequently, their addition may increase the lipase activity. Therefore, the choice of the surfactant either in the preparation of the emulsion or in the purification steps is crucial. Lipase of *P. hubeiensis* HB85A was incubated for 1 h at 40 °C, its most stable high temperature, in the presence of 1 % (v/v) of Triton X-100, Tween 80, Tween 20 and SDS. The non-ionic detergents Triton X-100, Tween 80 and Tween 20 strongly stimulated lipase activity (185.5 %, 150.8 % and 183.2 % residual activity, respectively) (Table 4). However, lipase activity was completely inhibited in the presence of 1 % SDS. It is possible to suggest that, besides preventing aggregation of the lipase, the non-ionic detergents, such as surface-active substances, stabilize the interfacial area facilitating the access of the substrate to the enzyme, since the catalytic reaction of lipases takes place at an oil–water interface (Karadzic et al., 2006).

The response to the presence of detergents by lipases is variable to some extent. The activity of the lipase from *B. thermoleovorans* CCR11 slightly increased with the addition of 1 % Triton X-100 after 30 min at 60 °C, but the lipase was completely inhibited in the presence of 1 % SDS, Tween 80 and Tween 20 (Castro-Ochoa et al., 2005). An inhibitory effect on lipase activity was detected in *P. aurantiogriseum* after the addition of 0.01 % of Triton X-100, while the enzyme was stable in 0.01 % Tween 80 and 0.01 % SDS after being incubated for 1 h at 28 °C (Lima et al., 2004).

The effect of different metal ions on the activity of the lipase is shown in Table 4. A slight increase in lipase activity due to 20 mM of Mg^{2+} , K^+ and Ba^{2+} salts (114 %, 115 % and 114.9 % residual activity, respectively) was observed after 1 h incubation at 40 °C. Different from our results, the lipase from *Kurtzmanomyces* sp. was not affected by 1 mM of Ba^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} salts after 1h of incubation at 37 °C (Kakugawa et al., 2002). On the other hand, an enhancement in the activity of the lipase from *P. aurantiogriseum* by the presence of 1 mM of Mg^{2+} salts (113 % residual activity) and a reduction in the lipolytic activity by the presence of 1 mM of Ba^{2+} salts (70 % residual activity) were observed (Lima et al., 2004). Generally, salt concentrations higher than 1 mM inhibit the enzyme activity, as observed for the lipase from the viscera of grey mullet, that presented a reduction in lipase activity by the presence of 10 mM of Mg^{2+} and Ca^{2+} salts compared with 1 mM of the same salts (Aryee et al., 2007).

In order to characterize the lipase further, we observed the effect of EDTA, a metal-chelating agent. This caused an increase in lipase activity (123.4 % residual activity), suggesting that the lipase from *P. hubeiensis* is not a metalloprotein (Table 4). The enhancer effect of EDTA was quite different from that observed with the lipase from *Y. lipolytica*, which was not affected by this reagent (Yu et al., 2007). We can tentatively explain this enhancer effect in association with the effect of salts (Table 4). Ca^{2+} salt showed a slight inhibitory effect on the *P. hubeiensis* (strain HB85A) lipase, which is consistent with the activation observed with EDTA, since EDTA may bind Ca ions in the reaction, explaining the activation obtained with this chelant. Although most lipases are strongly activated by Ca^{2+} salt (Castro-Ochoa et al., 2005; Yu et al., 2007),

possibly due to the stabilization of the enzyme tertiary structure, others are not influenced by calcium (Lima et al., 2004).

Table 4

Effect of detergents and diverse chemicals on *P. hubeiensis* lipase^a

Substance	Concentration	Residual activity (%)[*]
Control ^b		100
MgCl ₂	20 mM	114 ± 1.53 ^b
KCl	20 mM	115 ± 2.15 ^{b,c}
BaCl ₂	20 mM	114.9 ± 4.05 ^b
CaCl ₂	20 mM	94.7 ± 1.89 ^a
EDTA	20 mM	123.4 ± 1.20 ^c
<hr/>		
Triton X-100	1%	185.5 ± 19.6 ^b
Tween 20	1%	183.2 ± 11.32 ^b
Tween 80	1%	150.8 ± 3.19 ^b
SDS	1%	0 ^a

^a The enzyme solution was incubated in the presence of various compounds at 40 °C for 1h.

^b Control: culture supernatant without the addition of any substance.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

From a biotechnological point of view, there are many advantages in using lipases for enzymatic conversions in organic solvents, such as the better solubility of substrates in organic solvents, the ability to act in a non-water medium, specificity in the synthesis reaction, and supply of a product with high purity and fewer environmental problems. However, generally, enzymes lose their activity at organic solvent concentrations higher than 10–20 % (Karadzic et al., 2006). It is believed that water-miscible organic solvents take water from the enzymes, leading to the unfolding of the molecule and, consequently, to the occurrence of denaturation at a much faster rate than in a pure aqueous system (Lima et al., 2004; Yu et al., 2007).

Due to this reason, the effects of various organic solvents at the concentrations of 20 %, 50 % and 80 % (v/v) were examined (Table 5). The most stable high temperature (40 °C) was chosen for the treatment of the supernatant with the different solvents. A significant degree of lipase stabilization in ethanol and 2-propanol at the concentration of 20 % (40 % and 43 % residual activity, respectively) was observed. Higher concentrations of these solvents (50 % and 80 %) caused an immediate loss of lipolytic activity, probably because they promoted rapid protein denaturation. However, the lipase from *P. hubeiensis* (strain HB85A) was stable in the presence of iso-octane and hexane at the concentration of 80 % (104.86 % and 103.23 % residual activity, respectively) being slightly stable at the concentration of 50 % of methanol, n-butanol and acetone (8.7 %, 20.5 % and 11.3 %, respectively). A residual lipase activity (12.7 %) was detected when the enzyme solution was incubated in n-butanol at a concentration of 80%.

In fact, lipases are diverse in their sensitivity to miscible organic solvents. Different from *P. hubeiensis* HB85A, the lipase from *Kurtzmanomyces* presented

significant stability in acetone, ethanol and 2-propanol at the concentrations of 20, 40, 60 and 80 % after exposure for 1 h at 30 °C (Kakugawa et al., 2002). The lipase from *B. thermoleovorans* also showed high stability in the presence of water-miscible organic solvents, since it retained almost 100 % activity after exposure for 1 h at 30 °C in 70 % methanol, 70 % ethanol, 70 % 2-propanol and 70 % acetone (Castro-Ochoa et al., 2005). The lipase from *P. aurantiogriseum*, on the other hand, lost its lipolytic activity in the presence of methanol, ethanol and acetone and had a little residual activity in the presence of 2-propanol (1.9 %) after 1 h at 28 °C (Lima et al., 2004).

Table 5

Stability of *P. hubeiensis* lipase activity in organic solvents^a

Organic solvent	Concentration (%)	Residual activity (%) [*]
Control ^b		100
Acetone	20	46.2 ± 3.18 ^b
	50	11.3 ± 2.19 ^a
	80	0 ^a
Methanol	20	79.5 ± 9.98 ^b
	50	8.7 ± 1.82 ^a
	80	0 ^a
Ethanol	20	39.9 ± 5.78 ^b
	50	0 ^a
	80	0 ^a
2-propanol	20	42.9 ± 3.40 ^b
	50	0 ^a
	80	0 ^a
n-butanol	20	78.6 ± 8.51 ^b
	50	20.5 ± 0.91 ^a
	80	12.7 ± 0.00 ^a

iso-octane	20	99.25 ± 2.66 ^a
	50	115.26 ± 9.20 ^a
	80	104.86 ± 6.18 ^a
hexane	20	94.82 ± 0.03 ^a
	50	110.4 ± 2.97 ^a
	80	103.23 ± 3.88 ^a

^a The enzyme solution was incubated in the presence of various organic solvents at 40 °C for 1h.

^b Control: culture supernatant without the addition of any substance.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

4. Conclusions

The pilot-plant scale batch fermentation for lipase production by *P. hubeiensis* (strain HB85A) in a 14 L reactor showed a good cost/benefit rate for the enzyme attainment, denoting that industrial-scale lipase production may happen in an economically attractive manner. The lipase was characterized, aiming for new industrial applications. The good stability of the enzyme in organic solvents, as well as in acidic pH, and its optimum activity at 40 °C make the lipase from *P. hubeiensis* (strain HB85A) a good candidate for potential applications mainly in non-aqueous biocatalysis, such as the production of biopolymers, biodiesel, enantiopure pharmaceuticals, agrochemicals and flavour compounds.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: CNPq, CAPES and FAPERGS. DNA sequencing was performed by the Brazilian Genome Network at CBiot-UFRGS-RS.

References

- Akoh, C.C., Lee, G.C., Shaw, J.F., 2004. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. *Lipids*. 39, 513–526.
- Aryee, A.N.A., Simpson, B.K., Villalonga, R., 2007. Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*cephalus*). Isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 394–402.

- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 2000. Yeasts, Characteristics and Identification, fourth ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H., 2002. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. Trends Biotechnol. 20, 433–437.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M.S., Sanchez-Montero, J.M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J.V., 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeasts lipases. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 14, 111–123.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R.O., 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. Enzyme Microb. Technol. 37, 648–654.
- Chang, S.W., Lee, G.C., Shaw, J.F., 2006. Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. J. Agric. Food Chem. 54, 5831–5838.
- Chartrain, M., Marcin, C., Katz, L., Salmon, P., Brix, T., Buckland, B., Greasham, R., 1993. Enhancement of lipase production during fedbatch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* MB5001. J. Ferment. Bioeng. 76, 487–492.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A., Iride, A., 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food Microbiol. 23, 60–67.

- De Maria, P.D., Sanchez-Montero, J.M., Sinisterra, J.V., Alcantara, A.R., 2006. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol. Adv.* 24,180–196.
- Dominguez, A., Pastrana, L., Longo, M.A., Rúa, M.L., Sanroman, M.A., 2005. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 26, 95–99.
- Fernandez, L., Perez-Victoria, I., Zafra, A., Benitez, P.L., Morales, J.C., Velasco, J., Adrio, J.L., 2006. High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris* protein. *Expr. Purif.* 49, 256–264.
- Ferrer, P., Montesinos, J.L., Valero, F., Sola, C., 2001. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95, 221–255.
- Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R., 2000. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. *Process Biochem.* 36, 149–155.
- Jaeger, K.E., Eggert, T., 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 390–397.
- Kakugawa, K., Sobayashi, M., Suzuki, O., Miyakawa, T., 2002. Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp I-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 978–985.
- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I., Fujiwara, N., 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 82–89.

- Kim, B.S., Hou, C.T., 2006. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 29, 59–64.
- Kim, H.K., Jung, Y.J., Choi, W.C., Ryu, H.S., Oh, T.K., Lee, J.K., 2004. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 349–355.
- Kose, O., Tuter, M., Aksoy, H.A., 2002. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresour. Technol.* 83, 125–129.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Von Leeuwenhoek.* 73, 331–371.
- Li, C.Y., Chen, S.J., Cheng, C.Y., Chen, T.L., 2005. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. *Biochem. Eng. J.* 25, 195–199.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Fontana, L.D., 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng. J.* 18, 65–71.
- Linko, Y.Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppala, J., Linko, P., 1998. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *J. Biotechnol.* 66, 41–50.
- Puthli, M.S., Rathod, V.K., Pandit, A.B., 2006. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 27, 287–294.
- Qian, Z., Lutz, S., 2005. Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 13466–13467.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S., 2003. Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods* 52, 1–18.

- Schäfer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L.D., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenbøll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H., Xu, H., 2007. Industrial enzymes. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 105, 59–131.
- Schmid, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 1608–1633.
- Segura, R.L., Betancor, L., Palomo, J.M., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Cortés, A., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2006. Purification and identification of different lipases contained in PPL commercial extracts: A minor contaminant is the main responsible of most esterase activity. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 817–823.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627–662.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 40, 321–326.
- Valero, F., Del Rio, J.L., Poch, M., Sola, C., 1991. Fermentation behavior of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *J. Ferment. Bioeng.* 72, 399–401.
- Von Tigerstrom, R.G., Stelmaschuk, S., 1989. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Can. J. Microbiol.* 35, 511–514.
- Xin, J.Y., Xiao-Xue Hu, Y.X., Cui, J.R., Li, S.B., Xia, C.G., Zhu, L.M., 2002. Fine separation and characterization of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *J. Basic Microbiol.* 42, 355–363.

Yarrow, D., 1998. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds), *The Yeasts*. Amsterdam: Elsevier Science, pp.77–100.

Yu, M., Qin, S., Tan, T., 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 42, 384–391.

PARTE II

Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A) lipase by adsorption in a packed bed reactor by response surface methodology

Artigo submetido, em Abril de 2009, para o periódico *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*

Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A) lipase by adsorption in a packed bed reactor by response surface methodology

Roberta Bussamara ^a, Luciane Dall'Agnol ^a, Augusto Schrank ^b, Kátia Flávia Fernandes ^c, Marilene Henning Vainstein ^{a, *}

^a *Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil*

^c *Departamento de Química de Proteínas, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brasil*

^b *Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil*

*Corresponding author. Marilene Henning Vainstein

Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43421 – Campus do Vale/UFRGS,

CxP 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS – Brasil

Tel.: +55-51-3308-7767; 33086086; 33086087; fax: +55-51-3308-7309

E-mail address: mhv@cbiot.ufrgs.br

Homepage: www.ufrgs.br/cbiot

Abstract

This study aimed to develop an optimal continuous process for lipase immobilization in a packed-bed reactor to investigate the possibility of large-scale production further. An extracellular lipase of a *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A) was immobilized by adsorption onto a polystyrene-divinylbenzene support. Immobilization conditions were optimized and properties of the free and immobilized enzyme were compared. Lipase activity was measured with *p*-nitrophenilpalmitate as substrate. Response surface methodology (RSM) was employed to evaluate the effects of immobilization conditions and optimum temperature and pH activity for free and immobilized enzyme. The optimal immobilization conditions observed were: immobilization time 2 h and 29 min, immobilization pH 4.76, and enzyme/support ratio of 1282 U/g-support. The optimal activity temperature for free and immobilized enzyme was found to be 68 °C and 52 °C, respectively. Optimum pH for free and immobilized lipase activity was observed at pH 4.6 and 6.0, respectively. Lipase immobilization resulted in improved enzyme activity and stability at high temperatures, acidic and neutral pH, in the presence of non-ionic detergents and high concentrations of organic solvents as 2-propanol, methanol and acetone. Furthermore, the reuse and storage of immobilized enzyme was also studied.

Keywords: lipase, immobilization, *Pseudozyma hubeiensis*, packed bed reactor, biocatalysts, response surface methodology.

1. Introduction

Compared with conventional chemical catalysts, enzymes as biocatalysts exhibit a number of features that make their use advantageous. The specific characteristics presented by enzymes are high level of catalytic efficiency with low temperature and pressure and high degree of specificities including substrate specificity, regio-specificity and stereo-specificity. For example, a conventional process for fat and oil hydrolysis using NaOH as catalyst requires high pressure and temperature to achieve a high conversion (97–98%). In contrast, the fat and oil hydrolysis with enzymes like lipases can be carried out efficiently at normal temperature and pressure furthermore, the quantity of wastewater decreases significantly. These properties enable a series of biotransformation reactions which yield a wide range of useful biological and chemical compounds for pharmaceutical, food and agrochemical derivatives (Ye *et al.*, 2007; Yujun *et al.*, 2008).

Lipases (triacylglycerol hydrolase; EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of triglycerides to glycerol and fatty acids, as well as a variety of reactions in nonaqueous medium (e.g., transesterification, esterification, interesterification and alcoholysis). Lipases play an important role in biotechnological applications, due to their extreme versatility with respect to substrate specificity and stereoselectivity (Abrol *et al.*, 2007). Versatility of lipase leads to multiple industrial applications in foods, flavors, pharmaceuticals, detergent formulation, oil/fat degradation, cosmetics and environmental remediation (Chang *et al.*, 2008).

However, soluble enzymes usually exhibit lower stability and often can not be recovered and reused. This severely lowers their feasibility in practical uses. Thus, for industrial applications, lipases immobilized on solid support offer such

economic incentives as enhanced thermal and operational stabilities, ease of handling, enzyme stabilization, prevention of aggregation and autolysis. These properties allow recoverability and reuse (Mateo *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Liu and Chang, 2008; Pahujani *et al.*, 2008; Yujun *et al.*, 2008).

