

LIZZY AYRA PEREIRA ALCÂNTARA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CRIOGEL SUPERMACROPOROSO
PARA A SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A347i
2013 Alcântara, Lizzy Ayra Pereira, 1985-
Imobilização de lipase em criogel supermacroporoso para a
síntese de lipídios estruturados / Lizzy Ayra Pereira Alcântara. –
Viçosa, MG, 2013.
x, 92f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Luis Antônio Minim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Imobilização. 2. Lipase. 3. Lipídios. 4. Polimerização.
5. Alimentos - Qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22. ed. 664.02

LIZZY AYRA PEREIRA ALCÂNTARA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EM CRIOGEL SUPERMACROPOROSO
PARA A SÍNTESE DE LIPÍDIOS ESTRUTURADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADO: 4 de dezembro de 2013.

Fábio Coelho Sampaio

Monique Renon Eller

Maria do Carmo Hespanhol da Silva
(Coorientadora)

Paulo Henrique Alves da Silva

Luis Antonio Minim
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Jeová, Deus, o Autor da vida, o Amado Pai, o Grande EU SOU, te agradeço pelas suas misericórdias que se renovam a cada manhã, te agradeço pelo seu amor derramado em minha vida, agradeço as bênçãos concedidas, agradeço a graça e paz consoladora nos momentos difíceis. Toda honra, toda glória, todo louvor sejam dados a Ti Senhor!

Aos meus pais, José e Iara, e aos meus irmãos, Abraão e Isaque, por tamanho amor e por me ajudarem a progredir na carreira da fé;

Ao meu esposo, Marcio, por todo amor e apoio incondicional;

A todos da família Alcântara Veríssimo, por todo incentivo e apoio;

Ao Professor Luis Antonio Minim, pela confiança e orientação;

Aos Professores Fábio Coelho Sampaio, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Monique Renon Eller e Paulo Henrique Alves da Silva, pelas sugestões, colaboração e participação na banca de defesa da tese;

Ao CNPq, pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida;

Às companheiras de trabalho Lílian, Marcinha, Milene e Vanessa, pela amizade e companherismo;

Às estagiárias Wanêscy, Mayara e Viviane, pela ajuda e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos da UFV;

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelos serviços prestados;

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade e condições de realização do trabalho;

À Prozyn BioSolution, pelo fornecimento das amostras de lipases;

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Lizzy Ayra Pereira Alcântara, filha de José da Silva Alcântara e Iara Pereira da Encarnação Alcântara, nasceu em Teófilo Otoni, Minas Gerais, no dia 21 do mês de abril de 1985.

Em maio de 2003, iniciou o curso de graduação em Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, colando grau em fevereiro de 2008. No mês seguinte, em março de 2008, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, e em julho de 2009 concluiu com êxito o mestrado.

Em agosto de 2009 iniciou o doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV. Em dezembro de 2013 defendeu a presente tese, obtendo o título de *Doctor Scientiae*.

RESUMO

ALCÂNTARA, Lizzy Ayra Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Imobilização de lipase em criogel supermacroporoso para a síntese de lipídios estruturados.** Orientador: Luis Antonio Minim. Coorientadores: Valéria Paula Rodrigues Minim e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

A exigência atual por alimentos com elevada qualidade nutricional e sensorialmente atraentes têm tornado a tecnologia enzimática uma alternativa cada vez mais atrativa. Neste contexto, a modificação da composição dos triacilgliceróis por meio de reações enzimáticas de interesterificação é uma alternativa para a obtenção de lipídios com características nutricionais, sensoriais e tecnológicas superiores. Para esse propósito é interessante a aplicação de lipases (E.C.3.1.1.3) na sua forma imobilizada devido a vantagens como a reutilização do biocatalisador, a facilidade de separação do produto final e o potencial para aplicações em processos contínuos. Recentemente, os criogéis supermacroporosos têm despontado como potenciais suportes para a imobilização de enzimas por apresentar características de interesse tecnológico como excelente biocompatibilidade, baixo custo de aquisição e alta porosidade de estrutura, o que facilita o processo de escoamento e de transferência de massa. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um novo biorreator enzimático constituído de lipases de *Aspergillus niger* (ANL) confinadas por meio do processo de polimerização “*in situ*” em um criogel de poliacrilamida supermacroporoso, visando a síntese de lipídios estruturados. Inicialmente, as lipases de *Aspergillus niger* em sua forma livre foram caracterizadas em relação a sua atividade hidrolítica e de esterificação na síntese do butirato de butila, um aroma de interesse industrial. Para isso, empregou-se um delineamento composto central de face centrada (DCCF) a fim de avaliar o efeito dos parâmetros reacionais temperatura (°C), razão molar de substrato (ácido butírico:n-butanol) e conteúdo de água (% (v/v)) adicionada sobre o rendimento de esterificação (Y). Verificou-se que o uso de uma maior concentração molar de n-butanol em relação à concentração de ácido butírico proporcionou um efeito positivo sobre Y , enquanto que o aumento da temperatura foi prejudicial para a síntese do aroma. A adição de água também favoreceu o rendimento de esterificação (%). Por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR) verificou-se que um

rendimento máximo de esterificação (98,8%) foi obtida na condição de temperatura de 40,0 °C, razão molar de substrato de 1:2,41 (ácido:álcool) e conteúdo de água adicionada de 1,05% (v/v). Em seguida, as lipases foram imobilizadas por meio do confinamento em um criogel monolítico supermacroporoso. O sistema imobilizado (biorreator) foi caracterizado em termos das suas propriedades morfológicas e parâmetros de imobilização. Também foi avaliado o efeito da adição de aditivos estabilizantes (polietilenoglicol de massa molar média de 1500 g/mol, Triton X-100 e Tween 80), durante a etapa de imobilização, nos parâmetros de imobilização e propriedades morfológicas. O uso de aditivos estabilizantes não alterou as propriedades morfológicas dos criogéis ($p > 0,05$), enquanto que o emprego do aditivo triton X-100 resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade hidrolítica aparente (U/g_{criogel}), no rendimento de imobilização (%) e no conteúdo de proteína imobilizada ($mg_{\text{proteína}}/g_{\text{criogel}}$). Avaliou-se também o desempenho do biorreator na síntese do butirato de butila e em reações de interesterificação. Por meio MSR verificou-se que o rendimento máximo de esterificação (46,1%) na síntese do butirato de butila foi obtido na condição reacional de 40,0 °C, razão molar de substrato de 1:1,43 (ácido:álcool) e conteúdo de água adicionada de 65% (v/v). O maior rendimento de interesterificação (17,35%) foi obtido no meio reacional contendo 15 mmol/L de tripalmitina e 15 mmol/L trioleína, conteúdo de água adicionada de 35% (v/v) e a temperatura de 40 °C. Estes resultados indicam que o biorreator desenvolvido é um promissor biocatalisador para aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

ALCÂNTARA, Lizzy Ayra Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2013. **Lipase immobilization in supermacroporous cryogel for the synthesis of structured lipids.** Adviser: Luis Antonio Minim. Co-advisers: Valéria Paula Rodrigues Minim and Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

The current requirements for foods with high nutritional quality and sensory attractive has become the enzyme technology an attractive alternative compared to the conventional chemical processes. In this context, the modification of the triglycerides composition through enzymatic interesterification reactions is an alternative for obtaining lipids with high nutritional, sensory and technological properties. For this purpose is interesting the use of lipases (E.C.3.1.1.3) in its immobilized form due to advantages such as the reuse of the biocatalyst, ease separation of the final product and the potential for applications in continuous processes. Recently, the supermacroporous cryogels have emerged as potential supports for enzyme immobilization for presenting characteristics of technological interest as excellent biocompatibility, low cost and highly porous structure which facilitates the flow process and mass transfer. In this work we developed a new enzymatic bioreactor consisting of *Aspergillus niger* (ANL) lipase entrapped into a polyacrylamide based supermacroporous cryogels by "in situ" polymerization for the synthesis of structured lipids. Initially, free lipases from *Aspergillus niger* were characterized in terms to their hydrolytic and esterification activity in the synthesis of butyl butyrate, an flavor of industrial interest. For this purpose, it was used a central composite face-centered design (CCFD) in order to evaluate the effect of reaction parameters temperature (°C), substrate molar ratio (butyric acid:n-butanol) and added water (% (v/v)) on the esterification yield (Y). It has found that the use of a higher molar concentration of n-butanol in relation to the molar concentration of butyric acid promoted a positive effect on Y while increasing the temperature was detrimental for the flavor synthesis. The addition of water also favored the esterification yield (%). Through the Response Surface Methodology (RSM) it was found that a maximum yield of esterification (98.8%) was obtained in the condition of temperature at 40.0 °C, substrate molar ratio of 1:2.41 (acid:alcohol) and added

water of 1.05 % (v/v). Then, lipases were entrapped in a supermacroporous monolith cryogel. The immobilized system (bioreactor) was characterized in terms of their morphological properties and immobilization parameters. The effect of addition of stabilizing additives (polyethylene glycol of molar mass 1500 g/mol, Triton X-100 and Tween 80) in the parameters of immobilization and morphological properties was also evaluated. The use of stabilizing additives did not alter the morphological properties of cryogels ($p>0.05$), while the use of the additive Triton X-100 resulted in a significant increase ($p<0.05$) in the apparent hydrolytic activity ($\text{U/g}_{\text{cryogel}}$), immobilization yield (%) and the immobilized protein content ($\text{mg}_{\text{protein/g}_{\text{cryogel}}}$). It was also evaluated the performance of the bioreactor in the synthesis of butyl butyrate and interesterification reactions. Through the RSM it was found that the maximum yield of esterification (46.1%) in the synthesis of butyl butyrate was obtained in the reaction condition at 40.0 °C, substrate molar ratio of 1:1.43 (acid:alcohol) and added water of 65 % (v/v). A higher interesterification yield (17.35 %) was obtained in the reaction medium containing 15 mmol/L of tripalmitin and 15 mmol/L of triolein, added water content of 35 % (v/v) and 40 °C. These results indicated that the bioreactor developed is a promising biocatalyst for biotechnological applications.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Lipídios estruturados	3
1.2 Lipases	4
1.2.1 <i>Reações catalisadas por lipases</i>	7
1.2.2 <i>Aplicação das lipases na indústria de alimentos</i>	8
1.3 Imobilização de enzimas	10
1.4 Métodos de imobilização	11
1.4.1 <i>Imobilização por confinamento</i>	12
1.4.2 <i>Imobilização por adsorção</i>	14
1.4.3 <i>Imobilização por ligação covalente</i>	17
1.5 Adição de aditivos estabilizantes	19
1.6 Tipos de suportes e suas ativações	20
1.6.1 <i>Monólito de criogel</i>	22
1.6.1.1 Ativação de suportes contituídos de monólito de criogel	24
1.6.1.2 Aplicação do criogel na imobilização de enzimas	27
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	40
PRODUCTION OF FLAVOR ESTERS CATALYSED BY ASPERGILLUS NIGER LIPASE: INFLUENCE OF REACTION PARAMETERS ON THE ESTERIFICATION YIEL	40
<i>Abstract</i>	40
1. INTRODUCTION	41
2. MATERIALS AND METHODS	42
2.1. Materials and reagents	42
2.2. Total protein determination	43
2.3. Assay of synthesis activity	43
2.4. Experimental design and statistical analysis	44
3. RESULTS AND DISCUSSION	45
3.1. Experimental design, model fitting and ANOVA	45

3.2.	Effect of reaction parameters on esterification yield.....	49
3.2.1.	<i>Effect of water</i>	49
3.2.2.	<i>Effect of substrate molar ratio</i>	50
3.2.3.	<i>Temperature effect</i>	51
4.	CONCLUSION	52
5.	REFERENCES.....	52
CAPÍTULO 3		57
DEVELOPMENT OF A BIOREACTOR BASED ON ENTRAPPED LIPASE INTO A SUPERMACROPOROUS MONOLITHIC CRYOGEL: APPLICATION IN HYDROLYSIS, ESTERIFICATION AND INTERESTERIFICATION REACTIONS		57
<i>Abstract</i>		57
1.	INTRODUCTION	58
2.	MATERIALS AND METHODS	61
2.1.	Materials and reagents	61
2.2.	Preparation of the cryogel column containing entrapped lipases.....	61
2.3.	Determination of protein content immobilized into the cryogel matrix.....	62
2.4.	Assay of hydrolytic activity assay	62
2.5.	Determination of immobilization parameters.....	63
2.6.	Morphological characterization of lipase-immobilized into cryogel	63
2.6.1.	<i>Porosity (ϕ), water fraction (ϕ_w) and degree of swelling (S)</i>	63
2.6.2.	<i>Scanning electron microscopy (SEM)</i>	64
2.6.3.	<i>Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy</i>	64
2.7.	Bioreactor performance on esterification reactions.....	65
2.7.1.	<i>Quantification of butyric acid and butyl butyrate</i>	65
2.7.2.	<i>Operational stability of the bioreactor</i>	67
2.8.	Bioreactor performance on interesterification reactions	66
2.8.1.	<i>Quantification of free fatty acids and triglycerides</i>	66
2.9.	Experimental design and statistical analysis	67
3.	RESULTS AND DISCUSSION	69
3.1.	Effect of additives on immobilization parameters and morphological properties	69
3.2.	Bioreactor performance on ester synthesis.....	73
3.3.	Operational stability of biocatalysts	78

3.4. Bioreactor performance on interesterification reactions	79
4. CONCLUSION.....	81
5. REFERENCES.....	82
CONCLUSÕES GERAIS	92

INTRODUÇÃO GERAL

Existe uma tendência atual de crescimento da demanda por alimentos com apelação funcional, ou seja, que atuem preferencialmente na promoção de efeitos fisiológicos benéficos à saúde e que, ao mesmo tempo, sejam sensorialmente atraentes. Neste contexto, a modificação da posição dos ácidos graxos nas moléculas de triacilglicerol, por meio de reações enzimáticas de interesterificação é uma alternativa para a obtenção de lipídios com características nutricionais, sensoriais e tecnológicas para fins específicos.

A síntese de lipídios estruturados é um desafio tecnológico no desenvolvimento de produtos nutricionalmente superiores. Apesar do histórico de pesquisa nesta área, existe a necessidade de otimizar as condições reacionais de interesterificação, a fim de aumentar o rendimento global do processo, bem como desenvolver métodos de catálise enzimática de maneira economicamente viável e preditível.

A utilização de enzimas imobilizadas no processo de interesterificação é uma alternativa viável, uma vez que os custos de reaquisição do catalisador são minimizados. Ademais, a imobilização de enzimas apresenta vantagens como a prevenção de perdas mássicas de enzima e da geração de subprodutos indesejáveis, como nos processos químicos tradicionais; a facilidade de separação do produto final sem etapas adicionais de purificação; e o potencial de aplicação em processos contínuos via reatores empacotados, fluidizados ou colunas monolíticas.

Uma decisão importante para se estabelecer um método de imobilização enzimática é a escolha do suporte. Esta decisão é ainda mais complexa na aplicação de lipases, principalmente em reações enzimáticas envolvendo substratos como óleos e gorduras, uma vez que esses apresentam, naturalmente, alta viscosidade, o que dificulta os processos de escoamento e transferência de massa.

Apesar de existir uma grande variedade de suportes para imobilização de lipases, cada aplicação necessita de condições operacionais específicas. Portanto, existe uma constante busca pelo desenvolvimento de novos suportes e métodos para a imobilização enzimática.

Um suporte com potencialidades para a aplicação em imobilização enzimática é o criogel monolítico supermacroporoso devido à sua excelente biocompatibilidade,

ao baixo custo de aquisição, às potencialidades para aplicações comerciais diretas, à elasticidade, resistência química e física e alta porosidade de estrutura, o que resulta em elevada permeabilidade ao escoamento e baixa resistência à transferência de massa.

Assim, o objetivo neste trabalho foi desenvolver um biorreator enzimático constituído de lipase de *Aspergillus niger* confinada numa matriz de criogel supermacroporoso, para a aplicação em sistemas de esterificação e interesterificação.

Para isso, inicialmente foi avaliada a performance da lipase de *Aspergillus niger*, em sua forma nativa, como biocatalisador da reação de síntese do éster aromático butirato de butila.

Posteriormente, foi descrito o processo de obtenção do biorreator enzimático por meio da imobilização das lipases de *Aspergillus niger* na matriz do criogel via confinamento e o biorreator obtido foi aplicado em reações de síntese do butirato de butila.

E, por fim, o biorreator desenvolvido foi aplicado em reações de síntese de lipídios estruturados em um sistema reacional modelo de interesterificação, empregando como substratos de partida tripalmitina e trioleína.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Lipídios estruturados

Os lipídios estruturados são triacilgliceróis reestruturados ou modificados para alterar a composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol por métodos químicos, enzimáticos ou por engenharia genética (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2003; KIM, H.-R. et al., 2010). Tais lipídios são sintetizados com a finalidade de obter lipídios nutracêuticos que conferem benefícios específicos para a saúde, ou características nutricionais desejadas como presença ou ausência de ácidos graxos saturados ou insaturados de fácil absorção e digestão e melhorar ou modificar as características físicas e químicas dos triacilgliceróis como pontos de fusão, conteúdo de gordura sólida, viscosidade, consistência e estabilidade oxidativa (SOUMANOU, M. et al., 1997; SENANAYAKE; SHAHIDI, 2003; KIM, H.-R. et al., 2010).

Sob a perspectiva de custo e aplicação em larga escala, a interesterificação química parece ser o método mais atrativo para a obtenção de lipídios estruturados (WILLIS, W.; MARANGONI, 1999). Entretanto, a utilização da interesterificação química promove uma redistribuição aleatória dos ácidos graxos e na maioria dos casos exige etapas adicionais de branqueamento e desodorização do produto final. Estas etapas podem ter efeitos nutricionais e tecnológicos indesejáveis (BALCÃO, V. M.; MALCATA, 1998); (LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011).

A interesterificação catalisada por lipases não gera os inconvenientes da via química, e tem sido empregada na modificação da gordura do leite, banha, óleo de peixe, óleo de arroz, óleo de palma, óleo de amendoim, entre outros (SOUMANOU, M. et al., 1997; JENNINGS; AKOH, 2001; D'AGOSTINI; GIOIELLI, 2002; SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, 2006; NUNES et al., 2011b). Além disso, o processo enzimático empregando lipases também apresenta a vantagem de minimizar a formação de produtos secundários devido à especificidade dessas enzimas (LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011).

Entretanto, a escolha das tecnologias de modificação lipídica adequadas dependerá da estrutura lipídica alvo, dos custos da produção e da demanda de consumo. A tecnologia da interesterificação enzimática já é uma realidade comercial, sendo as aplicações reservadas a produtos de alto valor agregado. Assim, uma

combinação das técnicas atuais de imobilização enzimática de lipases e modificação lipídica pode ser necessária para o desenvolvimento de processos mais econômicos, o que permitirá o emprego desta tecnologia em produtos de maior consumo (WILLIS, W. M.; LENCKI; MARANGONI, 1998; IWASAKI; YAMANE, 2000; AKOH, 2005; LUBARY; HOFLAND; TER HORST, 2011).

1.2 Lipases

A maioria das lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) possui dupla função, com atividade lipolítica em substratos hidrofílicos, e de esterase em ambientes hidrofóbicos (JAEGER, K. E.; EGGERT, T., 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Como serino hidrolases, esta enzima catalisa a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis, atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula e promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A síntese de acilgliceróis envolve uma série de reações de acilação e desacilação no interior do sítio ativo das lipases, conforme mostrado na Figura 1 (MARANGONI, 2002). Durante a acilação, um complexo acil-enzima, de natureza covalente, é formado pelo ataque nucleofílico da serina à carbonila do substrato. A serina é o agente nucleofílico, cujo poder de atuação é potencializado pela presença dos resíduos de histidina e ácido aspártico. Durante a reação, grupamentos acilglicerol associam-se à tríade catalítica do sítio ativo através de ligações covalentes (MARANGONI, 2002).

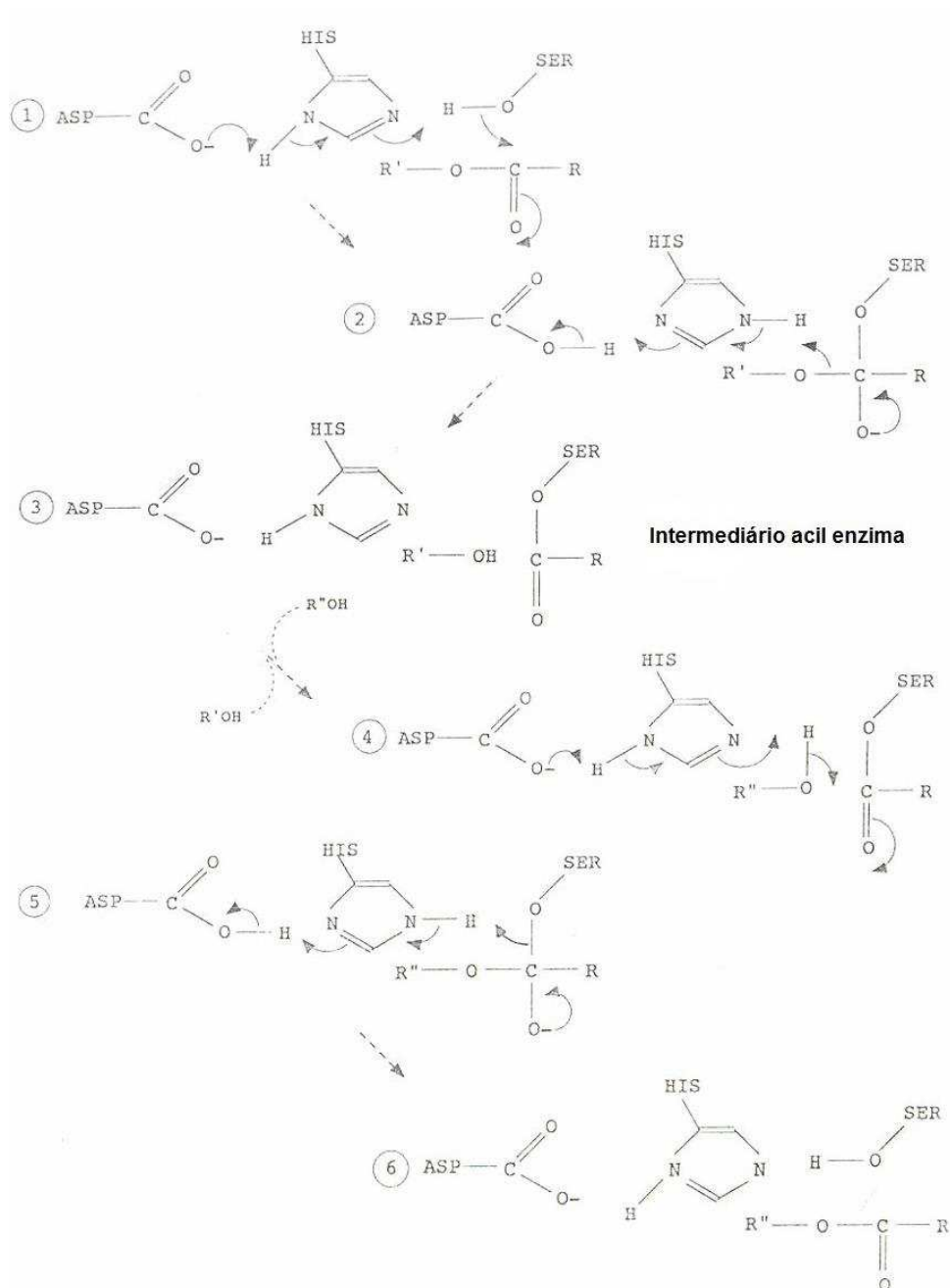


Figura 1. Reações envolvidas no sítio catalítico das lipases: mecanismo de interesterificação. Fonte:(MARANGONI, 2002).

