

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS
POROSOS DE LIPASE DE PÂNCREAS DE PORCO COM
PROPRIEDADES MAGNÉTICAS**

JOSÉ RENATO GUIMARÃES

SÃO CARLOS - SP

2019

JOSÉ RENATO GUIMARÃES

**ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS
POROSOS DE LIPASE DE PÂNCREAS DE PORCO COM
PROPRIEDADES MAGNÉTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

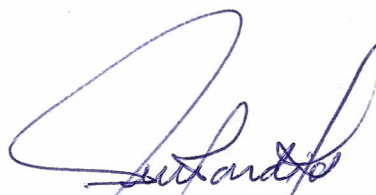
Orientação: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

SÃO CARLOS - SP

2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JOSÉ RENATO GUIMARÃES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Eduardo Guimarães e Maria Auxiliadora, por não medirem esforços para que a realização do sonho de cursar uma graduação e pós-graduação fosse concretizada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força superior que rege o destino de todos os seres vivos, mesmo daqueles que o considera como uma energia que transcende do inexplicável.

Aos meus pais, Eduardo Guimarães e Maria Auxiliadora, por terem me ensinado os princípios fundamentais para vida: respeito ao próximo, integridade, generosidade... mais do que isso, por em momentos muito difíceis terem buscado recursos e estratégias que puderam suprir a necessidade naqueles instantes e de projeções que levaram às realizações do presente.

Às minhas irmãs, Márcia e Mércia Guimarães, e aos sobrinhos, Lívia, Camila, Laís e Adriano Guimarães, por terem me aturado até então, já que é uma tarefa árdua e difícil.

À minha família paterna e materna, por terem confiado em meu potencial.

Ao Kaique Oliveira pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli, pela confiança para realizar este trabalho, orientação, apoio e dedicação.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática e do Laboratório de Tecnologias Ambientais, pela convivência, amizade e companheirismo.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Adriano A. Mendes e Prof. Dr. Marcelo P. A. Ribeiro, pela disposição em aceitar o convite de compor a comissão avaliadora deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ-UFSCar) representado pelos professores e funcionários.

À EMBRAPA Instrumentação (pesquisadora Dr^a. Cristiane S. Farinas e técnica M.^a Viviane F. Soares) pelas análises de MEV-FEG.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa durante o mestrado. À FAPESP (processo 2016/10636-8), ao CNPq (processo 405889-2016-0) e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho de dissertação, os meus agradecimentos.

“Para concretizar meus mais profundos anseios e desfrutar das experiências vitais presentes, desfiz-me dos meus monstros internos, destruí as angústias amordaçantes, dei asas fortes aos meus pensamentos, tal qual águia destemível, triunfante, visionária. Enfrentei os medos, fiz da solidão, aliada; encontrei o amor e a alegria em momentos singelos. E, quando no auge das dificuldades, deparei-me com dor e fragilidade, pude refazer-me, reconstruindo meus muros e constituindo fortaleza para minhas emoções. Renasço a cada amanhecer e como as aves que celebram a aurora, eu saúdo a vida com destemor e energia! Contemplo o Universo e suas belezas, para encontrar Deus. Entendo que é vital acolher meu semelhante sem tabus, preconceitos ou julgamentos. É necessário que o abraçe simples e puramente. Sinto gratidão! Emano a força da paz e sinto que ‘viver é melhor que sonhar’”.

Maíza Quirino da Silva

RESUMO

ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE AGREGADOS RETICULADOS POROSOS DE LIPASE DE PÂNCREAS DE PORCO COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

Agredados enzimáticos reticulados (CLEAs) é uma técnica de imobilização que não requer suporte sólido, permite o uso de enzimas semi-purificadas e o biocatalisador apresenta maior atividade volumétrica. No entanto, apresentam baixa resistência mecânica, dificuldade de recuperação e limitações de difusão intrapartícula. Em detrimento desses problemas, a preparação de agregados reticulados magnéticos porosos (pm-CLEA) de lipase de pâncreas de porco (LPP) é relatada. Algumas estratégias para melhorar a atividade volumétrica do biocatalisador imobilizado foram avaliadas, como o tratamento de LPP com agentes modificadores da superfície da enzima (polietilenoimina ou dodecil aldeído), coagregação com *co-feeders* proteicos (albumina de soro bovino (BSA) e/ou proteínas de soja (PS)), uso de nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos amino (SNMPs) como auxiliar de separação e amido como agente formador de poros. A combinação da modificação da superfície da enzima com dodecil aldeído, coagregação com SNMPs e PS ou BSA, na presença de 0,8% (m/m) de amido (seguido de hidrólise do amido com α -amilase), produziu pm-CLEAs com rendimento de imobilização (RI) em torno de 100% e atividade recuperada (AR) entre 67% e 81% para os CLEAs coagregados com SNMPs/BSA (pm-BSA-CLEA) e SNMPs/PS (pm-PS-CLEA), respectivamente. O pm-PS-CLEA e o pm-BSA-CLEA exibiram alta estabilidade a 40 °C e pH 8,0, retendo aproximadamente 50% e 80% de atividade, respectivamente, após 10 h de incubação, enquanto a LPP livre foi inativada após 2 h. A caracterização morfológica do pm-PS-CLEAs e pm-BSA-CLEAs utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) mostrou a presença de estruturas não-uniformes e porosas, o que poderia explicar o elevado fator de efetividade ($\eta \approx 0,65$), principalmente para o pm-CLEA coagregado com PS e SMNPs. Além disso, o pm-PS-CLEAs mostrou bom desempenho na hidrólise de tributirina (rendimento de 52% em 4 h) e capacidade de reutilização (rendimento de hidrólise de tributirina diminuiu apenas 7% (de 52% para 45%) após cinco bateladas com duração de 4 h para cada ciclo). Assim, as estratégias utilizadas neste trabalho proporcionaram ao CLEA, alta resistência mecânica e operacional, melhorias no transporte de massa intrapartícula e facilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas de sílica. Albumina de soro bovino. Amido. Modificadores da superfície enzimática. Fator de efetividade.