By an appropriate choice of the immobilization process, operational costs of industrial processes involving lipase can be significantly reduced (Chang *et al.*, 2008). An immobilization process involving hydrophobic binding of lipases by adsorption has proved successful due to the enzyme affinity for water/oil interfaces (Deng *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2008). This immobilization is assumed to involve the large hydrophobic area that surrounds the lipase active site adsorbing on hydrophobic solid surfaces. Thus, lipases recognize these surfaces similarly to those of their natural substrates, and they suffer interfacial activation during immobilization (Deng *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009; Dizge *et al.*, 2008). Advantages for this immobilization method consist of simplicity and low cost operation, high activation of lipases upon immobilization, the possibility to associate the immobilization with the purification of lipases; a strong but reversible immobilization that enable recovery of supports after inactivation and low activity loss of the adsorbed enzymes in an organic environment (Deng *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009).

Immobilization of lipases can be achieved either by batch or continuous reactors. Packed-bed reactors have currently received a lot of attention over batch reactors because of speed and ease of operation, low investment and reduced loss of support in the process (Ciftci *et al.*, 2009).

Therefore, the main objective of this work was to develop an optimal continuous process for lipase immobilization and to characterize the immobilized lipase comparing to free lipase from *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A). For immobilization, relationships among the variables (immobilization time, immobilization pH, and enzyme/support ratio) and the response (immobilized lipase activity) were analyzed by response surface methodology (RSM) and factorial experimental design.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A commercially available polystyrene divinylbenzene support (DIAION) was obtained from Sigma. The *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) was purchased from Sigma and used as received. All other chemicals were of analytical grade.

The lipase-producing yeast *P. hubeiensis* (strain HB85A) was originally isolated from the phylloplane of *Hibiscus rosa-sinensis* (Farroupilha Park, Porto Alegre, RS, Brazil). In our previous work this strain was phenotypically characterized by standard morphological and physiological tests and the identification was confirmed by sequencing of the D1/D2 region of the 26 S rDNA (GenBank access number DQ 123912) (Bussamara *et al.*, 2010). The enzyme was produced in a batch culture of *P. hubeiensis* (strain HB85A) that was carried out in a 14 L New Brunswick MF 14 Bioreactor with 10 L basal medium (glucose 2.0 g/L, peptone 5.0 g/L, MgSO₄ 0.1 g/L and K₂HPO₄ 1.0 g/L) and 20 g/L of soy oil as enzyme inducer. Cells were removed by centrifugation at 14.000 rpm for 10 min and the culture supernatant was used for enzyme source. Also in this previous

study, it was detected at the culture supernatant 1200 U/L of lipase at pH 8.0; 25 mg of total protein /L and absence of protease (Bussamara *et al.*, 2010).

2.2. Immobilization of lipase by adsorption in a packed-bed reactor

Lipase was immobilized onto the polystyrene divinylbenzene support (matrix: estireno divinilbenzeno, particles size: 250 – 850 μm , pore volume: 1,30 mL/g, pore size: 260 A°) by adsorption.

The polystyrene divinylbenzene support was packed into a glass column (\emptyset 2.5 cm \times 20 cm). In the packed reactor system, a peristaltic pump was used to recycle the solutions used at a flow rate of 2 mL/min. The support was pre-treated in cycles of 15 minutes with distilled water and buffer solutions of pH ranging 1.0 to 9.0 (1 M HCl; 0.05 M citrate-phosphate buffer pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0; 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.0 and 9.0). Afterwards, free lipase (1 – 1999 U/g of support) was added at the column and cycles of 1 min. to 5 hours at 25 $^\circ\text{C}$ were done to lipase immobilization (Table 1). Free lipase was then drained out from the column and the support was washed three times with 2.5 mL of buffer solutions per g of support at studied pH values.

Table 1

Coded levels and real values (in parentheses) for the first factorial design (20 trials) and immobilized lipase activity.

Run	pH	t (h)	SE* (U/g-support)	IE* (U/g-support)
1	-1 (3)	-1 (1)	-1 (405)	2
2	+1 (7)	-1 (1)	-1 (405)	5
3	-1 (3)	+1 (4)	-1 (405)	24
4	+1 (7)	+1 (4)	-1 (405)	6
5	-1 (3)	-1 (1)	+1 (1600)	27
6	+1 (7)	-1 (1)	+1 (1600)	30
7	-1 (3)	+1 (4)	+1 (1600)	153
8	+1 (7)	+1 (4)	+1 (1600)	32
9	-1.68 (1)	0 (2.5)	0 (1000)	1
10	+1.68 (9)	0 (2.5)	0 (1000)	1
11	0 (5)	-1.68 (1 min)	0 (1000)	179
12	0 (5)	+1.68 (5)	0 (1000)	101
13	0 (5)	0 (2.5)	-1.68 (1)	1
14	0 (5)	0 (2.5)	+1.68 (1999)	163
15	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	168
16	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	165
17	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	173
18	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	166
19	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	167
20	0 (5)	0 (2.5)	0 (1000)	171

* SE: soluble enzyme and IE: immobilized enzyme

2.3. Lipase activity spectrophotometric assay

The assay was performed by measuring the increase in absorbance at 410 nm in a visible spectrophotometer (Ultrospec 2000) caused by the release of *p*-nitrophenol after hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) at 37 °C for 30 min, with reference to an enzyme free control. To initiate the reaction, 0.1 mL of the cell-free culture supernatant or 100 mg of the support containing the immobilized lipase was added to 0.9 mL of substrate solution containing 3 mg of *p*NPP dissolved in 1 mL iso-propanol and 9 mL of the following solution: buffer solution plus 40 mg of Triton X-100 and 10 mg of arabic gum (Winkler & Stuckmann, 1979; Maia *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). For immobilized enzyme, after its precipitation, the supernatant was measured at 410 nm. One unit of lipase (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol *p*-nitrophenol per h, in the assay conditions described above. The calibration curve was prepared using *p*-nitrophenol as standard (100 μ mol/mL).

2.4. Free and immobilized lipase characterization

Lipase characterization was performed using the supernatant containing the free enzyme and the immobilized lipase. Conditions for lipase activity evaluation were the same as described above (section 2.3.), unless stated otherwise.

2.4.1. Effect of temperature and pH on lipase activity

Optimal temperature and pH for free and immobilized lipase activity was determined by fractional design using *p*NPP as substrate (section 2.3.) in buffer solutions of pH ranging 3.0 to 9.0 (0.05 M citrate-phosphate pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0

and 7.0; 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 and 9.0) at different temperatures (30 -70 °C) (Table 2).

Table 2

Coded levels and real values (in parentheses) for the second (12 trials) and third (13 trials) factorial design and free and immobilized lipase activity.

Run	pH	T	SE (U/mL supernatant)	IE (U/g-support)
1	-1 (4)	-1 (36)	28	9
2	+1 (8)	-1 (36)	20	11
3	-1 (4)	+1 (64)	128	12
4	+1 (8)	+1 (64)	13	13
5	-1.41 (3)	0 (50)	79	12
6	+1.41 (9)	0 (50)	0	35
7	0 (6)	-1.41 (30)	37	9
8	0 (6)	+1.41 (70)	145	51
9	0 (6)	0 (50)	119	74
10	0 (6)	0 (50)	122	62
11	0 (6)	0 (50)	119	74
12	0 (6)	0 (50)	123	69
13	0 (6)	0 (50)	-	69

* SE: soluble enzyme and IE: immobilized enzyme

2.4.2. Effect of temperature and pH on lipase stability

The lipase temperature stability was determined by incubating 100 μL of the culture supernatants or 100 mg of immobilized lipase for 1 h and 2 h at 30, 40, 50, 60 and 70 $^{\circ}\text{C}$ in the absence of substrate. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay (section 2.3.) using 68 $^{\circ}\text{C}$ and pH 4.6 for free lipase and 52 $^{\circ}\text{C}$ and pH 6.0 for immobilized lipase.

The lipase pH stability was determined by incubating 2 μL of the culture supernatants or 2 mg of immobilized lipase with 98 μL or 100 μL , respectively of buffer solutions pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 for 1 h and 2 h at 50 $^{\circ}\text{C}$ in the absence of substrate. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay (section 2.3.) using 68 $^{\circ}\text{C}$ and pH 4.6 for free lipase and 52 $^{\circ}\text{C}$ and pH 6.0 for immobilized lipase.

2.4.3. Effect of detergents and diverse chemicals on lipase activity

Culture supernatants (2 μL) diluted in 98 μL of 0.05 M citrate-phosphate pH 5.0 or immobilized enzyme (2 mg) diluted in 100 μL of 0.05 M citrate-phosphate pH 7.0 were incubated for 1 h at 50 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of 1 % (v/v) of the detergents (Triton X-100, Tween 80, Tween 20 and SDS) and 5 mM of BaCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , KCl and EDTA. For control, 0.1 mL of culture supernatant was incubated with buffer solution without chemicals for 1 h at 50 $^{\circ}\text{C}$. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay (item 2.3.) using 68 $^{\circ}\text{C}$ and pH 4.6 for free lipase and 52 $^{\circ}\text{C}$ and pH 6.0 for immobilized lipase.

2.4.4. Lipase stability in organic solvents

Culture supernatants or immobilized enzyme were incubated in 50 μL of acetone, methanol, ethanol, 2-propanol and butanol at different concentrations (20, 50 and 80 % v/v) for 1 h at 50 °C. For control 0.1 mL of culture supernatant was incubated with buffer solution without organic solvents for 1 h at 50 °C. Residual activity was measured by the spectrophotometric assay (item 2.3) using 68 °C and pH 4.6 for free lipase and 52 °C and pH 6.0 for immobilized lipase.

2.4.5. Repeated use of the immobilized lipase

The lipase reuse was tested by repeated batch experiments using the activity determination (section 2.3.) at 52 °C and pH 6.0. The relationship between operating time and the decrease in the enzyme activity was determined. The initial activity of freshly prepared immobilized lipase in the first operation was defined as 100% activity.

2.4.6. Storage stability

Free and immobilized enzyme was stored at 4 °C. Enzyme stability was tested over 40 days by determining residual activity (section 2.3.) using 68 °C and pH 4.6 for free lipase and 52 °C and pH 6.0 for immobilized lipase.

2.5. Factorial design and statistical analysis

Three factorial designs were performed. Firstly a 2^3 factorial design examined the effects of immobilization time (t), immobilization pH (pH) and enzyme/support ratio (SE). The immobilized lipase activity per g-support (IE) was studied as a response. Additionally, two 2^2 factorial designs were employed, in

which the optimal pH (pH) and temperature (T) of free lipase (SE) and immobilized lipase (IE) activity were studied. The independent variables and their levels are presented in Tables 1 (first factorial design) and 2 (second and third factorial designs).

In the first experimental design, 20 experimental runs were carried out, which included 14 factorial points and 6 central points. The distance of the axial points was ± 1.68 , calculated from equation (1) (Khuri and Cornell, 1987).

Equation 1: $\alpha = (2^n)^{1/4}$

Where α is the distance of the axial points and n is the number of independent variables.

In the second experimental design, 12 experimental runs were carried out, which included 8 factorial points and 4 central points. In the third experimental design, 13 experimental runs were carried out, which included 8 factorial points and 5 central points. The distance of the axial points was ± 1.41 , calculated from equation (1) (Khuri and Cornell, 1987).

All data were treated with the software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 3rd Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

Free and immobilized lipase characterization experiments were conducted in duplicate and statistical analysis was performed by SPSS 13.0 software. Analysis of variance was carried out using the ANOVA procedure by the Turkey multiple comparison procedure to determine significant differences between the means.

3. Results and discussion

The application of lipase for transesterification reactions in organic media or in solvent-free systems has increased significantly in the last decade. For the design of suitable reactors, process optimization and the determination of effects of changes in operating conditions are essential (Chang *et al.*, 2007). Packed bed reactors provide the best continuous way to minimize labor, overhead costs and to further process control to conform all commercial industrial demands (Chang *et al.*, 2007).

3.1. Immobilization of lipase by adsorption in a packed-bed reactor model fitting

Lipases show two different conformations. The closed form, considered inactive, where the active site is isolated from the reaction medium by a polypeptide chain called lid, and the open form, where this lid is displaced and the active site is fully exposed to the reaction medium (Deng *et al.*, 2004). Both forms of lipases are in an equilibrium affected by experimental and media conditions. In the presence of hydrophobic drops of substrate, lipases may become strongly adsorbed on the interface of these drops and the conformational equilibrium is shifted towards the open form of the lipases. From these features, a strategy to immobilize lipase with an improved activity has been chosen, the goal being “to fix” the open form of the lipase.

The immobilization process is best optimized before scaling-up in order to save work, money and time. Compared with one-factor design, which has been adopted most often in the literature, RSM employed in this study was more efficient in reducing the experimental runs and time for investigating the optimized conditions of lipase immobilization.

Therefore, the variables selected in this study were immobilization time (1 min to 5 h), immobilization pH (1.0 to 9.0) and enzyme/support ratio (1 to 1999 U/g-support).

Model fitting was accomplished for the first three factorial design (Table 1). The independent and dependent variables were fitted to the second-order model equation and examined in terms of the goodness of fit. The ANOVA were used to evaluate the adequacy of the fitted model. The R-squared value provided a measure of the variability in the observed response values that could be explained by the experimental factors and their interactions. A good model ($R > 0.9$) explains most of the variation in the response (Burkert *et al.*, 2004). As R-squared approaches 1.00, the stronger the model and the better the response predictions (Haaland, 1989). On the basis of the analysis of variance (ANOVA), as shown in Table 3 for immobilized lipase activity per g-support, a second order model (equation 2) was established, describing the immobilized lipase activity as a function of time, pH immobilization and enzyme/support ratio. The pure error was low, indicating good reproducibility of the experimental data. Based on the F test, the model is accepted, since its calculated F value is 3.40 times higher than the critical F value and the regression coefficient (0.88) is close to 0.9. The coded model was used to generate response surfaces (Fig. 1) for the analysis of the variable effects on lipase activity.

Table 3

ANOVA for the first factorial design for the lipase immobilization optimization.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square
Regression	98819	8	12352.38
Residual	13532	11	1230.18
Lack of fit	13484	6	2247.38
Pure error	47.7	5	9.6
Total	112351.0	19	-

Regression coefficient: $R = 0.88$; $F_{0.95;8;11} = 2.95$; $F_{0.95;6;5} = 10.04$.

Equation 2 : Immobilized lipase activity (U/g-support) = $169 - (11.06 \text{ pH}) - (65.88 \text{ pH}^2) - (16.66 \text{ t}^2) + (33.7 \text{ ES}) - (37.14 \text{ ES}^2) - (15.94 \text{ pH} \times \text{t}) - (19.59 \text{ pH} \times \text{ES}) + (15.37 \text{ t} \times \text{ES})$

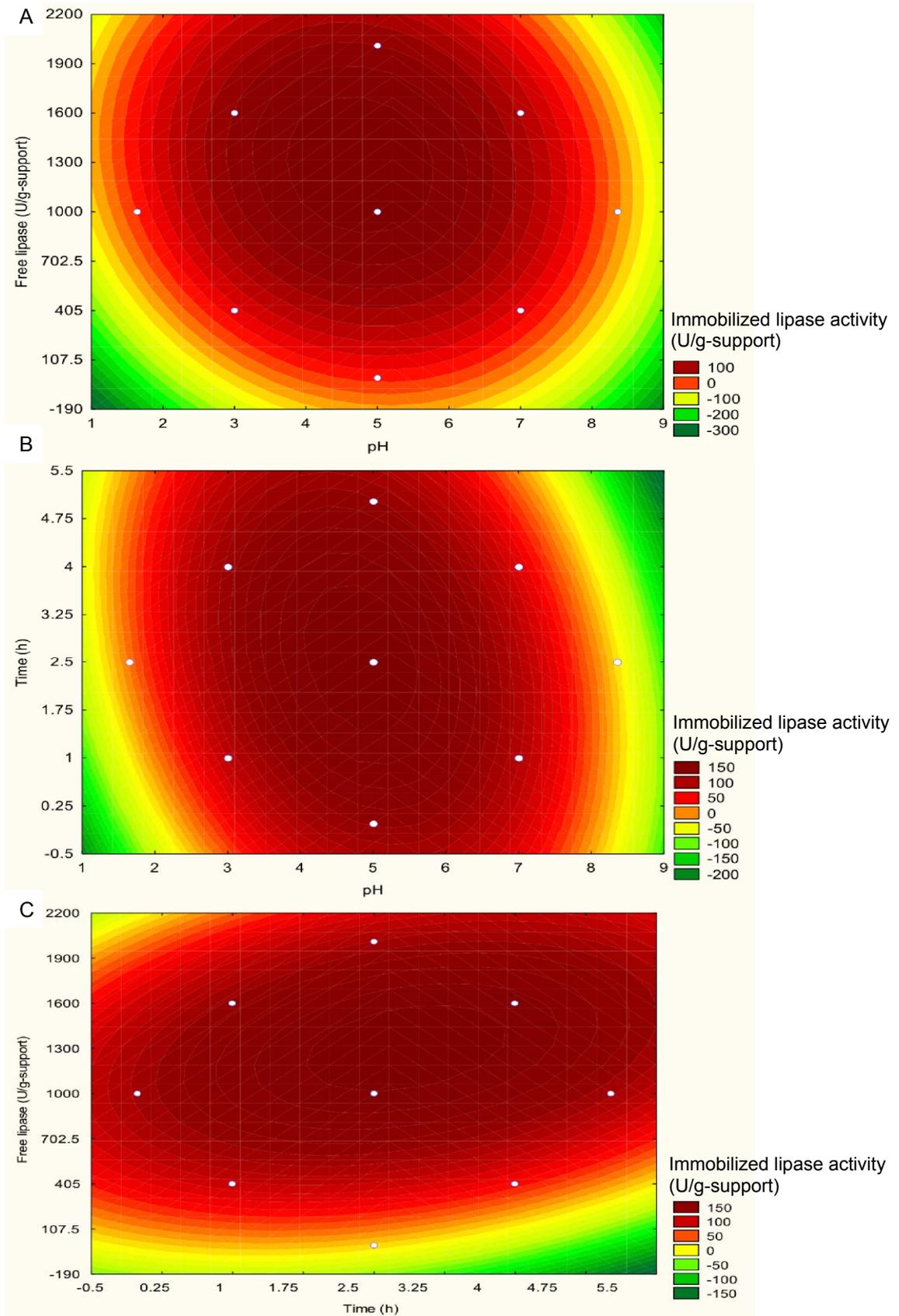


Fig 1. (A) Contour diagrams for immobilized lipase activity as a function of pH and enzyme/support ratio, (B) Contour diagrams for immobilized lipase

activity as a function of pH and time, (C) Contour diagrams for immobilized lipase activity as a function of enzyme/support ratio and time according to the first experimental design. The support was pre-treated in cycles of 15 min. with distilled water and buffer solutions of pH ranging 1.0 to 9.0. Afterwards, free lipase (1 – 1999 U/g of support) was added at the column and cycles of 1 min to 5 h at 25 °C were done to immobilize the lipase. Free lipase was then drained out from the column and the support was washed three times with 2.5 mL of buffer solutions per g of support at studied pH values.