Lipases podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal ou microbiana (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006), são solúveis em água (PETERS et al., 1996), apresentam boa resistência a diversas condições operacionais e são muito utilizadas em processos em larga escala (JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998). Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 kDa a 75 kDa, com cerca de 150 a 650 resíduos de aminoácidos, atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até

70 °C, sendo que, em sua maioria, apresentam atividade ótima entre 30 °C a 40 °C (PACKTER, 1994; JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998).

Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas e se mantêm estáveis em uma ampla faixa de pH (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Em condições naturais, as lipases atuam na interface do sistema bifásico óleo/água, na qual possuem sua atividade aumentada (VERGER, 1997; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). A atuação da lipase, durante a hidrólise de lipídios, é uma reação interfacial que ocorre na superfície bidimensional da micela e não no volume tridimensional da gotícula de óleo (VERGER, 1997). Por este motivo, reações lipolíticas envolvendo lipases não obedecem à cinética descrita pela equação de Michaelis-Menten, que somente pode ser seguida caso a reação ocorra em uma fase homogênea (JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998).

As reações catalisadas pelas lipases podem apresentar especificidade diferencial quanto à estrutura estereoquímica do substrato (PARIDA; DORDICK, 1993; CYGLER, MIROSLAW et al., 1994), quanto à posição do grupamento acila sobre o qual devem atuar na molécula do triglicerídeo (FOGLIA; CONKERTON; SONNET, 1995), quanto ao comprimento da cadeia de ácido graxo (CYGLER, M.; GROCHULSKI; SCHRAG, 1995) e quanto à presença de insaturações na cadeia (SHIMADA et al., 1995). As lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (inespecíficas ou 1,3-específicas) ou quanto à especificidade por ácidos graxos (XU, 2000), como pode ser visto a seguir:

- **Lipases inespecíficas:** atuam sobre todos os ácidos graxos, independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol, promovendo a hidrólise e produzindo tanto ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (CASTRO, H. F. D. et al., 2004);

- **Lipases 1,3 específicas:** promovem a hidrólise de ácidos graxos das posições 1 e 3, formando produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regiosseletivas (CASTRO, H. F. D. et al., 2004);

- **Lipases ácido graxo específicas:** atuam especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função do tamanho da cadeia carbônica ou da insaturação (GUPTA, R.; RATHI; BRADDOO, 2003; CASTRO, H. F. D. et al., 2004).

A versatilidade das lipases permite que essas enzimas sejam selecionadas para aplicações potenciais em diversos setores, como a indústria de alimentos,

oleoquímica, farmacêutica, tratamento de efluentes, na formulação de detergentes, síntese de biosurfactantes, entre outros (OHNISHI et al., 1994; GANDHI, 1997; LEAL et al., 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Portanto, existe uma constante demanda pelo desenvolvimento de métodos que permitam a utilização de lipases de maneira efetiva e econômica.

1.2.1 Reações catalisadas por lipases

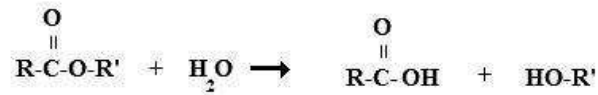
As lipases podem atuar tanto em ambientes com alto conteúdo de água, hidrolisando ligações ésteres de triglicerídeos, como em ambientes com baixo conteúdo aquoso catalisando reações de síntese (como de esterificação), transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (PACKTER, 1994; JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER, K.-E.; EGGERT, T., 2002; MAHADIK et al., 2002; REIS, P. et al., 2009). Durante a hidrólise, há consumo de água, que participa como substrato. Nas reações de síntese, como por exemplo, na formação de ésteres a partir do ácido graxo e álcool (Figura 2), a formação de água no meio reacional pode deslocar o equilíbrio da reação de esterificação para a via direta (hidrólise) e a atividade de esterificação da lipase é reduzida na medida que o conteúdo aquoso do meio aumenta. Portanto, os processos de hidrólise e síntese dependem do deslocamento do equilíbrio da reação, sendo o controle do conteúdo de água um fator crítico do processo, uma vez que este afeta diretamente a velocidade de reação, a extensão de reações paralelas de hidrólise, o rendimento de produto, a atividade enzimática e seletividade da reação (GHAZALI, H.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y., 1995; BALCÃO, V. et al., 1998).

As reações básicas de hidrólise e síntese podem ser combinadas de forma sequencial, para resultar em um conjunto de reações de transesterificação (hidrólise, acidólise e interesterificação), dependendo dos materiais de partida empregados (GHAZALI, H.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y., 1995). Assim, as seguintes reações são possíveis (CASTRO, H. F. D. et al., 2004):

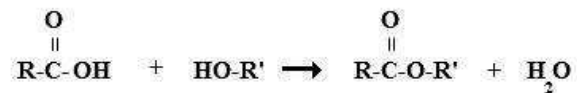
- **Acidólise:** reação na qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um ácido carboxílico.
- **Alcóólise:** reação no qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um álcool.

- **Interesterificação:** reação na qual dois grupos acilas são trocados entre dois acilgliceróis.

HIDRÓLISE



ESTERIFICAÇÃO

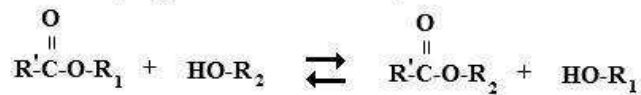


TRANSESTERIFICAÇÃO

Acidólise (reação entre éster e ácido graxo)



Alcoólise (reação entre éster e álcool)



Interesterificação (reação entre éster e éster)

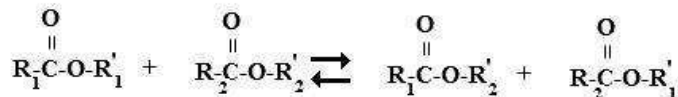


Figura 2. Reações catalisadas pelas lipases. Fonte: (CASTRO, H. F. D. et al., 2004).

Entre as reações catalisadas por lipases, a interesterificação é o processo mais utilizado para obtenção de lipídios com funções nutricionais e tecnológicas desejáveis na indústria de alimentos. Esse processo envolve a troca e a redistribuição de alguns ácidos graxos na molécula do triacilglicerol, possibilitando modificações das propriedades nutricionais e tecnológicas dos óleos e gorduras por meio de um catalisador (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 2008).

1.2.2 Aplicação das lipases na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, lipases podem ser empregadas na hidrólise seletiva de óleos e gorduras para obtenção de ácidos graxos que influenciam as propriedades físico-químicas, tecnológicas e nutricionais dos alimentos. Outra aplicação é no caso do rearranjo da posição das cadeias de ácidos graxos nos triglicerídeos ou

substituição um ou mais destes ácidos graxos por novos o que, conseqüentemente, modifica as propriedades dos lipídios presentes no alimento (JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A última aplicação tem importância para a indústria de chocolates, que busca produtos análogos à manteiga de cacau, uma vez que essa contém teores substanciais de ácido palmítico e esteárico, que lhes confere características únicas e valiosas de cristalização e de derretimento, essenciais na fabricação de produtos com ponto de fusão próximo à temperatura do corpo humano. Entretanto, o alto custo inviabiliza sua utilização em muitos produtos alimentícios e faz com que a manteiga de cacau seja substituída por outras gorduras de preços inferiores. Portanto, existe um grande interesse no desenvolvimento de produtos análogos à manteiga de cacau, o que diminuiria, por exemplo, o custo da produção do chocolate (JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). A transesterificação do óleo de palma promovida por lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas tem sido empregada comercialmente para a substituição da manteiga de cacau. Este processo foi patenteado em 1976 pela Unilever e esta tecnologia é comercializada pela Quest-Loders Croklaan (JAEGER, KARL-ERICH; REETZ, 1998).

Lipases também podem participar da aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Na indústria de laticínios, a lipase é empregada na produção de queijos que têm seu aroma intensificado, ou na produção de ésteres aromatizantes de queijo para produtos salgados e petiscos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na indústria de panificação, a utilização de lipase proporciona aumento da elasticidade e fortalecimento da massa, melhoram o volume específico e maciez do miolo e retardam o envelhecimento dos pães (GOESAERT et al., 2005; GANDRA et al., 2008). As lipases podem ainda ser aplicadas na obtenção de monoacilgliceróis, que são usados como agentes emulsificantes (FREIRE; CASTILHO, 2008); empregadas para contribuição do aroma e sabor de margarina, bebidas alcoólicas, chocolates e doces (JAEGER, K. E.; EGGERT, T., 2002); em processos como a fermentação de salsichas, lipólise da gordura da manteiga e do creme de leite (JAEGER, K. E.; EGGERT, T., 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; FREIRE;

CASTILHO, 2008); e na formação de produtos voláteis que conferem sabor ao chá preto (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Contudo, as enzimas estão sujeitas a inativação por processos físicos, químicos ou biológicos, durante sua utilização ou estocagem (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Além das perdas ocorridas devido à inativação enzimática durante os bioprocessos, deve-se ressaltar também a existência de perdas mássicas de enzimas durante o processo de separação do produto final.

1.3 Imobilização de enzimas

A tecnologia enzimática despontou como área de investigação no início da década de 1960 com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então esses biocatalisadores têm sido empregados em diversos segmentos, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos (MENDES, A. A. et al., 2011b).

Apesar do longo histórico da imobilização de enzima, (STRAATHOF; PANKE; SCHMID, 2002) estima-se que apenas 20 % dos processos biocatalíticos envolvem enzimas imobilizadas. No entanto, ao longo dos últimos anos um número interessante de novas metodologias de imobilização enzimática têm sido relatadas na literatura e nos pedidos de patentes, indicando que a imobilização de enzimas está em evidência (BRADY, D.; JORDAAN, 2009).

Em 2003, o mercado global de enzimas para aplicações industriais foi estimado em U\$ 2,3 bilhões divididos nas seguintes áreas: detergentes, 35%; alimentos, 28%; agricultura e ração animal, 16,5%; têxteis, 10,5%; papel, celulose, couro e produtos químicos, 10%. Em 2009, esse valor de mercado foi de \$5,1 billion (SANCHEZ; DEMAIN, 2010) e a projeção é que o crescimento anual será de aproximadamente 6,3%, com estimativa de movimentação de U\$ 7,0 bilhões de dólares para 2013 (MENDES, A. A. et al., 2011b).

A imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a sua imobilização em um suporte pode resultar em melhorias do seu desempenho catalítico e reduzir a sua inativação por distorção de sua estrutura nativa pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, o que é atrativo para

a aplicação de enzimas no setor industrial (BRADY, D.; JORDAAN, 2009; MENDES, A. A. et al., 2011b).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são: reutilização do biocatalisador, retenção da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de conduzir processos em modo contínuo; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão (BRADY, D.; JORDAAN, 2009; MENDES, A. A. et al., 2011b). Porém, durante o processo de imobilização, deve-se atentar para questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem a sua imobilização numa forma inativa; perda da atividade catalítica e perdas mássicas de enzima por meio da lixiviação; efeitos difusionais ou de transferência de massa, em decorrência de limitações do acesso do substrato à enzima e do produto para o seio da solução; e o custo da imobilização, que deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador (MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b).

1.4 Métodos de imobilização

Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos tais como encapsulamento em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; encapsulação; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (Figura 3) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; ILLANES et al., 2012).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES, A. A. et al., 2011b; ILLANES et al., 2012).

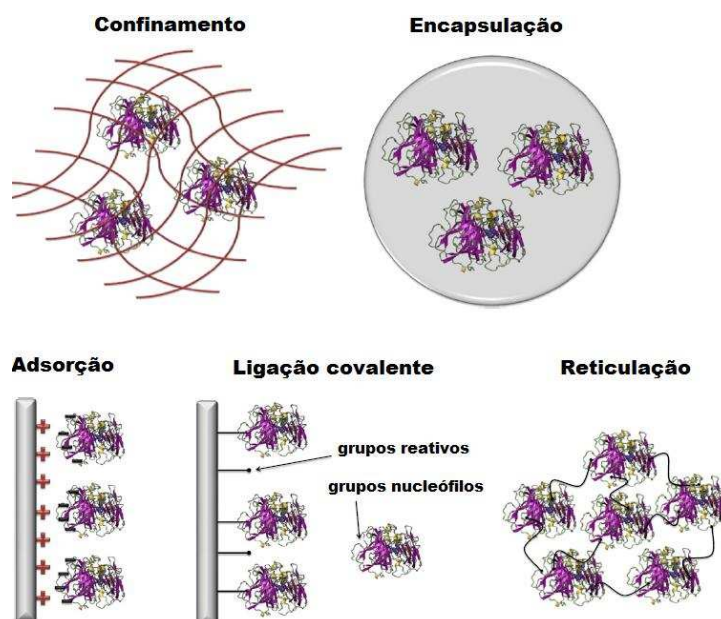


Figura 3. Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação. Fonte: (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A seguir serão relatados os seguintes métodos de imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, confinamento e reticulação, suas principais características e os recentes avanços nessas técnicas.

1.4.1 Imobilização por confinamento

A imobilização de enzimas por confinamento envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. Na medida em que a polimerização prossegue, a matriz polimérica vai se formando em torno da enzima, confinando-a dentro de sua estrutura. Assim, esse método é atraente para a imobilização de enzimas pelo processo sol-gel, visto que o mesmo ocorre em meio aquoso, o que permite a manutenção da atividade catalítica das enzimas ocultas na matriz de sol-gel (KATO et al., 2002; HODGSON et al., 2004; HAGE, D.; RUHN, 2005).

Resumidamente, o processo de sol-gel é caracterizado por ser um processo de síntese de materiais no qual ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é definido como uma dispersão de partículas coloidais em um fluido, enquanto o termo gel pode ser empregado para definir um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel

polimérico) que retém, normalmente, a fase líquida nos seus interstícios (Figura 4). Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação de partículas coloidais, devido a uma adequada alteração das condições físico-químicas da suspensão, enquanto os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização, em que a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

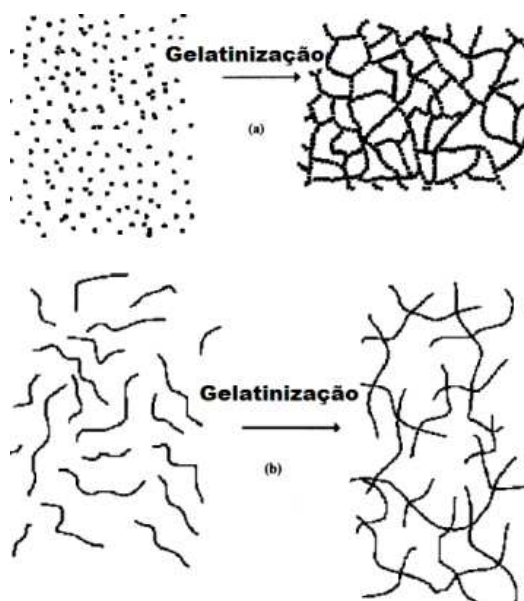


Figura 4. Esquema da transição sol-gel: (a) formação do gel particulado e (b) formação do gel polimérico. Fonte: (ALFAYA; KUBOTA, 2002).

De modo simplificado, o processo global de imobilização de enzimas por confinamento por meio do processo sol-gel pode ser visualizado na Figura 5. A vantagem de utilizar esse método de imobilização é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando assim os efeitos de desnaturação por solventes orgânicos. Além disso, esse é um método de imobilização de fácil execução e pode ser empregado para imobilizar uma ampla variedade de enzimas, visto que o mesmo não promove alterações estruturais da enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; SHELDON, 2007; BRADY, D.; JORDAAN, 2009).

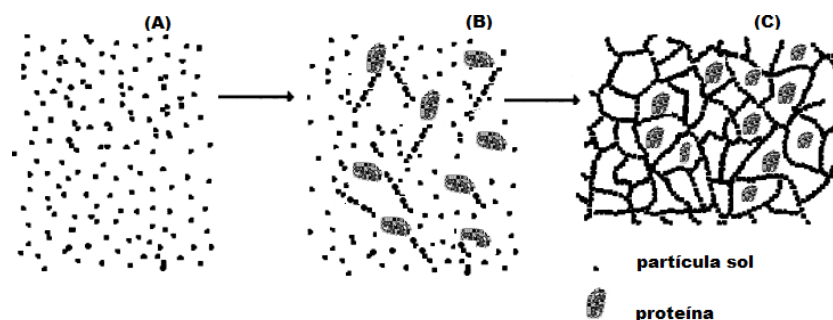


Figura 5. Procedimento para o confinamento de enzimas durante o processo sol-gel, incluindo (a) formação de partículas de sol durante a hidrólise e condensação, adição (b) da enzima na suspensão contendo as partículas sol, e (c) agregação de partículas coloidais em torno das moléculas de enzima. Fonte: (MALLIK; HAGE, 2006).

Como desvantagens, tem-se as dificuldades associadas com o controle do tamanho dos poros do suporte devido à retração do sol-gel com o tempo; o encolhimento do gel durante o processo de condensação e de secagem, o que pode causar a desnaturação das enzimas, ou a lixiviação da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos através da matriz (VILLENEUVE et al., 2000; ALFAYA; KUBOTA, 2002; KATO et al., 2002; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; HODGSON et al., 2004; BRADY, D.; JORDAAN, 2009; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; MENDES, A. A. et al., 2011b; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Outra desvantagem é que muitos precursores da mistura sol-gel podem desnaturar as enzimas, devido à produção de subprodutos alcoólicos durante a hidrólise dos grupos alcóxidos dos alcóxissilanos, entretanto, precursores alternativos foram desenvolvidos a fim de minimizar este problema (HODGSON et al., 2004).

1.4.2 Imobilização por adsorção

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Nesse método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHENG et al., 2012; ZHOU et al., 2012).

As principais vantagens da imobilização por adsorção residem no baixo custo e na facilidade e na simplicidade do processo. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ZHOU et al., 2012).

Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e possibilidade de dessorção e lixiviação da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica (ARICA; ALTINTAS; BAYRAMOĞLU, 2009; BRADY, D.; JORDAAN, 2009; GUIDINI et al., 2010; MENDES, A. A. et al., 2011b). Contudo, diversas técnicas foram desenvolvidas a fim de reduzir a lixiviação da enzima como por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros (HE, J. et al., 2006; REIS, PEDRO; WITULA; HOLMBERG, 2008). Outros estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (SERRA et al., 2008).

A imobilização de lipases por adsorção em suportes hidrofóbicos resulta em grandes melhorias de sua atividade catalítica (MATEO et al., 2007; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). Essa enzima apresenta duas diferentes configurações: uma forma fechada, considerada inativa, na qual o contato entre o sítio ativo e o meio reacional é bloqueado por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica chamada de tampa (*lid*); e a forma aberta, na qual essa tampa é deslocada e o sítio ativo é totalmente exposto ao meio de reação (BRADY, L. et al., 1990; DEREWENDA et al., 1992; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

Na presença de uma superfície hidrofóbica, a lipase sofre uma ativação interfacial e o equilíbrio de suas formas é deslocado para a conformação aberta. Neste caso, a região do sítio ativo da enzima interage com o suporte por adsorção hidrofóbica, uma vez que o reconhece como similar aos seus substratos naturais. Assim, a lipase é imobilizada em sua conformação ativa (Figura 6) (BRADY, L. et al., 1990; DEREWENDA et al., 1992; PALOMO, JOSÉ M. et al., 2002; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008).

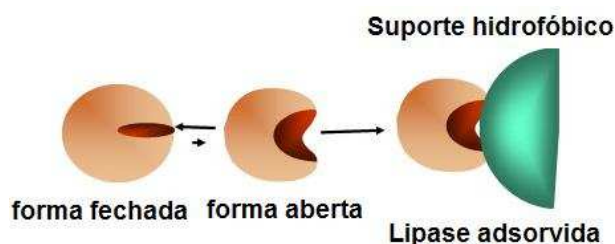


Figura 6. Ativação interfacial da lipase frente a um suporte hidrofóbico. Fonte: (MATEO et al., 2007).

A eficiência de imobilização da enzima por adsorção também está intimamente relacionada com o suporte empregado para tal fim. Nesse sentido, diversos suportes podem ser utilizados e a escolha de um deles depende de suas propriedades como porosidade e tamanho do poros, área superficial, resistência mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

Nos últimos anos, os materiais mesoporosos têm se destacado como excelentes suportes para adsorção de enzimas por apresentarem características desejáveis como tamanhos de poros uniformes, elevada área superficial e facilidade de funcionalização, o que permite proporcionar estabilidade química e térmica ao biocatalisador imobilizado. Ademais, o uso de materiais porosos também é vantajoso visto que a enzima pode ser adsorvida tanto na superfície externa quanto no interior dos poros do suporte (QUIRÓS; GARCÍA; MONTES-MORÁN, 2011; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHOU et al., 2012).