ABSTRACT

STRATEGIES TO PRODUCE POROUS CROSS-LINKED AGGREGATES OF PORCINE PANCREAS LIPASE WITH MAGNETIC PROPERTIES

Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) is an immobilization technique that does not require solid support, allows the use of semi-purified enzymes and the biocatalyst show higher volumetric activity. However, they present low mechanical resistance, difficulty of recovering and intraparticle diffusion limitations. To overcome these problems, the preparation of highly porous magnetic crosslinked aggregates (pm-CLEA) of porcine pancreas lipase (PPL) is reported. Some strategies to improve the volumetric activity of the immobilized biocatalyst were evaluated, such as treatment of PPL with enzyme surface-modifying agents (polyethyleneimine or dodecyl aldehyde), co-aggregation with protein co-feeders (bovine serum albumin (BSA), and/or soy protein (SP)), use of silica magnetic nanoparticles functionalized with amino groups (SMNPs) as a separation aid, and starch as pore-making agent. The combination of enzyme surface modification with dodecyl aldehyde, co-aggregation with SMNPs and SP, in the presence of 0.8% (w/w) starch (followed by hydrolysis of the starch with α -amylase), produced pm-CLEAs of PPL with immobilization yield (IY) around 100% and recovered activities (RA) between 67% and 81% for the co-aggregates CLEAs with SMNPs/BSA (pm-BSA-CLEA) and SMNPs/SP (pm-SP-CLEA), respectively. The pm-SP-CLEA and pm-BSA-CLEA exhibited high stability at 40 °C and pH 8.0, retaining approximately 50% and 80% of activity, respectively, after 10 h of incubation, while free PPL was inactivated after 2 h. The morphological characterization of pm-SP-CLEAs and pm-BSA-CLEAs using scanning electron microscopy (SEM-FEG) showed the presence of non-uniform and porous structure, which could explain the high effectiveness factor ($\eta \approx 0.65$), mainly for pm-CLEA of PPL prepared in presence of SP and SMNPs. Besides that, pm-SP-CLEAs showed good performance in tributyrin hydrolysis (52% yield in 4 h) and reutilization capacity (the hydrolysis yield of tributyrin decreased only 7% (from 52% to 45%) after five 4 h-batches). Thus, the strategies used in this work provided the CLEA with high mechanical and operational resistance, improvements in intraparticle mass transport, and ease of recovery and reuse of the biocatalyst.

Keywords: Silica magnetic nanoparticles. Bovine serum albumin. Soy protein. Starch. Protein surface modifiers. Effectiveness factor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1. Reações catalisadas por lipases.....	20
Figura 2-2. Fenômeno de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas.....	21
Figura 2-3. Reação de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipase 1,3-específica para formação de ácidos graxos, 2-monoacilgliceróis e 1,2 ou 2,3-diacilgliceróis (1,2-DG ou 2,3-DG).....	23
Figura 2-4. Estrutura tridimensional do complexo lipase-colipase do pâncreas de porco elaborado com o programa PyMol (The PyMol Molecular Graphics System; Versão 2.1.0; Schrödinger, LLC). O complexo (apenas cadeias A e B) é mostrado como modo de superfície a partir da estrutura do PDB (código de acesso 1ETH). As cadeias A (domínio N-terminal em cinza claro e domínio C-terminal em cinza escuro) e B (colipase em azul claro) são mostradas e os resíduos de aminoácidos são destacados em vermelho (Lys), laranja (triáde catalítica, Ser ¹⁵³ , Asp ¹⁷⁷ e His ²⁶⁴), magenta (N-terminal), amarelo (C-terminal), azul (segmento, Cys ²³⁸ – Cys ²⁶²) e verde (alça, resíduos 77-88).....	24
Figura 2-5. Fluxograma dos métodos de imobilização enzimática.....	27
Figura 3-1. Procedimento geral de preparação de CLEAs convencionais.....	34
Figura 3-2. Procedimento para a preparação de CLEAs magnéticos porosos pm-CLEA.....	35
Figura 3-3. Modificação química ou física da superfície da lipase de pâncreas de porco (LPP) com dodecil aldeído e polietilenoimina.....	36
Figura 4-1. Imagens da separação magnética do CLEA pela aplicação de um campo magnético externo: (a) suspensão CLEA, (b) campo magnético capturando o CLEA e (c) CLEA separado da suspensão.....	41
Figura 4-2. Efeito da proporção mássica de BSA/SNMPs sobre os parâmetros de imobilização (AR - atividade recuperada, RI - rendimento de imobilização e RG - rendimento global) da lipase de pâncreas porco (LPP) na preparação de CLEAs.....	43
Figura 4-3. Inativação térmica da LPP livre não modificada e modificada com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído.....	45
Figura 4-4. Efeito da concentração de amido no rendimento de imobilização e atividade recuperada dos CLEAs de LPP.....	47
Figura 4-5. Perfil de atividade versus pH para LPP livre e imobilizada.....	50
Figura 4-6. Perfil de atividade de LPP em relação à temperatura.....	51
Figura 4-7. Efeito da agitação no desempenho catalítico das LPP livre e imobilizadas.....	52
Figura 4-8. Perfil de inativação térmica da LPP livre e imobilizada a 40 °C e pH 8,0 sob agitação de 150 rpm.....	53
Figura 4-9. Fatores de efetividade (η) para CLEAs de LPP.....	54