Fig. 1 indicates a higher bound lipase activity was achieved at pH range 4.0 to 6.0, immobilization times from 1 to 4 h and a enzyme/support ratio of 1000 to 1600 U/g-support. The interaction effects of each factor, was significant (equation 2). The optimal of every variable was obtained by equation 2 differential approximation. The maximal immobilized lipase activity was calculated as 177.5 U/g-support at pH 4.76 with an enzyme/support ratio of 1282 U/g-support over 2 h and 29 min of immobilization.

The validity of the predicted model was examined by doing experiments at the suggested optimal activity conditions. The predicted value for immobilized lipase activity was 177.5 U/g-support and the actual value was 143 U/g-support. In comparison with the results, our model is valid since the observed value is 80 % of the predicted value.

The effect of the enzyme/support ratio on immobilization efficiency is shown in Fig. 1 A and C. The lipase activity significantly increased when enzyme/support ratio was increased, reaching 1600 U/g-support. It's possible that at low enzyme loading, the lipase molecules may to maximize the contact with the surface, which

may result in a loss of conformation and, consequently in reduced activities. However, loading greater than 1600 U/g-support, may have lead to multilayer adsorption effectively inhibiting access to the enzyme active sites (Ghamgui *et al.*, 2007). The same effect was observed in the *Rhizopus oryzae* lipase immobilization by adsorption onto CaCO₃ (Ghamgui *et al.*, 2007).

The optimal immobilization time, 1 to 4 h, was also reported with lipase immobilized by other methods (Jiang *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007b). Similar to our work, Chang *et al.* (2007b) observed that adsorption was limited when the immobilization time was short.

In our study, pH influenced lipase immobilization with decreased enzyme loading at both lower and higher pH values (Fig. 1 A and B). This effect is likely due to altered enzyme conformation, which is vital for the enzymatic activity. Enzymes have no net charge at their isoelectric points, and therefore the maximal adsorption from aqueous solutions is usually observed at their isoelectric points (Secundo *et al.*, 2008). Possibly the *P. hubeiensis* lipase may exhibit net negative charge at pH 7.0, thus at increasingly acid pH values the adsorbed amount of lipases increases. The optimal pH for lipase absorption can change with each kind of support. Ye *et al.* (2007) immobilized lipase on chitosan support by adsorption and the maximum activity was obtained with the immobilized enzyme prepared at pH 7.5.

The operational flexibility observed in the immobilization of lipase in a packed-bed reactor showed that this process is a good choice for industrial application.

3.2. Effect of temperature and pH on lipase activity

Optimal conditions for maximum enzyme activity differ for free and immobilized enzymes depending on the type of the support, method of activation, method of immobilization, etc. (Tumturk *et al.*, 2007).

On the basis of the analysis of variance (ANOVA), as shown in Table 4 and 5 for lipase activity, a second order model (equation 3) for free lipase and (equation 4) for immobilized lipase was established, describing the enzyme activity as a function of pH and temperature. The pure error was low, indicating good reproducibility. Based on the F test, the model for free lipase is predictive, since its calculated F value is 7.59 times higher than the critical F value and the regression coefficient (0.97) is close to unity. The coded model was used to generate response surfaces (Fig. 2) for the analysis of the variable effects on lipase activity. For immobilized lipase, based on the F test, the model is accepted, since its calculated F value is 7.55 times higher than the critical F value and the regression coefficient (0.88) is close to 0.9. The coded model was used to generate response surfaces (Fig. 3) for the analysis of the variable effects on lipase activity.

Table 4

ANOVA for the second factorial design for free lipase characterization.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square
Regression	31199	5	6239.7
Residual	1124.2	6	187.4
Lack of fit	1112.00	3	370.7
Pure error	12.2	3	4.1
Total	32322.88	11	-

Regression coefficient: $R = 0.97$; $F_{0.95;5,6} = 4.39$; $F_{0.95,3,3} = 33.3$.

Equation 3: Free lipase activity (U/mL supernatant) = $120.9 - (29.35 \text{ pH}) - (45.48 \text{ pH}^2) + (30.9 \text{ T}) - (19.54 \text{ T}^2) - (26.64 \text{ pH xT})$.

Table 5

ANOVA for the third factorial design for immobilized lipase characterization.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square
Regression	8258	3	2752.7
Residual	1025.0	9	113.9
Lack of fit	925.9	5	185.2
Pure error	99.1	4	24.8
Total	9283.1	12	-

Regression coefficient: $R = 0.88$; $F_{0.95;3,9} = 3.2$; $F_{0.95,5,4} = 24.17$.

Equation 4: Immobilized lipase activity (U/g-support) = $69.71 - (26.57 \text{ pH}^2) + (8.79 \text{ T}) - (23.27 \text{ T}^2)$

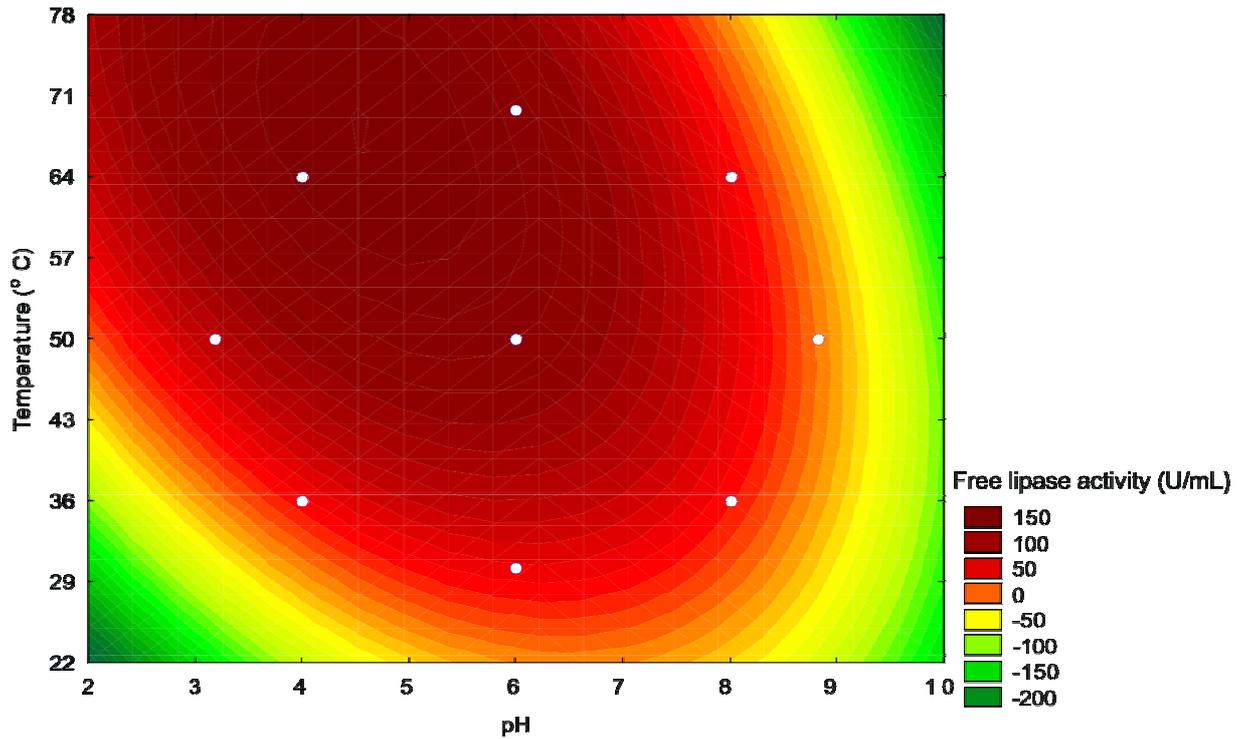


Fig 2. Contour diagrams for free lipase activity as a function of pH and temperature according to the second experimental design. Optimal temperature and pH for free lipase activity was determined by fractional design using pNPP as substrate (section 2.3.) in buffer solutions of pH ranging 3.0 to 9.0 at different temperatures (30 -70 °C)

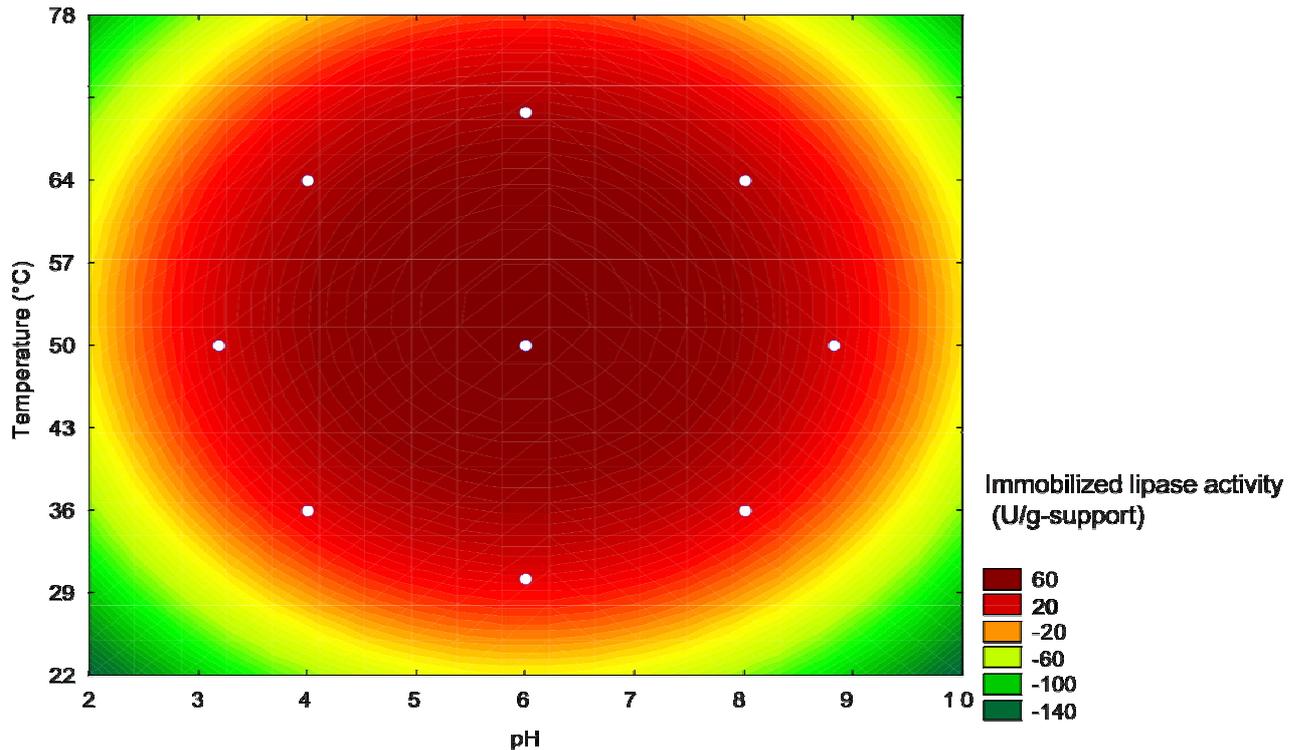


Fig 3. Contour diagrams for immobilized lipase activity as a function of pH and temperature according to the third experimental design. Optimal temperature and pH for immobilized lipase activity was determined by fractional design using *p*NPP as substrate (section 2.3.) in buffer solutions of pH ranging 3.0 to 9.0 at different temperatures (30 -70 °C)

The *P. hubeiensis* (strain HB85A) lipase in the supernatant showed higher activity from pH 3.0 to 6.0 and temperature from 50 to 78 °C. The optimal condition derived from every variable was obtained by differential approximation (equation 3 for free lipase and equation 4 for immobilized lipase). Maximal free lipase activity obtained was 151 U/mL at pH 4.6 and 68 °C. We observed interaction effects between pH and temperature on free lipase activity (equation 3).

The immobilized lipase showed higher activity at pH 4.0 to 8.0 and 36 to 70 °C. Maximal immobilized lipase activity was 71 U/g-support at pH 6.0 and 52 °C

(Fig. 3). Interaction effects between pH and temperature on immobilized lipase activity was not significant (equation 4).

Comparing the temperature effect on the activity of free and immobilized lipases it was found that the optimal temperature for the free lipase (68 °C) was highest than the immobilized one (52 °C). It can be probably due to the fact that three-dimensional structure of the enzymes may be affected upon immobilization procedure and thus the optimum activity parameters (pH and temperature) of both immobilized and free form may be different.

Though the maximal activity for immobilized lipase was lower than the free enzyme our results suggest that both enzyme forms have industrial applications under high temperature conditions. Different from our results, Deng *et al.* (2004) observed a optimal temperature for free lipase activity at 35 °C and 40, 43 and 45 °C for the enzyme immobilized on 8-PAP-modified, 12- PAP-modified, and 18-PAP-modified Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers, respectively. However, Tumturk *et al.* (2007) found the same optimal temperature for free and entrapped lipase, probably because this immobilization process was a physical confinement of enzymes within micro spaces formed in the matrix structures and in this method, enzymes do not chemically bond to polymeric matrices.

Related to pH effects on the activity of both free and immobilized *P. hubeiensis* lipase, neutral pH and also acidic pH showed good activity values. The pH range of immobilized lipase was slightly higher than free lipase and the pH for maximal activity increased from 4.6 (free lipase) to 6.0 (immobilized lipase). Thus, we suggest that the immobilized enzyme can be used in industrial processes with neutral pH and free lipase could be used in acidic applications. An increase in

optimal pH after lipase immobilization was also observed for *Candida rugosa* lipase after adsorption on polypropylene hollow fiber membrane (optimal free lipase pH 7.7 and 8.5 for immobilized lipase) (Abrol et al., 2007). Deng et al. (2004) found an optimal pH of 7.7 for free lipase and immobilized lipase optimal pH values of 8.3, 8.7, and 8.5 for 8-PAP-modified, 12-PAP-modified, and 18-PAP-modified Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers, respectively. These results may be attributed to the stabilization of lipase resulting from its attachment to the support surface, which limited the transition of enzyme conformation against the change of pH (Yong et al., 2008). On the other hand, Ye et al. (2007) immobilized a lipase from *Candida rugosa* by adsorption on a chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface, whereas maximal activity of free lipase was at pH 7.7 and immobilized enzyme was at pH 6.5.

The validity of the predicted model for free and immobilized lipase was examined by experiments at the suggested optimal conditions. The predicted value for free lipase was 151 U/mL and the actual value was 130 U/mL. For immobilized lipase the predicted value was 71 U/g-support, and the actual was 65 U/g-support. In comparison with the results in both cases, our model can be accepted since the actual value is less than 20 % different from the predicted one.