Outra técnica de adsorção comumente utilizada para a imobilização de enzimas é a troca iônica, a qual ocorre a partir das interações iônicas e eletrostáticas entre os grupos iônicos da proteína e os íons com cargas opostas do suporte (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHENG et al., 2012).

A interação eletrostática entre o suporte e a enzima geralmente é modulada pelo pH do meio no qual se procede a imobilização. Assim, a adsorção das enzimas por troca iônica é mais eficiente quando as forças eletrostáticas são maximizadas. Para isso, a enzima e o suporte devem apresentar cargas líquidas opostas, ou seja, o pH do meio de imobilização deverá estar abaixo do ponto isoelétrico (pI) da enzima e acima do pI do material que constitui o suporte e vice-versa. Nesta situação

especificada, a enzima apresenta uma carga líquida positiva e o suporte uma carga líquida negativa, o que resultará na atração eletrostática entre os mesmos. Caso o pH da solução esteja acima do ponto isoelétrico da enzima, uma carga líquida (negativa) semelhante entre essa e o suporte conduzirá a forças repulsivas entre ambos, o que resultará em baixa adsorção da enzima. A mesma repulsão eletrostática seria observada se o pH do meio estivesse abaixo do ponto isoelétrico da enzima e do suporte, concomitantemente (NELSON; COX, 2008; GUIDINI et al., 2010; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHENG et al., 2012).

Como desvantagem desse protocolo há a possibilidade de desprendimento das enzimas do suporte durante uma reação, quando ocorrerem mudanças no valor do pH e da força iônica do meio. Nesse caso, para se contornar esse inconveniente, geralmente, após a adsorção da enzima, essa é reticulada com um agente bifuncional como o glutaraldeído (FILHO et al., 2008; GUIDINI et al., 2010).

1.4.3 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na fixação da enzima ao suporte através de ligações covalentes. A força desta ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima proporcionando uma grande rigidez na estrutura da mesma (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009; MILETIĆ et al., 2009). Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009; MILETIĆ et al., 2009). Contudo, em excesso, tal rigidez pode ser prejudicial à atividade enzimática.

A imobilização covalente da enzima frequentemente se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). Geralmente, o glutaraldeído é o reagente utilizado na ativação de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (MATEO et al., 2007; CHAUBEY et al., 2009; BARBOSA et al., 2012). Nesse caso, o glutaraldeído se liga ao suporte e à enzima, e essas são imobilizadas covalentemente no suporte através de seus grupos aminos (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química),

que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff (MATEO et al., 2007; BRADY, D.; JORDAAN, 2009; BARBOSA et al., 2012).

Outros grupos funcionais da enzima como grupos carboxílicos (β -COOH do ácido aspártico, γ -COOH do ácido glutâmico e o α -carboxílico), grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano também podem se ligar covalentemente ao grupos reativos do suporte. O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais, tanto da enzima quanto do suporte, e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte (GUISÁN, 1988; BRADY, D.; JORDAAN, 2009; ERDEMIR; YILMAZ, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, torna este método de imobilização aplicável em muitas situações. Contudo, a seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de imobilização (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

Inconvenientes da imobilização da enzima por ligação covalente estão relacionados a parcial desativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima devido a restrições na sua conformação, impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (ERDEMIR; YILMAZ, 2009). Também, durante o processo de interação da enzima com o suporte, a região do sítio ativo pode tornar se menos acessível ao substrato, ocasionando um impedimento estérico (MATEO et al., 2007), ou a forte fixação da enzima ao suporte pode dificultar a ativação da mesma, caso essa possua conformações distintas quando ativada e não ativada (MATEO et al., 2007; MACARIO et al., 2009).

As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e frente a solventes orgânicos; os derivados preparados também podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, após a etapa de imobilização, a enzima não corre o risco de ser lixiviada (MATEO et al., 2007; MENDES, A. et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

Entre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas (PEDROCHE et al., 2007; MANRICH et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; MENDES, A. A. et al., 2011a). Essa estabilização é devido ao aumento da rigidez da enzima imobilizada, por induzir uma elevada resistência frente a modificações conformacionais causadas pelo aquecimento, solventes orgânicos ou agentes desnaturantes, entre outros (ERDEMIR; YILMAZ, 2009). A necessidade do aumento da estabilidade das enzimas, não obstante, é ainda umas das principais questões que torna a imobilização de enzimas uma técnica atrativa do ponto de vista econômico (LÓPEZ-GALLEGÓ et al., 2005; MENDES, A. A. et al., 2011a).

1.5 Adição de aditivos estabilizantes

Um bom protocolo de imobilização deve manter alta atividade catalítica após a imobilização da enzima. No entanto, em alguns casos, a enzima pode possuir diferentes conformações, com atividades catalíticas distintas, ou apresentar uma estrutura multimérica que necessita ser mantida estável durante o processo de imobilização. Assim, a adição de aditivos estabilizantes durante a etapa de imobilização enzimática, pode contornar os inconvenientes de se obter um biocatalizador imobilizado em sua forma inativa ou com baixa atividade catalítica.

Na literatura, é relatado que durante a etapa de imobilização de lipases em meio aquoso, o uso de aditivos estabilizantes macromoleculares como proteínas (albumina de soro bovino, lecitina e caseína), polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA) e surfactante (Triton X-100) (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2006) proporcionou incrementos em sua atividade hidrolítica, enquanto que carboidratos monoméricos (sorbitol, arabitol) e polissacarídeos (dextrana e amido) não apresentaram efeito estabilizante significativo sobre sua atividade (ROCHA; GIL; GARCIA, 1998; SOARES et al., 2001; GUNCHEVA et al., 2011).

Estudos sugerem que, ao ocupar o sítio ativo da enzima, o aditivo estabilizante previne interações indesejáveis entre essa e o suporte, evitando assim, a sua inativação. Além disso, é relatado que os aditivos estabilizantes auxiliam na retenção de uma camada de água em torno do biocatalisador, preservam a estrutura nativa da enzima em meio orgânico e contribuem para a dispersão de suas moléculas no meio reacional ou em preparações enzimáticas para imobilização, o que evita a formação de agregados enzimáticos e conseqüentemente, reduz a resistência à

transferência de massa do substrato, facilitando a sua difusão através da matriz (CAO, 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2006; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; GUNCHEVA et al., 2011).

Os líquidos iônicos (ILs) possuem um grande potencial como meio reacional alternativo para biocatálises e o seu uso resultou em incrementos na reatividade, seletividade e estabilidade de algumas enzimas (KRAGL; ECKSTEIN; KAFTZIK, 2002; LEE; KIM, 2002; PARK; KAZLAUSKAS, 2003). Especificamente, as lipases recobertas por ILs apresentaram melhor atividade catalítica em meios reacionais contendo solventes orgânicos (LEE; KIM, 2002; ITOH et al., 2004; ITOH et al., 2006).

Outro procedimento para melhorar a atividade catalítica das lipases é a “bio-impressão” por meio da adição de um análogo do substrato (FISHMAN; COGAN, 2003). A bio-impressão ocorre quando, ainda em solução aquosa, o sítio ativo da enzima é preenchido com um análogo do substrato formando um complexo similar ao complexo enzima-substrato. Esse processo possivelmente é acompanhado por pequenas modificações conformacionais, o chamado encaixe induzido (*induced fit*). Quando o complexo é transferido para meio essencialmente anidro, o ligante é removido, mas a enzima está inapta a retornar para sua conformação original devido à rigidez de sua estrutura, resultante de fortes interações eletrostáticas em meios contendo baixas constantes dielétricas. Como consequência, a estrutura tridimensional da enzima permanece “congelada” na forma modificada, com a mesma configuração de quando o ligante estava presente. A bio-impressão é restrita a solventes orgânicos anidros ou microaquosos, pois a chamada “memória” é perdida em meio aquoso, a menos que sejam tomadas outras medidas para estabilização. A ativação causada pela impressão com o análogo é drasticamente reduzida pela presença de água, mesmo quando quantidades de água de apenas 0,04% são adicionadas ao solvente (FISHMAN; COGAN, 2003).

1.6 Tipos de suportes e suas ativações

O bom desempenho da enzima imobilizada é em grande parte dependente do suporte e, apesar de existirem inúmeros materiais que podem ser utilizados, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (MILETIĆ et al., 2009).

De modo geral, os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes na superfície dos mesmos, dentre outras (MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b; TALBERT; GODDARD, 2012).

De acordo com a sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, esses podem ser porosos, não-porosos e de estrutura de gel (MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem sua elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo, é importante atentar-se para o diâmetro dos poros do suporte, de modo que esses sejam suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato e difusão dos produtos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Como inconveniente, tem-se possíveis problemas relacionados a limitações difusionais, uma vez que o substrato além de se difundir do seio da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, no qual grande parte das moléculas do catalisador estão situadas. Todavia, a localização das enzimas no interior dos poros também lhes conferem uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b).

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por estes suportes é sua mais notória desvantagem (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b). Na tentativa de contornar esse problema muitos pesquisadores têm optado pela utilização de partículas ou fibras finas (WANG, Y.; HSIEH, 2008; HUANG et al., 2011; LIU, C.-X. et al., 2012), porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam esses tipos de materiais como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO et al., 2007; MENDES, A. A. et al., 2011b).

Os materiais orgânicos, em especial os polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos, são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de enzimas. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte de acordo com as características desejadas, porém os polímeros naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, como baixo custo e fácil degradabilidade.

Contudo, alguns polímeros naturais e sintéticos, não apresentam em sua superfície grupos funcionais altamente reativos para a realização de ligações covalentes com as moléculas de enzima, sendo necessária a inserção de grupos reativos na superfície dos mesmos por meio de reações químicas com reagentes de ativação, tais como epícloridrina, etilenodiamina, glicidol, carbodiiminas, carbonildiimidazol, glurataraldeído, dentre outros.

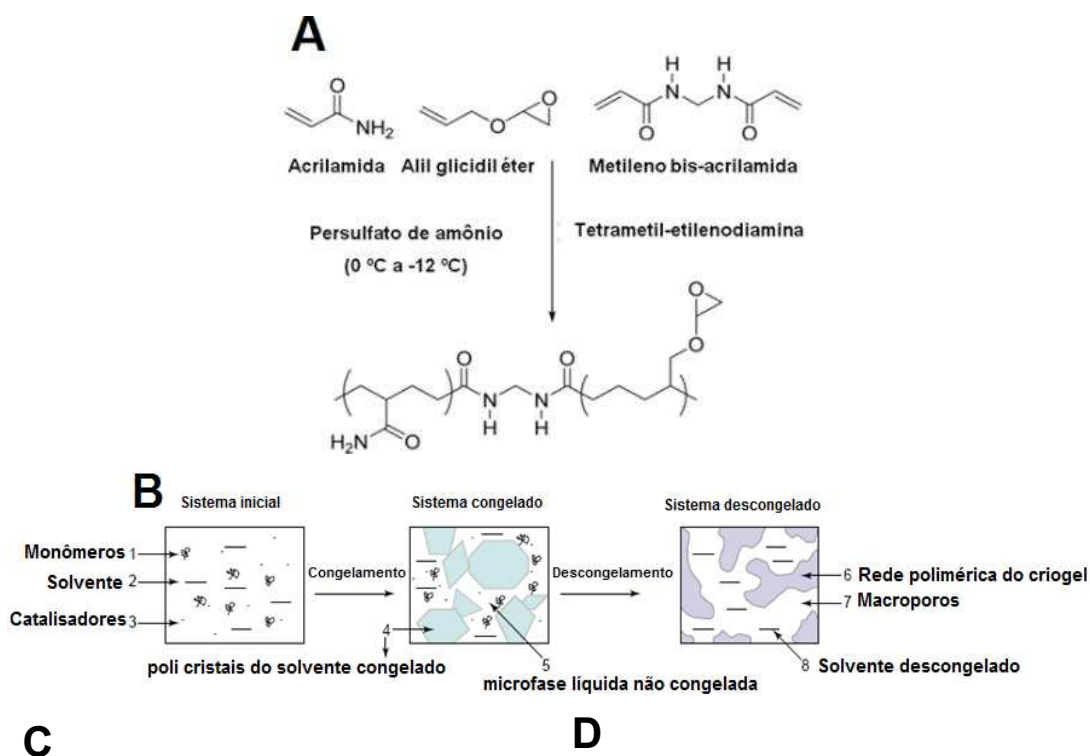
Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas destacam-se os hidrogéis de quitosana, quitosana-agarose ou quitosana-alginato (MENDES, A. et al., 2011; MENDES, A. A. et al., 2011b; ROMDHANE et al., 2011; SILVA, J. A. et al., 2012), as partículas de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) (PAULA et al., 2008; SANTOS, JULIO C. et al., 2008; SANTOS, J. C. et al., 2008; SANTOS, JÚLIO C. et al., 2008), as resinas comerciais (Toyopearl, Eupergit C e Sepabeads) (KNEZEVIC et al., 2006; MATEO et al., 2007; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; BARBOSA et al., 2012) e os monólitos (QUIRÓS; GARCÍA; MONTES-MORÁN, 2011; KHAN et al., 2012; LUANGON et al., 2012; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012; CALLERI et al., In Press).

1.6.1 Monólito de criogel

Criogéis são monólitos poliméricos formados em meio congelado e foram introduzidos como uma nova matriz de separação para aplicação em vários processos de biosseparação (LOZINSKY, V. et al., 2001). Os criogéis possuem um sistema contínuo de macroporos interconectados com tamanho variando de 10 a 100 μm e se caracterizam por fornecer uma baixa resistência ao escoamento de fluidos e uma difusão desobstruída de solutos de qualquer tamanho. Estes materiais poliméricos altamente porosos podem ser produzidos essencialmente a partir de qualquer precursor de formação de gel e com uma ampla variedade de morfologias e porosidades (PLIEVA et al., 2008).

Em resumo, o criogel é obtido quando a crio-copolimerização de uma solução contendo monômeros (por exemplo, acrilamida, alil glicidil éter e N,N-metilenobisacrilamida) é adicionada de catalisadores adequados (como o persulfato de amônio e o N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina), e ocorre sob condições criogênicas (abaixo de -10 °C) (LOZINSKY, V. et al., 2001; ARVIDSSON et al., 2003; YAO, K. et al., 2006).

Ao se iniciar o processo de congelamento, os monômeros se concentram em uma microfase que ainda não se congelou. Dessa forma, um maior número de ligações entre os monômeros é realizada, formando-se um gel resistente. Durante a produção do criogel sob condições de congelamento, os cristais de gelo em crescimento atuam como agentes porogênicos, sendo que, após o descongelamento desses cristais são formadas as cavidades dos criogéis, obtendo-se um gel de estrutura macroporosa (Figura 7). A presença desses poros é essencial para permitir que o escoamento de fluidos através do material sob uma pressão razoável. Além disso, apresentam condições favoráveis à transferência de massa de substratos e solutos (LOZINSKY, V. et al., 2001; ARVIDSSON et al., 2003; YAO, K. et al., 2006).



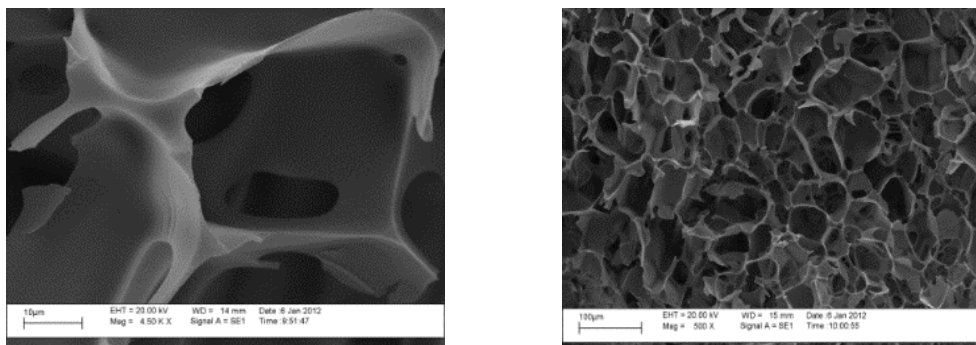


Figura 7. (A) reação de copolimerização dos monômeros acrilamida, alil glicidil éter e N,N-metilenobisacrilamida para a preparação do criogel de poli(acrilamida). Fonte: (MALLIK; HAGE, 2006); (B) esquema principal para a formação dos criogéis poliméricos. Fonte: (LOZINSKY, V. I. et al., 2003); (C) e (D) imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de criogéis de poli(acrilamida).

1.6.1.1 Ativação de suportes contínuos de monólito de criogel

Os criogéis têm sido utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de várias biomoléculas, utilizando diversos métodos de ativação da superfície dos criogéis, seguido da imobilização das biomoléculas, têm sido relatados (MALLIK; HAGE, 2006; KHAN et al., 2012; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012; UYGUN, M. et al., 2012).

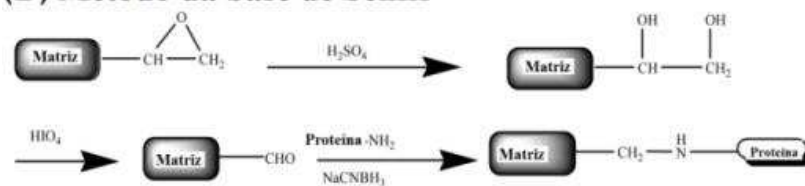
Essa etapa de modificação da superfície do criogel é normalmente realizada por meio da circulação das soluções contendo os agentes de ativação através da matriz polimérica ou por imersão do suporte (geralmente para criogéis em formato de disco) na solução contendo os grupos ligantes (KIM, H. S.; HAGE, 2005).

Um dos métodos empregados para a imobilização de enzimas via ligação covalente é o método do epóxi que envolve o ataque nucleofílico dos grupos $-NH_2$ das enzimas sobre os grupos epóxi do criogel, levando à formação de uma ligação amina secundária estável (Figura 8A) (MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004). Dependendo das condições da reação, este método pode ser utilizado para imobilizar biocatalisadores que contêm sulfidril ou grupos hidroxila (KIM, H. S.; HAGE, 2005), contudo, a uma taxa de imobilização mais lenta que outros métodos disponíveis e nenhum braço espaçador é inserido entre o suporte e a enzima (BERRUEX; FREITAG; TENNIKOVA, 2000; GUPALOVA et al., 2002; OSTRYANINA; VLASOV; TENNIKOVA, 2002).

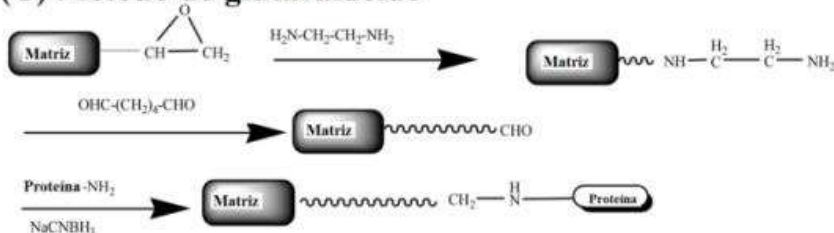
(A) Método epóxi



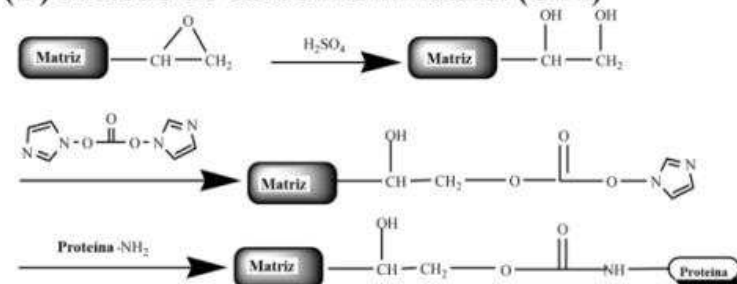
(B) Método da base de Schiff



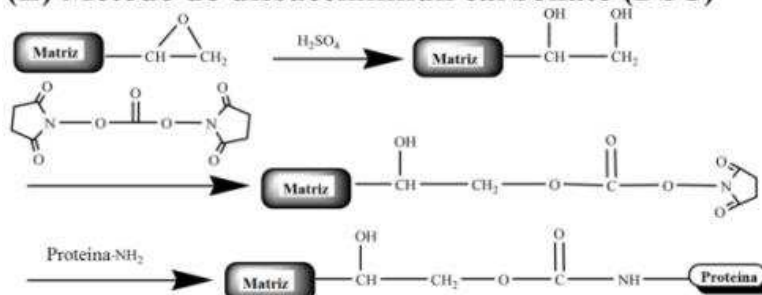
(C) Método do glutaraldeído



(D) Método do carbonildiimidazol (CDI)



(E) Método do dissuccinimidil carbonato (DSC)



(F) Método da hidrazida

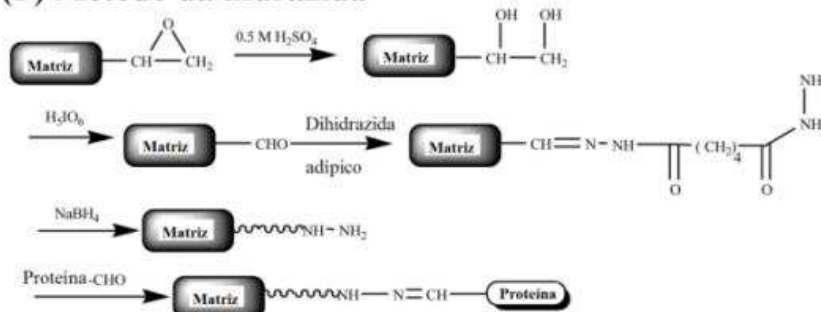


Figura 8. Diversos métodos de imobilização de ligantes e biomoléculas em criogéis. Fonte: (MALLIK; HAGE, 2006).

A segunda técnica que tem sido adaptada para a imobilização de biomoléculas no criogel, via ligação covalente, é o método da base Schiff (LUO et al., 2002; MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004). Primeiramente, os grupos epóxi do criogel são convertidos em dióis e estes são então oxidados com ácido periódico formando grupos aldeídos que podem interagir com aminas primárias da enzimas, formando uma base de Schiff (Figura 8B). Uma vez que esta é uma reação reversível, as bases de Schiff estáveis são obtidas por meio de reações de redução empregando um agente redutor, como por exemplo, o cianoborohidreto de sódio (KIM, H. S.; HAGE, 2005). Este método tende a ter uma taxa de imobilização mais rápida do que o método do epóxi. A principal desvantagem do método da base Schiff é o uso de agentes redutores que podem reduzir alguns grupos sulfidrilos (-SH) da enzima imobilizada (MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004; KIM, H. S.; HAGE, 2005).