- Figura 4-10.** Imagens MEV-FEG de pm-CLEAs de lipase de pâncreas de porco coagregadas com (a) SNMPs e albumina de soro bovino (pm-BSA-CLEA), (b) SNMPs e proteínas de soja (pm-PS-CLEA), seguido por tratamento com α -amilase (c e d, respectivamente).....55
- Figura 4-11.** Rendimento da hidrólise de tributirina em função do tempo de reação a 37 °C e pH 7,5, agitação de 500 rpm catalisada pela LPP livre e pm-PS-CLEA (74,22 mM de tributirina e 70 TBU/g de tributirina). O rendimento foi calculado como porcentagem do ácido butírico liberado (em μ mol) em relação ao valor teórico total.....56
- Figura 4-12.** Ensaio de reutilização (4h-Ciclos) do pm-PS-CLEA na hidrólise de tributirina (74,22 mM) a 37 °C, pH 7,5 e agitação de 500 rpm. Meio reacional: 6 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5), 16,5 mL de água destilada, 0,5 mL de tributirina e 70 TBU/g de tributirina.....57
- Figura A1.** Curva padrão “absorbância vs. concentração de grupos aminos” usando glicina como aminoácido padrão. Condições do ensaio: soluções de TNBS 0,01% (v/v) contendo glicina (0,25; 0,5; 0,75; e 1,00 mg mL⁻¹) foram preparadas em tampão borato de sódio 100 mM, pH 9,0 e incubadas a 25°C por 30 min. Em seguida, a absorbância foi medida em 420 nm. A concentração de grupos aminos foi determinada pela relação estequiométrica de glicina e grupos aminos presentes neste aminoácido.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1. Composição de aminoácidos da lipase do pâncreas de porco.....	25
Tabela 4-1. Avaliação da adição de nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizada com grupos aminos (SNMPs) e <i>co-feeders</i> proteicos (BSA e PS) na preparação de CLEAs de lipase de pâncreas de porco (LPP). Os valores são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão.....	41
Tabela 4-2. Avaliação do tratamento da lipase de pâncreas de porco (LPP) com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído usando o método colorimétrico do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) para a determinação dos grupos aminos.....	44
Tabela 4-3. Avaliação do tratamento da lipase do pâncreas de porco (LPP) com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído quanto aos parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR). Os valores são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão (σ).....	46
Tabela 4-4. Influência de diferentes tempos de reticulação com glutaraldeído na atividade recuperada (AR) do CLEA de LPP.....	48
Tabela 4-5. Avaliação de diferentes aditivos na preparação de CLEAs magnéticos porosos (pm-CLEAs) da lipase de pâncreas de porco (LPP). Os valores do parâmetro de imobilização referente a atividade recuperada (AR) são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão (σ).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
A _{derivado}	Atividade do derivado (TBU)
A _i	Atividade inicial (TBU)
Ala	Alanina
A _{lav}	Atividade da lavagem (TBU)
APTS	3-aminopropiltrióxido
AR	Atividade recuperada (%)
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
A _{sobre}	Atividade do sobrenadante (TBU)
Asp	Aspartato
BSA	Albumina de soro bovino
CLEA	Cross-linked enzyme aggregate
CLEC	Cross-linked enzyme crystal
Cys	Cisteína
DG	Digliceróis
EEAG	Ester etílico de ácido graxo
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
KOH	Hidróxido de potássio
Leu	Leucina
LPB	Lipase de pâncreas bovino
LPP	Lipase de pâncreas de porco
Lys	Lisina
Met	Metionina
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com aplicação de campo elétrico
NPG	Neopentil glicol
p-CLEA	CLEA poroso

PEI	Polietilenoimina
Phe	Fenilalanina
pm-BSA-CLEA	CLEA magnético poroso coagregado com BSA e SNMPs
pm-CLEA	CLEA magnético poroso
pm-PS-CLEA	CLEA magnético poroso coagregado com PS e SNMPs
Pro	Prolina
PS	Proteínas de soja
RG	Rendimento global (%)
RI	Rendimento de imobilização (%)
Ser	Serina
SNMPs	Nanopartícula magnética sílica
SPD	Sulfato de PEI-dextrano
TBU	Unidade de tributirina
TCAC	Taxa de crescimento anual composta
TG	Trigliceróis
Thr	Treonina
TMG	Trimetilolpropano
TNBS	Ácido trinitrobenossulfônico
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
V_{derivado}	Velocidade inicial do derivado
V_{livre}	Velocidade inicial da enzima livre
η	Fator de efetividade
σ	Desvio padrão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	18
2.1. Enzimas como biocatalisadores	18
2.2. Imobilização de enzimas.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais	33
3.2. Procedimento geral de preparação do CLEA.....	33
3.3. Determinação de proteína	35
3.4. Ensaio de Atividade Padrão	35
3.5. Modificação química ou física da superfície da lipase	36
3.6. Caracterização da LPP Livre e Imobilizada.....	37
3.6.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da LPP e na estabilidade térmica.....	37
3.6.2. Determinação do fator de efetividade	38
3.6.3. Microscopia eletrônica de varredura com aplicação de campo elétrico (MEV-FEG) dos CLEAs de LPP.....	38
3.7. Reutilização de biocatalisadores em hidrólise de tributirina	38
3.8. Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1. Influência de co-feeders na preparação de CLEAs.....	40
4.2. Tratamento da superfície da LPP	43
4.3. Preparação de CLEAs magnéticos usando amido nas etapas de agregação e reticulação	46
4.4. Influência do tempo de tratamento com glutaraldeído na preparação de CLEAs de LPP	47
4.5. Seleção de aditivos para a preparação de CLEAs de LPP usando 0,8% (m/v) de amido como agente formador de poros.....	48
4.6. Caracterização da LPP livre e imobilizada	49
4.6.1. Efeito do pH, temperatura e velocidade de agitação na atividade hidrolítica e estabilidade térmica.....	49