Previously, we studied the effect of temperature and pH on free lipase activity varying one parameter while keeping the other constant. The optimal pH and temperature obtained were pH 7.0 (60 U/mL) and 50 °C (45.3 U/mL), instead of pH 4.6 and 68 °C (130 U/mL) from this work. As can be seen, with factorial design the maximal lipase activity increased 216 % compared to the one-way analysis

(Bussamara *et al.*, 2010). The disadvantage of a single variable optimization is because it does not reflect the interactions among variables.

3.3. Lipase stability

The stability of bound enzyme, of great importance for commercial applications, depends on the strength of the non-covalent bonds formed between the clay support and the amino acid residues on the interacting surface of the protein.

3.3.1. Effect of temperature and pH on lipase stability

The thermal stability of the free and immobilized lipase from *P. hubeiensis* strain HB85A was tested by incubation over a range of temperatures for 1 h and 2 h (Table 6). The free lipase showed a good thermal stability during incubation for up to 2 h at 30 °C, 40 °C, 50 °C and 60 °C. Only at 70 °C, it was observed a decrease in the residual activity (Table 6). Comparing to the free enzyme, the immobilized lipase presented better thermal stability at range from 30 °C to 60 °C (Table 6). There was a slight decrease in the residual activity values at 1 h at 30 °C, 50 °C, 60 °C and 70 °C followed by an increase in the residual activity at 2 h (Table 6). Thus, the immobilized lipase was more stable than the soluble enzyme at all temperatures. This can be explained probably by a lipase multilayer dissolution increasing the effectively access to the immobilized enzyme active site (Ghamgui *et al.*, 2007). Also the interaction of lipase with the support may stabilize the conformation of enzyme and improves the resistance of protein to thermal denaturation (Ozturk *et al.*, 2007; Karra-Châabouni *et al.*, 2008).

However, Tümtürk et al. (2007) obtained lower thermal stability of immobilized lipase, whether the enzyme was immobilized by entrapment (23 % relative activity) or by covalent bound (29 % relative activity), after incubation for 25 min at 45 °C.

Our results demonstrate that both free and immobilized lipases are particularly stable at high temperatures. Since optimal temperature for free and immobilized lipase were 68 and 52 °C, respectively, and since both showed better thermo stability at 50 °C, we chose this temperature (50 °C) to characterized both free and immobilized lipase with respect to other properties.

Table 6

Temperature stability of the free and immobilized lipase ^{*}.

Temperature	Time	Residual activity (%) ^{***}	
		Free lipase	Immobilized lipase
Control ^{**}		100 ^{d,e,f}	100 ^{d,e,f}
30 °C	1 h	63 ± 0.53 ^{h,i,j,k}	90 ± 11.5 ^{e,f,g}
30 °C	2 h	50 ± 8.24 ^k	102 ± 15.1 ^{d,e}
40 °C	1 h	61 ± 10.65 ^{i,j,k}	168 ± 8.7 ^b
40 °C	2 h	51 ± 2.35 ^{j,k}	91 ± 9.0 ^{e,f,g}
50 °C	1 h	74 ± 7.9 ^{g,h,i,j,k}	99 ± 9.1 ^{d,e,f,g}
50 °C	2 h	85 ± 0 ^{e,f,g,h,i}	227 ± 0 ^a
60 °C	1 h	63 ± 5.09 ^{h,i,j,k}	61 ± 7.3 ^{i,j,k}
60 °C	2 h	87 ± 5.23 ^{e,f,g,h}	143 ± 0 ^{b,c}
70 °C	1 h	54 ± 2.44 ^{j,k}	75 ± 10.4 ^{f,g,h,i,j}
70 °C	2 h	53 ± 0 ^{j,k}	123 ± 3.7 ^{c,d}

^{*} The free and immobilized enzyme were incubated at different temperatures for 1 h and 2 h.

^{**} Control: culture supernatant and immobilized lipase without incubation

^{***} Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

The stability of free and immobilized *P. hubeiensis* HB85A lipase was investigated over the pH range from 3.0 to 9.0 in the absence of substrate (Table 7). After 1 or 2 h at 50 °C residual activity was measured at 68 °C and pH 4.6 for

crude lipase and at 52°C and pH 6.0 for immobilized lipase. Both free and immobilized lipases were stable over almost the whole pH range. Immobilization resulted in stable enzyme and the immobilized enzyme was more stable in pH in comparison to free enzyme. This could be due to the direct interaction between lipases and the supports used which allows lipase to obtain suitable conformation that facilitates hydrolysis of *p*NPP or the enzyme undergo interfacial activation during immobilization and the active site was fully exposed to the reaction medium.

Most lipases reported in the literature were observed to have improved stability only over specific pH ranges. Pahujani et al. (2008) observed that nylon-6 immobilized lipase was fairly stable within a pH range of 7.5–9.5 and the free enzyme was stable within a pH range of 8.0–10.5. Vaidya et al. (2008) showed that lipase from *Candida rugosa* immobilized in a macro porous polymer improved the stability appreciably so at alkaline pHs. Different from results of others, ours demonstrate that immobilization improved lipase stability over almost all pHs tested.

Besides the immobilized lipase presented a high increment on residual activity at pH 8.0 and 9.0 at 1 h (192 % and 387 %, respectively) and 2 h incubation (143 % and 97 %, respectively), the absolute activity value (62 U/g-support for 1 h, pH 8.0, 47 U/g-support for 2 h, pH 8.0, 73 U/g-support for 1 h, pH 9.0 and 18 U/g-support for 2 h, pH 9.0) continue below comparing the activity value of others pHs. The pH 7.0 also showed a good increase on the residual activity at 1h and 2 h incubation (171 % and 150 %, respectively) and also a good activity value (274 U/g-support for 1 h and 240 U/g-support for 2h incubation) and because of it pH 7.0 was chosen for immobilized lipase characterization. For free

lipase, besides it was observed at pH 7.0 an enhance on the relative activity at 1 h and 2 h (115 % and 117 %, respectively), the absolute activity value (10.63 U/mL and 10.84 U/mL, respectively) continue below comparing pHs 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0. Therefore, pH 5.0 was used for free lipase characterization because it also presented a high residual activity (102 % and 83 %, respectively) and a high absolute activity value (137 U/mL and 112 U/mL, respectively) at 1 h and 2 h.

Table 7

pH stability of the free and immobilized lipase *

pH	Time	Residual activity (%) ***	
		Free lipase	Immobilized lipase
Control **		100 ^{g,h,i}	100 ^{g,h,i}
3.0	1 h	189 ± 8.5 ^d	39 ± 2.7 ^{m,n}
3.0	2 h	155 ± 0 ^e	100 ± 6.0 ^{g,h,i}
4.0	1 h	63 ± 7.7 ^{k,l,m}	79 ± 2.6 ^{h,i,j,k}
4.0	2 h	52 ± 9.2 ^{l,m,n}	69 ± 13.1 ^{j,k,l,m}
5.0	1 h	102 ± 7.2 ^{g,h,i}	310 ± 8.1 ^b
5.0	2 h	83 ± 2.1 ^{h,i,j,k,l}	239 ± 10.1 ^c
6.0	1 h	93 ± 3.2 ^{g,h,i,j,k}	106 ± 8.8 ^{g,h}
6.0	2 h	70 ± 11.6 ^{ij,k,l,m}	97 ± 10.8 ^{g,h,i,j}
7.0	1 h	115 ± 0 ^{f,g}	171 ± 3.2 ^{d,e}
7.0	2 h	117 ± 13.7 ^{f,g}	150 ± 0.1 ^e
8.0	1 h	79 ± 8.8 ^{h,i,j,k,l}	192 ± 7.9 ^d
8.0	2 h	99 ± 9.2 ^{g,h,i,j}	143 ± 5.9 ^{e,f}
9.0	1 h	25 ± 12.3 ⁿ	386 ± 7.3 ^a
9.0	2 h	39 ± 10.9 ^{m,n}	97 ± 7.4 ^{g,h,i,j}

* The free and immobilized enzyme were incubated at different buffer solutions for 1 h and 2 h at 50 °C.

** Each pH study had a different control. Control: culture supernatant and immobilized lipase with respective buffer solution analysed without incubation.

*** Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

3.3.2. Effect of diverse chemicals and detergents on lipase activity

The effect of cations on the activity of the lipase is shown in Table 8. Immobilized lipase activity showed better stability at the presence of 5 mM Mg^{2+} , Ba^{2+} salts (144 % and 100 % residual activity, respectively) than the free enzyme (98 % and 7 % residual activity, respectively) after 1 h incubation at 40 °C. On the other hand, a reduction in the immobilized lipase stability compared with free lipase was detected at the presence of 5 mM of K^+ salt (37 % and 65% residual activity, respectively). Both free and immobilized lipases were not affected by 5 mM Zn^{2+} salt (85 % and 98 % residual activity, respectively) (Table 8). Lima et al. (2004) observed an enhancement in the activity of the free lipase from *P. aurantiogriseum* in the presence of 1 mM Mg^{2+} salts (113% residual activity) and a reduction in the lipolytic activity of the free enzyme in the presence of 1 mM of Ba^{2+} salts (70% residual activity).

We analyzed the effect of metal removal by EDTA chelating agent. EDTA reduced in free lipase activity by 45 % had no effect on immobilized lipase (Table 8). These results suggest that the conformation of free lipase from *P. hubeiensis* may be modulated by cations and the immobilization stabilized the active conformation thus preventing loss of activity when incubated with EDTA (Table 8). Ca^{2+} salt showed an enhanced effect on free lipase stability and a reduction of immobilized lipase activity. Calcium ion has been reported to form complexes with ionized fatty acids, changing their solubility and behaviors at interfaces (Hiol et al., 1999). Free lipase was inhibited in about 40 % by 5 mM β -mercaptoetanol while the activity of immobilized lipase was increased by about 40 % (Table 8). These responses suggest that probably has no cysteine residue included in this catalytic area because the free enzyme was low affected by β -mercaptoetanol. It should

be mentioned that lipase from *P. hubeiensis* (strain HB85A) may contain cystein residues that form an intramolecular disulfide bridge, and that, this disulfide bonds is sensitive to reduction only in the free enzyme (Karadzic *et al.*, 2006).

Detergents have been described to permit the hyperactivation of lipases, very likely by stabilizing their open forms (Cabrera *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009). In fact, detergents may be used to break the lipase–lipase homo or heterodimers formed by interaction between the open forms of two lipase molecules interfacially activating each other. In our study, both free and immobilized lipase of *P. hubeiensis* (strain HB85A) was incubated for 1 h at 50 °C in the presence of 1 % (v/v) of Triton X-100, Tween 80, Tween 20 and SDS. The non-ionic detergents Triton X-100, Tween 80 and Tween 20 stimulated free lipase activity (107 %, 103 % and 123 % residual activity, respectively) and provide relevant changes in the immobilized lipase activity (228 %, 149 % and 181 % residual activity, respectively) (Table 8). It is possible to suggest that, besides preventing aggregation of the lipase, the non-ionic detergents, stabilize the interfacial area facilitating the access of the substrate to the enzyme (Mateo *et al.*, 2007). Recently, the stabilization of the open forms of lipases adsorbed on aminated supports has been shown. Results suggested that this is a good option to get lipases exhibiting a higher catalytic activity (Mateo *et al.*, 2007). However, in our work the anionic detergent SDS acts as a strong inhibitor in the hydrolysis activity of both immobilized and free lipase. Contrary results were observed by Cabrera *et al.* (2007). They verified that the detergent triton X-100 acts as a strong inhibitor in the hydrolysis of lipase from *Thermomyces lanuginose* covalently immobilized on CNBr-activated agarose and that SDS increased the enzyme activity after incubation time.

Table 8

Effect of diverse chemicals and detergents on *P. hubeiensis* free and immobilized lipase activity.*

Substance	Concentration	Residual activity (%)***	
		Free lipase	Immobilized lipase
Control**		100	100
MgCl ₂	5 mM	98 ± 11.4 ^{c,d}	144 ± 3.6 ^b
KCl	5 mM	65 ± 8.8 ^{d,e,f}	37 ± 6.2 ^{f,g}
BaCl ₂	5 mM	7 ± 2.8 ^g	100 ± 3.8 ^c
CaCl ₂	5 mM	185 ± 11.4 ^a	58 ± 4.2 ^{e,f}
ZnSO ₄	5 mM	85 ± 4.0 ^{c,d,e}	98 ± 3.6 ^{c,d}
EDTA	5 mM	55 ± 0 ^{e,f}	103 ± 7.7 ^c
β-mercaptoethanol	5 mM	62 ± 4.4 ^{e,f}	139 ± 11.7 ^b
Triton X-100	1%	107 ± 12.4 ^d	330 ± 13.6 ^a
Tween 20	1%	123 ± 0 ^{c,d}	250 ± 3.0 ^b
Tween 80	1%	103 ± 10.3 ^d	149 ± 6.8 ^c
SDS	1%	0 ^e	0 ^e

* The free and immobilized enzyme were incubated in the presence of various compounds at 50 °C for 1h.

** Control: culture supernatant and immobilized lipase without the addition of any substance.

*** Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

3.3.3. Lipase stability in organic solvents

The use of enzymes in organic medium is of great interest as it permits to carry on esterification and transesterification reactions that are difficult to occur in presence of a high amount of water. However, it is well known that enzyme activity is strongly affected by the choice of the organic solvent which may bring about the denaturation of the enzyme thus leading to the loss of the catalytic activity (Karra-Châabouni *et al.*, 2008). In order to study tolerance of immobilized enzyme to organic solvent, the effects of various organic solvents at concentrations of 20 %, 50 % and 80 % (v/v) were examined (Table 9). The most stable high temperature (50 °C) was chosen for the treatment of the supernatant and immobilized lipase with the different solvents. Immobilized *P. hubeiensis* strain HB85 lipase showed enhanced stability on the presence of 80 % acetone, methanol and 2-propanol retained respectively about 101 %, 77 % and 102 % residual activity at 1 h incubation compared with free lipase that retained respectively only 25 %, 17 % and 33 % residual activity.

The results suggest that the support might trap and prevent the disruption of the enzyme-bound water essential to maintain the three dimensional structure of the enzyme for catalysis (Pahujani *et al.*, 2008). After immobilization minor conformational changes in enzyme structure may take place, resulting in higher stability of the immobilized enzyme (Chaubey *et al.*, 2006). Such a phenomenon had also been observed by other researchers (Karra-Châabouni *et al.*, 2008; Chaubey *et al.*, 2006) which meant that the immobilization methods preserved the enzyme activity. On the other hand, free lipase presented better stability on 80 % butanol and both showed little residual activity on 80 % ethanol (Table 9). The lipase from *B. coagulans* when immobilized on nylon-6 presented a decreased of

its lipolytic activity in the presence of methanol, ethanol and iso-butanol, a little residual activity in the presence of acetone (15.8 %) after 55 min at 30 °C (Pahujani *et al.*, 2008).

Table 9

Stability of *P. hubeiensis* free and immobilized lipase activity in organic solvents*

Organic solvent	Concentration (%)	Residual activity (%)***	
		Free lipase	Immobilized lipase
Control**		100 ^{b,c,d}	100 ^{b,c,d}
Acetone	20	91 ± 10.3 ^{b,c,d,e}	94 ± 6.3 ^{b,c,d}
	50	39 ± 12.3 ^{i,j}	102 ± 7.0 ^{a,b,c,d}
	80	25 ± 0.6 ^{j,k}	101 ± 1.5 ^{b,c,d}
Methanol	20	103 ± 13.9 ^{b,c,d,e}	169 ± 3.5 ^a
	50	42 ± 8 ^{h,i,j,k}	134 ± 5.3 ^b
	80	17 ± 2.9 ^{k,l}	77 ± 4.3 ^{d,e,f,g}
Ethanol	20	112 ± 11.6 ^{a,b}	85 ± 0.5 ^{c,d,e,f}
	50	41 ± 12.5 ^{h,i,j}	38 ± 4.3 ^{i,j}
	80	0 ^k	17 ± 11.0 ^{j,k}
2-propanol	20	78 ± 11.1 ^{c,d,e,f}	79 ± 0 ^{c,d,e,f}
	50	23 ± 6.3 ^{k,j}	110 ± 12.4 ^{a,b,c}
	80	33 ± 8.8 ^{i,j,k}	102 ± 6.4 ^{a,b,c,d}
Butanol	20	77 ± 8.2 ^{a,b,c,d}	27 ± 6.9 ^{g,h,i}
	50	49 ± 5.0 ^{d,e,f,g,h}	74 ± 11.1 ^{b,c,d,e}
	80	72 ± 8.1 ^{b,c,d,e,f}	59 ± 13.4 ^{c,d,e,f,g}

* The free and immobilized enzyme was incubated in the presence of various organic solvents at 50 °C for 1h.