Uma outra abordagem relacionada com a técnica da base de Schiff é o método do glutaraldeído (Figura 8 C). Neste método, um criogel epóxi-ativado é primeiro convertido a uma forma amina-ativado pela reação dos grupos epóxi com reagentes etilenodiamina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996) ou hexametilendiamina (LUO et al., 2002). O criogel amina-ativado reagirá então com um dialdeído (por exemplo, glutaraldeído) para produzir um criogel aldeído-ativado que poderá se ligar aos grupos aminas da enzimas, formando uma base de Schiff. Em seguida, ocorre a redução e estabilização dessas base de Schiff por meio do uso de um agente redutor. Este método também tende a ter uma taxa de imobilização mais rápida do que o método do epóxi e devido a um maior espaçamento entre o biocatalisador imobilizado e a superfície do criogel, este método de imobilização tem sido útil para evitar efeitos de impedimento estérico (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996; LUO et al., 2002). Como inconvenientes, tem-se novamente a possibilidade de redução dos grupos -SH das enzimas imobilizadas durante o uso dos agentes redutores.

Outra técnica que pode ser empregada para a imobilização de enzimas no criogel, via ligação covalente, é o método do carbonildiimidazol (CDI). Inicialmente, os grupos epóxidos do criogel são convertidos a grupos diol, os quais reagem com o carbonildiimidazol para produzir imidazolil-carbamatos (Figura 8 D). Por meio de uma substituição nucleofílica, os grupos imidazolil-carbamatos inseridos no criogel são substituídos por grupos aminas primários das enzimas, resultando em uma

ligação amida estável. Este método é mais rápido do que o método de epóxi e envolve menos etapas de ativação do que o método da base de Schiff ou do glutaraldeído (MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004; HAGE, D. S.; CAZES, 2005).

No método do dissuccinimidil carbonato (DSC), os grupos epóxi também são convertidos a grupos diol, os quais reagem com o DSC para a inserção dos grupos dissuccinimidil carbonato na superfície do criogel (Figura 8E) (CALLERI et al., 2004; MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004; HAGE, D.; RUHN, 2005; JIANG; MALLIK; HAGE, 2005). Em seguida, o criogel ativado com os grupos dissuccinimidil carbonato reagem com os grupos aminos primários das enzimas, para formar uma ligação carbamato estável (HERMANSON, 2008). Este método é rápido e pode ser finalizado em 10h (MALLIK, RANGAN; JIANG, TAO; HAGE, DAVID S., 2004). No entanto, a estabilidade do DSC e do criogel ativado é baixa e a reação deve ser conduzida de forma cuidadosa a fim de evitar reações prejudiciais como a hidrólise do DSC (HAGE, D. S.; CAZES, 2005; HERMANSON, 2008).

Outra técnica de imobilização de enzimas nos criogéis, via ligação covalente, é o método da hidrazida, que pode ser aplicada para glicoproteínas ou biomoléculas contendo grupos aldeídos disponíveis para realizar ligações covalentes. Primeiramente, o criogel é ativado da mesma maneira como descrito anteriormente para o método da base de Schiff. Após isso, os grupos aldeídos formados a partir da reação de oxidação com o ácido periódico, reagem com o dihidrazida adípico, e, em seguida, com borohidreto de sódio. Por fim, os grupos aldeídos das biomoléculas reagem com os grupos hidrazida do suporte para formar uma ligação hidrazona estável (Figura 8F) (RUHN; GARVER; HAGE, 1994).

1.6.1.2 Aplicação do criogel na imobilização de enzimas

Nos últimos anos, os criogéis têm sido utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de biomoléculas e ligantes (MALLIK; HAGE, 2006). Khan e pesquisadores (2012) imobilizaram duas variantes de β -glicosidase termoestável de *Thermotoga neapolitana* em criogéis de poliácridamida pelo método epóxi e método do glutaraldeído, por meio da imersão dos criogéis ativados na solução contendo as enzimas (KHAN et al., 2012). Szczesna-Antczak et al. (2002) imobilizaram lipases de *Mucor circinelloides* e *Mucor racemosus* em *beads* criogéis

de álcool polivinílico (PVA) por confinamento (SZCZEŚNA-ANTCZAK et al., 2002). He e colaboradores (2010) imobilizaram lipase A de *Candida antarctica* também em uma coluna monólítica macroporosa de sílica via interações multipontuais entre a enzima e o suporte (HE, P.; GREENWAY; HASWELL, 2010). Luo et al. (2002), Tüzmen e sua equipe (2012) e Petro e pesquisadores (1996) também utilizaram criogéis monolíticos de poli(acrilamida e metacrilato para imobilizarem proteína A e L-histidina (LUO et al., 2002), catalase (TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012) e tripsina (PETRO; SVEC; FRÉCHET, 1996), respectivamente.

Assim, criogéis têm sido avaliados para fins biotecnológicos devido às suas características importantes para a imobilização de biomoléculas com novas perspectivas nos processos de imobilização de células e enzimas.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C. Structured and Specialty Lipids. In: (Ed.). **Healthful Lipids**: AOCS Publishing, 2005,

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n., p. 835-841, 2002.

ARICA, M. Y.; ALTINTAS, B.; BAYRAMOĞLU, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 665-669, 2009.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.

BALCÃO, V.; KEMPPINEN, A.; MALCATA, F.; KALO, P. Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 10, p. 1347-1358, 1998.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 2, p. 309-341, 1998.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.

BERRUEX, L. G.; FREITAG, R.; TENNIKOVA, T. B. Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith

affinity chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 95-104, 2000.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGENJENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; MASSOLINI, G.; LUBDA, D.; DE FAZIO, S. S.; FURLANETTO, S.; WAINER, I. W.; MANZO, L.; CACCIALANZA, G. Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized β -glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 5, p. 1179-1189, 2004.

CALLERI, E.; AMBROSINI, S.; TEMPORINI, C.; MASSOLINI, G. New monolithic chromatographic supports for macromolecules immobilization: Challenges and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v., n. 0, p., In Press.

CAO, L. Unconventional Enzyme Immobilization. In: (Ed.). **Carrier-bound Immobilized Enzymes**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, p.449-549.
CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D.; AGUIAR, C. L. D. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n., p. 146-156, 2004.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Arthrobacter sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 154-160, 2009.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and Screening of Alkaline Lipase-producing Fungi from Brazilian Savanna Soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2006.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K. A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 8, p. 3180-3186, 1994.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; SCHRAG, J. D. Structural determinants defining common stereoselectivity of lipases toward secondary alcohols. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. SUPPL. 1, p. 289-296, 1995.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n., p. 345-354, 2002.

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

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1992.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 29-35, 2009.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v., n. in press, p., 2012.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; ORTIZ, C.; CABRERA, Z.; GUIBÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610-2615, 2006.

FILHO, M.; PESSALA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBÁN, J. M. Immobilization–stabilization of an α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 3, p. 265-271, 2008.

FISHMAN, A.; COGAN, U. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 3-4, p. 193-202, 2003.

FOGLIA, T.; CONKERTON, E.; SONNET, P. Regioselective analysis of triacylglycerols by lipase hydrolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p. 1275-1279, 1995.

FREIRE, D. M. A.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., *et al* (Ed.). **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p.506

GANDHI, N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GANDRA, K. M.; DEL BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n., p. 182-192, 2008.

GHAZALI, H.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633-639, 1995.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 12-30, 2005.

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

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

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 923-930, 2011.

GUPALOVA, T. V.; LOJKINA, O. V.; PÀLÀGNUK, V. G.; TOTOLIAN, A. A.; TENNIKOVA, T. B. Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 949, n. 1-2, p. 185-193, 2002.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 635 - 644, 2003.

HAGE, D.; RUHN, P. An Introduction to Affinity Chromatography. In: Hage, D. S. (Ed.). **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, 2005, p.3-13. (Chromatographic Science Series)

HAGE, D. S.; CAZES, J. **Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition**: Taylor & Francis, 2005

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

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

HE, J.; SONG, Z.; MA, H.; YANG, L.; GUO, C. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 44, p. 4307-4315, 2006.

HE, P.; GREENWAY, G.; HASWELL, S. J. Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 593-597, 2010.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**: Academic Press, 2008

HODGSON, R. J.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; TLEUGABULOVA, D.; LONG, H.; ZHAO, X.; ORGAN, M.; BROOK, M. A.; BRENNAN, J. D. Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol-Gel Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.

HUANG, X.-J.; CHEN, P.-C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M.-R.; XU, Z.-K. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 3-4, p. 95-100, 2011.

ILLANES, A.; CAUERHFF, A.; WILSON, L.; CASTRO, G. R. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 48-57, 2012.

ITOH, T.; HAN, S.; MATSUSHITA, Y.; HAYASE, S. Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 437-439, 2004.

ITOH, T.; MATSUSHITA, Y.; ABE, Y.; HAN, S. H.; WADA, S.; HAYASE, S.; KAWATSURA, M.; TAKAI, S.; MORIMOTO, M.; HIROSE, Y. Increased enantioselectivity and remarkable acceleration of lipase-catalyzed transesterification by using an imidazolium PEG-Alkyl sulfate ionic liquid. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 36, p. 9228-9237, 2006.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 129-140, 2000.

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

JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. BACTERIAL BIOCATALYSTS: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

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

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

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 273-278, 2001.

JIANG, T.; MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 8, p. 2362-2372, 2005.

KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; MATSUMOTO, N.; TOYO'OKA, T. A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1915-1921, 2002.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformations with Lipases. In: (Ed.). **Biotechnology**: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008, p.36-191.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, n. 0, p. 28-38, 2012.

KIM, H.-R.; HOU, C. T.; LEE, K.-T.; KIM, B. H.; KIM, I.-H. Enzymatic synthesis of structured lipids using a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 846-849, 2010.

KIM, H. S.; HAGE, D. S. **Handbook of Affinity Chromatography**. Boca Raton: CRC Press, 2005

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 269-278, 2006.

KRAGL, U.; ECKSTEIN, M.; KAFTZIK, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 565-571, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT' ANNA JR., G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n., p. 175-180, 2002.

LEE, J. K.; KIM, M.-J. Ionic Liquid-Coated Enzyme for Biocatalysis in Organic Solvent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 6845-6847, 2002.

LIU, C.-X.; ZHANG, S.-P.; SU, Z.-G.; WANG, P. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 266-272, 2012.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2005.

LOZINSKY, V.; PLIEVA, F.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001.

LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 445-451, 2003.

LUANGON, B.; SIYASUKH, A.; WINAYANUWATTIKUN, P.; TANTHAPANICHAKOON, W.; TONANON, N. Flow-through immobilization of *Candida rugosa* lipase on hierarchical micro-/macroporous carbon monolith. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, n. 0, p. 80-85, 2012.

LUBARY, M.; HOFLAND, G.; TER HORST, J. The potential of milk fat for the synthesis of valuable derivatives. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 1, p. 1-8, 2011.

LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 118, n. 1-3, p. 334-340, 2009.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MANRICH, A.; GALVÃO, C. M. A.; JESUS, C. D. F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 54-61, 2008.

MARANGONI, A. J. **Lipases: structure, function, & properties: Lipid biotechnology**. United States of America: Marcel Dekker, 2002
MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and

selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A.; DE CASTRO, H.; DE S. RODRIGUES, D.; ADRIANO, W.; TARDIOLI, P.; MAMMARELLA, E.; DE C. GIORDANO, R.; DE L. C. GIORDANO, R. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011.

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

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n., p. 831-840, 2011b.

MILETIĆ, N.; VUKOVIĆ, Z.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 4, p. 196-201, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**: W. H. Freeman, 2008

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V. D.; CASTRO, H. F. D.; SANTOS, J. C. D. Optimization of the Enzymatic Interesterification of Milk Fat and Canola Oil Blends Using Immobilized *Rhizopus oryzae* Lipase by Response Surface Methodology. **Food Technology Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 385–390, 2011b.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; TOITA, J.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 413-419, 1994.

OSTRYANINA, N. D.; VLASOV, G. P.; TENNIKOVA, T. B. Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 949, n. 1-2, p. 163-171, 2002.

PACKTER, N. M. Lipases — their structure, biochemistry and application: Edited by P Woolley and S B Petersen. pp 363. Cambridge University Press. 1994. £45. **Biochemical Education**, v. 22, n. 4, p. 216-216, 1994.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, n. 0, p. 279-286, 2002.

PARIDA, S.; DORDICK, J. S. Tailoring lipase specificity by solvent and substrate chemistries. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 3238-3244, 1993.

PARK, S.; KAZLAUSKAS, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 432-437, 2003.

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

PEDROCHE, J.; DEL MAR YUST, M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160-1166, 2007.

PETERS, G. H.; VAN AALTEN, D. M.; EDHOLM, O.; TOXVAERD, S.; BYWATER, R. Dynamics of proteins in different solvent systems: analysis of essential motion in lipases. **Biophysical Journal**, v. 71, n. 5, p. 2245-2255, 1996.

PETRO, M.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Immobilization of trypsin onto “molded” macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 4, p. 355-363, 1996.

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NOPPE, W.; MATTIASSON, B. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 11, p. 543-551, 2008.

QUIRÓS, M.; GARCÍA, A. B.; MONTES-MORÁN, M. A. Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts. **Carbon**, v. 49, n. 2, p. 406-415, 2011.

REIS, P.; WITULA, T.; HOLMBERG, K. Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 110, n. 2–3, p. 355-362, 2008.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, n. 0, p. 237-250, 2009.

ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 61-67, 1998.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on

chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100-109, 2008.

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

RUHN, P. F.; GARVER, S.; HAGE, D. S. Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 669, n. 1-2, p. 9-19, 1994.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224-230, 2010.

SANTOS, J. C.; MIJONE, P. D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 229-236, 2008.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52–53, n. 0, p. 49-57, 2008.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane–polyvinyl alcohol prepared by sol–gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42–44, p. 4823-4826, 2008.

SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F. Structured Lipids Enriched with Omega-3 and Omega-6 Highly Unsaturated Fatty Acids. In: (Ed.). **Food Factors in Health Promotion and Disease Prevention**: American Chemical Society, 2003. v.851, p.16-26. (ACS Symposium Series)

SERRA, E.; MAYORAL, Á.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 114, n. 1–3, p. 201-213, 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHIMADA, Y.; MARUYAMA, K.; NAKAMURA, M.; NAKAYAMA, S.; SUGHIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 12, p. 1577-1581, 1995.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, n. 0, p. 16-24, 2012.

SILVA, R. C. D.; GIOIELLI, L. A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n., p. 223-235, 2006.

SOARES, C.; DE CASTRO, H.; SANTANA, M.; ZANIN, G. Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, n. 1, p. 703-718, 2001.

SOUMANOU, M.; BORNSCHEUER, U.; MENGE, U.; SCHMID, R. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 427-433, 1997.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

SZCZEŚNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, n. 0, p. 261-268, 2002.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 8-19, 2012.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 26-33, 2012.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, n. 0, p. 73-78, 2012.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANG, Y.; HSIEH, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 309, n. 1–2, p. 73-81, 2008.

WILLIS, W.; MARANGONI, A. Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 4, p. 443-450, 1999.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 639 - 674, 1998.

XU, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 4, p. 287-303, 2000.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006.

ZHENG, M.-M.; LU, Y.; DONG, L.; GUO, P.-M.; DENG, Q.-C.; LI, W.-L.; FENG, Y.-Q.; HUANG, F.-H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresource Technology**, v. 115, n. 0, p. 141-146, 2012.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, n. 0, p. 133-141, 2012.

CAPÍTULO 2

PRODUCTION OF FLAVOR ESTERS CATALYSED BY *ASPERGILLUS NIGER* LIPASE: INFLUENCE OF REACTION PARAMETERS ON THE ESTERIFICATION YIELD

Abstract

The performance of lipase from *Aspergillus niger* (ANL) in catalyzing of butyl butyrate synthesis was studied as a function of reaction parameters temperature (°C), substrate molar ratio and added water (% (v/v)). Thus, a face-centered design (FCD) and response surface methodology (RSM) was applied in order to optimize the esterification yield (*Y*). It was verified a favorable effect of alcohol excess in relation to acid. High temperatures were detrimental to the synthesis of butyl butyrate. Addition of water also provided a strong increase in esterification yield (%). The optimal conditions for butyl butyrate synthesis were found at 40 °C; substrate molar ratio of 1:2.41 butyric acid:n-butanol and added water content of 1.05 % (v/v). Under these conditions, over 94.5% of esterification was obtained in 20 h. This high esterification yield represents an improvement to previously reported results and confirms the potential application of lipases from *Aspergillus niger* in processes for producing flavor ester.

Keywords: lipase, *Aspergillus niger*, synthesis, butyl butyrate, flavor ester

1. INTRODUCTION

Lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) are hydrolytic enzymes that reversibly catalyze the cleavage of ester bonds of triglycerides (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012). These enzymes present numerous industrial applications, such as the synthesis of food ingredients (SOUMANOU, M. et al., 1997; CARVALHO, PATRÍCIA DE O. et al., 2009; KIM, H.-R. et al., 2010; MARTINS et al., 2013), enantiopure drugs (CARVALHO, PATRÍCIA DE O. et al., 2005; CARVALHO, P. D. O. et al., 2006), refined products (WANG, P.-Y. et al., 2009), additives to detergents (KAMINI; MALA; PUVANAKRISHNAN, 1998; SAISUBRAMANIAN et al., 2006; LIU, R. et al., 2009) and others. Nevertheless, few enzymes have demonstrated adequate stability and activity in organic media to be considered industrially applicable (DANDAVATE; MADAMWAR, 2007; AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010).

Among microorganisms that produce lipase, *Aspergillus niger* is one of the most notable producers because its extracellular lipase is high stable and recognized as generally regarded as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA) (MAHADIK et al., 2002; MHETRAS, N. C.; BASTAWDE; GOKHALE, 2009; CONTESINI et al., 2010; ROMERO, C. M. et al., 2012). Lipase from *Aspergillus niger* (ANL) also presents high positional specificity and lower cost compared with other sources (MAHADIK et al., 2002; DE OLIVEIRA CARVALHO et al., 2005; MHETRAS, N. C.; BASTAWDE; GOKHALE, 2009; SILVA, V.; CONTESINI; OLIVEIRA CARVALHO, 2009; CONTESINI et al., 2010). Although this enzyme has already been applied to reactions such as some esters synthesis (MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010; ROMERO, C. M. et al., 2012), hydrolysis of triacylglycerol (CARVALHO, PATRÍCIA DE O. et al., 2009), alcoholysis (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002) and interesterification (PABAI; KERMASHA; MORIN, 1995), few works have been performed to exploit the potential from these lipases for synthesis of short chain aliphatic esters such as butyl butyrate (LANGRAND et al., 1990; WELSH; WILLIAMS, 1990; CHOWDARY; PRAPULLA, 2002; CONTESINI et al., 2010; MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010), an important flavor ester with great application in food, beverage and

cosmetic industries with sweet fruity flavor similar to that of pineapple (VARMA; MADRAS, 2008; MARTINS et al., 2013).

Butyl butyrate can be obtained by direct extraction from fruits or by chemical synthesis (PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012; MARTINS et al., 2013). The production of flavors by direct extraction from fruits is dependent of environmental factors which makes the extraction process expensive and chemical synthesis often results in the formation of undesirable byproducts, reducing process efficiency and increasing downstream costs (PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009; MARTINS et al., 2011; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012; MARTINS et al., 2013). Therefore the use of lipases in flavor ester synthesis results in lower cost compared to the direct extraction process from fruits and higher selectivity than chemical synthesis, as well as acquiring of compounds considered “natural” (MARTINS et al., 2011; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012).

Thus, for utilization of ANL in specific applications, knowledge on the reaction parameters for determining the high conversion yield is essential.

The aim of this study was to produce butyl butyrate catalyzed by ANL and assess the effect of parameters such as temperature, substrate molar ratio and added water on the ester yield. A face-centered design (FCD) coupled with the response surface methodology (RSM) was applied to determine optimal yield of butyl butyrate. Additionally, the routes of butyl butyrate synthesis under the best conditions tested were investigated in order to determine the optimal operating conditions in terms of reaction time and high conversion yields for the industrial application of ANL.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials and reagents

Lipase from *Aspergillus niger* (ANL) was kindly provided by Prozyn BioSolution (São Paulo, Brazil). Hydrolytic activity of ANL (95.84 U/g) was estimated by hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) at pH 8.0 and 45 °C (WINKLER; STUCKMANN, 1979). One unit of hydrolytic activity is defined as 1 μmol of p-nitrophenol released per minute per mg of enzyme. Bovine serum albumin (BSA, 98%), butyl butyrate, butyric acid, n-butanol and hexane were purchased from

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were of analytical grade.

2.2. Total protein determination

The protein concentration was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976). Absorbance was measured at 595 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Scientific, USA) and the analytical curve was constructed using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

2.3. Assay of synthesis activity

The synthesis reactions of butyl butyrate in organic media were carried out in screw-capped vials using n-butanol and butyric acid as substrates. The standard mixture was composed of 5 ml of hexane as the reaction medium. Temperature, substrate molar ratio (butyric acid: n-butanol) and added water (% by volume of reaction medium) were selected according to each defined experimental condition (Table 1). In all experiments the butyric acid concentration was maintained constant at 0.120 mol/L and the n-butanol concentration was varied as 0.182 mol/L, 0.289 mol/L and 0.706 mol/L.

The enzyme (± 0.08 g, d.wt) was initially weighted in the reaction vial and then added to the reaction mixture. This sample was incubated at the selected temperature for 24 h with continuous shaking. Butyric acid consumption and the butyl butyrate formed were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) with a diode array detector (Shimadzu, Japan), at a wavelength set at 210 nm. A reverse phase column (C18 apHeraTM, 250 mm \times 4.6 mm, Supelco Analytical) was employed for chromatographic separation. The mobile phase was composed of acetonitrile/water (75:25, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. A volume of 20 μ L was injected into the chromatograph and the esters were eluted from the column using an isocratic method (CHEN, 1996). The retention times of butyric acid and butyl butyrate under these conditions are 4.0 min and 6.0 min, respectively. Each sample was previously filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore, Bedford, USA).