4.6.2. Determinação de fatores de efetividade	53
4.7. Avaliação da hidrólise da tributirina e reutilização do biocatalisador	55
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – Curva padrão da absorbância vs. concentração de grupos aminos.....	69
APÊNDICE B – Artigo previamente publicado: Evaluation of Strategies to Produce Highly Porous Cross-Linked Aggregates of Porcine Pancreas Lipase with Magnetic Properties. ..	69

1. INTRODUÇÃO

A busca por recursos biotecnológicos vem fornecendo melhorias ao processo produtivo em vários setores da indústria e favorecendo o desenvolvimento de processos químicos sustentáveis, eficientes e ambientalmente “limpos”, podendo complementar ou substituir os já existentes (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; XUE; WOODLEY, 2012). Os processos enzimáticos destacam-se por atuarem em diferentes reações bioquímicas nos organismos vivos e possuírem comprovada atividade *in vitro*, podendo catalisar diversas reações de interesse industrial (WANG *et al.*, 2018).

Dentre as várias enzimas utilizadas industrialmente, as lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) têm um papel de destaque em reações de biotransformações. As lipases são enzimas cuja função natural é a hidrólise de triglicerídeos na interface água-lipídio liberando ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (CASTRO *et al.*, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002; KAPOOR; GUPTA, 2012; SHARMA *et al.*, 2001). No entanto, *in vitro*, elas também são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e glicerólise), acidólise e interesterificação em meios orgânicos (com conteúdo restrito de água) (CASTRO *et al.*, 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; HE *et al.*, 2018; JAEGER; EGGERT, 2002; KAPOOR; GUPTA, 2012; SHARMA *et al.*, 2001). Essa ampla área de atuação das lipases, somada às excelentes quimio, regio- e enantiosseletividades e/ou especificidades, tem sido explorada para várias aplicações biotecnológicas importantes nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agroquímica (HASAN *et al.*, 2006; JAMIL *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2012; PANDEY *et al.*, 1999; SÁ *et al.*, 2017; SARMAH *et al.*, 2018; TALEKAR *et al.*, 2012). Dentre elas, a lipase do pâncreas de porco (LPP) é amplamente utilizada em reações de biotransformação em meios orgânicos para diversas aplicações industriais, devido à sua alta seletividade, alta tolerância a solventes, alta atividade catalítica e estabilidade térmica em altas temperaturas sob baixas concentrações de água (BYUN *et al.*, 2007; CABALLERO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2017).

No entanto, o uso de enzimas na sua forma solúvel para processos industriais de larga escala, não é muito atraente, devido ao seu alto custo de produção e baixa estabilidade operacional (DICOSIMO *et al.*, 2013). Uma estratégia que tem sido amplamente explorada para superar essas desvantagens é a sua imobilização, que se executada adequadamente, pode fornecer várias vantagens do ponto de vista industrial, como possibilidade de processamento

contínuo e em batelada, aumento da estabilidade em comparação com a enzima livre, aumento da atividade volumétrica, fácil recuperação da corrente de produtos e reutilização por vários ciclos (ADLERCREUTZ, 2013; BARBOSA *et al.*, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2007).

Há um grande número de técnicas e suportes adequados para a imobilização enzimática (ADLERCREUTZ, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; MANOEL *et al.*, 2015; SHELDON; VAN PELT, 2013; XAVIER MALCATA *et al.*, 1990). No caso das lipases, uma técnica popular que tem sido amplamente relatada é a sua imobilização por adsorção hidrofóbica em superfícies altamente hidrofóbicas (BASTIDA *et al.*, 1998; CIPOLATTI *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2013; PALOMO *et al.*, 2002; PAULA *et al.*, 2007; RIOS *et al.*, 2018; VESCOVI *et al.*, 2017). Isso ocorre, porque a interação entre os grupos hidrofóbicos do suporte e da enzima induzem a abertura da tampa da lipase (ativação interfacial) tornando o sítio ativo acessível ao substrato (BRADY *et al.*, 1990; MANOEL *et al.*, 2015; MILED *et al.*, 2001; SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997). Apesar dos excelentes resultados desta abordagem de imobilização, o uso de suportes pré-existentes aumenta o custo final do biocatalisador.

Reduzir o custo do biocatalisador pode ser uma abordagem interessante para tornar a aplicação de lipases imobilizadas ainda mais atraente. Nesse sentido, o grupo de pesquisa de Sheldon relatou o desenvolvimento da técnica de agregados enzimáticos reticulados (CLEA, do inglês cross-linked enzyme aggregate), na qual não há necessidade de utilizar suporte, já que este método envolve a reticulação após agregação e precipitação das enzimas induzidas naturalmente ou artificialmente. Essa técnica permite o uso de enzimas não purificadas ou a coimobilização de diferentes enzimas, além disso, o CLEA apresenta elevada atividade volumétrica em comparação à enzima imobilizada em suporte sólido (CAO *et al.*, 2000; MATEO *et al.*, 2004). No entanto, também apresenta alguns problemas, como baixa resistência mecânica operacional do biocatalisador, dificuldade de recuperação das partículas e alta limitação de difusão intrapartícula (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos vêm relatando modificações do método original, com o objetivo de reduzir as limitações da transferência de massa intrapartículas (CUI *et al.*, 2017; CUI; JIA, 2015; SHAH *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011). Além disso, estudos vem sendo desenvolvidos na preparação de CLEAs magnéticos capazes de melhorar os processos de recuperação e reutilização desses biocatalisadores (KHORSHIDI *et al.*, 2016; KOPP *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; PEIRCE *et al.*, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a preparação de compósitos reticulados de lipase de pâncreas de porco (LPP) empregando a técnica de

precipitação/reticulação (CLEAs). Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral desse estudo foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas, que podem ser visualizadas como objetivos específicos:

- Otimização do processo de reticulação do agregado enzimático utilizando *co-feeders* proteicos e nanopartículas magnéticas;
- Análise da influência da modificação superficial da lipase de pâncreas de porco com estruturas macromoleculares, tais como, polietilenoimina ou aldeído hidrofóbico;
- Verificação da influência da utilização de amido como agente porogênico na estrutura do agregado enzimático;
- Avaliação do tempo de reticulação do CLEA utilizando glutaraldeído;
- Verificação da estabilidade operacional do biocatalisador em reação em meio aquoso.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Enzimas como biocatalisadores

A busca por recursos biotecnológicos vem fornecendo melhorias ao processo produtivo em vários setores da indústria e favorecendo o desenvolvimento de processos químicos sustentáveis, eficientes e ambientalmente “limpos”, podendo complementar ou substituir os já existentes (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; XUE; WOODLEY, 2012). Os processos enzimáticos destacam-se por atuarem em diferentes reações bioquímicas nos organismos vivos e possuírem comprovada atividade *in vitro*, podendo catalisar diversas reações de interesse industrial (WANG *et al.*, 2018).

As enzimas são biocatalisadores altamente eficientes para realizar reações catalíticas em escala industrial, devido às suas diversas vantagens, dentre as quais destacam-se: atuação em condições suave de temperatura, pH e pressão, o que permitem atingirem velocidade de reação bastante superior à dos catalisadores químicos convencionais, que normalmente são utilizados em condições extremas de reação; seletividade do produto, devido à sua elevada especificidade que resulta em um maior rendimento no processo; baixa demanda energética e menor toxicidade ambiental e fisiológica (BOMMARIUS, 2013; CHOI *et al.*, 2015; MADHAVAN *et al.*, 2017; PRASAD; ROY, 2018). Essas vantagens proporcionam redução nos custos operacionais quando as enzimas são empregadas como biocatalisadores em processos industriais (BOMMARIUS, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; MADHAVAN *et al.*, 2017).

O mercado global de enzimas industriais se expandiu ao longo dos anos faturando US\$ 5,5 bilhões em 2018 e projetando atingir US\$ 7,0 bilhões até 2023, chegando a uma taxa de crescimento anual composta (TCAC) de 4,9% para o período 2018-2023. Espera-se que o segmento de alimentos e bebidas desse mercado cresça de US\$ 2,0 bilhões em 2018 para US\$ 2,5 bilhões em 2023. Enquanto, o segmento de rações animais deverá crescer de US\$ 625,5 milhões em 2018 para US\$ 825,8 milhões em 2023. De modo geral, as lipases pertencem ao grupo de enzimas (carbohidrase, polimerase e nuclease, protease e lipase) responsáveis por um crescimento robusto no mercado global de enzimas, que representa um TCAC de 5,77% durante 2017–2022. Esse resultado será impulsionado principalmente pela indústria de ração animal e de biocombustíveis (BBC RESEARCH, 2018).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) são carboxil-esterases que pertencem à família das serina-hidrolases (FICKERS *et al.*, 2011; RAMOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; SARDA; DESNUELLE, 1958). Essas enzimas hidrolisam substratos insolúveis com

cadeia acila superior a 10 átomos de carbonos, embora, possam hidrolisar substratos com cadeia carbônica inferiores a dez (BORNSCHEUER, 2002; JAEGER; REETZ, 1998).

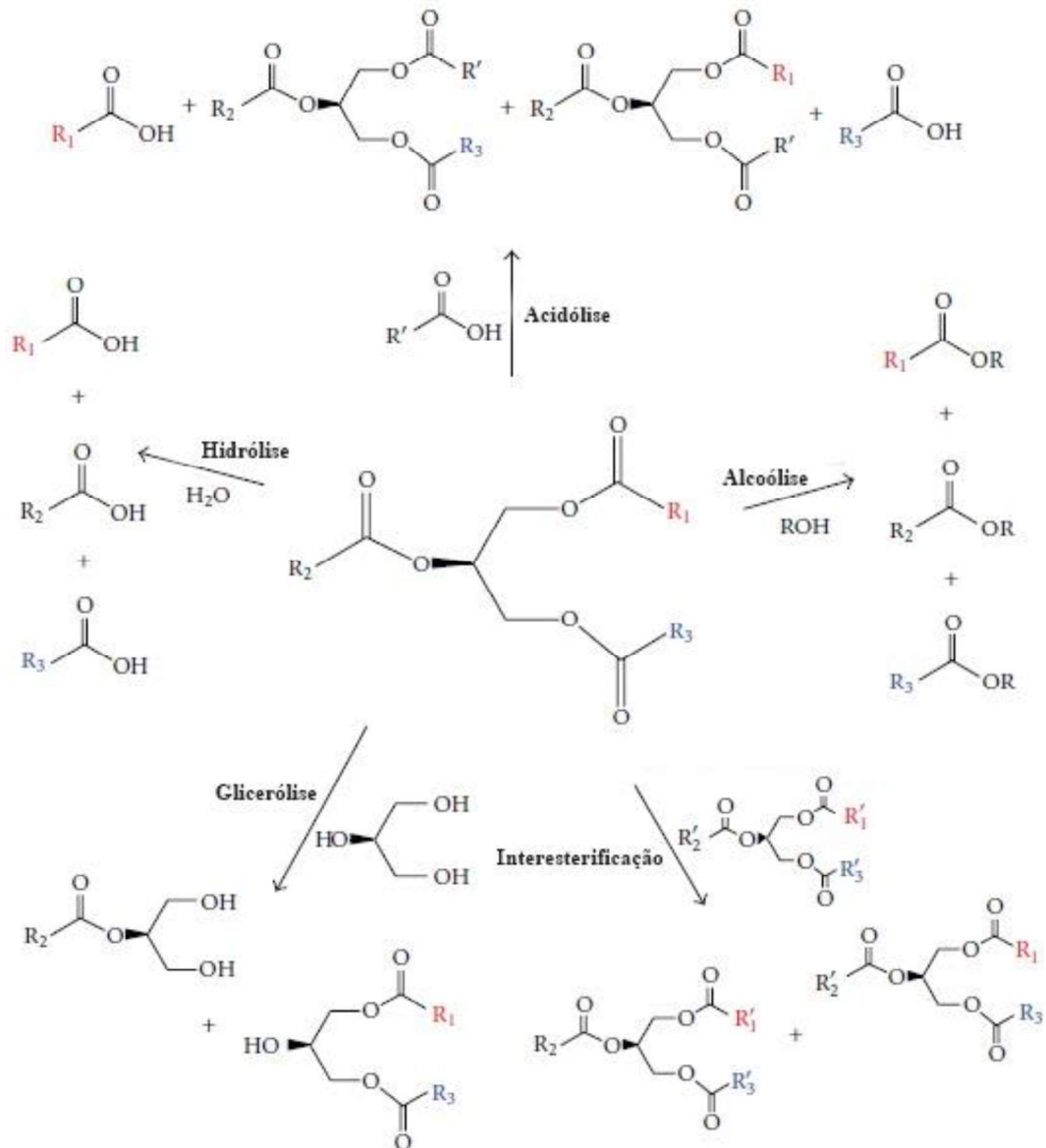
As lipases catalisam uma série de reações, como ilustrado na Figura 2-1 (RIBEIRO *et al.*, 2011). Essas carboxil-esterases são enzimas cuja função natural é a hidrólise de triglicerídeos na interface água-lipídio, liberando ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (CASTRO *et al.*, 2004; JAEGER; EGGERT, 2002; KAPOOR; GUPTA, 2012; SHARMA *et al.*, 2001). No entanto, *in vitro*, elas também são capazes de catalisar as seguintes reações:

i) esterificação, em que as lipases catalisam reações de duplo deslocamento entre álcoois e ácidos carboxílicos, resultando em ésteres e água. Esta reação vem se expandindo no campo da produção de ésteres, pois durante a síntese ocorre apenas a formação de água como o único subproduto, bem como apresenta a vantagem da utilização de solventes não tão perigosos, como ocorre nos processos convencionais de síntese química. Além disso, a reação de esterificação proporciona conversão completa quando há a remoção *in situ* da água durante o processo (HE *et al.*, 2018; STERGIOU *et al.*, 2013);

ii) transesterificação (alcoólise ou glicerólise, usando álcoois ou glicerol, respectivamente), em que as lipases catalisam reações no qual um radical acila de um éster é transferido para um álcool ou glicerol. Essas reações, na ausência de água, evitam a formação de subprodutos indesejados, facilitando a recuperação do produto de interesse e aumentando a produção de ésteres (HE *et al.*, 2018; SARMAH *et al.*, 2018).

iii) acidólise (usando ácidos graxos livres) ou interesterificação (usando ésteres de ácidos graxo distintos), esses termos têm sido considerados sinônimos em muitos casos e até mesmo confundidos com transesterificação. Ambas as reações seguem um mecanismo similar. Nos glicerídeos, a ligação éster entre o resíduo do ácido graxo nativo e a porção glicerol é hidrolisada liberando o ácido graxo nativo e produzindo um glicerídeo inferior contendo pelo menos um grupo hidroxila. Uma nova ligação éster pode ser formada entre o grupo hidroxila recém-criado e um ácido graxo livre (reação de acidólise) ou ácido graxo derivado de outro glicerídeo (reação de interesterificação) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; GHAZALI *et al.*, 1995).

Figura 2-1. Reações catalisadas por lipases.

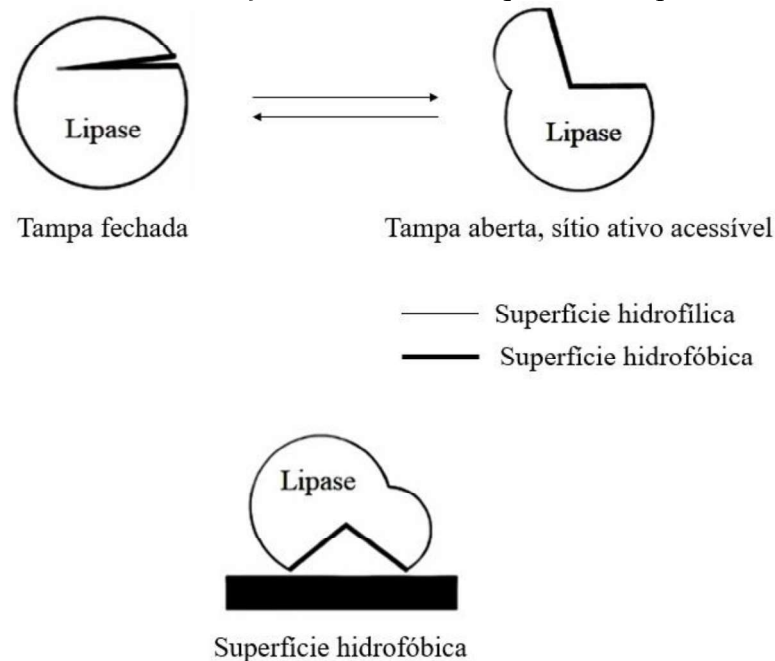


FONTE: Adaptado de RIBEIRO *et al.* (2011).