** Control: culture supernatant and immobilized lipase without the addition of any substance.

*** Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test ($p=0.01$).

3.3.4. Storage and reuse

To investigate the reusability, the immobilized *P. hubeiensis* lipase was washed with citrate-phosphate buffer (0.05 M, pH 6.0) after one catalysis run and reintroduced into a fresh *p*NPP solution for another hydrolysis at 52 °C. Fig. 4 shows loss of activity of 72 % after the first cycle. The reduction of the enzymatic activity is probably related to lipase desorption from the support or to the denaturation of lipase during the repeated use (Karra-Châabouni *et al.*, 2008, Yong *et al.*, 2008). Karra-Châabouni *et al.* (2008) immobilized lipase by adsorption and noted that the enzyme started to lose its activity during the third cycle. By the fifth cycle, 25 % of the initial catalytic activity was retained.

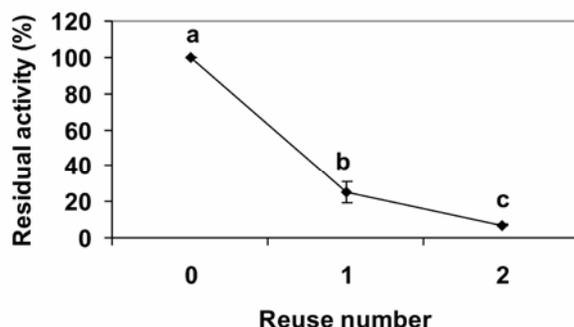


Fig. 4. Effect of immobilized lipase repeated use. The lipase reuse was tested by repeated batch experiments using the activity determination (section 2.3.) at 52 °C and pH 6.0.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test ($p=0.01$).

Storage stability is one of the most important criteria for the application of an enzyme on commercial scale (Tumturk *et al.*, 2007). The immobilized and free enzyme was stored at 4 °C and activities were measured periodically during 40 days. The lipase residual activity at different time intervals was estimated and results are given in Fig. 5. Under the same storage conditions, the activity of the free lipase decreased at a slower rate than that of the immobilized lipase (Fig. 5). Upon 40 days of storage, adsorbed lipase retained about 50 % of its original activity while free lipase retained 80 %. On contrary with our results, Tumturk *et al.* (2007) verify that covalently immobilized lipase on P(DMAm-co-AAm) and entrapped enzyme into P(NIPA-co-AAm)/Carrageenan hydrogels retained about 54 % and 42.5 % of its original activity, respectively and the free enzyme lost completely its activity. Dizge *et al.* (2008) immobilized a microbial lipase by covalent attachment onto polyglutaraldehyde-activated poly(styrene-divinylbenzene) and observed that immobilized enzyme retained its full activity for

30 days in storage at 4 °C. Under the same conditions, free enzyme lost 55 % of its initial activity. Different from covalent immobilization where enzyme is strongly attached onto the support, our results suggest that in adsorption, the enzyme is weakly attached onto the support and probably desorbed from the support during the time.

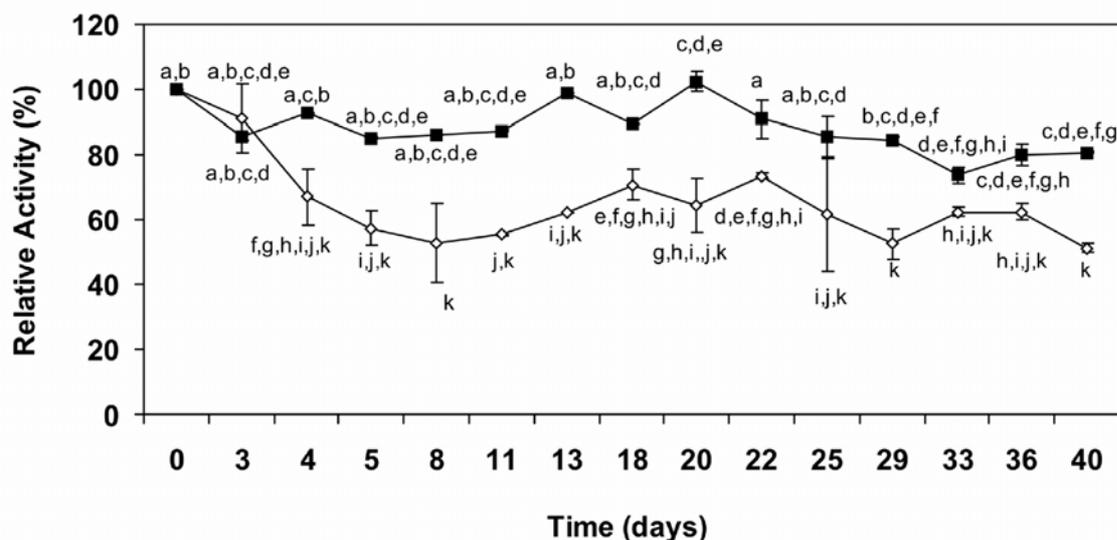


Fig 5. Storage stability of free (■) and immobilized (◇) *P. hubeiensis* HB85A lipase. Free and immobilized enzymes were stored at 4 °C. The storage stability of enzymes was tested for 40 days by determining the activity everyday using activity assay method.

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test (p=0.01).

4. Conclusion

Immobilization of enzymes is one of the most common methods to achieve operational stability of enzyme. Here we focused on lipase immobilization due to its potential applications in industry. Lipase from *P. hubeiensis* (strain HB85A) was successfully immobilized by hydrophobic binding to a polystyrene–divinylbenzene

support. The optimal conditions for lipase immobilization were: pH 4.76, an enzyme/support ratio of 1282 U/g-support and immobilization time of 2 h and 29 min, the highest lipase activity obtained was 177.5 U/g-support. The optimal temperature for free and immobilized enzyme activity was found to be 68 °C and 52 °C, respectively. Optimal pH for free and immobilized lipase activity was observed to be pH 4.6 and 6.0, respectively. Lipase immobilization provides enhanced enzyme activity and stability at high temperatures, acidic and neutral pH, and in the presence of non-ionic detergents and organic solvents. Regardless of the immobilization process, our results demonstrated that the continuous bioreactor model developed in this study was simple, inexpensive and effective, proving to be a useful technique for increased enzymatic activity and stability, thus making this system attractive for practical applications.

References

- Abrol, K., Qazi, G.N., Ghosh, A.K. (2007) Characterization of an anion-exchange porous polypropylene hollow fiber membrane for immobilization of ABL lipase. *J. Biotechnol.* 128, 838–848.
- Burkert, J.F.M., Maugeri, F., Rodrigues, M.I. (2004) Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technol.* 91, 77–84.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A.M., Oliveira, E.S., Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2010) Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 168-275.

- Cabrera, Z., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2007) Partial and enantioselective hydrolysis of diethyl phenylmalonate by immobilized preparations of lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1280–1285.
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M. (2009) Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B–Enzym.* 57, 171-176.
- Chaubey, A., Parshad, R., Koul, S., Taneja, S.C., Qazi, G.N. (2006) *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 598–606.
- Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, C.K., Shieh, C.J. (2007a) Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. *Process. Biochem.* 42, 1362–1366.
- Chang, S.F., Chang, S.W., Yen, Y.H., Shieh, C.J. (2007b) Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Appl. Clay Sci.* 37, 67–73.
- Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, K.H., Chang, S.F., Shieh, C.J. (2008) Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM. *Bioresour. Technol.* 99, 2800–2805.
- Chen, B., Miller, E.M., Gross, R.A. (2007) Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida Antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity. *Langmuir.* 23, 6467-6474.
- Çiftçi, O.N., Fadıloğlu, S., Gögüs, F. (2009) Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 324–329.

- Deng, H.T., Xu, Z.K., Huang, X.J., Wu, J., Seta, P. (2004) Adsorption and Activity of *Candida rugosa* Lipase on Polypropylene Hollow Fiber Membrane Modified with Phospholipid Analogous Polymers. *Langmuir* 20, 10168-10173.
- Dizge, N., Keskinler, B., Tanriseven, A. (2008) Attachment of microbial lipase onto microporous styrene–divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 66, 34–38.
- Ghamgui, H., Miled, N., Karra-chaabouni, M., Gargouri, Y. (2007) Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. *Biochem. Eng. J.* 37, 34–41.
- Haaland, P.D. (1989) *Experimental design in biotechnology*. Marcel Dekker inc, New York.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Druet, D., Comeau, L. (1999) Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 80–87.
- Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I., Fujiwara, N. (2006). Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 82–89.
- Karra-Châabouni, M., Bouaziz, I., Boufi, S., Botelho, A.M. R., Gargouri, Y. (2008) Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies. *Colloids Surf. Biointerfaces*. 66, 168–177.
- Jiang, D.J., Long, S.Y., Huang, J., Xiao, H.Y., Zhou, J.Y. (2005) Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochem. Eng. J.* 25, 15–23.

- Khuri, A.I., Cornell, J.A. (1987) Response surface design and analyses. Marcel Dekker Inc, New York.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Fontana, L.D. (2004) Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem. Eng. J.* 18, 65–71.
- Liu, C.H., Chang, Jo-Shu. (2008) Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia* sp. C20. *Bioresour. Technol.* 99, 1616–1622.
- Maia, M.M.D., Heasley, A., Moraes, M.M.C., Melo, E.H.M., Moraes Jr.M.A., Ledingham W.M., Lima Filho J.L. (2001) Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour. Technol.* 76, 23-27.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451–1463.
- Ozturk, N., Akgol, S., Arisoy, M., Denizli, A. (2007) Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Sep. Purif. Technol.* 58, 83–90.
- Pahujan, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R. (2008) Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Bioresour. Technol.* 99, 2566–2570.
- Secundo, F., Miehé-Brendle, J., Chelaru, C., Ferrandi, E.E., Dumitriu, E. (2008) Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 350–361.

- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process. Biochem.* 40, 321–326.
- Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F. (2007). Preparation and application of poly(*N,N*-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/κ-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase. *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 281–285.
- Vaidya, B.K., Ingavle, G.C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B.D., Nene, S.N. (2008) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* 99, 3623–3629.
- Winkler, U.K., Stuckmann, M. (1979) Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 138, 663-670.
- Zeng, L., Luo, K., Gong, Y. (2006) Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 38, 24–30.
- Ye, P., Jiang, J. , Xu, Z-K. (2007) Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 60, 62–67.
- Yong, Y., Bai, Y.X., Li, Y.F., Lin, L., Cui, Y.J., Xia, C.G. (2008) Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process. Biochem.* 43, 1179–1185.

- Yu, H., Wu, J., Ching, C. B. (2004) Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution. *Biotechnol. Lett.* 26, 629–633.
- Yujun, W., Jian, X., Guangsheng, L., Youyuan, D. (2008) Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface. *Bioresour. Technol.* 99, 2299–2303.

PARTE III

Produção de biodiesel utilizando-se lipase imobilizada como catalisador

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção de lipase em reator de 14 L

A produção de lipases foi realizada pelo cultivo da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) em reator modelo New Brunswick MF 14 com capacidade para 14 L. Para preparação do inóculo, a levedura foi previamente cultivada a 28 °C, 200 rpm por 16 h em Erlenmeyer de 1.000 mL contendo 250 mL de meio GYMP (glicose 20g/L, extrato de malte 20g/L, extrato de levedura 5g/L e fosfato de sódio monobásico 2g/L). O cultivo foi realizado em 9.550mL de Meio Basal (glicose 2g/L, potássio fosfato dibásico 1g/L, peptona 5g/L, sulfato de magnésio 0,1g/L) acrescido de 200 mL de óleo de soja. O meio basal foi esterilizado no reator por 30 min a 120 °C e o óleo de soja foi esterilizado previamente por fornagem e posteriormente adicionado assepticamente ao meio antes da inoculação da levedura. O inóculo para a fermentação foi realizado adicionando-se ao reator os 250 mL do pré-inóculo. As condições de fermentação foram agitação de 200 rpm, temperatura de 28 °C, vazão de ar de 1 vvm (volume de ar por volume de meio) e tempo de fermentação de 18 h sem controle de pH. Após fermentação, as células foram removidas por centrifugação a 14.000 rpm por 10 min e o sobrenadante contendo lipase foi utilizado para a imobilização da enzima em suporte sólido.

3.2. Imobilização de lipase utilizando-se hexano como solvente.

A lipase foi imobilizada em suporte de poliestireno divinilbenzeno. O suporte (2 g) foi empacotado em uma coluna de vidro (Ø 2.5 cm × 20 cm). No sistema de reator fixo, uma bomba peristáltica foi utilizada para recircular as soluções a uma vazão de 2 mL/min. Diferentemente do processo de imobilização da lipase

utilizada anteriormente neste trabalho, 17 mL de lipase livre (1.282 U/g de suporte) foram diluídas em 5 mL de hexano e adicionada à coluna contendo o suporte sem tratamento prévio. Ciclos de 2 h e 29 min a 25 °C foram realizados a fim de se proporcionar suficiente contato da enzima com o suporte na imobilização. Após este período, a lipase não imobilizada foi drenada da coluna e o suporte foi lavado por 3 vezes com 10 mL de hexano.

3.3. Produção de Biodiesel na ausência de co-solvente utilizando-se diferentes fontes de álcoois e triglicerídeos e como catalisador a lipase imobilizada.

As reações de transesterificação foram procedidas por batelada em Erlenmeyer de 125 mL contendo 2 g de lipase imobilizada (80 U, quantidade determinada pela atividade de hidrólise), 10 g de triglicerídeo (10 mmol) e 2,96 g de álcool (60 mmol) ou 4,14 g de álcool (90 mmol). Foram utilizados como fonte de álcool: metanol, etanol e iso-propanol e como fonte de triglicerídeo: óleo de soja, óleo de mamona, óleo residual e gordura bovina. A mistura foi incubada em *shaker* com agitação orbital a 260 rpm e 50 °C pelos períodos de 24 e 48 h. O álcool foi adicionado à mistura em duas etapas a fim de se evitar a desnaturação da enzima. Após a reação, a lipase imobilizada foi removida da mistura final por centrifugação com agitação de 9.000 rpm por 10 min. A fase superior obtida na centrifugação da mistura foi submetida à secagem por vácuo a 80 °C por 40 min com a finalidade de liberar possíveis solventes contaminantes. Uma alíquota (0,2 g) do material foi retirada para análise quanto à produção de biodiesel por cromatografia por camada delgada (CCD). As amostras cujos picos de biodiesel foram visualizados na CCD foram quantificadas através de cromatografia gasosa.

3.4. Produção de Biodiesel, em diferentes temperaturas, na presença de co-solvente utilizando-se como catalisadores a lipase livre e imobilizada.

A partir das matérias-primas analisadas no item 3.3 que propiciaram um maior rendimento de produção de biodiesel, foi realizada a reação de transesterificação na presença de co-solvente (hexano). As reações de transesterificação foram procedidas por batelada em Erlenmeyer de 125 mL contendo 200 mg ou 400 mg de lipase imobilizada (8 U ou 16 U) ou 100 µL da lipase livre (16 U); 1 g de óleo de mamona (1 mmol) e 4,14 g de iso-propanol (9 mmol), sendo adicionados à mistura 20 mL de hexano. A mistura foi incubada em *shaker* com agitação orbital a 260 rpm nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C pelo período de 24 h. O álcool foi adicionado à mistura em duas etapas a fim de se evitar a desnaturação da enzima. Após a reação, a lipase imobilizada foi removida da mistura final por centrifugação com agitação de 9.000 rpm por 10 min. A fase superior obtida na centrifugação da mistura foi submetida à secagem por vácuo à 80 °C por 40 min. com a finalidade de liberar possíveis solventes contaminantes. A amostra foi posteriormente analisada por CCD.

3.5. Cromatografia por camada delgada (CCD)

A cromatografia por camada delgada foi realizada para a determinação qualitativa dos produtos da transesterificação, utilizando-se como controle as fontes de triglicerídeos utilizadas como matéria-prima. Na CCD, ésteres são separados de acordo com as forças de interação entre a substância, o adsorvente (sílica) e com a fase móvel. A posição relativa de cada banda é característica para cada substância sendo o diâmetro e a intensidade das bandas relacionadas

à quantidade de material presente. A análise consistiu na diluição de 0,2 g de produto em 0,2 mL de hexano. Posteriormente, 1 µL da mistura e 1 µL do controle foram aplicados na placa de sílica (Alugram Sil G/UV da Macherey-Nagel). As amostras contidas na placa foram eluídas com uma mistura contendo 80 mL de hexano, 20 mL de éter etílico e 1 mL de ácido acético. Após eluição as bandas foram reveladas com iodo.