The esterification yield (Y , %) in butyl butyrate synthesis was based on the amount of butyric acid consumed (Eq. (1)) (MARTINS et al., 2011).

$$Y\% = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

where C_0 is the initial molar concentration of butyric acid (mol/L) and C_f is the final molar concentration of butyric acid (mol/L).

2.4. Experimental design and statistical analysis

A face-centered design (FCD) with three independent variables, specifically temperature (X_1), substrate molar ratio (butyric acid: n-butanol) (X_2) and added water (X_3) coupled with RSM was carried out in order to obtain the optimal conditions for synthesis reactions of butyl butyrate. RSM includes factorial designs and regression analysis and it is applied to evaluate the significance of several affecting factors even in the presence of complex interactions (GÜVENÇ et al., 2007). For this design setup, the original and coded variables as well as each level are shown in Table 1. Table 2 shows the experimental conditions evaluated by the FCD, with three variables at three levels and four replications at the central point. In each case the esterification yield was determined.

The experimental data obtained from the FCD (Table 2) was analyzed by the response surface regression procedure (RSREG, SAS Institute Inc., v. 9.0, Cary, NC, USA) using the second order polynomial equation (Eq. (2)):

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

where Y is the response variable, β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the regression coefficients for intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively and X_i and X_j are the independent variables.

Statistical significance of the model was evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the suitability of the model was assessed using Fisher's statistical test (F -test) by testing for significant differences between sources of variation in experimental results, i.e. the significance of the regression, the lack of fit, and the coefficient of multiple determination (R^2). For each parameter estimator (β_i), a test of significance was performed. Parameters with less than 95% significance ($p > 0.05$) were pooled into the error term. Results associated with the RSM were used to visualize the effect of the factors on the esterification reaction and to optimize this response, i.e., to determine conditions that maximize yield of the esterification

reaction. All statistical analyses were carried out using the SAS v.9 software (SAS Institute Inc., v. 9.0, Cary, NC, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Experimental design, model fitting and ANOVA

Experimental results obtained from the FCD are shown in Table 2. Statistical analysis of the esterification yield using the full quadratic model was tested by ANOVA using a Fisher statistical test. The results of the ANOVA can be visualized in a Pareto chart (Fig. 1), in which the standardized estimated effect of each factor is plotted in decreasing order and compared to the minimum magnitude of a statistically significant factor with 95% confidence, represented by the vertical dashed line.

Table 1

Coded and uncoded values for each factor of the face-centered design (FCD)

Factor	Name	Levels		
		-1	0	+1
X_1	Temperature (°C)	40.0	45.0	50.0
X_2	Substrate molar ratio (butyric acid: n-butanol)	1: 5.88	1:2.41	1:1.52
X_3	Added water (% (v/v))	0	0.7	1.4

According to Fig. 1, the variable that showed the highest estimated linear effect on esterification yield was the added water followed by its quadratic effect. The next linear significant effect was the substrate molar ratio and lastly the negative effect of temperature which points out the importance of working at low temperature reaction.

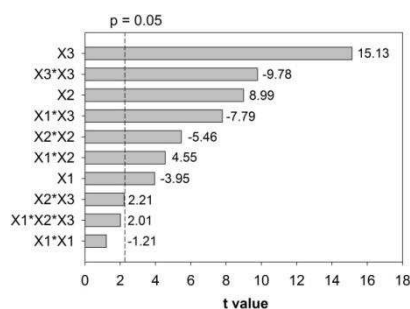


Fig. 1. Pareto chart for the standardized effects of the variables temperature (X_1),

substrate molar ratio (X_2) and added water (X_3) on the esterification yield.

Table 2

Experimental design and results of the FCD

Assay	X_1	X_2	X_3	Esterification yield (%)
1	-1	-1	-1	12.27
2	-1	-1	+1	86.82
3	-1	+1	-1	23.97
4	-1	+1	+1	99.98
5	+1	-1	-1	15.55
6	+1	-1	+1	19.75
7	+1	+1	-1	45.52
8	+1	+1	+1	79.99
9	-1	0	0	98.40
10	+1	0	0	97.32
11	0	-1	0	70.13
12	0	+1	0	99.38
13	0	0	-1	44.66
14	0	0	+1	98.22
15	0	0	0	92.72
16	0	0	0	98.09
17	0	0	0	98.70
18	0	0	0	98.23

After removing the factors that were not statistically significant at a 95% confidence level, new reduced models were obtained for the response variable by regression analysis using only the significant factors listed before. The ANOVA (Table 3) performed for the reduced models indicated that the model is statistically valid, with significant p-values ($p < 0.0001$). A lack-of-fit test, which compares the residual error to the pure error from replication at the central point was evaluated and p-values higher than 0.05 were obtained for the response variable. These reduced models can be described by Eq. (3), in terms of coded values.

$$Y = 98.656 - 6.33X_1 + 14.43X_2 + 24.28X_3 - 18.15X_2^2 - 31.46X_3^2 + 8.17X_1X_2 - 13.98X_1X_3 \quad (3)$$

where Y is the percentage of esterification yield and X_1 , X_2 and X_3 are the coded values of temperature, substrate molar ratio and added water, respectively.

The coefficient of determination (R^2) was found to be 0.98 and there are also a non-significant lack of fit ($p > 0.06$). This result showed the suitability of the model for an appropriate representation of the real relationship among the reaction variables.

Table 3

Analysis of variance performed for esterification yield (Y) using the FCD design

Source	SS	DF	MS	<i>F-values</i>	<i>p-values</i>
Model	19127.97	7	2732.57	61.07	<.0001
Error	447.42	10	44.74		
Lack of fit	423.58	7	60.71	7.64	0.0616
Pure error	23.84	3	7.95		
Total	19575.39	17			

SS: Sum of square; DF: Degrees of freedom; MS: Mean Square.

The whole effects of the studied factors on esterification yield can be better visualized by examining the contour plots presented in Figs. 2 A, B and C.

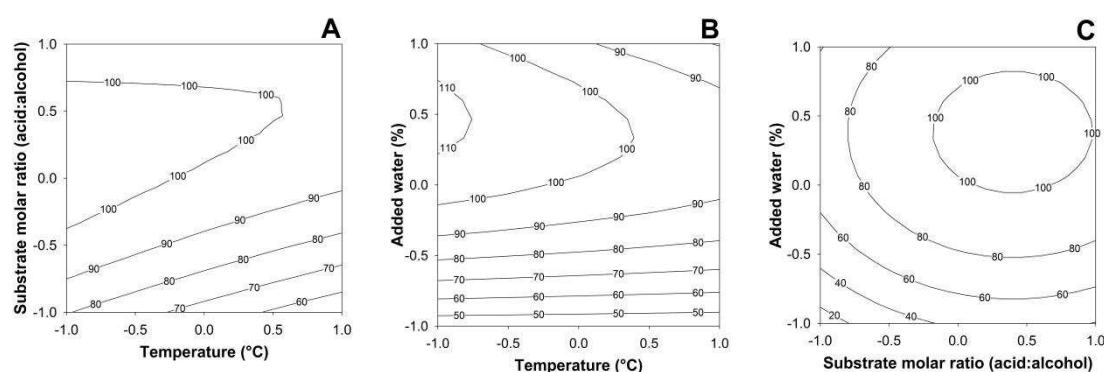
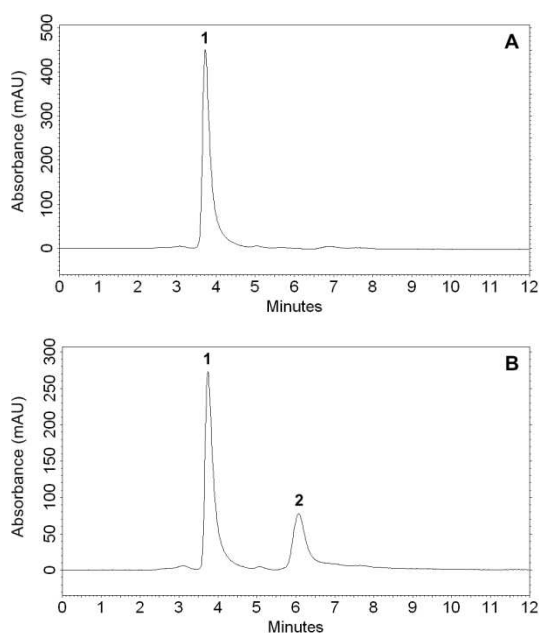


Fig. 2. Effects of reaction parameters on esterification yield: (A) temperature (°C) and substrate molar ratio (acid:alcohol); (B) temperature (°C) and added water (%); (C) substrate molar ratio (acid:alcohol) and added water (%). The numbers inside the contour plots indicate esterification yields (%) at given reaction conditions. In each figure, the missing variable was fixed at the central point.

Observing the contour plots (Fig. 2), it can be verified that at low temperatures and medium levels of substrate molar ratio and added water, the esterification yield was over 90%. In the range of experimental conditions studied, the optimal experimental conditions for butyl butyrate synthesis corresponded to the reaction mixture incubated at 40 °C, molar ratio of 1:2.41 butyric acid: n-butanol and 1.05% (v/v) of added water. Under these conditions, the experimental esterification yield was $98.8\% \pm 0.19\%$.

Additionally, experiments were performed at the optimal conditions defined by the experimental design in order to evaluate the reaction progress of butyl butyrate synthesis catalyzed by ANL (Figs. 3A, B and C). This is considered an important indicator of the ester synthesis since reaction time is related to efficiency and productivity. Results show $94.7\% \pm 0.89\%$ conversion obtained after 20h of reaction (Fig. 4). Others works reported approximately 18h, 24h and 25h for maximal yields (74%, 56% and 69.6%) of butyl butyrate synthesis using lipase of *Aspergillus sp.*(LANGRAND et al., 1990), *Aspergillus niger* (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002) and *Aspergillus niger* ADF 75,000 (WELSH; WILLIAMS, 1990), respectively. In this work it was achieved 60% of esterification yield after 5 h of reaction, which is interesting for industrial applications.



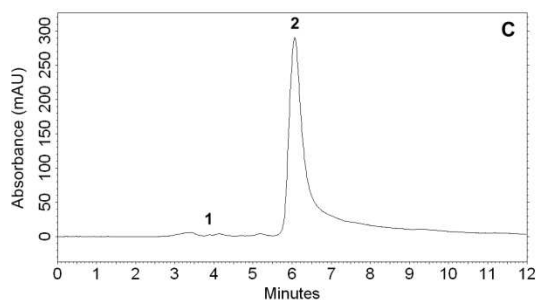


Fig. 3. Chromatogram of butyl butyrate synthesis catalyzed by ANL under optimal time condition: 0h (A), after 5h (B) and after 24h (C). Chromatographic peaks are as follows: butyric acid (1) and butyl butyrate (2).

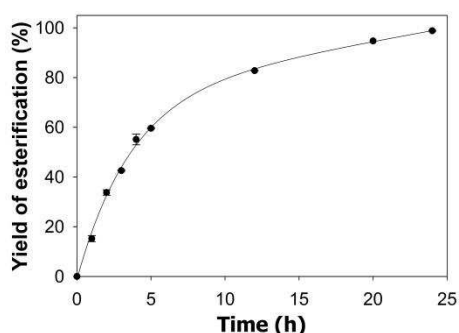


Fig. 4. Esterification yield (%) as a function of time for butyl butyrate synthesis catalyzed by *Aspergillus niger* lipase at the best experimental conditions.

3.2. Effect of reaction parameters on esterification yield

3.2.1. Effect of water

Observing the contour plots (Figs. 2B and 2C) it can be seen that the esterification yield increased with the increasing quantity of water added, whereas in the reaction system with no initial added water a poor esterification yield (less than 46%) was observed.

Based on these results, it can be confirmed that the presence of water strongly contributed to ester synthesis. In fact, these results agreed with the studies of other researchers (WELSH; WILLIAMS, 1990; MONOT et al., 1991), who suggested that an optimum amount of water greater than that found in the anhydrous solvent might be required to ensure enzyme activity, especially for reaction mixtures containing hydrophilic substrates. In the reaction media in which hydrophilic substrates are employed (i.e. butyric acid) the added water should be increased to prevent undesirable interactions between the hydrophilic substrates and enzyme hydration

water, which are fundamental to maintain its active three-dimensional conformational form and mobility (KISEE; FUJIMOTO; NORITOMI, 1988; WELSH; WILLIAMS, 1990; MONOT et al., 1991; CHEN, 1996; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998; MARTINS et al., 2011). However, because water is one of the products of the esterification reaction employing a primary aliphatic monoalcohol and an aliphatic monoacid, it has been reported that an excess of water can decrease the esterification yield by shifting the equilibrium towards hydrolysis rather than synthesis (GOLDBERG; THOMAS; LEGOY, 1990; KARRA-CHAABOUNI et al., 2002; BEN SALAH et al., 2007; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012; LORENZONI et al., 2012).

In the present study it was found that the optimal content of added water was 1.05% (v/v) which was suitable to maintaining a proper enzyme hydration level during the full reaction time. Other researchers found that the optimum amount of water added to the reaction mixtures was 0.25% (w/w) for butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym[®] 435 (MARTINS et al., 2011) and 5% (v/v) in butyl butyrate synthesis (MONOT et al., 1991) catalyzed by *Mucor miehei* lipase.

3.2.2. Effect of substrate molar ratio

Several researchers have suggested that high initial alcohol concentrations can shift the esterification reaction from hydrolysis to ester biosynthesis because the equilibrium of the reaction is directed toward product formation as the nucleophile (alcohol) concentration is elevated (GUBICZA et al., 2000; HARI KRISHNA et al., 2001; ROMERO, M. D. et al., 2005; HAN et al., 2009; MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010; MARTINS et al., 2011; ROMERO, M. D. et al., 2011; JIN et al., 2012). Thus, from previous studies it was decided to work with high initial alcohol concentrations, with a substrate molar ratio around 1:5 to 1:1.5 (acid:alcohol) and maintaining the butyric acid molar concentration fixed at 120 mmol/L. The substrate molar ratios utilized are within the ranges commonly studied (YADAV; LATHI, 2003; MELO; PASTORE; MACEDO, 2005; PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2007; AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010; MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012; JIN et al., 2012).

As is shown in Figs. 2A and C, the extent of esterification was negatively affected by an alcohol excess, especially when the initial n-butanol concentration

was increased from approximately 1:3.42 to 1:5.88 (butyric acid:n-butanol). This excess of alcohol content was detrimental to ester synthesis and could be attributed to the inhibitory effect of n-butanol on the reaction, since alcohol was found to act as a dead-end inhibitor of the enzyme in the synthesis of other esters (YADAV; LATHI, 2003; GOGOI et al., 2008; AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010). This same inhibitory effect was observed by others (HARI KRISHNA et al., 2001; ROMERO, M. D. et al., 2005; MARTINS et al., 2013) when working with a substrate molar ratio of approximately 1:4 (acid: alcohol). Therefore, it could be hypothesized that alcohol excesses in the reaction medium led to the formation of an inactive complex between the second substrate n-butanol and the binary enzyme–acyl complex, or affected acyl transfer due to alcohol binding, as other studies have reported (CHEN, 1996; HARI KRISHNA et al., 2001; YADAV; LATHI, 2003; PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2007; ROMERO, M. D. et al., 2007; AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010). Therefore, the best molar ratio of butyric acid to alcohol was found to be 1:2.41.

3.2.3. Temperature effect

As reported in literature, the temperature parameter may favor the reaction kinetics or negatively affect the stability of the enzyme (YADAV; LATHI, 2003; MAHAPATRA et al., 2009; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012). As is visualized in Figs. 2 A and B, the esterification yield decreased with increases in temperature. This negative effect was also observed in biosynthesis of butyl butyrate (SANTOS; CASTRO, 2006) and ethyl butyrate (RODRIGUEZ-NOGALES; ROURA; CONTRERAS, 2005; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012), and may be due to thermal inactivation of the enzyme which negatively affects its stability (YONG; AL-DURI, 1996; MAHAPATRA et al., 2009; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012).

In the present study, the optimum temperature for butyl butyrate synthesis was found to be 40 °C (Figs. 2A and B). Some authors reported the best results for butyl butyrate synthesis using lipase from *Aspergillus niger* (WELSH; WILLIAMS, 1990) and *Thermomyces lanuginosus* (MARTINS et al., 2013) at 50 °C, and when using lipase from *Rhizomucor miehei* at 40 °C (LORENZONI et al., 2012).

4. CONCLUSION

This work demonstrated that lipase from *Aspergillus niger* is a suitable choice to catalyze the synthesis of butyl butyrate due to its high esterification yields (94.7% after 20h of reaction). It was also concluded that the added water played an important role in maintaining the enzyme stability and mobility, since 1.05% (v/v) of added water was the highest amount that can be used in the reaction to obtain maximal esterification yields (above 90%).

5. REFERENCES

AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3628-3634, 2010.

BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, P. D. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n., p. 614-621, 2005.

CARVALHO, P. D. O.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; CALAFATTI, S. A.; MACEDO, G. A. Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 713-718, 2006.

CARVALHO, P. D. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V. Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: optimization of process parameters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n., p. 117-124, 2009.

CHEN, J.-P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 404-407, 1996.

CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 393-397, 2002.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. D. G.; CARVALHO, P. D. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 163-171, 2010.

DANDEVATE, V.; MADAMWAR, D. Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 265-270, 2007.

DE OLIVEIRA CARVALHO, P.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; ALVES MACEDO, G. Kinetic Properties and Enantioselectivity of The Lipases Produced by Four *Aspergillus* Species. **Food Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 183-192, 2005.

GOGOI, S.; PATHAK, M. G.; DUTTA, A.; DUTTA, N. N. Porcine pancreas lipase catalyzed synthesis of lauryl laurate in organic solvent media: A kinetic study. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 45, n. 3, p. 192-197, 2008.

GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M.-D. The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, n. 3, p. 603-609, 1990.

GUBICZA, L.; KABIRI-BADR, A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO, K. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 193-196, 2000.

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

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOĞAN, Ö.; MEHMETOĞLU, Ü. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778-785, 2007.

HAN, S.-Y.; PAN, Z.-Y.; HUANG, D.-F.; UEDA, M.; WANG, X.-N.; LIN, Y. Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 168-172, 2009.

HARI KRISHNA, S.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193-201, 2001.

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

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.-Y.; ZHENG, S.-P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 108-114, 2012.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KARRA-CHAABOUNI, M.; PULVIN, S.; THOMAS, D.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a *Mucor miehei* esterase in a solvent-free system. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 23, p. 1951-1955, 2002.

KIM, H.-R.; HOU, C. T.; LEE, K.-T.; KIM, B. H.; KIM, I.-H. Enzymatic synthesis of structured lipids using a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 846-849, 2010.

KISEE, H.; FUJIMOTO, K.; NORITOMI, H. Enzymatic reactions in aqueous-organic media. VI. Peptide synthesis by α -chymotrypsin in hydrophilic organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 279-290, 1988.

LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 8, p. 581-586, 1990.

LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.; LI, X. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 265-270, 2009.

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

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; KUMAR GARLAPATI, V.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1-2, p. 57-63, 2009.

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

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

MELO, L. L. M. M.; PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3181-3185, 2005.

MHETRAS, N.; PATIL, S.; GOKHALE, D. Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: A Potential Biocatalyst for Synthesis of Isoamyl Acetate. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 432-437, 2010.

MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1486-1490, 2009.

MONOT, F.; BORZEIX, F.; BARDIN, M.; VANDECASTEELE, J.-P. Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 759-765, 1991.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 669-677, 1995.

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

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

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 63-68, 2005.

ROMERO, C. M.; PERA, L. M.; LOTO, F.; VALLEJOS, C.; CASTRO, G.; BAIGORI, M. D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 25-31, 2012.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 42-48, 2005.

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

ROMERO, M. D.; GÓMEZ, J. M.; DÍAZ-SUELTO, B.; GARCÍA-SANZ, A. Study of the influence of alcohols in the synthesis of short chain esters. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, n., p. 37-42, 2011.

SAISUBRAMANIAN, N.; EDWINOLIVER, N. G.; NANDAKUMAR, N.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 669-676, 2006.

SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Optimization of Lipase-catalysed Synthesis of Butyl Butyrate Using a Factorial Design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1007-1011, 2006.

SILVA, V.; CONTESINI, F.; OLIVEIRA CARVALHO, P. Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in different supports. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 949-954, 2009.

SOUMANOU, M.; BORNSCHEUER, U.; MENGE, U.; SCHMID, R. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 427-433, 1997.

VARMA, M. N.; MADRAS, G. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 8, p. 1135-1144, 2008.

WANG, P.-Y.; CHEN, Y.-J.; WU, A.-C.; LIN, Y.-S.; KAO, M.-F.; CHEN, J.-R.; CIOU, J.-F.; TSAI, S.-W. (R,S)-Azolides as Novel Substrates for Lipase-Catalyzed Hydrolytic Resolution in Organic Solvents. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 351, n. 14-15, p. 2333-2341, 2009.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase-mediated production of ethyl butyrate and butyl butyrate in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 10, p. 743-748, 1990.

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

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 245-252, 2003.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

YONG, Y. P.; AL-DURI, B. Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 65, n. 3, p. 239-248, 1996.

CAPÍTULO 3

IMMOBILIZATION OF LIPASE INTO A SUPERMACROPOROUS MONOLITHIC CRYOGEL: APPLICATION IN ESTERIFICATION AND INTERESTERIFICATION REACTIONS

Abstract

In this work, a novel bioreactor consisting of *Aspergillus niger* lipase (ANL) entrapped into a polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel was developed. The bioreactor obtained was characterized in terms of their morphological properties and immobilization parameters. It was also assessed the effect of addition of additives in immobilization parameters. The use of additive triton X-100 resulted in a significant increase in the apparent hydrolytic activity (U/g_{cryogel}), immobilization yield (%) and protein content ($mg_{\text{protein}}/g_{\text{cryogel}}$). The scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis indicated that the cryogel matrix was unaffected by the presence of the lipase and Triton X-100. The bioreactor performance in catalyzing of butyl butyrate synthesis was studied as a function of temperature ($^{\circ}\text{C}$), substrate molar ratio (butyric acid: n-butanol) and added water (% (v/v)). The bioreactor was also applied in interesterification reactions. The optimal conditions for butyl butyrate synthesis were found at 40°C , a butyric acid:n-butanol molar ratio of 1:1.43 and added water of 65% (v/v). Under these conditions, above 46% of esterification yield was achieved. The reusability of the bioreactor proved to be attractive with 4 consecutive reuses in esterification reaction, a residual esterification yield of 64.6% and volumetric activity of 31.6 mmol/mL.h . High interesterification yield (17.35% in 24 h) was achieved in the experimental condition of substrates concentration of 15 mmol/L , added water of 35% (v/v) and temperature of 40°C . These results indicate that the developed bioreactor is a promising biocatalyst for biotechnology applications.