As lipases possuem um mecanismo peculiar, chamado de ativação interfacial, que permite que a enzima exista em duas formas em equilíbrio (Figura 2-2): uma forma fechada, na qual uma cadeia polipeptídica (ou tampa) cobre o sítio ativo da enzima e uma forma aberta, na qual a tampa é afastada permitindo que a lipase se adsorva à superfícies hidrofóbicas (por exemplo, gotas de óleos, bolhas de ar, etc.) (BRADY *et al.*, 1990; MILED *et al.*, 2001; SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997) e tornando o sítio ativo acessível ao substrato (VERGER, 1997). Essas enzimas são capazes de sofrer tal "ativação interfacial" na presença de outras interfaces hidrofóbicas como suportes hidrofóbicos (BASTIDA *et al.*, 1998), proteínas hidrofóbicas e também a superfície hidrofóbica oferecida por uma lipase na forma

“aberta”, formando uma estrutura biomolecular compreendendo duas lipases (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2003).

Figura 2-2. Fenômeno de ativação interfacial das lipases em superfícies hidrofóbicas.



FONTE: Adaptado de HANEFELD *et al.* (2009).

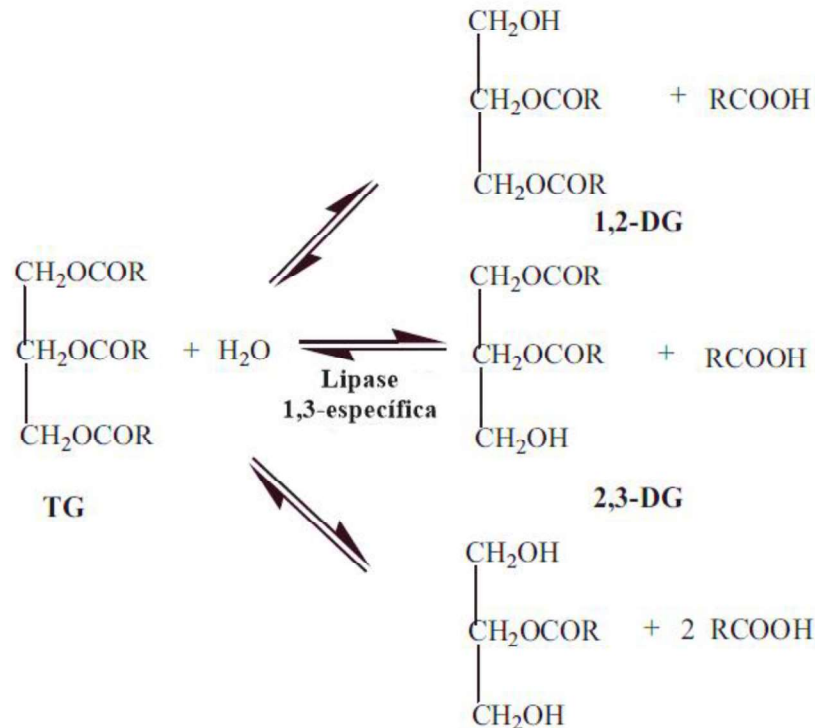
A especificidade das lipases é um critério importante na descrição de suas aplicações em processos industriais, podendo ser agrupadas em três categorias principais:

i) Especificidade pelo substrato. Nesta categoria, as lipases apresentam especificidade em relação ao tipo (cadeia saturada ou insaturada) e ao comprimento da cadeia de ácido graxo (curta, média ou longa) (BERGER; SCHNEIDER, 1991; KAPOOR; GUPTA, 2012; MACRAE; HAMMOND, 1985). As lipases de *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor arrhizus*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium camembertii* (Lipase G) preferem ácidos graxos insaturados que apresentam ligação dupla na extremidade carboxil (JACHMANIA *et al.*, 1996). Também existe algumas lipases que apresentam especificidade no que se refere às partes alcoólicas dos substratos (atividade da lipase frente à diferentes classes de álcoois em ordem crescente: álcoois primários > secundários > terciários). As lipases de *Burkholderia* sp. YY62 apresentam elevada eficiência na hidrólise de ésteres de terc-butyl, enquanto as lipases de pâncreas de porco, *C. rugosa* e *Candida antártica* mostram limitação na atividade em relação a tal substrato (KRISHNA *et al.*, 2002; O’HAGAN; ZALDI, 1994; YEO *et al.*, 1998).

ii) *Regioespecificidade*. Nesta categoria, as lipases apresentam especificidade posicional em relação ao radical acila, ou seja, a lipase hidrolisa ácido graxo que está ligado a qualquer posição sn do glicerol (lipase não específica), nas posições sn-1 ou sn-3 (lipase 1,3-específicas), sn-2 (lipase 2-específica, as mais raras) (BARROS *et al.*, 2010; KAPOOR; GUPTA, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011; UHLIG, 1998). As lipases *Chromobacterium viscosum*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* não apresentam regioespecificidade e são consideradas muito robustas, capazes de atuar em múltiplos substratos geralmente catalisando a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol com mono e diacilgliceróis como intermediários (GODFREY, 1995; KAPOOR; GUPTA, 2012; SCHMID; VERGER, 1998; UHLIG, 1998). Enquanto as lipases *Bacillus thermocatenuatus*, *Aspergillus niger*, *Candida antarctica* B, *Penicillium camembertii*, *Mucor circinelloidis*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Yarrowia lipolytica*, *Brassica napus* e lipases de pâncreas de porco e de pâncreas bovino (LPB) são 1,3-específicas e capazes de hidrolisar triacilgliceróis produzindo ácidos graxos livres, 2-monoacilgliceróis e 1,3 ou 2,3-diacilgliceróis (Figura 2-3). Devido à instabilidade dos compostos ligados na posição sn-2 do glicerol, a migração de acila ocorre levando à formação de 1,3-diacilgliceróis e 1- ou 3-monoacilgliceróis (BARROS *et al.*, 2010; GODFREY, 1995; HILLS *et al.*, 1990; SCHMID; VERGER, 1998). Ainda existe as lipases de *Geotrichum candidum* e sementes de aveia não germinadas, um caso bem particular, que apresentam especificidade para ácidos graxos com duplas ligações na posição 9 (posição Δ^9) (RIBEIRO *et al.*, 2011; SCHMID; VERGER, 1998).