3.6. Cromatografia gasosa

As amostras que apresentaram picos indicativos da possível presença de biodiesel na CCD foram posteriormente analisadas por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas pela Profa. Dra. Rosana Schneider no laboratório de Tecnologia Ambiental da Universidade de Santa Cruz. Foi utilizado um cromatógrafo à gás acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) marca Shimadzu, modelo QP 2010 e coluna HP5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Temperatura da coluna 150 °C (0,1 min.) 5 °C/min até 280 °C. Temperatura do injetor 250 °C. Temperatura da Interface 300 °C. Temperatura do detector 290 °C. Injetor split splitless - 1:10. Volume de injeção 1 µL. Vazão da fase móvel (He)- 1mL.min⁻¹. Sistema de ionização- impacto de elétrons (0,7 eV). Modo de varredura –SCAN.

4. RESULTADOS

4.1. Produção de Biodiesel na ausência de co-solvente utilizando-se diferentes fontes de álcoois e triglicerídeos e como catalisador a lipase imobilizada.

A atividade de transesterificação da lipase de *P. hubeiensis* (HB85) imobilizada em suporte hidrofóbico foi analisada com o intuito de comparar a eficácia deste biocatalisador em reações de síntese. Para tanto, quatro diferentes fontes de triglicerídeos (óleo de soja, óleo de mamona, óleo residual de restaurante e gordura bovina) e três fontes distintas de álcool (metanol, etanol e isopropanol) foram testados na produção de biodiesel. Todas as reações foram realizadas nos períodos de 24 e 48 h à 50 °C com um excesso de álcool na razão de 1 mol de triglicerídeo : 6 mol de álcool e 1 mol de triglicerídeo : 9 mol de álcool em relação à estequiometria de equilíbrio da reação (1 mol de triglicerídeo : 3 mol de álcool). A análise qualitativa por CCD, dos produtos da reação de transesterificação presentes na fase superior da mistura reacional demonstra que não se atingiu o equilíbrio da reação mesmo após o período de 48 h em todas as fontes de triglicerídeos e alcoóis utilizadas. Verificou-se a presença de pequenas bandas indicativas de biodiesel no teste realizado com óleo de mamona e isopropanol (1:9) no período de 24 h e nos testes com óleo de mamona e metanol (1:9) pelos períodos de 24 e 48 h. As amostras possivelmente positivas para biodiesel, segundo a cromatografia de camada delgada, foram analisadas por cromatografia gasosa. O máximo rendimento obtido foi de 3,15 % utilizando-se óleo de mamona e iso-propanol na proporção molar de 1:9 pelo período de 24 h.

Os rendimentos obtidos nas reações realizadas com óleo de mamona e metanol (1:9) pelos períodos de 24 e 48 h foram de 1,84 % e 2,32 %, respectivamente.

4.2. Produção de Biodiesel, em diferentes temperaturas, na presença de co-solvente utilizando-se como catalisadores a lipase livre e imobilizada.

Com o objetivo de se aumentar a transferência de massa entre as três fases formadas pela mistura álcool, triglicerídeo e catalisador sólido, foi analisada a produção de biodiesel na presença do co-solvente hexano. Os produtos da transesterificação presentes na fase superior da mistura reacional foram analisados por CCD. Verificaram-se pequenas bandas possivelmente indicativas de biodiesel em todas as condições testadas. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, porém não apresentaram nenhum pico de produção de biodiesel (0 % de rendimento).

5. DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho dedicou-se à seleção de novos microrganismos produtores de lipase para posterior imobilização dessa enzima a partir de um processo mais econômico e eficiente, a fim de utilizá-la em aplicações industriais.

Para tanto, foram utilizadas 29 leveduras isoladas da superfície foliar de *Hibiscus rosa-sinensis*, previamente selecionadas por teste qualitativo com Tween 20 como possíveis produtoras de lipase, para seleção do melhor microrganismo produtor de lipase. A seleção da melhor levedura produtora de lipase foi realizada cultivando-se esses 29 microrganismos em meio basal e gordura bovina como indutor. As 10 leveduras melhores produtoras de lipase, neste meio, foram novamente cultivadas em meio basal, porém utilizando-se de um novo indutor, o óleo de soja. A gordura bovina e o óleo de soja foram escolhidos como fontes de carbono nas análises de produção de lipase por se tratarem de matérias-primas de baixo custo, proporcionando uma economia no processo de produção da enzima. A partir das análises realizadas, o microrganismo melhor produtor de lipase tanto em meio com gordura bovina como em meio contendo óleo de soja foi a levedura *Pseudozyma hubeiensis* (isolado HB85A).

Após a seleção do melhor microrganismo produtor de lipase, *P. hubeiensis* (HB85A), o óleo de soja foi selecionado como substrato para a produção de lipases em escala piloto (reator de 14 L), visando posterior imobilização dessa enzima para utilização na produção de biodiesel. Esse substrato foi escolhido, com o objetivo de posterior análise do desempenho da lipase imobilizada na produção de biodiesel utilizando-se o óleo de soja.

Na produção de lipase em escala piloto, 10 L de solução enzimática foram produzidos a partir do cultivo da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) em reator de 14 L New Brunswick MF 14 em meio basal contendo 2 % de óleo de soja. Evidenciou-se um aumento da atividade de lipase durante o cultivo, alcançando-se um máximo em 18 h. Ainda verificou-se um pico de atividade específica até 18 h de cultivo com uma baixa atividade de protease. Quanto ao pH no cultivo da levedura *P. hubeiensis* (HB85A), observou-se a manutenção do pH próximo ao neutro durante todo o período de cultivo.

Além disso, o processo de produção de lipase em reator de 14 L promoveu uma atividade de lipase 3 vezes maior comparativamente à produção de lipase em Erlenmeyer, num tempo quase 3 vezes menor. Constata-se, portanto, que o processo de produção da lipase de *P. hubeiensis* (HB85A) em reator de 14 L demonstrou ter o melhor custo/benefício na obtenção da enzima, pois esta levedura apresentou uma maior atividade de lipase em menor tempo de processo, acarretando em um aumento no rendimento da produção da enzima, em menor tempo de produção. Esses fatores reduzem o custo de obtenção da lipase e tornam possível sua produção em escala industrial de maneira economicamente atrativa.

Com o intuito de se utilizar a lipase para aplicações industriais, é de suma importância conhecer a atuação dessa enzima frente às diversas condições do meio reacional como: temperatura, pH, efeitos de sais, detergentes e solventes orgânicos pois, além de direcionar as melhores condições para se trabalhar com essa enzima na produção de biodiesel, permite identificar outras potenciais aplicações para esta enzima. Com isso, a lipase de *P. hubeiensis* (HB85A)

produzida em escala piloto foi caracterizada, a fim de se ampliar o conhecimento sobre a atuação da enzima frente a diferentes meios reacionais.

Esta caracterização deu-se a partir do sobrenadante do cultivo da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) sem adicional purificação da enzima, pois um estágio de purificação dessa lipase viria acarretar em um aumento significativo no custo da enzima para comercialização. Sendo que, há aplicações industriais em que não há a necessidade de se utilizar a enzima purificada, como em detergentes, indústria coureira e tratamento de efluentes, podendo até a presença de outras enzimas auxiliarem no processo.

Ao longo de todo estudo, utilizou-se o substrato sintético *p*-nitrofenilpalmitato para determinação da atividade da lipase. Este substrato foi escolhido para este trabalho, pois contém uma cadeia de 16 carbonos em sua estrutura determinando somente a atuação de “verdadeiras lipases”.

Tanto as lipases como as esterases possuem a propriedade de hidrolisar moléculas de ácidos graxos. No entanto, as lipases se distinguem das esterases devido ao fato desse último grupo de enzimas não exibirem atividade catalítica por ativação interfacial. Sua atuação ocorre somente em substratos que se encontram solúveis em água e atuam apenas em ácidos graxos de cadeia curtas (Reis *et al.*, 2009). As lipases, por outro lado, apresentam vários graus de seletividade ao substrato. Elas são capazes de catalisar reações contendo uma ampla variedade de substratos (triglicerídeos), porém a intensidade da atividade pode variar de acordo com a estrutura da molécula de cada substrato. Reis *et al.* verificou ainda que, pela característica dessa enzima em atuar a partir de ativação interfacial, quando o substrato, por exemplo, um ácido graxo de cadeia curta, encontra-se solúvel na solução aquosa a atividade desta enzima é ínfima. Sua atividade

começa a aumentar quando a concentração destes substratos aumenta formando agregados micelares ou emulsões (Reis *et al.*, 2009).

Para tanto, neste trabalho foram testados substratos sintéticos com cadeias carbônicas curtas contendo 2 e 4 carbonos em sua estrutura e dois substratos de cadeia longa contendo 14 e 16 carbonos em sua estrutura. Todos os substratos foram emulsionados no meio aquoso proporcionando condições que somente as lipases poderiam atuar e não as esterases. Verificou-se a partir deste teste que, dentre as enzimas produzidas pela levedura *P. hubeiensis* (HB85A) tem-se “verdadeiras” lipases por ter-se obtido boa atividade com substratos de cadeias curtas emulsionados e aproximadamente o dobro de atividade no substrato de cadeia longa (16 carbonos).

Dando-se prosseguimento à caracterização do sobrenadante contendo lipases, foram analisados os efeitos da variação da temperatura, pH, presença de sais, detergentes e solventes orgânicos na atividade da enzima. Essas análises foram realizadas de duas formas, sendo que, a primeira forma está apresentada na parte I deste trabalho onde a determinação do pH e temperatura ótimos de reação foram obtidos a partir do ensaio de tentativa e erro e cujos resultados influenciaram as determinações futuras quanto a análise dos efeitos de detergentes, solventes e sais. Já na parte II desta tese foi realizada a caracterização do meio contendo lipase a partir do método de planejamento fatorial e superfície de resposta.

A metodologia de planejamento fatorial, associada à análise se superfícies de respostas é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Rodrigues & lemma, 2005). O planejamento

consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar e mesmo quantificar a influência das variáveis sobre a resposta desejada é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos. A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, dentre outros objetivos, tem levado profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (Rodrigues & lemma, 2005).

É bem conhecido que o desenvolvimento de um novo produto ou processo é, em geral, dependente de um grande número de variáveis. O planejamento fatorial reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. Os fatores são analisados simultaneamente, assim pode-se verificar e quantificar os efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; torna possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo e permite calcular e avaliar o erro experimental (Rodrigues & lemma, 2005).

Na parte I da tese, a análise do pH e temperatura ótimos para a atividade da lipase foi realizada utilizando-se o método de tentativa e erro. A determinação do pH ótimo foi realizada fixando-se a temperatura à 37 °C e variando-se o pH de 3,0 à 9,0. Posteriormente, a partir do ponto ótimo obtido no ensaio de pH, foi realizada a análise da temperatura ótima variando-se a temperatura de 30 à 70 °C (Fig. 1 da parte I). No segundo artigo, a temperatura e pH ótimos para atividade de lipase foram estabelecidos a partir de um planejamento experimental onde se verificou conjuntamente a atuação da lipase nas mesmas variações de temperatura e pH, bem como, a influência de uma variável na outra em relação a atividade (Fig. 2 da parte II).

Pode-se observar que no método de tentativa e erro foram determinados dois pontos máximos de atividade, o primeiro no pH 7,0 a 37 °C e o segundo à 50 °C no pH 7,0 sendo a atividade máxima alcançada de 60 U/mL. No entanto, com o método de superfície de resposta, a partir de um planejamento fatorial, obteve-se além de pontos máximos de pH (4,6) e temperatura (68 °C), uma região ótima de atividade entre as temperaturas de 50 a 78 °C e pH de 3,0 à 6,0, sendo a atividade máxima obtida de 130 U/mL.

A diferença entre o dois métodos de trabalho consiste na influência que uma variável (pH) exerce na outra (temperatura) sendo esta influência, neste caso, extremamente positiva pois, a partir deste modelo, verificou-se que há possibilidade de se obter atividades quase 216 % maiores do que nos ensaios de tentativa e erro. Ademais, esta metodologia não nos fornece apenas um ponto ótimo, mais uma região ótima de atuação da enzima.

Em aplicações em indústrias o estabelecimento de uma região ótima de atuação da enzima fornece um grande diferencial, visto que, a partir destas informações, pode-se escolher aplicações industriais que não necessariamente trabalhem nas condições máximas de temperatura, no entanto, ainda se encontrem na região ótima de atuação da enzima. Este tipo de alternativa nos possibilita, ainda, desenvolver modelos operacionais que permitam um menor gasto com energia, bem como, atuação em ambientes mais extremos dependendo da aplicação desejada.

Em relação à termoestabilidade do sobrenadante contendo lipase, na parte I o teste foi realizado no pH 7,0 e na parte II da tese, para a mesma análise, a estabilidade foi medida utilizando-se a amostra sem nenhum tampão. Verificou-se que a estabilidade da lipase no pH 7,0 foi boa somente em baixas temperaturas

(30 e 40 °C). Porém, ao utilizar-se o sobrenadante contendo lipase para o teste sem a presença de tampão, verificou-se uma boa estabilidade em todas as temperaturas testadas (30, 40, 50, 60 e 70 °C) por um maior tempo (2h). Possivelmente, a adição do tampão possa ter proporcionado uma alteração das cargas do meio, promovendo uma alteração conformacional da enzima ou uma maior dificuldade na entrada do substrato no sítio ativo da enzima. Reis *et al.* (2009) propuseram que repulsões eletrostáticas podem ocorrer entre o sítio ativo, negativamente carregado, da enzima e os ácidos graxos ionizados em pH alcalinos.

Quanto aos detergentes testados, verificou-se que tanto nos testes realizados na parte I (pH 7,0 e 40 °C) como na parte II da tese (pH 5,0 e 50 °C) não houve perda de atividade na presença de detergentes não iônicos. Porém, a lipase no meio pH 7,0 demonstrou um significativo aumento de atividade em relação ao meio com pH 5,0 quando em presença destes detergentes. Pode-se supor que talvez esses detergentes no pH 7,0 possam ter promovido uma alteração da tensão superficial da interface água/óleo favorecendo a atuação da enzima.

Na análise do efeito de sais na atividade da lipase, na parte I foram analisados o efeito de 20 mM de sal em pH 7,0 e temperatura de 40 °C e na parte II, foi determinado o efeito de 5 mM de sal em pH 5,0 e temperatura 50 °C. Verificou-se nesta análise um aumento na atividade da lipase na presença de uma maior concentração da maioria dos sais testados.

O efeito de solventes orgânicos foi analisado, nas duas primeiras partes da tese, de forma similar apenas alterando-se a temperatura de incubação de 40 °C (parte I) para 50 °C (parte II). No entanto, ao comparar-se esse dois estudos,

pode-se constatar que ao se incubar a lipase na presença de solventes orgânicos em temperatura mais alta, o efeito inibitório do mesmo é menor. Sugere-se que, a incubação e medida de atividade em altas temperaturas tenham possibilitado uma maior volatilização destes solventes diminuindo os efeitos inibitórios do mesmo.

Após caracterização da lipase contida no sobrenadante do cultivo da levedura *P hubeiensis* (HB 85A) em reator de 14 L., iniciou-se o desenvolvimento do processo de imobilização desta enzima.

Como mencionado neste trabalho, apesar de existirem centenas de protocolos de imobilização, o projeto de um novo protocolo que permita o aumento das propriedades da enzima durante e após a imobilização trata-se ainda de um desafio. Ademais, se detendo ao fato de que este processo será realizado em escala industrial, deve-se atentar a toxicidade e instabilidade do suporte, bem como, deve-se realizar um projeto simples e robusto.

Para tanto, antes de iniciar-se a imobilização da lipase, foram realizadas uma série de ponderações com o objetivo de se realizar um projeto simples e robusto que nos permitisse atingir a nossa meta com eficácia.

Por isso, primeiramente, foi analisado o tipo de metodologia de imobilização a ser utilizada frente à atividade catalítica da lipase.

Excetuando-se a imobilização por adsorção ou oclusão em micelas reversas, os outros métodos promovem a fixação da enzima de forma aleatória, ou seja, independente do tipo de enzima analisada. Para a imobilização da lipase por ligação covalente em superfície sólida ou por "cross linking; ligação iônica ou confinamento em poros de membranas e géis poliméricos poderia haver a necessidade de se purificar a enzima, a fim de se permitir a fixação preferencial

da mesma, o que, conforme argumentado acima acarretaria em um significativo aumento no custo do catalisador.

Por este fato, houve necessidade de se escolher um método de imobilização que fixasse preferencialmente a lipase a outras enzimas. Na oclusão por micelas reversas, a parte hidrofóbica da micela interage com a parte hidrofóbica da enzima rodeando-a de forma a ocluí-la no meio do agregado micelar. Todavia, a lipase é uma enzima hidrofílica que contém uma região altamente hidrofóbica apenas próxima ao seu sítio ativo, sendo que se acredita que o método de oclusão em micelas reversas não seria adequado para a lipase, neste caso.