Keywords: supermacroporous monolithic cryogel, *Aspergillus niger* lipase, immobilization, entrapment, interesterification, structured lipids

1. INTRODUCTION

The requirements for "natural products", with high nutritional value and at the same time with reduced saturated fatty acids content or specific intermediates of industrial interest have become the enzyme immobilization technology an attractive alternative for utilization in many reactions in industrial scale (KIM, H.-R. et al., 2010; MICHAUX et al., 2010; MARTINS et al., 2011; JIN et al., 2012; PÉRIGNON et al., 2013; SOUMANOU, M. M.; PÉRIGNON; VILLENEUVE, 2013).

The versatility of lipases (glycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) in biocatalysis such as the triacylglycerols hydrolysis (GUAUQUE TORRES; FORESTI; FERREIRA, 2013), aminolysis (COUTURIER; TAUPIN; YVERGNAUX, 2009), transesterification (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002; HSU et al., 2004; ANUAR et al., 2013), esterification (GUNCHEVA et al., 2011; MARTINS et al., 2013) and this ability to produce the structured lipids have attracted interest of the chemical and food industries (BALCÃO, V. M.; PAIVA; XAVIER MALCATA, 1996; SAXENA et al., 2003; PAULA, A. et al., 2010; MARTINS et al., 2011; PÉRIGNON et al., 2013; SOUMANOU, M. M.; PÉRIGNON; VILLENEUVE, 2013).

The enzymatic synthesis of structured lipids has presented a technological challenge and a new frontier in the development of nutritionally superior products. Despite extensive research in this area, there is a need to develop methods of enzymatic catalysis for the production of structured lipids in an economically viable way (PABAI; KERMASHA; MORIN, 1995; SRIVASTAVA et al., 2006; PAULA, A. et al., 2010; NUNES et al., 2011a; SOUMANOU, M. M.; PÉRIGNON; VILLENEUVE, 2013; TELES DOS SANTOS; GERBAUD; ROUX, 2013).

Therefore, for practical and economic reasons, it's advantageous to use these enzymes in immobilized form (DAMNJANOVIĆ et al., 2012; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012; SUN et al., 2012; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012).

The use of immobilized enzymes is an attractive alternative for this purpose, since in this process the enzyme is retained in the support and the cost of acquisition of new biocatalyst is minimized. Moreover, enzymatic interesterification processes are specific and occur at mild temperatures, with no need for induction periods

(PAULA, A. V. et al., 2010; NUNES et al., 2011a; PÉRIGNON et al., 2013; SOUMANOU, M. M.; PÉRIGNON; VILLENEUVE, 2013).

Additionally, the immobilization process enables the application of the immobilized system for use in continuous or semi-continuous processes (SOUMANOU, M. et al., 1997).

An important decision to be taken in order to establish a method of immobilization of lipases is the choice of support material since these enzymes can act simultaneously in the reaction of hydrolysis and synthesis, which commonly occur in macro and micro-aqueous systems, respectively (MILAŠINOVIĆ et al.; MUSTRANTA; FORSSELL; POUTANEN, 1993; JAEGER, K.-E.; EGGERT, T., 2002; SCHRADER et al., 2004; MARTINS et al., 2011). In this context, reactions involving large or hydrophilic substrates in the presence of hydrophobic surface might promote some steric hindrances, reducing the lipase activity (KAWAKAMI et al., 2004; HE, P.; GREENWAY; HASWELL, 2010). On the other hand, the use of hydrophilic support in synthesis reactions in organic medium seems to be incompatible (MILAŠINOVIĆ et al., 2012).

In this context, the polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel is a potential support for these biotechnological field due to its excellent biocompatibility with biomolecules (ARVIDSSON et al., 2003; KUMAR et al., 2003; LOZINSKY, V. I. et al., 2003; PLIEVA et al., 2004b; YAO, KEJIAN et al., 2006), low-cost materials (KUMAR et al., 2003; PLIEVA et al., 2004b; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012) and high porosity structure, which results in low back pressure, short diffusion paths and reduction of blocking problems (ARVIDSSON et al., 2003; KUMAR et al., 2003; LOZINSKY, V. I. et al., 2003; YAO, KEJIAN et al., 2006; JAIN; KUMAR, 2009; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012; UYGUN, D. et al., 2012).

Other features that make the cryogel an interesting support for lipase immobilization is its high loading capacity (KUMAR et al., 2003; MALLIK; HAGE, 2006; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012) and natural water content (PLIEVA et al., 2004a; PLIEVA et al., 2004b; ERZENGIN; ÜNLÜ; ODABAŞI, 2011; CARVALHO, B. M. A. et al., 2013). Although it appears that the water content shifts the reaction equilibrium of synthesis to hydrolysis, in the literature is well documented that a proper enzyme hydration state would be also necessary for its stability and activity (WELSH; WILLIAMS, 1990; MONOT et al., 1991; CHEN,

1996; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998; MILAŠINOVIĆ et al., 2012). Thus, the hydrolysis and esterification reaction can be modulated by a careful control of swelling/deswelling of cryogels (MILAŠINOVIĆ et al., 2012). Nevertheless, the reaction parameters of synthesis need to be optimized for each new system of lipase immobilization (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002; MILAŠINOVIĆ et al., 2012).

Additionally, the cryogel can be produced in the form of monolithic columns allowing the coupling of enzymatic processes in reactors and can be operated at continuous flow (HANORA et al., 2005; HE, P.; GREENWAY; HASWELL, 2010; KHAN et al., 2012; ANUAR et al., 2013). Such system configuration offers benefits that are unattainable when using packed-bed configurations (KUMAR et al., 2003; TOKESHI et al., 2003; HONDA et al., 2006; RAHMAN; KAMARUDDIN; UZIR, 2011) such as the optimization of lipase/substrate contact time (BALCÃO, V. M.; PAIVA; XAVIER MALCATA, 1996; TISHER; KASCHE, 1998; FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999; VILLENEUVE et al., 2000; MATEO et al., 2007).

Most works involving cryogels applications are related to chromatographic and purification processes (LUO et al., 2002; MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S., 2004; PLIEVA et al., 2004b; HANORA et al., 2005; MALLIK; HAGE, 2006; YUN et al., 2007; MICHAUX et al., 2010; ERZENGIN; ÜNLÜ; ODABAŞI, 2011; YUN et al., 2012) and few studies using these new materials as matrices for enzyme immobilization are reported (BUSTO et al., 2007; KHAN et al., 2012; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012; UYGUN, M. et al., 2012; ALTUNBAŞ et al., 2013). Hence, the immobilization of lipases in cryogels extends the industrial applications of this biocatalyst in processes involving viscous substrates and at not clarified media.

In this study, it was reported a simple method for entrapped *Aspergillus niger* lipase (ANL) into a polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel as bioreactor device. The performance of bioreactor in butyl butyrate synthesis in biphasic system hexane-water was tested. Butyl butyrate is a short chain ester with valuable flavor and fragrance commonly used in food and chemical industries (VARMA; MADRAS, 2008; MARTINS et al., 2013). Thus, in order to improve conditions for ester synthesis, a central composite rotatable design (CCRD) and response surface methodology (RSM) were used to evaluate the effects of several reaction parameters on the ester yield. The bioreactor was characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and morphological analysis. The reusability

of the bioreactor has also been evaluated. In addition, the bioreactor was applied in interesterification reactions of triolein with tripalmitin since these triglycerides are formed only by oleic and palmitic acid, respectively, which are presented in high quantity in the raw materials of oils and fats industry, besides they represent an adequately reaction system interesterification model.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials and reagents

Lipase from *Aspergillus niger* (ANL) was kindly provided by Prozyn BioSolution (São Paulo, Brazil). Bovine serum albumin (BSA, 98%), *N,N,N',N'* - Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED, 99%), acrylamide (AAm, 99%), *N,N'* - methylene-bis(acrylamide) (MBAAm, 99%), allylglycidyl ether (AGE, 99%), and ammonium persulfate (APS, 98%), p-nitrophenyl palmitate (p-NPP), p-nitrophenol, butyl butyrate, butyric acid, n-butanol, hexane, polyethylene glycol, average molar mass 1500 g/mol (PEG 1500), Triton X-100, Tween 80 and Tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All other chemicals used were of analytical grade.

2.2. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase into cryogel column

2.2.1. Preparation of the cryogel column containing entrapped lipases

A supermacroporous monolithic cryogel containing entrapped lipase was produced by polymerization in the frozen state of the monomers AAm and AGE with MBAAm as a crosslinker and added of lipase solution in presence of APS and TEMED as an initiator and activator pair, respectively. Monomers (1.185 g of AAm, 0.3175 g of MBAAm and 0.25 mL of AGE) were dissolved in 17 mL of deionized water (6% of final concentration) (ARVIDSSON et al., 2003). Then, a volume of 8 mL of lipase solution (3.45 mg_{protein}/mL) was added to a monomers mixture and then the free radical polymerization was initiated by APS (27.5 mg) and TEMED (23.8 μL). The reaction mixture was poured into a glass column (I.D. 5 mm, length of 100 mm) and was frozen at -12 °C for 22 h into a refrigerated bath system (QUIMIS, Brazil) containing ethanol. Pure cryogel was prepared by the same way described above, but without the addition of enzyme solution, which was replaced by deionized water. After, the column was washed with 300 mL of water at a flow rate of 0.25 mL/min and then stored at 4 °C.

2.2.2. Effect of additives on immobilization

It was evaluated the influence of the additives Triton X-100, PEG 1500 and Tween 80 on the parameters RHA and η of the bioreactors obtained. Each additive was added during the preparation of ANL solution that was subsequently added to the solution containing the monomers (AAm, MBAAm and AGE). The values of concentration of additives Triton X-100 (0.34 mg/mL), PEG 1500 (0.64 mg/mL) and Tween 80 (0.64 mg/mL) were determined from preliminary experiments where it was found that the addition of Triton X-100 and Tween 80 at concentrations above 0.4 mg/ mL and 0.7 mg/ mL, respectively, hindered the process of cryopolymerization and formation of cryogel (results not shown). Controls were taken by producing cryogels with entrapped ANL at the same conditions described above but without addition of additive.

2.2.3. Determination of protein content immobilized into the cryogel matrix

Total protein content immobilized into the cryogel was determined indirectly from the difference between the amount of protein introduced into the glass column and the protein content in the washing solution. The amount of free protein added into the glass column and in the washing solution was measured by the Bradford method (BRADFORD, 1976). Absorbance was measured at 595 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Scientific, USA) and the analytical curve was constructed using bovine serum albumin (BSA) as the standard.

2.2.4. Assay of hydrolytic activity

The hydrolytic activity of the bioreactor was estimated by monitoring hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) into p-nitrophenol (GUPTA, N.; RATHI; GUPTA, 2002; CHIOU; WU, 2004). The substrate solution was obtained by addition of 6 mL of p-NPP solution (7.95 mmol/L in isopropanol) to 54 mL of Tris HCl buffer (50 mmol/L, pH 8.0, containing 0.4% w/v of Triton X-100 and 0.1% w/v of arabic gum) under continuous stirring. Then, the substrate solution was pre-incubated for 30 min at 45 °C and after that, it was pumped through the bioreactor at flow rate of 0.25 mL/min over 1 h at 45 °C. Samples were collected at the outlet of the bioreactor and the content of p-nitrophenol released was quantified by a UV-Vis spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Scientific, USA) at 410 nm. Under these conditions, sample blank corresponded to the substrate solution before this being

pumped through the bioreactor. An analytical curve was constructed using p-nitrophenol at different concentrations (0 µg/mL to 0.05 µmol/mL). Activity was expressed as international units (IU), where 1 IU was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of p-nitrophenol per minute under the assay conditions.

2.2.5. Determination of immobilization parameters

The efficiency of immobilization was evaluated in terms of parameters hydrolytic activity recovered (R_{HA}) and loading efficiency (η), as follows (WON et al., 2005; MILAŠINOVIĆ et al., 2012):

$$R_{HA}(\%) = \frac{HA_i}{HA_0} \times 100 \quad (1)$$

Where HA_0 is the specific hydrolytic activity of free lipase (U/mg_{protein}) and HA_i is the specific hydrolytic activity of immobilized lipase (U/mg_{protein}).

$$\eta(\%) = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100 \quad (2)$$

Where C_i is the initial protein concentration added into the glass column, V_i is the initial volume of enzyme solution, C_f is the protein concentration of the washing solution and V_f is the total volume of the washing solution.

2.3. Morphological characterization of lipase-immobilized into cryogel

2.3.1. Porosity (ϕ), water fraction (ϕ_w) and degree of swelling (S)

The porosity (ϕ) of pure cryogel monolith and containing entrapped lipase was estimated by measuring the content of free water and the monolith volume of a given sample. A sample of the cryogel saturated with deionized water was immersed in deionized water of a given volume V_1 in a measuring cylinder and the total volume V_2 was determined. The sample volume V_0 was calculated by the volume difference, i.e., $V_0 = V_2 - V_1$. The mass of the wet sample saturated with water, m_w , was weighted. The sample was squeezed to remove the free water within the large pores and the mass of the sample without free water (m_s) was weighted. The porosity was calculated by the Eq. (3) (ARVIDSSON et al., 2003; PLIEVA et al., 2004b; YAO, K. et al., 2006; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012):

$$\varphi = \left(\frac{m_w - m_s}{\rho_w V_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

where ρ_w is the deionized water density.

Then the sample was lyophilized and the dried mass m_d was determined, which was used to calculate the total water fraction (φ_w), according to Eq. (4):

$$\varphi_w = \left(\frac{m_w - m_d}{\rho_w V_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

The swelling degree of the cryogels (S (g water/g dry cryogel)) was determined according to Eq. (5) (ARVIDSSON et al., 2003; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012)

$$S = \frac{(m_w - m_d)}{m_d} \quad (5)$$

2.3.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out for evaluation of the macroporous structures of pure cryogel and containing immobilized lipase. The samples were prepared according to Palla et al. (2011). A small sample cut from the middle part of the cryogel monolith was dried and coated with gold/palladium (40/60) (PALLA; PACHECO; CARRÍN, 2011). The morphology of gel structure was examined using a scanning electron microscope (LEO 1430 VP, Zeiss, Jena, Germany) operated at 15 kV.

2.3.3. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

Cryogel matrix containing immobilized lipase (approximately 2 mg) was mixed and grounded with 200 mg of potassium bromide and compressed into a pellet under a pressure of 9.807×10^3 MPa. IR spectra of the pellets were obtained with a Perkin Elmer Spectrum 1000. The spectras were obtained in the wavenumber ranging from 500 to 4000 cm^{-1} for evaluation of the immobilization procedures. For comparison, FTIR analysis was done for the pure cryogel.

2.4. Bioreactor performance on esterification and interesterification reactions

2.4.1. Esterification reactions

The synthesis reaction of butyl butyrate was carried out using a substrate solution composed by hexane as the reaction medium and n-butanol and butyric acid as substrates. Temperature (°C), substrate molar ratio (butyric acid: n-butanol) and added water (% (v/v)) were selected according to each defined experimental condition (Table 1). In all experiments the butyric acid concentration was maintained constant at 0.120 mol/L and the n-butanol concentration was varied as 0.116 mol/L to 0.330 mol/L.

The substrate solution was pumped through the bioreactor at continuous flow rate of 0.1 mL/min during 24 h at different experimental condition (Table 2). Samples were collected at the outlet of the bioreactor and the content of butyl butyrate formed and consumed butyric acid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The esterification yield (Y , %) in butyl butyrate synthesis was determined according the Eq. (6) (GHAMGUI; KARRA-CHAÂBOUNI; GARGOURI, 2004).

$$Y\% = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (6)$$

Where C_0 is the initial molar concentration of butyric acid (mol/L) and C_f is the final molar concentration of butyric acid (mol/L).

2.4.1.1. Quantification of butyric acid and butyl butyrate

The butyric acid and butyl butyrate content were determined by liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) with a diode array detector (Shimadzu, Japan), at a wavelength set at 210 nm. A reverse phase column (C18 apHeraTM, 250 mm × 4.6 mm, Supelco Analytical) was employed for chromatographic separation. The mobile phase was composed of acetonitrile/water (75:25, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. A volume of 20 µL was injected into the chromatograph and the esters were eluted from the column using a isocratic method (CHEN, 1996). Each sample was filtered through a 0.22 µm nylon membrane (Millipore, Bedford, USA). Under these conditions, sample blank corresponded to the substrate solution.

2.4.2. *Interesterification reactions*

The interesterification reactions of tripalmitin (PPP) with triolein (OOO) were performed using hexane as the reaction medium. The effect of substrate concentration (15 mmol/L and 30 mmol/L) and added water (35% and 65% (v/v)) on interesterification yield (%) was evaluated and the experimental conditions tested are listed in Table 5. In all experiments the substrate molar ratio (tripalmitin:triolein) was maintained at 1:1.

The substrate solution was pumped through the bioreactor (cryogel matrix containing immobilized lipase) at continuous flow rate of 0.1 mL/min over 24 h at fixed temperature of 40 °C. Samples were collected at the outlet of the bioreactor and the content of triglycerides and free fatty acids (palmitic and oleic acid) were analyzed HPLC. The interesterification yield (I (%)) was calculated according to Eq. (7) (PAULA, A. et al., 2010).

$$I\% = \frac{(C_{C_{50}} + C_{C_{52}})_t}{(C_{C_{48}} + C_{C_{54}})_0} \times 100 \quad (7)$$

Where $C_{C_{50}}$ and $C_{C_{52}}$ are the concentration (mmol/L) of triglycerides having 50 and 52 carbons in the residues of fatty acids, respectively; $C_{C_{48}}$ and $C_{C_{54}}$ are the concentration (mmol/L) of tripalmitin and triolein, respectively. The indexes “ t ” and “ 0 ” represented the concentrations at given time and at the initial reaction, respectively.

The hydrolysis degree (H (%)) was calculated according to Eq. (8) (PAULA, A. V. et al., 2010).

$$H\% = \frac{(FA_f)_t}{(FA_t)_0} \times 100 \quad (8)$$

Where FA_f is the total concentration of free fatty acids formed in the reaction (mmol/L) and FA_t is the total concentration of fatty acids that would be liberated, considering the total hydrolysis of triglycerides in the reaction medium.

2.4.2.1. *Quantification of free fatty acids and triglycerides*

The free fatty acids and triglycerides content were determined by liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) using a liquid chromatograph (Shimadzu, Japan) with a diode array detector (Shimadzu, Japan), at a wavelength set at 205 nm. A reverse phase column (C18 apHera™, 250 mm × 4.6 mm, Supelco Analytical) was

employed for chromatographic separation, with the mobile phase composed of pure acetonitrile and water (97:3 (v/v)) at a flow rate of 1 mL/min and temperature of 40 °C. A volume of 5 µL was injected into the chromatograph and the triglycerides and palmitic acid (P) and oleic acid (O) were eluted from the column using an isocratic method (BORCH, 1975). Each sample was filtered through a 0.22 µm nylon membrane (Millipore, Bedford, USA).

Product concentrations were determined by the detection of all triglycerides present in the reaction medium in which the sum of carbon number in the fatty acid residues result in 50 (PPO, POP, and OPP) and 52 (POO, OPO, and OOP).

2.4.3. Operational stability of the bioreactor

The operational stability of the bioreactor was evaluated by successive esterification of butyric acid with n-butanol using the procedure described above in the section 2.6 at the best experimental conditions founded, with a time of 24 h for every run. The ester yield was monitored by determining the conversion of butyric acid as described above. After each run the bioreactor was rinsed with 100 mL of water at flow rate of 1 mL/min and stored for 12h at room temperature. Then, the bioreactor was used in a new run using fresh substrates.

2.5. Experimental design and statistical analysis

A central composite rotatable design (CCRD) with three independent variables, specifically temperature (°C) (X_1), substrate molar ratio (butyric acid:n-butanol) (X_2) and added water (% (v/v)) (X_3) coupled with RSM was carried out in order to obtain the optimal conditions for esterification reaction catalyzed by lipase-immobilized into cryogel.

For this design setup, the variables as well as their coded and uncoded values are presented in Table 1. The variables were coded according to Eq. (9):

$$X_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (9)$$

where X_i is the dimensionless coded value of an independent variable, X_i is the real value of an independent variable, X_0 is the real value of an independent variable (X_i) at the center point and ΔX_i is the step change value.

Table 1

Coded and uncoded values for each factor of CCRD

Factor	Name	Levels				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
X_1	Temperature (°C)	31.59	35.0	40.0	45.0	48.41
X_2	Substrate molar ratio (acid: alcohol)	1:2.75	1:2.0	1:1.43	1:1.11	1:0.97
X_3	Added water (% (v/v))	56.59	60.0	65.0	70.0	73.41

The experimental results obtained from the CCRD were analyzed by the response surface regression procedure (RSREG, SAS Institute Inc., v. 9.0, Cary, NC, USA) using the second order polynomial equation (Eq. (10)):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (10)$$

where Y is the response variable, β_0 is the model intercept, β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the quadratic coefficient, and β_{ij} is the interaction coefficient, X_i and X_j are the levels of the independent variables.

Statistical significance of the model was evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the suitability of the model was assessed using the Fisher statistical test (F -test) by testing for significant differences between sources of variation in experimental results, i.e. the significance of the regression, the lack of fit, and the coefficient of multiple determination (R^2). Parameters with less than 95% significance ($p > 0.05$) were excluded and assembled to the error term.

Results associated with the response surface methodology (RSM) were used to visualize the effect of the factors on the esterification yield and to optimize the response in order to determine conditions that maximize the esterification yield.