Para as lipases, dentre os vários tipos de imobilização que podem ser realizados, a imobilização por adsorção tem sido a estratégia mais popular em aplicações de larga escala (Al-Zuhair *et al.*, 2009), por ser simples, de baixo custo e efetiva, mantendo inalteradas a especificidade e seletividade da enzima na reação (Ye, *et al.*, 2007; Ghamgui *et al.*, 2007; Ozturk *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2009). A imobilização por adsorção permite ainda que o suporte possa ser reutilizado no processo. A menor força de interação entre a enzima e o suporte possibilita que, com a perda de atividade do biocatalisador, seja possível desadsorver a enzima inativa e utilizar o suporte para uma nova imobilização, reduzindo, com isso, o preço final do biocatalisador, bem como, a geração de resíduos (Ozturk *et al.*, 2007). Visto que, neste trabalho o suporte será comprado e, por mais econômico que o suporte seja, a sua reutilização na imobilização da enzima torna seu custo significativamente menor.

Portanto, considerando-se o mecanismo de ativação interfacial da lipase acredita-se que a metodologia de imobilização por adsorção adequar-se-ia neste caso. Pela hipótese de que a enzima possa reconhecer a superfície hidrofóbica

de um suporte de forma similar à superfície das partículas do substrato natural, espera-se que a lipase comece seletivamente a se imobilizar no suporte por ligações fracas de Van der Waals (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Secundo *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007; Dizge *et al.*, 2008).

Acredita-se que a partir deste mecanismo, todas as lipases imobilizadas provavelmente se apresentarão em sua forma ativa, proporcionando um significativo aumento de atividade em comparação as mesmas lipases quando em solução aquosa (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007). Ademais, alguns estudos têm demonstrado que a lipase é capaz de se fixar por adsorção em suportes hidrofóbicos em condições que outras enzimas não conseguiriam permitindo um significativo aumento na pureza do catalisador diminuindo, com isso, custos adicionais com a purificação da lipase (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Macário *et al.*, 2009). Além disso, o emprego de enzimas imobilizadas em suportes hidrofóbicos faz-se indicada para atuação em meios contendo solventes orgânicos, por propiciar uma melhor difusão do substrato ao sítio ativo da biomolécula. Portanto, foi escolhida a metodologia de imobilização por adsorção para ser utilizada neste trabalho.

A segunda etapa no processo de imobilização da lipase consistiu na escolha do tipo de suporte mais apropriado para o método de imobilização escolhido.

De modo geral, o suporte deve apresentar grande superfície interna a fim de se obter uma boa interação da enzima na superfície. Se o suporte tiver superfície menor que a enzima, dificilmente se conseguirá uma intensa interação entre o suporte e a biomolécula (Mateo *et al.*, 2007). Além disso, suportes devem ser macroporosos, pois estruturas macroporosas permitem que as moléculas de enzima interajam e se fixem no interior destes poros. A fixação de enzimas no

interior de poros de suportes sólidos proporciona uma maior proteção da molécula à interação com alguma substância do extrato aquoso, bem como, à desnaturação pelo contato com solventes orgânicos, previne sua agregação, autólise, proteólise por proteases e torna-as mais resistentes a ação de bolhas de gases e forte agitação (Mateo *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Miletic *et al.*, 2009).

De acordo com as características apresentadas acima, foram pesquisados suportes hidrofóbicos que fossem de baixo custo, com grande área superficial, macroporosos e de fácil manipulação. O suporte selecionado para o desenvolvimento do trabalho é uma resina poliaromática adsorvente, composta pelo material poliestireno divinilbenzeno, tem uma área superficial de 500 m²/g, tamanho da partícula de 250 a 850 µm, tamanho do poro 260 Å; sua granulometria é alta, ou seja, não são esferas muito finas sendo fáceis de manipular, evitando perdas durante o processo e, dentre os suportes comerciais, tem um dos menores custos.

O terceiro estágio analisado para a imobilização da lipase foi focado no planejamento operacional do processo para a imobilização da enzima no suporte.

O processo de imobilização da enzima mais empregado é o por batelada, por isso o primeiro planejamento operacional realizado, neste trabalho, foi pelo processo de batelada. Contudo, verificou-se uma excessiva manipulação do suporte imobilizado durante o processo (reator – filtro – reator); perdas de material durante a filtração e transporte; cisalhamento do suporte durante a agitação mecânica; demonstrou-se tratar de um processo relativamente demorado.

A fim de se demover estas desvantagens, começou-se a desenvolver o planejamento de um processo de imobilização da lipase por leito fixo. O processo

por leito fixo tem demonstrado maiores vantagens para utilização em escala industrial, visto que permite a reutilização do catalisador sem necessidade de prévia separação. Trata-se de um processo fácil de operar, permite um maior contato entre a enzima e o suporte, reduzindo o tempo necessário para a imobilização da enzima e evita possíveis cisalhamentos da enzima causados pela agitação magnética no processo de batelada (Chang *et al.*, 2007; Ciftci *et al.*, 2009; Halim *et al.*, 2009).

Trata-se, portanto, de um processo rápido, pois além de reduzir o tempo de reação, não necessita de parada para transporte de material entre as etapas do processo, diminuindo, com isso, a perda de material, gasto com mão-de-obra e equipamentos sendo, portanto, um processo mais econômico que o de batelada (Chang *et al.*, 2007; Ciftci *et al.*, 2009; Halim *et al.*, 2009). Pelas vantagens descritas acima e comprovadas na prática, o processo de imobilização de lipase implantado neste trabalho foi por leito fixo.

Por fim, iniciou-se a imobilização da lipase da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) por adsorção em suporte hidrofóbico em um reator de leito fixo.

A adsorção da enzima na superfície de um suporte sólido pode induzir a ocorrência de alterações conformacionais, as quais podem afetar o rendimento e estabilidade do catalisador. A distribuição da enzima no suporte e o microambiente criado em volta do mesmo também podem alterar a catálise enzimática (Chen *et al.*, 2007).

Portanto, neste trabalho foram otimizadas as condições de imobilização da lipase no suporte hidrofóbico (tempo de contato da lipase com o suporte, quantidade de enzima adicionada ao suporte para imobilização e pH do meio) pelo método de superfície de resposta antes de um aumento de escala de

produção deste catalisador, a fim de se economizar material, tempo e dinheiro. Posteriormente, a lipase imobilizada foi caracterizada também através do planejamento fatorial, a fim de se aprofundar o conhecimento da atuação desta enzima após imobilização e direcionar as melhores condições para se trabalhar com ela na produção de biodiesel e identificar outras potenciais aplicações para este catalisador heterogêneo.

Pode-se verificar que a atividade máxima da lipase imobilizada alcançada nesta otimização foi de 143 U/g (11 % de rendimento) ao se recircular 1282 U/g de lipase livre pelo período de 2 h e 29 min no leito fixo contendo o suporte no pH de 4,76. Deve-se considerar as ponderações dos autores Fernandez-Lorente *et al.* (2007) e Mateo *et al.* (2007), que sugerem que este tipo de imobilização funciona melhor em meio apolar. A imobilização da lipase por adsorção cria um ambiente altamente hidrofóbico em volta do sítio ativo da enzima, impedindo a proximidade do substrato hidrofílico a esse sítio ativo, impedindo sua atuação. De fato, as lipases adsorvidas em suportes hidrofóbicos, na maioria das vezes, exibem atividades hidrolíticas mais baixas que lipases imobilizadas por outras técnicas (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007). Como a aplicação almejada (produção de biodiesel) trata-se de uma reação de síntese, ou seja, ocorrerá em meio hidrofóbico, espera-se que essa lipase tenha mais alta atuação nesta aplicação.

Para a implementação do processo de imobilização desenvolvido neste projeto em escala industrial, pode-se alterar as condições de processo a fim de se reduzir custos operacionais e de matéria-prima (lipase livre). Ao analisar-se a Figura 1 da parte II da tese, constata-se que ao se manter o pH em 4,76, reduzindo o tempo de imobilização em 1 hora (1 h e 30 min) e a quantidade de enzima adicionada ao processo de 1282 U/g para 650 U/g de suporte ainda

obtém-se uma ótima atividade da lipase imobilizada (aproximadamente 100 U/g de suporte) reduzindo, com isso, o custo com o fornecimento da lipase livre e o tempo de processo.

Na parte II da tese, a lipase tanto na sua forma livre (solúvel no sobrenadante), quanto na forma imobilizada, foram caracterizadas exatamente nas mesmas condições. Comparando-se a lipase livre com a imobilizada analisada neste projeto, esta última apresentou maior estabilidade frente às condições testadas. Este fato deve-se provavelmente a interação entre o suporte e a enzima que possibilitou a fixação da lipase com uma conformação adequada permitindo que o seu sítio ativo encontre-se completamente exposto ao meio, e ainda, por ela provavelmente estar imobilizada dentro dos poros do suporte, houve uma maior proteção da enzima em condições mais desnaturantes.

Após a otimização do processo de imobilização e a caracterização da lipase imobilizada, foi testada a capacidade de reutilização do catalisador heterogêneo em reações de hidrólise. Constatou-se significativa perda de atividade na primeira reutilização deste catalisador. Esta perda de atividade pode estar relacionada à fácil desadsorção da enzima neste tipo de imobilização devido à interação fraca entre enzima e o suporte, ou ação de algum agente do meio reacional neste catalisador. Como a atividade de hidrólise da lipase é medida utilizando-se o substrato *p*-nitrofenilpalmitato em meio contendo, entre outras substâncias, 0,1 % do detergente Triton X-100, sugere-se que possivelmente este surfactante esteja agindo sobre a lipase imobilizada desadsorvendo-a do suporte.

Estudos verificaram que surfactantes podem expelir a enzima da interface hidrofóbica a qual ela esteja ligada (Reis *et al.*, 2009). Conseqüentemente, a interação entre a enzima e o surfactante exerce um importante impacto na

regulação da catálise da lipase (Reis *et al.*, 2009). Detergentes podem ser utilizados para desestabilizar dímeros de lipase (lipase-lipase) que se formam pela interação das formas ativas destas duas enzimas que interfacialmente se ligam uma a outra (Cabrera *et al.*, 2007).

Cabrera *et al.* (2008), a fim de provar que a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) imobilizada por adsorção em um suporte de octil agarose, e a Novozyme 435, que é a CAL-B imobilizada por adsorção em uma resina acrílica polimérica macroporosa, foram realmente imobilizadas através de interações hidrofóbicas, verificaram quanto de enzima se desadsorvia do suporte quando incubada com Triton X-100. Cabrera *et al.* (2008) verificaram que lipase CAL-B foi totalmente desadsorvida do suporte quando incubada com 1 % de Triton X 100. Já a Novozyme 435 foi desadsorvida ao ser incubada com 2 % de Triton X 100.

Por fim, depois de desenvolvido o catalisador heterogêneo, este foi analisado quanto a sua eficácia na produção de biodiesel utilizando-se a lipase imobilizada como catalisador.

Para a produção do biodiesel utilizando-se a lipase imobilizada desenvolvida neste projeto, foram testadas quatro fontes de triglicerídeos (óleo de soja, óleo de mamona, óleo residual de restaurante e gordura bovina). O óleo de soja foi selecionado por ser proveniente da maior fonte de oleaginosa do Rio Grande do Sul e ser a única fonte de óleo com grande disponibilidade de uso no Brasil (www.biodiesel.gov.br; Parente, 2003). O óleo de mamona foi selecionado por apresentar o dobro do rendimento na obtenção do óleo a partir da oleaginosa em comparação à soja, sendo o seu óleo não comestível favorecendo a sua utilização como combustível evitando, com isso, a utilização de óleos comestíveis na produção do biocombustível (Parente, 2003). A gordura bovina foi escolhida

para estudo, pois no Brasil, principalmente na região sul do país, é possível uma grande oferta de gordura bovina e de porco por ser uma região grande produtora de carne e couro sendo que grande parte desta gordura, atualmente, é descartada como resíduo gerando a necessidade de gastos com tratamento de efluente (Parente, 2003). A última fonte de triglicérido testada foi o óleo residual de restaurante. Os óleos residuais de frituras representam um enorme potencial de oferta a baixo custo, sendo o seu descarte considerado um problema para os estabelecimentos alimentícios (Smith *et al.*, 2009).

Os alcoóis mais utilizados na produção de biodiesel são os de cadeia curta como metanol, etanol, propanol e butanol. O etanol foi selecionado por ser a fonte de álcool adotada para a produção de biodiesel no país (www.biodiesel.gov.br). O metanol foi escolhido para teste, pois atualmente a produção de biodiesel, em escala industrial, é realizada utilizando-se o metanol como fonte de álcool (Soriano *et al.*, 2009; Vyas *et al.*, 2009). A última fonte de álcool testada foi o iso-propanol. O iso-propanol foi utilizado com o intuito de verificar a atuação da lipase imobilizada em alcoóis de cadeia ramificada sendo que, conforme os resultados demonstrados na tabela 9 da parte II da tese, a lipase imobilizada apresentou boa estabilidade na presença de iso-propanol.

Apesar da boa atuação da lipase imobilizada conforme a metodologia descrita no item 2.2. da parte II da tese em reações de hidrólise, a mesma não se mostrou eficaz na produção de biodiesel utilizando-se óleo de soja e etanol nas condições descritas no item 3.3 da parte III desta tese.

Acredita-se que devido o pré-tratamento do suporte na imobilização ser realizado com água e tampão aquoso e todo o processo de imobilização e lavagem do catalisador ser realizado na presença de tampão. As moléculas de

água circundaram as partículas do sólido contendo a lipase imobilizada, fazendo com que o microambiente criado entre a enzima e o suporte não se encontrasse com alto grau de hidrofobicidade, impedindo o suficiente contato dos substratos ao sítio ativo da enzima desfavorecendo a ocorrência da reação de transesterificação. Analisando-se esta desvantagem, foi desenvolvido um novo processo de imobilização, onde não houvesse pré-tratamento do suporte e que fosse utilizado um solvente apolar durante o processo a fim de proporcionar suficiente contato da lipase presente em meio aquoso com o suporte hidrofóbico; mantendo o microambiente em volta do suporte imobilizado com a polaridade ideal para a transesterificação e não fosse prejudicial à enzima. O solvente apolar selecionado foi o hexano pelo fato deste ser incapaz de retirar água da enzima desnaturando-a e ainda proporcionar uma maior emulsificação das fases do sistema permitindo suficiente contato da solução aquosa contendo a lipase com o suporte durante a imobilização (Nie *et al.*, 2006). Além do mais, neste trabalho, conforme demonstrado na tabela 9 da parte II da tese, a lipase apresentou alta estabilidade na presença de hexano. Portanto, a imobilização desta enzima foi realizada substituindo-se a água e o tampão pelo hexano.

A partir do novo processo de imobilização da lipase utilizando-se hexano (item 3.2 da parte III da tese), foi testada a eficácia desta lipase imobilizada na produção de biodiesel utilizando-se diferentes fontes de álcool e triglicerídeos como matéria-prima (item 3.3 da parte III da tese). Porém não se atingiu o equilíbrio da reação mesmo após o período de 48 h em todas as fontes de triglicerídeos e alcoóis utilizadas. O melhor resultado foi obtido quando utilizado óleo de mamona e iso-propanol na proporção molar de 1:9.

A baixa eficiência da lipase imobilizada na produção de biodiesel pode ser explicada pela perda da água essencial que permanece como uma micro-camada envolta da enzima, ocasionada pelo contato dos solventes orgânicos (etanol, metanol e iso-propanol) com a lipase imobilizada em um meio sem água. Tal desidratação pode causar uma alteração conformacional da enzima e conseqüentemente a sua desnaturação (Nie *et al.*, 2006). Provavelmente, o suporte não possibilitou a proteção da enzima perante a desnaturação por solventes orgânicos (álcool) (Antczak *et al.*, 2009).

Ranganathan *et al.* (2008) apresentaram em sua revisão muitos casos de baixa conversão de biodiesel devido à inibição da lipase causada pela presença do metanol, mesmo em condições mínimas como 1:5 (proporção molar entre óleo e álcool). Rendimentos próximos a zero também foram observados por Al-Zuhair *et al.* (2009) na produção de biodiesel utilizando-se óleo residual e metanol como matéria-prima e como catalisador as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *Candida antarctica* imobilizadas.

Macario *et al.* (2009) também observaram uma perda da atividade da lipase na produção de biodiesel utilizando-se como matéria-prima o metanol e a trioleína e a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em micelas de surfactantes como catalisador. O máximo rendimento obtido foi de 60 % na proporção molar de trioleína/ metanol de 1:3, sendo que nas proporções molares de trioleína/ metanol de 1:6 e 1:9 os rendimentos observados foram de 30 % e 35 %, respectivamente. Macario *et al.* (2009) sugere que o suporte não foi capaz de proteger a enzima de quantidades maiores de álcool. Também foi observado por Nie *et al.* (2006) que a adição de metanol em proporções maiores que 1:1 (álcool:óleo) promoviam a

desnaturação da enzima, porém ao se adicionar uma quantidade maior de álcool de forma graduada (3 etapas), no processo, atingiu-se o rendimento de 95 %.

Além da baixa atividade de transesterificação demonstrada pela lipase imobilizada nesta tese possivelmente ter sido causada pela ação do álcool na enzima, sugere-se que, possivelmente, não houve suficiente miscibilidade entre as três fases formadas neste sistema (triglicerídeo, álcool e catalisador sólido) impedindo a atuação da lipase imobilizada.

Álcool, triglicerídeo e catalisador sólido são fases imiscíveis sendo que a transferência de massa entre as fases na reação de transesterificação para produção de biodiesel se torna um fator importante que pode influenciar no grau de conversão do produto (Guan *et al.*, 2009). Ranganathan *et al.* (2008) comentam que, sem uma eficiente mistura das três fases através da adição de co-solventes ou alta agitação, não há atuação da lipase. Porém, acredita-se que, no caso da lipase imobilizada, a agitação não pode ser muito alta a fim de permitir suficiente contato dos substratos à enzima. Guan *et al.* (2009) também sugerem a utilização de co-solventes na produção de biodiesel a fim de aumentar a miscibilidade entre as fases, propiciando a transferência de massa mesmo na catálise alcalina e ácida.

Segundo Nie *et al.* (2006), na produção de biodiesel utilizando-se lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada, metanol e etanol e diversas fontes de óleo na presença de um co-solvente (n-hexano), obteve-se em todos os casos um rendimento maior que 95 %. Nie *et al.* (2006) testaram ainda a utilização de lipase de *Candida sp.* imobilizada por adsorção em membrana têxtil e verificaram que solventes apolares como o hexano são capazes de proporcionar uma maior emulsificação das fases do sistema aumentando a taxa de conversão de

biodiesel. A maior taxa foi obtida utilizando-se n-hexano (96 %) seguido de heptano (94 %).

A fim de sobrepujar as desvantagens verificadas neste trabalho, estabeleceu-se a realização da produção de biodiesel utilizando-se hexano como co-solvente (item 3.4.) para melhorar a transferência de massa entre as três fases da mistura e realizar a adição do álcool em duas etapas a fim de evitar a desnaturação da enzima. Contudo, apesar das ações tomadas visando aumentar a eficiência do catalisador na produção de biodiesel, não se verificou melhora de atividade da lipase imobilizada nas reações de transesterificação realizadas conforme explicitado no item 4.2 da parte III da tese. Sugere-se que o ponto limitante é a transferência de massa entre as três fases formadas e a ação do álcool como desnaturante. Portanto, indica-se como perspectiva para futuros projetos a utilização de maiores concentrações de hexano no processo e uma adição de álcool de forma mais gradual. Deve-se salientar, no entanto, que a utilização do catalisador heterogêneo desenvolvido neste projeto faz-se viável em outras aplicações industriais como na formulação de fármacos, cosméticos e alimentos.

Acredita-se que as lições aprendidas a partir deste trabalho possam ser utilizadas como base para novos estudos possibilitando a exploração de novas metodologias que alcancem um maior sucesso.

6. CONCLUSÃO

A fermentação da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) para produção da lipase em escala de 14 L mostrou-se com uma boa relação custo/benefício, demonstrando que a ampliação da produção da enzima para escala industrial pode se tornar uma alternativa viável e economicamente atrativa.

A lipase da levedura *P. hubeiensis* (HB85A) foi imobilizada por adsorção hidrofóbica em suporte de poliestireno-divinilbenzeno por processo contínuo em reator de leito fixo. As condições ótimas de imobilização foram: pH 4,76, razão enzima adicionada por grama de suporte de 1282 U/g-suporte e o tempo de imobilização foi de 2 h and 29 min, sendo a máxima atividade de lipase imobilizada obtida de 177,5 U/g–suporte com um rendimento de imobilização de 11 %. A temperatura ótima observada para a lipase livre e imobilizada foi de 68 °C e 52 °C, respectivamente. Os valores ótimos de pH verificados para a lipase livre e imobilizada foram de pH 4,6 and 6,0, respectivamente. A imobilização da lipase proporcionou um aumento na estabilidade da enzima em altas temperaturas, pH neutros e ácidos, na presença de detergentes não-iônicos e solventes orgânicos.

Em relação ao processo de imobilização, nossos resultados demonstram que o modelo de bioreactor contínuo utilizado neste estudo se mostrou simples, economico e efetivo, provando ser uma técnica útil para o aumento da estabilidade da enzima, fazendo com que esse sistema se torne atrativo para aplicações industriais.

7. PERSPECTIVAS

- Determinar a melhor concentração de co-solvente (hexano e heptano) necessária para produção de biodiesel utilizando-se a lipase imobilizada como catalisador;
- analisar a máxima proporção de álcool (metanol, etanol e iso-propanol) que pode ser adicionada, em uma única etapa, na produção de biodiesel utilizando-se a lipase imobilizada como catalisador;
- constatar a quantidade ótima de enzima imobilizada a ser utilizada no processo;
- determinar o melhor tempo e temperatura de reação de transesterificação;
- a partir das melhores condições e matérias-primas para produção de biodiesel, realizar a produção do biocombustível em processo contínuo;
- produzir biodiesel, em maior escala, utilizando a lipase imobilizada como catalisador;
- testar o catalisador heterogêneo desenvolvido em uma planta industrial de biodiesel.

8. REFERÊNCIAS

- Abramian, L., El-Rassy, H. (2009) Adsorption Kinetics and Thermodynamics of Azo-Dye Orange II onto Highly Porous Titania Aerogel. *Chem Eng J (in press)*.
- Agarwal, D., Kumarb, L., Agarwal, A.K. (2008) Performance evaluation of a vegetable oil fuelled compression ignition engine. *Renewable Energy* 33, 1147–1156.
- Albuquerque, M.C.G., Machado, Y.L., Torres, A.E.B., Azevedo, D.C.S., Cavalcante, C.L., Firmiano, L.R.Jr., Parente, E.J.S.Jr. (2009) Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renewable Energy* 34, 857–859.
- Al-Zuhair, S., Dowaidar, A., Kamal, H. (2009) Dynamic Modeling of Biodiesel Production from Simulated Waste Cooking Oil Using Immobilized Lipase. *Biochem. Eng. J. (in press)*.
- Antczak, M.S., Antczak, A.K., Bielecki, T.S. (2009) Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34, 1185–1194.
- Aryee, A.N.A., Simpson, B.K., Villalonga, R. (2007) Lipase fraction from the viscera of grey mullet (*cephalus*) isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 394–402.
- Arzamendi, G., Campo, I., Arguinarena, E., Sanchez, M., Montes, M., Gandia, L.M. (2007) Synthesis of biodiesel with heterogeneous NaOH/alumina catalysts: Comparison with homogeneous NaOH. *Chem. Eng. J.* 134, 123–130.

- Bouaid, A., Martinez, M., Aracil, J. (2007) A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. *Chem. Eng. J.* 134, 93–99.
- Bouaid, A., Martinez, M., Aracil, J. (2009) Production of biodiesel from bioethanol and *Brassica carinata* oil: Oxidation stability study. *Bioresour. Technol.* 100, 2234–2239.
- Briggs, M.S., Pearson, J. (2005) Biodiesel Handout for 2005 New Hampshire Science Teacher's Association Workshop UNH Biodiesel Group <http://www.unh.edu/p2/biodiesel>.
- Cabrera, Z., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2007) Partial and enantioselective hydrolysis of diethyl phenylmalonate by immobilized preparations of lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1280–1285.
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M. (2008) Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B–Enzym.* (*in press*).
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M. (2009) Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification. *Process. Biochem.* 44, 226–231.
- Candeia, R.A., Silva, M.C.D., Carvalho Filho, J.R., Brasilino, M.G.A., Bicudo, T.C., Santos, I.M.G., Souza, A.G. (2009) Influence of soybean biodiesel content on basic properties of biodiesel–diesel blends. *Fuel* 88, 738–743.

- Cao, X., Yang, J., Shu, L., Yu, B., Yan, Y. (2009) Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues. *Process. Biochem.* 44, 177–182.
- Chang, S.W., Shaw, J.F., Yang, C.K., Shieh, C.J. (2007) Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. *Process. Biochem.* 42, 1362–1366.
- Chaubey, A., Parshad, R., Taneja, S.C., Qazi, G.N. (2009) *Arthrobacter* sp. lipase immobilization on magnetic sol–gel composite supports for enantioselectivity improvement. *Process. Biochem.* 44, 154–160.
- Cheirsilp, B., Kittikun, A.H., Limkatanyu, S. (2009) Impact of Transesterification Mechanisms on the Kinetic Modeling of Biodiesel Production by Immobilized Lipase. *Biochem. Eng. J.* (*in press*).
- Chen, B., Miller, E.M., Gross, R.A. (2007) Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida Antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity. *Langmuir.* 23, 6467-6474.
- Chisti, Y. (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126-131.
- Ciftci, O.N., Fadıloglu, S., Gögüs, F. (2009) Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. *Bioresour. Technol.* 100, 324–329.
- Dizge, N., Keskinler, B., Tanriseven, A. (2008) Attachment of microbial lipase onto microporous styrene–divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 66, 34–38.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B. (2009) Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils

by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresour. Technol.* 100, 1983–1991.

Easterling E.R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M. (2008) The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresour. Technol.* [Epub ahead of print].

Feltre, R. (1988) *Química*. Ed. Moderna: São Paulo, Brasil.

Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Cabrera, Z., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 565–569.

Ghamgui, H., Miled, N., Karra-chaabouni, M., Gargouri, Y. (2007) Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. *Biochem. Eng. J.* 37, 34–41.

Guan, G., Sakurai, N., Kusakabe, K. (2009) Synthesis of biodiesel from sunflower oil at room temperature in the presence of various cosolvents. *Chem Eng J* 146, 302–306.

Halim, S.F.A., Kamaruddin, A.H., Fernando, W.J.N. (2009) Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresour. Technol.* 100, 710–716.

Han, Minghan., Yi, W., Wu, Q., Liu, Y., Hong, Y., Wang, D. (2009) Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Brønsted acidic ionic liquid *Bioresour. Technol.* 100, 2308–2310.

- Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L.T. (2008) Sol–gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 50, 80-86.
- Hasan, S.D.M., Melo, D.N.C., Filho, R.M. (2005) Simulation and response surface analysis for the optimization of a three-phase catalytic slurry reactor. *Chem. Eng. Process.* 44, 335–343.
- Hernandez-Martín, E., Otero, C. (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresour. Technol.* 99, 277–286.
- Huang, X.-J., Ge, D., Xu, Z.-K. (2007) Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *Eur. Polym. J.* 43, 3710–3718.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH* 16, 396-403.
- Kovalenko, G.A., Perminova, L.V., Chuenko, T.V., Rudina, N.A. (2009) Adsorptive immobilization of enzymatic active substances on alumina–silica foam coated by carbon nanofibers. *Carbon* 47, 420-427.
- Laszlo, J.A., Evans, K.O. (2007) Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 48, 84–89.
- Lei, Lin., Yong, X.B., Yan, F.L., Liu, X.Y., Yong, Y., Chungu, X. (2009) Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *J Magn. Mater.* 321, 252–258.

- Li, H., Shen, B., Kabalu, J.C., Nchare, M. (2009) Enhancing the production of biofuels from cottonseed oil by fixed-fluidized bed catalytic cracking. *Renewable Energy* 34, 1033–1039.
- Liang, X., Gong, G., Wu, H., Yang, J. (2009) Highly efficient procedure for the synthesis of biodiesel from soybean oil using chloroaluminate ionic liquid as catalyst. *Fuel* 88 (2009) 613–616
- Lima, D.O., Vergílio, P.S, Tânia, C.C.C. (2006) Uma análise sobre o mercado mundial do biodiesel. (www.sober.org.br).
- Liu, C.H., Chang, Jo-Shu. (2008) Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous *Burkholderia* sp. C20. *Bioresour. Technol.* 99, 1616–1622.
- Lu, J., Chen, Y., Wang, F., Tan, T. (2009) Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 122–125.
- Macario, A., Moliner, M., Corma, A., Giordano, G. (2009) Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater.* 118, 334–340.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. (2008) Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Process. Technol.* 89, 740-748.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451–1463.
- Miletic, N., Vukovi, Z., Nastasovi, A., Loos, K. (2009) Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile

- immobilization supports for biocatalysts. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 196–201.
- Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T. (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 43, 142–147.
- Oliveira, A.P., Villa, R.D., Antunes, K.C.P., Magalhães, A.S., Edinaldo, C. (2009). Determination of sodium in biodiesel by flame atomic emission spectrometry using dry decomposition for the sample preparation. *Fuel* 88, 764–766.
- Othman, S.S., Basri, M., Hussein, M.Z., Rahman, M.B.A., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Jasmani, H. (2008). Production of highly enantioselective menthyl butyrate using *Candida rugosa* lipase immobilized on epoxy-activated supports. *Food Chem.* 106, 437–443.
- Ozsezen, A.N., Canakci, M., Turkcan, A., Sayin, C. (2009). Performance and combustion characteristics of a DI diesel engine fueled with waste palm oil and canola oil methyl esters. *Fuel* 88, 629–636.
- Ozturk, N., Akgol, S., Arisoy, M., Denizli, A. (2007) Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres. *Sep. Purif. Technol.* 58, 83–90.
- Ozyilmaz, G. (2009) The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 56, 231–236.
- Parente, E.J.S. (2003) Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. Ed. Unigráfica: Fortaleza, Brasil.
- Pousa, G.P.A., G, Santos, A.L.F., Suarez, P.A.Z. (2007). History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy* 35, 5393–5398.

- Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 99, 3975–3981.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 147-148, 237-250.
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. (2005). Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Ed. Casa do Pão: Campinas, Brasil.
- Secundo, F., Miehe-Brendle, J., Chelaru, C., Ferrandi, E.E., Dumitriu, E. (2008) Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 350–361.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627–662.
- Smith, P.C., Ngothai, Y., Nguyen, Q.D., O'Neill, B.K. (2009) Alkoxylation of biodiesel and its impact on low-temperature properties. *Fuel* 88, 605–612.
- Solazyme, Chevron (2008) Focus on Catalysis: Enzymes for industrial applications. *Catal. Commun.* 9, 1050. Business Communications Co, Inc, 40 Washington St, Wellesley, MA 02481, USA. Website: <http://www.bccresearch.com>.
- Soriano, N.U.Jr., Venditti, R., Argyropoulos, D.S. (2009) Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel* 88, 560–565.
- Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G., Sahin, F. (2007) Preparation and application of poly(*N,N*-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/κ-Carrageenanhydrogels for immobilization of lipase. *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 281–285.
- Vaidya, B.K., Ingavle, G.C., Ponrathnam, S., Kulkarni, B.D., Nene, S.N. (2008) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(allyl glycidyl ether-co-

- ethylene glycol dimethacrylate) macroporous polymer particles. *Bioresour. Technol.* 99, 3623–3629.
- Vyas, A.P., Subrahmanyam, N., Patel, P.A. (2009). Production of biodiesel through transesterification of *Jatropha* oil using KNO_3/Al_2O_3 solid catalyst. *Fuel* 88, 625–628.
- Wachsmann, U., Wood, R., Lenzen, M., Schaeffer, R. (2009) Structural decomposition of energy use in Brazil from 1970 to 1996. *Appl. Energy* 86, 578–587.
- Wen, D., Jiang, H., Zhang, K. (2009) Supercritical fluids technology for clean biofuel production. *Prog. Nat. Sci.* (*in press*).
- Yagiz, F., Kazanc, D., Akin, A.N. (2007). Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chem. Eng. J.* 134, 262–267.
- Yang, H.-H., Chien, S.-M., Lo, M.-Y., Lan J.C.-W., Lu, W.-C., Ku, Y.-Y. (2007). Effects of biodiesel on emissions of regulated air pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons under engine durability testing. *Atmos. Environ.* 41, 7232–7240.
- Yazdani, S.S., Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 213–219.
- Ye, P., Jiang, J., Xu, Z-K. (2007) Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 60, 62–67.
- Yu, D.Z.W., Zhao, L., Cheng, Y., Cao, S. (2007). Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. lipase *J. Mol. Catal., B Enzym.* 48, 64–69.

- Zhou, G., Chen, Y., Yang, S. (2009) Comparative studies on catalytic properties of immobilized *Candida rugosa* lipase in ordered mesoporous rod-like silica and vesicle-like silica. *Microporous and Mesoporous Mater.* 119, 223–229.
- Zhu, L.Y., Zong, M.H., Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour Technol.* 99: 7881-7885.