Results of immobilization parameters and morphological characterization were subjected to the ANOVA and means were compared by Tukey test at 95% of significance using SAS v.9 software. In this case, each experiment was done in triplicate and data were expressed as means \pm standard deviation. All statistical analyses were carried out using the SAS v.9 software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of additives on immobilization parameters and morphological properties

The effect of the additives Triton X-100, PEG 1500 and Tween 80 on the parameters protein content, apparent hydrolytic activity, R_{HA} and η of the bioreactors were evaluated as can be visualized in the Table 2. The experimental results were submitted to ANOVA at 95% of significance (Table 2).

Table 2

Influence of different additives on immobilization and morphological parameters of entrapped lipase into cryogel.

Additive	Immobilization parameters			
	Protein content	Apparent hydrolytic	R_{HA}	η
	(mg _{protein} /g _{cryogel})	activity (U/g _{cryogel})	(%)	(%)
Control (without additive)	7.74 ^b ± 0.31	0.047 ^d ± 0.002	20.64 ^a ± 2.2	43.52 ^b ± 0.31
Triton X-100	16.17 ^a ± 0.32	0.114 ^a ± 0.0005	20.58 ^a ± 2.5	59.05 ^a ± 0.79
PEG 1500	16.77 ^a ± 0.79	0.086 ^b ± 0.001	19.55 ^a ± 2.0	54.59 ^a ± 2.48
Tween 80	12.53 ^c ± 0.34	0.062 ^c ± 0.001	16.78 ^a ± 0.3	39.08 ^b ± 0.29
Morphological parameters				
	ϕ	ϕ_w	S (g water/g dry cryogel)	
Pure cryogel	77.8 ^a ± 0.9%	89.2 ^a ± 3.7%	18.175 ^a ± 0.034	
Control (without additive)	77.5 ^a ± 1.2%	85.2 ^a ± 1.2%	16.257 ^a ± 0.073	
Triton X-100	76.1 ^a ± 0.7%	88.6 ^a ± 1.7%	15.755 ^a ± 0.845	
PEG 1500	76.7 ^a ± 2.8%	89.1 ^a ± 3.7%	15.00 ^a ± 0.802	
Tween 80	76.5 ^a ± 2.4%	88.7 ^a ± 1.4%	15.691 ^a ± 0.033	

* Mean values with the same letter do not statistically differ from each other by the ANOVA Tukey test ($p=0.05$).

As can be seen in Table 2, the presence of additives significantly affected ($p=0.05$) the immobilization parameters as apparent hydrolytic activity and protein

content ($\text{mg}_{\text{protein}}/\text{g}_{\text{cryogel}}$) and Triton X-100 was the additive that provided greater increases in these parameters.

The same behavior was verified by Fernandez-Lorente et al. (2006), Fernandez-Lorente et al. (2007) and Guncheva et al. (2011) which verified that among the different additives used during the immobilization process the Triton X-100 showed the highest activity recovered (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2006; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007; GUNCHEVA et al., 2011).

As can be visualized by Transmission Electron Microscopy (TEM) in Fig. 1, free *Aspergillus niger* lipases appears to exhibit a tendency to form bimolecular aggregates in solution (PALOMO, JOSE M. et al., 2003; RODRIGUES et al., 2008). Therefore, the presence of Triton X-100 on the lipase solution used to prepare the bioreactor contributed to dispersion of the enzymes in the monomers solution, preventing the formation of lipase–lipase aggregates and minimized the mass transfer limitations (PALOMO, JOSE M. et al., 2005; THAKAR; MADAMWAR, 2005).

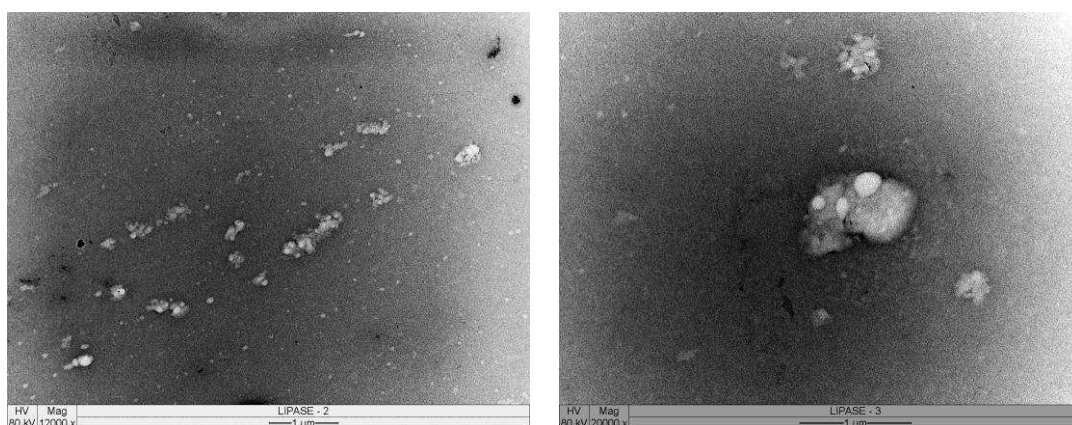


Fig. 1. TEM images of free *Aspergillus niger* lipase solution at the concentration of $3.45 \text{ mg}_{\text{protein}}/\text{ml}$ were recorded using Zeiss model EM 109 operated at 120 Kv.

It was also found that the presence of additives did not significantly affect the morphological parameters of the bioreactor and pure cryogel (Table 2). These results indicate that a high apparent hydrolytic activity of bioreactor was obtained while their characteristic of high porosity was maintained.

Moreover, the addition of the additive did not affect the swelling degree of the pure cryogel and the control bioreactor without additive. The S values around 15.0 to 16.2 ($\text{g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry cryogel}}$) obtained in this work are close to the result of 15.01 ($\text{g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry cryogel}}$) found by Uygun et al. (2012) for a poly (ethylene glycol

dimethacrylate) based cryogel with a concentration of monomers of 10% (w/v) (UYGUN, M. et al., 2012), while the S result for pure cryogel ($18.175 \text{ (g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{dry cryogel}})$) is in agreement to that value found by Savina et al. (2005) for a cryogel with 6% monomers (Aam+AGE+MBAAm) (SAVINA; MATTIASSON; GALAEV, 2005).

Additionally, the results obtained for immobilized protein content ($16.17 \text{ mg}_{\text{protein}}/\text{g}_{\text{cryogel}}$) and hydrolytic activity recovered (20.58%) are in the same order to those reported by Ozyilmaz and Yağız (2012) for CRL entrapped into a gel composed by sodium alginate-chitosan and glutaraldehyde ($8.8 \text{ to } 15 \text{ mg}_{\text{protein}}/\text{g}_{\text{gel}}$) and Kim et al. (2012) for CRL entrapped into cellulose–biopolymer based hydrogel beads ($R_{HA} = 24\%$), respectively (KIM, M. H. et al., 2012; OZYILMAZ; YAĞIZ, 2012).

The internal structures of bioreactor composed by entrapped lipase into cryogel with Triton X-100, without additive and pure cryogel were visualized by SEM micrographs as shown in Fig. 2. As can be seen in Fig. 2 C to 2 F, the bioreactor has large continuous interconnected pores with diameters ranging from $20 \mu\text{m}$ to $100 \mu\text{m}$ as found by other authors (KUMAR et al., 2003; PLIEVA et al., 2004b; ÇIMEN; DENIZLI, 2012; TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012). The pore walls had thickness ranging from $0.1 \mu\text{m}$ to $7.0 \mu\text{m}$ and the surfaces presented some structures with appearance of “small fingers” (Figs. 2 (C) to (F)) where probably lipases were entrapped.

The gel phase (polymer with tightly bound water) composes approximately 12% of the total cryogel volume and the most part of the bioreactors (88%) is an interconnected system of supermacropores filled with water. The percentage of porosity for macropores was around 76.1% to 77.5%. In the bioreactors, the pores are equally accessible for substrates of different molecular mass and the mass transfer resistance is practically negligible.

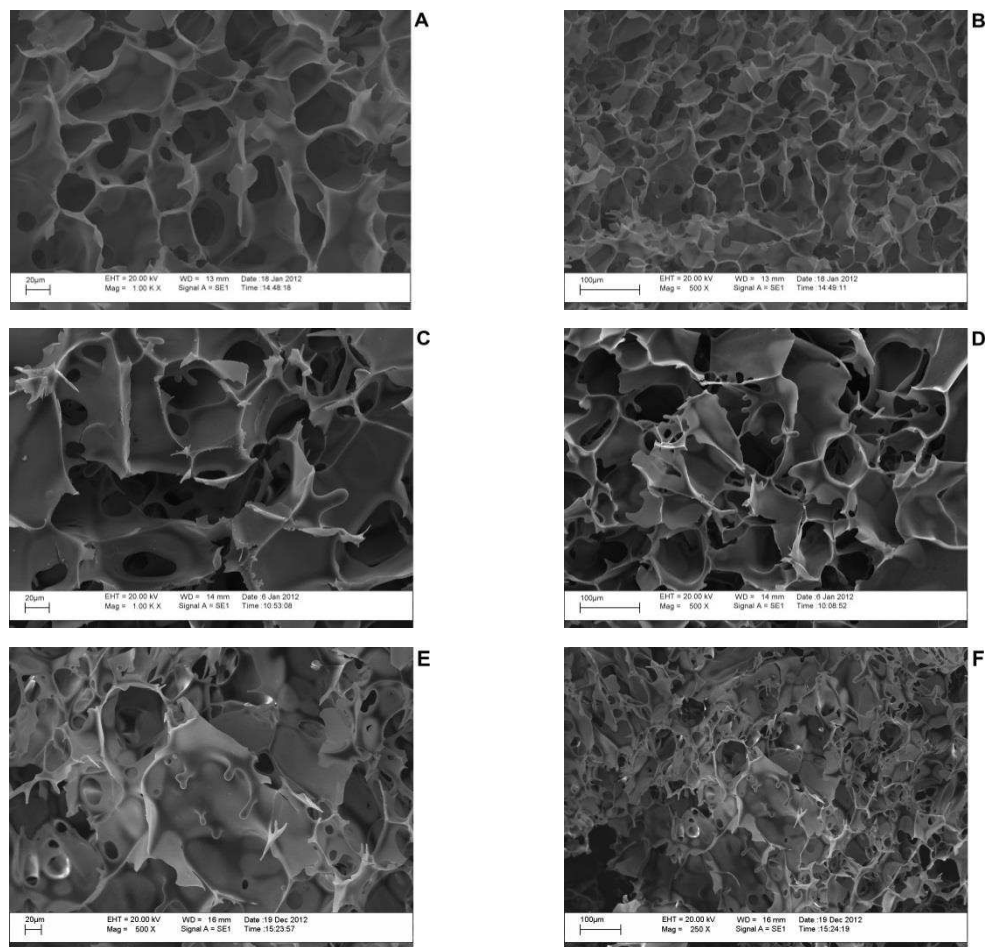


Fig. 2. SEM micrographs of pure cryogel (**A**) and (**B**); cryogel containing entrapped ANL without additive (**C**) and (**D**); and with additive Triton X-100 (**E**) and (**F**).

FTIR spectra of the free ANL, the pure cryogel and the bioreactor are shown in the spectras (A), (B) and (C) of Fig. 3, respectively. As can be visualized in Fig 3 (A), the free ANL showed a spectrum with typical absorption bands of proteins with characteristic amino (R-NH) and carboxyl (R-CO-) groups at $1560\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ and $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, respectively. In the Figs. 3 (B) and (C), the strong broad peaks near 3200 cm^{-1} have been assigned to N-H stretching due to primary amides of the cryogel samples. The sharp peak near 2933 cm^{-1} (symmetric and asymmetric N-H stretch) confirms the presence of secondary amide groups within the cryogel networks (WILLIAMS; FLEMING, 2007; PAVIA et al., 2008). The bending band of C-H in the epoxide groups of AGE observed around 2750 cm^{-1} was present in the pure cryogel (Fig. 3 (B)) and in the bioreactor (Fig. 3 (C)) and absent in free ANL (Fig. 3 (A)) (TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012). Moreover the C-O stretch (1115 cm^{-1}) due to epoxy groups was perceptible in Figs. 3 (B) and (C)

(WILLIAMS; FLEMING, 2007; PAVIA et al., 2008). No absorption bands related to lipase or Triton X-100 were clearly detectable because the majority of them lie in the same range of the other components or probably because their amount is too small. However the similarity between the two spectras of the pure cryogel and the bioreactor indicates that the presence of lipase did not affect the cryogel structure.

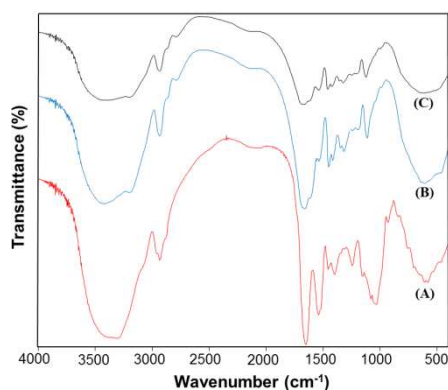


Fig. 3. FTIR spectra of free ANL (A), pure cryogel (B) and the cryogel containing entrapped ANL with additive Triton X-100 (C).

3.2. Bioreactor performance on ester synthesis

Initially, some preliminary experiments (data not shown) were performed in order to determine the better form to apply the bioreactor (hydrophilic) on butyl butyrate synthesis with hexane as reaction medium. Experiments of the ester synthesis were conducted as described in item 2.7 employing the bioreactor lyophilized and without the addition of water to the solution containing the substrates; or the bioreactor wet and also without the addition of water to the substrate solution; or the bioreactor wet with the addition of water to the solution containing the substrates. It was verified that lyophilization caused a drastic reduction on the synthesis activity of the bioreactor and the presence of the ester was not detected. It was also noted that the use of the bioreactor wet but without the addition of water to the solution of substrate was not appropriate to ester synthesis since the butyl butyrate was not detectable. The bioreactor was only able to synthesize the butyl butyrate at detectable levels from its use in wet form and with the addition of water to the substrate solution at concentrations over 31% (v/v). Thus, the high level of water content seems to promote an adequate enzyme hydration during esterification reaction.

Then, a CCRD was applied in order to study the influence of reaction parameters on the esterification yield of the butyl butyrate synthesis. The experimental results obtained from CCRD (Table 3) were submitted to the ANOVA using a Fisher statistical test. The results of the ANOVA can be visualized in a Pareto chart (Fig. 4), in which the standardized estimated effect of each factor is plotted in decreasing order and compared to the minimum magnitude of a statistically significant factor with a 95% confidence level, represented by the vertical dashed line.

Table 3

Experimental design and results of the CCRD

Assay	Temperature X_1	Substrate molar ratio X_2	Added water X_3	Esterification yield (%)
1	-1 (35.0) ^a	-1 (1:2.0)	-1 (60.0)	9.21
2	-1 (35.0)	-1 (1:2.0)	+1 (70.0)	23.94
3	-1 (35.0)	+1 (1:1.11)	-1 (60.0)	45.62
4	-1 (35.0)	+1 (1:1.11)	+1 (70.0)	2.63
5	+1 (45.0)	-1 (1:2.0)	-1 (60.0)	7.26
6	+1 (45.0)	-1 (1:2.0)	+1 (70.0)	17.34
7	+1 (45.0)	+1 (1:1.11)	-1 (60.0)	34.43
8	+1 (45.0)	+1 (1:1.11)	+1 (70.0)	6.48
9	-1.682 (31.59)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	24.01
10	+1.682 (48.41)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	7.87
11	0 (40.0)	-1.682 (1:2.75)	0 (65.0)	16.81
12	0 (40.0)	+1.682 (1:0.97)	0 (65.0)	16.87
13	0 (40.0)	0 (1:1.43)	-1.682 (56.59)	6.56
14	0 (40.0)	0 (1:1.43)	+1.682 (73.41)	12.49
15	0 (40.0)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	48.70
16	0 (40.0)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	46.27
17	0 (40.0)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	49.25
18	0 (40.0)	0 (1:1.43)	0 (65.0)	40.16

^a Numbers in parenthesis represents the uncoded experimental values.

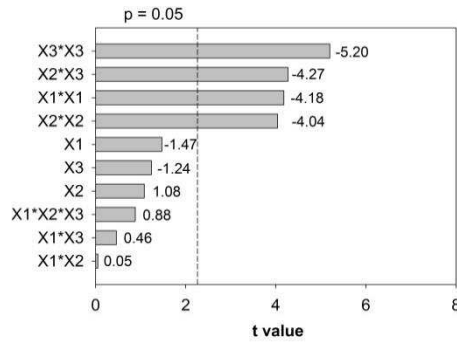


Fig. 4. Pareto chart for the standardized effects of the coded variables temperature (X_1), substrate molar ratio (X_2) and added water (X_3) on the esterification yield.

As can be seen in Fig. 4 the added water presented the major negative estimated effect on esterification yield, followed by its interaction with substrate molar ratio. This result suggests that esterification reaction was in great part governed by the total water content in the biphasic system. The next largest significant effect was the negative influence of the temperature reaction indicating that low temperature was beneficial for the butyl butyrate production.

The insignificant factors that were not statistically significant at a 95% confidence level were eliminated and a new reduced model was obtained for the variable esterification yield by regression analysis using only the significant factors listed in Fig. 4. The ANOVA (Table 4) performed to the reduced model indicated that the model is statistically valid ($p=0.0004$) with a coefficient of determination (R^2) of 0.89, and there was also a non-significant lack of fit ($p>0.15$). This result showed the adequacy of the model for an appropriate representation of the real relationship among the reaction variables. This reduced model can be described by Eq. (11), in terms of coded values.

$$Y = 45.80 - 3.15X_1 + 2.31X_2 - 2.65X_3 - 9.32X_1^2 - 9.00X_2^2 - 11.59X_3^2 - 11.97X_2X_3 \quad (11)$$

where Y is the percentage of esterification yield and X_1 , X_2 and X_3 are the coded values of temperature, substrate molar ratio and added water, respectively.

Table 4

Analysis of variance performed to esterification yield (Y) using the FCD design

Source	SS	DF	MS	F -values	p -values
Model	4171.92	7	595.99	11.98	0.0004
Error	501.38	10	50.138		
Lack of fit	449.34	7	60.19	3.70	0.1549
Pure error	52.04	3	17.35		
Total	4673.3	17			

SS: Sum of square; DF: Degree of freedom; MS: Mean Square.

The relationship between the reaction parameters and the esterification yield can be examined by the contour plots depicted in Figs. 5 A, B and C, which were generated from the predicted model.

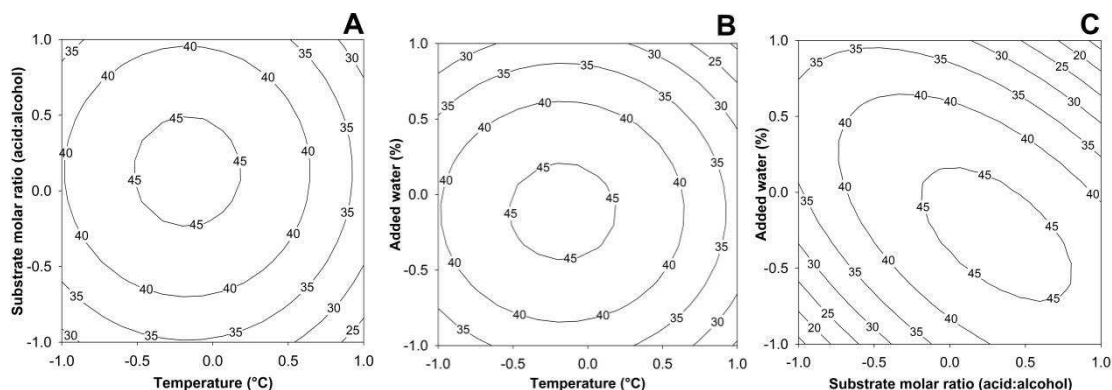


Fig. 5. Effects of reaction parameters on esterification yield: **(A)** temperature ($^{\circ}\text{C}$) and substrate molar ratio (acid:alcohol); **(B)** temperature ($^{\circ}\text{C}$) and added water (%); **(C)** substrate molar ratio (acid:alcohol) and added water (%). The numbers inside the contour plots indicate the esterification yield (%) at given reaction conditions. In each figure, the missing variable was fixed at the central point.

Observing the contour plots (Fig. 5), it can be seen that the esterification yield was increased until a maximum value (approximately 45 %) with the increasing of temperature and quantity of added water from 35 $^{\circ}\text{C}$ to 40 $^{\circ}\text{C}$ and from 60 % to 65 % (v/v) respectively, and reducing the substrate molar ratio 1:2.0 to 1:1.43 (acid:alcohol).

In fact, the initial effect of added water and substrate molar ratio on esterification yield is intrinsically correlated to the partition effects of the relatively hydrophilic substrates butyric acid and n-butanol to the aqueous phase (LAANE et

al., 1987; MONOT et al., 1991; CASTRO, H. et al., 1999). In this context, at low coded levels of substrate molar ratio (from 1:2.75 to 1:1.8) and added water (around 60 % v/v)) both the butyric acid and n-butanol were fully solubilized in the aqueous phase. As a result, a high substrate concentration and the alcohol excess may have become toxic to the enzyme microenvironment or induced some inhibitory effect (LAANE et al., 1987; YADAV; LATHI, 2003; ROMERO, M. D. et al., 2005; PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2007; MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010; GUILLÉN; BENAIGES; VALERO, 2012).

The other aspect observed here concerns to the fact that the butyl butyrate presented a high partition coefficient (MONOT et al., 1991) in a biphasic system water – hexane which explains why it was possible a continuous synthesis of this ester in spite of the presence of elevated water content in the biphasic systems, since the butyl butyrate produced was the totally transferred to the organic phase (MONOT et al., 1991; CASTRO, H. et al., 1999; KLIBANOV et al., 2000). However, at high substrate concentrations (obtained at low coded levels of substrate molar ratio around 1:2.75 to 1:1.8) the polarity of the organic phase may have increased and led to a decrease in the partition coefficient of butyl butyrate, so a shifting of the reaction equilibrium may have occurred due to a favorable partition coefficient of the product to the aqueous phase since a low esterification yield was observed (20 % to 30 %) (HALLING, P. J., 1984; EGGERS; BLANCH; PRAUSNITZ, 1989; HALLING, PETER J., 1990; MONOT et al., 1991; KLIBANOV et al., 2000; ROMERO, M. D. et al., 2005).

Thus, the increasing of added water up to 65 % (v/v) and the decreasing of the substrate molar ratio from 1:2.75 to approximately 1:1.43 (Fig. 5) resulted in an increase of the percentage of esterification until a maximum value (around 45 %).

Similar behavior was verified by Ben Salah et al. (2007) which obtained maximum esterification yields when 45 % (w/w) of water (in relation the total amount of the reaction mixture) was used in butyl acetate synthesis catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on Celite 545 (BEN SALAH et al., 2007).

Nevertheless, the continuous increase of water added in the substrate solution over 65 % (v/v) resulted in a reduction of the esterification yield that may have been caused due to a shifting of the equilibrium reaction for hydrolysis of the product, butyl butyrate (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002; BEN SALAH et al., 2007; MHETRAS, N.; PATIL; GOKHALE, 2010). Additionally, the water released during

the synthesis reaction may also have contributed to the shifting of the equilibrium reaction since this will accumulate on the support due to the great swelling properties of the cryogel (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002; PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2007).

As it is shown in Figs. 5 A and B, the bioreactor reached the best esterification yield at constant temperature of 40 °C, suggesting a better stability of the immobilized system at this temperature. Over this value, a decreasing in yields was observed, probably due to a negatively effect on enzyme stability or some thermal inactivation of the lipases.

Other researchers also found that the temperature of 40 °C was the best suited for esterification reaction (MANJÓN; IBORRA; AROCAS, 1991; AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010; MARTINS et al., 2011).

3.3. Operational stability of biocatalysts

For industrial applications of immobilized enzyme, reusability is an important parameter in terms of process economy. In this work, the bioreactor was used repeatedly in the esterification of butyl butyrate at temperature of 40 °C, substrate molar ratio of 1:1.43 and 65 % (v/v) of added water and the residual esterification yield as a function of reuse number was assessed (Fig. 6). For the first two reuses, only 6% of loss of residual esterification yield was observed. After six reuses, the bioreactor retained 31.9 % of residual esterification yield and presented a volumetric productivity of 7.64 mmol/mL.h. This result was lower from those (45 %) reported by Santos et al. (2007) using a *Candida rugosa* lipase adsorbed in poly(N-methylolacrylamide) after six batch process of butyl butyrate synthesis, but the volumetric activity (even at 6th cycle) was superior from those results (4.75 mmol/mL.h) founded by Milašinović et al. (2012) after 48 h of reaction of n-amyl isobutyrate at batch process, using a *Candida rugosa* lipase entrapped into poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels.

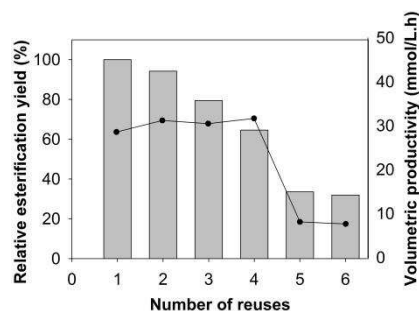


Fig. 6. Relative esterification yield (bars chart) and volumetric productivity (—●—) of butyl butyrate catalyzed by immobilized ANL with Triton X-100 into cryogel matrix as a function of reuse number. The reactions were performed in hexane with substrate molar ratio of butyric acid:n-butanol of 1:1.43, added water of 65 % (v/v) and temperature of 40 °C.

3.4. Bioreactor performance on interesterification reactions

The results of performance of bioreactor in interesterification reactions at 40 °C and employing equimolar substrate concentration of tripalmitin and triolein are presented in Table 5.

Table 5

Experimental results of interesterification reactions catalyzed by the bioreactor

Assay	Substrate concentration (mmol/L)	Added water % (v/v)	Protein content (mg _{protein} /g _{cryogel})	<i>H</i> (%)	<i>I</i> (%)
1	15:15	35.0	14.057	6.69	17.35
2	15:15	65.0	14.070	2.23	4.51
3	30:30	35.0	14.848	2.92	0.38
4	30:30	65.0	13.304	0.017	0.39

According to the Table 5, the interesterification reactions occurred only at systems with lower substrate concentration (15 mmol/L). Moreover, the highest value of *I* (%) was obtained when the lowest water content (35 % v/v) was added to the substrate solution. Thus, it seems that at low levels of substrate concentration the added water influenced negatively the interesterification yield and the water excess (65 % v/v) may have favored the reaction equilibrium to triglycerides hydrolysis instead of its re-esterification (PÉRIGNON et al., 2013).

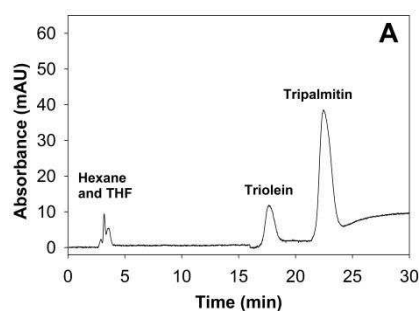
In fact, the interesterification reaction catalyzed by lipases is a special case of fatty acids transference and involves, at molecular level, sequential reactions of hydrolysis and acyl exchange (SVENSSON et al., 1994; GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B., 1995; MARANGONI, 2002; PÉRIGNON et al., 2013).

The initial step of interesterification reactions involves hydrolysis of triacylglycerols to produce diacylglycerols, monoacylglycerols, and free fatty acids. The production of hydrolysis products will occur during the interesterification until equilibrium is achieved (MARANGONI, 2002). However, when the water content is low the reesterification is favored and the interesterification will occur (MARANGONI, 2002; PÉRIGNON et al., 2013).

Therefore, the water content is the limiting step of interesterification reaction and its content in the reaction medium modulate the course of interesterification (PÉRIGNON et al., 2013).

For the system with 30 mmol/L of tripalmitin and triolein a negligible formation of triglyceride C_{50} and C_{52} was detected even using low levels of water (35 % v/v). This behavior may be related to the influence of substrate concentrations in the interesterification reactions. The negative effect of substrate concentration may have been a result of the accumulation of free fatty acids in reaction medium due to the tryglyderides hydrolysis (BORNSCHEUER et al., 2002; HASEGAWA; AZUMA; TAKAHASHI, 2008; PAULA, A. et al., 2010; PÉRIGNON et al., 2013). This accumulation of free fatty acids may have led to an acidification of the aqueous phase surrounding the enzyme, leading to a loss of its catalytic activity (MARANGONI, 2002; PÉRIGNON et al., 2013).

The best interesterification yield (17.35 %) was achieved at system with equimolar concentration of substrate of 15 mmol/L, added water of 35 % (v/v) and constant temperature of 40 °C (Fig. 7).



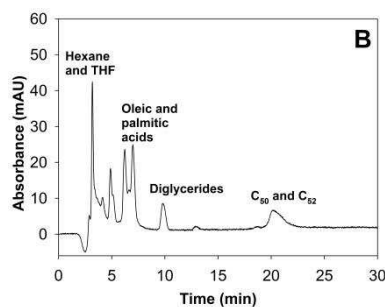


Fig. 7. Chromatograms of interesterification reaction of tripalmitin (15 mmol/L) and triolein (15 mmol/L) with 35% (v/v) of added water catalyzed by the bioreactor at 40 °C at time 0 h (A) and after 24 h of reaction (B).

This result was higher than those obtained by Tecelão et al. (2010) using *C. parapsilosis* lipase immobilized on Accurel MP 1000 (8.5 %) and Lipozyme TL IM (8.2 %) and those obtained by Paula, A. et al. (2010) which obtained a maximum interesterification yield of 10% using tripalmitin (60 mmol/L) and triolein (40 mmol/L) as substrate and catalyzed by *Aspergillus niger* lipase covalently immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol and lower than those obtained by Tecelão et al. (2010) using Novozym 435 (21.6 %) and Lipozyme RM IM (20%) and by Tweddell et al. (1997) which obtained 40% of interesterification yield after 72 h of reaction in hexane-water biphasic system at 40 °C, using 20 mM of tripalmitin and 20 mM of triolein as substrate and 100 mg of free *R. niveus* lipase.

4. CONCLUSION

The lipase entrapment into polyacrylamide cryogel offered an attractive and low cost way for lipases immobilization since the application of bioreactor on hydrolysis and esterification reactions was successful.

The addition of non-ionic surfactant Triton X-100 to the lipases solution during the entrapment process was a great and simple strategy to significantly increase the apparent hydrolytic activity recovered of the bioreactor.

The use of the bioreactor in esterification reactions was efficient and the optimization of the butyl butyrate synthesis in the presence of organic solvents was achieved. According to the RSM the optimized reaction condition corresponded to a temperature of 40 °C, substrate molar ratio (acid: alcohol) of 1:1.43 and 65% (v/v) of added water. Under this condition, a maximum esterification yield (46%) was achieved.

The possibility of reuse of the bioreactor for four consecutive times makes this system a very attractive from the point of view of industrial application.

Moreover, the bioreactor also demonstrated to be an effective catalyst in interesterification reactions between triolein and tripalmitin in a biphasic system n-hexane/water. The interesterification yield of 17% confirms that the bioreactor has potential for future applications involving the modifications of oil and fat. However, further studies have to be performed in order to optimize the experimental conditions of interesterification.

The advances made in this work open doors for novel applications of immobilized enzyme systems in industry.

5. REFERENCES

AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3628-3634, 2010.

ALTUNBAŞ, C.; UYGUN, M.; UYGUN, D.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Immobilization of Inulinase on Concanavalin A-Attached Super Macroporous Cryogel for Production of High-Fructose Syrup. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 1909-1921, 2013.

ANUAR, S. T.; ZHAO, Y.-Y.; MUGO, S. M.; CURTIS, J. M. The development of a capillary microreactor for transesterification reactions using lipase immobilized onto a silica monolith. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 92, n. 0, p. 62-70, 2013.

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 986, n. 2, p. 275-290, 2003.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; XAVIER MALCATA, F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

BORCH, R. F. Separation of long-chain fatty acids as phenacyl esters by high-pressure liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 2437-2439, 1975.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; HARI KRISHNA, S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUSTO, M. D.; MEZA, V.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1177-1182, 2007.

CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. R.; DA SILVA, M. C. H.; CARVALHO, L. M.; MINIM, L. A. Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 43, n. 3, p. 241-262, 2013.

CASTRO, H.; OLIVEIRA, P.; SOARES, C. F.; ZANIN, G. Immobilization of porcine pancreatic lipase on celite for application in the synthesis of butyl butyrate in a nonaqueous system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 147-152, 1999.

CHEN, J.-P. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 404-407, 1996.

CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197-204, 2004.

CHOWDARY, G. V.; PRAPULLA, S. G. The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 393-397, 2002.

ÇIMEN, D.; DENIZLI, A. Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 29-35, 2012.

COUTURIER, L.; TAUPIN, D.; YVERGNAUX, F. Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 29-33, 2009.

DAMNJANOVIĆ, J. J.; ŽUŽA, M. G.; SAVANOVIĆ, J. K.; BEZBRADICA, D. I.; MIJIN, D. Ž.; BOŠKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, n. 0, p. 50-59, 2012.

EGGERS, D. K.; BLANCH, H. W.; PRAUSNITZ, J. M. Extractive catalysis: Solvent effects on equilibria of enzymatic reactions in two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 2, p. 84-89, 1989.

ERZENGIN, M.; ÜNLÜ, N.; ODABAŞI, M. A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 484-490, 2011.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 1-4, p. 181-189, 1999.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242-250, 2007.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; ORTIZ, C.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610-2615, 2006.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355-363, 2004.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633-639, 1995.

GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, n. 0, p. 18-23, 2013.

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

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 923-930, 2011.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 98-99, 2002.

HALLING, P. J. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 11, p. 513-516, 1984.

HALLING, P. J. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: Predictions of effects on equilibrium position. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, p. 691-701, 1990.

HANORA, A.; PLIEVA, F. M.; HEDSTRÖM, M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 4, p. 421-433, 2005.

HASEGAWA, S.; AZUMA, M.; TAKAHASHI, K. Stabilization of enzyme activity during the esterification of lactic acid in hydrophobic ethers and ketones as reaction media that are miscible with lactic acid despite their high hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 3, p. 309-316, 2008.

HE, P.; GREENWAY, G.; HASWELL, S. J. Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reactions in a biphasic mobile system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 593-597, 2010.

HONDA, T.; MIYAZAKI, M.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. Facile Preparation of an Enzyme-Immobilized Microreactor using a Cross-Linking Enzyme Membrane on a Microchannel Surface. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 15, p. 2163-2171, 2006.

HSU, A.-F.; JONES, K.; FOGLIA, T.; MARMER, W. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix**. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 11, p. 917-921, 2004.

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

JAIN, E.; KUMAR, A. Designing Supermacroporous Cryogels Based on Polyacrylonitrile and a Polyacrylamide-Chitosan Semi-interpenetrating Network. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 7-8, p. 877-902, 2009.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.-Y.; ZHENG, S.-P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 108-114, 2012.

KAWAKAMI, K.; SERA, Y.; SAKAI, S.; ONO, T.; IJIMA, H. Development and Characterization of a Silica Monolith Immobilized Enzyme Micro-bioreactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 1, p. 236-240, 2004.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E. N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, n. 0, p. 28-38, 2012.

KIM, H.-R.; HOU, C. T.; LEE, K.-T.; KIM, B. H.; KIM, I.-H. Enzymatic synthesis of structured lipids using a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 846-849, 2010.

KIM, M. H.; AN, S.; WON, K.; KIM, H. J.; LEE, S. H. Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, n. 0, p. 68-72, 2012.

KLIBANOV, A. M.; SAMOKHIN, G. P.; MARTINEK, K.; BEREZIN, I. V. A new approach to preparative enzymatic synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 737-747, 2000.

KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, n. 1–2, p. 185-194, 2003.

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

LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 445-451, 2003.

LUO, Q.; ZOU, H.; ZHANG, Q.; XIAO, X.; NI, J. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 481-489, 2002.

MALLIK, R.; JIANG, T.; HAGE, D. S. High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns. **Anal Chem.**, v. 76, n. 23, p. 7013-7022, 2004.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MANJÓN, A.; IBORRA, J. L.; AROCAS, A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 339-344, 1991.

MARANGONI, A. J. **Lipases: structure, function, & properties: Lipid biotechnology**. United States of America: Marcel Dekker, 2002

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

MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. L. R.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.;

RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, n. 0, p. 417-422, 2013.

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

MHETRAS, N.; PATIL, S.; GOKHALE, D. Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: A Potential Biocatalyst for Synthesis of Isoamyl Acetate. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 432-437, 2010.

MICHAUX, F.; ZOUMPANIOTI, M.; PAPAMENTZELOPOULOU, M.; STÉBÉ, M. J.; BLIN, J. L.; XENAKIS, A. Immobilization and activity of *Rhizomucor miehei* lipase. Effect of the matrix properties prepared from nonionic fluorinated surfactants. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 39-46, 2010.

MILAŠINOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; MILOSAVLJEVIĆ, N.; FILIPOVIĆ, J.; KRUŠIĆ, M. K. Controlled release of lipase from *Candida rugosa* loaded into hydrogels of N-isopropylacrylamide and itaconic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v., n. 0, p.

MILAŠINOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.; JAKOVLJEVIĆ, Ž.; FILIPOVIĆ, J.; KALAGASIDIS KRUŠIĆ, M. Synthesis of n-amyl isobutyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized into poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels. **Chemical Engineering Journal**, v. 181–182, n. 0, p. 614-623, 2012.

MONOT, F.; BORZEIX, F.; BARDIN, M.; VANDECASTEELE, J.-P. Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 759-765, 1991.

MUSTRANTA, A.; FORSELL, P.; POUTANEN, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 2, p. 133-139, 1993.

NUNES, G. F. M.; DE PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; DOS SANTOS, J. C. Compositional and textural properties of milkfat–soybean oil blends following enzymatic interesterification. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 133-138, 2011a.

OZYILMAZ, G.; YAĞIZ, E. Isoamylacetate production by entrapped and covalently bound *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipases. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2326-2332, 2012.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 669-677, 1995.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 199-207, 2011.

PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General Trend of Lipase to Self-Assemble Giving Bimolecular Aggregates Greatly Modifies the Enzyme Functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2003.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PAULA, A.; NUNES, G.; SILVA, J.; CASTRO, H.; SANTOS, J. Screening of Food Grade Lipases to be Used in Esterification and Interesterification Reactions of Industrial Interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1146-1156, 2010.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 117-121, 2010.

PÉRIGNON, M.; LECOMTE, J.; PINA, M.; RENAULT, A.; SIMONNEAU-DEVE, C.; VILLENEUVE, P. Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B Lipases in Interesterification Reactions: Effect of the Aqueous Microenvironment. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 8, p. 1151-1156, 2013.

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

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10-11, p. 828-836, 2004a.

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 129-137, 2004b.

RAHMAN, N. K.; KAMARUDDIN, A. H.; UZIR, M. H. Enzymatic synthesis of farnesyl laurate in organic solvent: initial water activity, kinetics mechanism, optimization of continuous operation using packed bed reactor and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 6, p. 687-699, 2011.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100-109, 2008.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 42-48, 2005.

SAVINA, I. N.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I. Y. Graft polymerization of acrylic acid onto macroporous polyacrylamide gel (cryogel) initiated by potassium diperiodatocuprate. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 9596-9603, 2005.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239-247, 2003.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; HILMER, J. M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 463-472, 2004.

SOUMANOU, M.; BORNSCHEUER, U.; MENGE, U.; SCHMID, R. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 427-433, 1997.

SOUMANOU, M. M.; PÉRIGNON, M.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 3, p. 270-285, 2013.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; CHANG, S.-W.; LEE, G.-C.; SHAW, J.-F. *Candida rugosa* Lipase LIP1-Catalyzed Transesterification To Produce Human Milk Fat Substitute. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 5175-5181, 2006.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S.-Q. Optimisation of flavour ester biosynthesis in an aqueous system of coconut cream and fusel oil catalysed by lipase. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2714-2720, 2012.

SVENSSON, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 5, p. 549-556, 1994.

TELES DOS SANTOS, M.; GERBAUD, V.; ROUX, G. A. C. L. Modeling and simulation of melting curves and chemical interesterification of binary blends of vegetable oils. **Chemical Engineering Science**, v. 87, n. 0, p. 14-22, 2013.

THAKAR, A.; MADAMWAR, D. Enhanced ethyl butyrate production by surfactant coated lipase immobilized on silica. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3263-3266, 2005.

TISHER, W.; KASCHE, V. **TIBTECH**, v. 16, n., p. 325, 1998.

TOKESHI, M.; KIKUTANI, Y.; HIBARA, A.; SATO, K.; HISAMOTO, H.; KITAMORI, T. Chemical processing on microchips for analysis, synthesis, and bioassay. **ELECTROPHORESIS**, v. 24, n. 21, p. 3583-3594, 2003.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 26-33, 2012.

UYGUN, D.; AKDUMAN, B.; UYGUN, M.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Purification of Papain Using Reactive Green 5 Attached Supermacroporous Monolithic Cryogel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 552-563, 2012.

UYGUN, M.; UYGUN, D. A.; ÖZÇALIŞKAN, E.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. **Journal of Chromatography B**, v. 887–888, n. 0, p. 73-78, 2012.

VARMA, M. N.; MADRAS, G. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 8, p. 1135-1144, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113-148, 2000.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase-mediated production of ethyl butyrate and butyl butyrate in nonaqueous systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 10, p. 743-748, 1990.

WON, K.; KIM, S.; KIM, K.-J.; PARK, H. W.; MOON, S.-J. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149-2154, 2005.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 245-252, 2003.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7–8, p. 438-450, 1998.

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 1, p. 103-110, 2006.

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 20, p. 6701-6708, 2006.

YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, F.; YAO, K. One-step isolation of adenosine triphosphate from crude fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by anion-exchange chromatography using supermacroporous cryogel. **Journal of Chromatography B**, v. 860, n. 1, p. 57-62, 2007.

YUN, J.; TU, C.; LIN, D.-Q.; XU, L.; GUO, Y.; SHEN, S.; ZHANG, S.; YAO, K.; GUAN, Y.-X.; YAO, S.-J. Microchannel liquid-flow focusing and cryo-polymerization preparation of supermacroporous cryogel beads for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, n. 0, p. 81-88, 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, foram realizadas avaliações preliminares de *Aspergillus niger* (ANL) em termos de sua atividade hidrolítica específica (95.84 U/g) e por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR) foi possível obter as condições experimentais ótimas em que a síntese do butirato de butila é maximizado. Tal condição foi obtida a 40 °C, razão molar de substrato de 1:2,41 (ácido butírico:n-butanol) e conteúdo de água adicionada de 1,05 % (v/v). Nessa condição 98,8 % de esterificação foi obtido após 24 h.

Em seguida, um biorreator enzimático constituído de ANL confinadas em um criogel de poliacrilamida supermacroporoso foi desenvolvido, caracterizado e aplicado em reações de hidrólise, esterificação e interesterificação.

No processo de imobilização da enzima a adição do aditivo estabilizante Triton X-100 proporcionou incrementos na atividade hidrolítica aparente, no rendimento de imobilização e no conteúdo de proteína imobilizada no criogel, sem provocar alterações na estrutura supermacroporosa, o que é de grande importância para os processos de escoamento e transferência de massa, principalmente quando são empregados substratos e reagentes viscosos.

O biorreator enzimático contendo o aditivo Triton X-100 foi aplicado com êxito em reações de síntese do butirato de butila e por meio da MSR foi possível obter as condições experimentais ótimas em que o rendimento de esterificação foi maximizado. Tal condição foi obtida a 40 °C, razão molar de substrato de 1:1,43 (ácido butírico:n-butanol) e conteúdo de água adicionada de 65 % (v/v). Nessa condição 46 % \pm 0,19 % de esterificação foi obtido após 24 h.

O biorreator apresentou boa capacidade de reutilização, podendo ser empregado por 4 reações de síntese consecutivas e, ainda assim, reter aproximadamente 65% do seu rendimento de esterificação inicial, permitindo a aplicação do biorreator em processos semi-contínuos.

Por fim, o biorreator foi empregado com êxito em reações de interesterificação, obtendo rendimentos de interesterificação em torno de 17 % após 24 h de reação, confirmando a potencialidade de aplicação do biorreator em processos biotecnológicos de interesse industrial.