iii) *Enantioespecificidade*. Nesta categoria, as lipases apresentam a capacidade de distinguirem (e preferirem) certas formas isoméricas de seus substratos (ou formarem seus produtos), isômeros R ou S. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* tem sido usada na resolução de muitas misturas racêmicas de ácidos e álcoois (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Cristais de enzimas reticulados (CLEC, do inglês cross-linked enzyme crystal) de lipases de *Pseudomonas cepacia* e *C. rugosa* foram testadas quanto ao seu potencial para catalisar a resolução quiral de vários ácidos, álcoois e aminas por acilação em solvente orgânico e provaram ser mais ativos do que as enzimas brutas (KHALAF *et al.*, 1996). A lipase de pâncreas de porco é uma das lipases mais utilizadas em reações de hidrólise enantiosseletiva dos ésteres correspondentes para produção de intermediários importantes para as indústrias agroquímica e farmacêutica (FUKUSAKI *et al.*, 1999; GHANEM, 2007; HE *et al.*, 2006; PASSARELLA *et al.*, 2002; SEGURA *et al.*, 2017).

Figura 2-3. Reação de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipase 1,3-específica para formação de ácidos graxos, 2-monoacilgliceróis e 1,2 ou 2,3-diacilgliceróis (1,2-DG ou 2,3-DG).



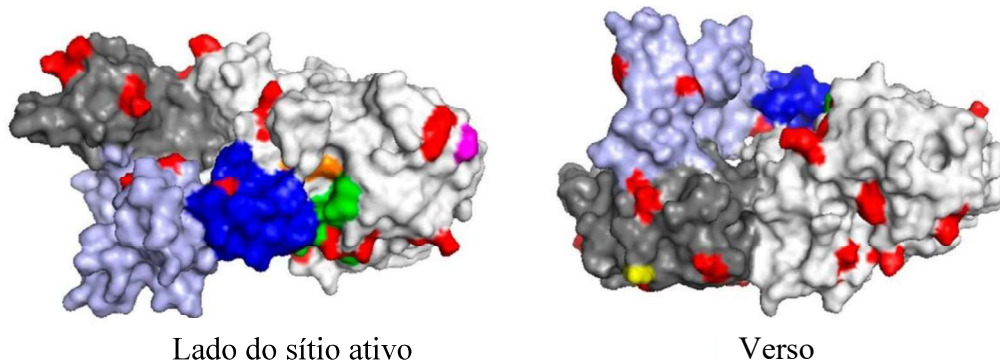
FONTE: Adaptado de KAPOOR; GUPTA (2012).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbiana (PARTIL *et al.*, 2011; RAY, 2012; SARMAH *et al.*, 2018). Dependendo da fonte, podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em geral, máxima atividade na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C (VULFSON, 1994).

A lipase de pâncreas de porco é uma lipase 1,3-regeoespecífica e apresenta estabilidade na faixa de temperatura de 35 a 45 °C e pH 7,5-9,0 (MENDES *et al.*, 2012). Sua estrutura é composta por uma única cadeia de 449 aminoácidos, como mostra a Tabela 2-1, com massa molar de 49,8 kDa (HERMOSO *et al.*, 1996; MILED *et al.*, 2001; SEGURA *et al.*, 2017). A determinação da estrutura tridimensional da LPP (Figura 2-4) revelou a presença de dois domínios: *i*) N-terminal que compreende os resíduos 1-336 e contém a tríade catalítica (Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷, His²⁶⁴) e *ii*) o domínio C-terminal composto pelos aminoácidos 337-449 (HERMOSO *et al.*, 1996). A estrutura cristalina da LPP apresenta “loops” que cobrem a tríade catalítica, podendo dificultar o acesso do substrato a esse local. Uma ligação dissulfeto entre Cys²³⁸ e Cys²⁶² define o maior destes “loops”, que representa o domínio da tampa. Outros “loops” que

podem dificultar o acesso à tríade catalítica são formados pelos resíduos 76-86 ($\beta 5$) e 213-217 (HERMOSO *et al.*, 1996; LOWE, 1996). A conformação aberta é estabilizada por ligações de hidrogênio entre a tampa da enzima e a colipase, que consiste numa proteína pequena de 10-11 kDa secretada pelo pâncreas (LOWE, 1996; VAN TILBEURGH *et al.*, 1993). A interação entre a estrutura da LPP e a colipase ocorre através de várias ligações, as quais, 8 são de natureza polar, 17 por interações de van der Waals e 4 ligações mediadas por água (HERMOSO *et al.*, 1996).

Figura 2-4. Estrutura tridimensional do complexo lipase-colipase do pâncreas de porco elaborado com o programa PyMol (The PyMol Molecular Graphics System; Versão 2.1.0; Schrödinger, LLC). O complexo (apenas cadeias A e B) é mostrado como modo de superfície a partir da estrutura do PDB (código de acesso 1ETH). As cadeias A (domínio N-terminal em cinza claro e domínio C-terminal em cinza escuro) e B (colipase em azul claro) são mostradas, e os resíduos de aminoácidos são destacados em vermelho (Lys), laranja (tríade catalítica, Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷ e His²⁶⁴), magenta (N-terminal), amarelo (C-terminal), azul (segmento, Cys²³⁸ – Cys²⁶²) e verde (alça, resíduos 77-88).



FONTE: Adaptado de GUIMARÃES *et al.* (2018).

Tabela 2-1. Composição de aminoácidos da lipase do pâncreas de porco

Aminoácidos	Unidades	Aminoácidos (% unidades)
Ala	21	4,68
Arg	21	4,68
Asn	30	6,68
Asp	32	7,13
Cys	14	3,12
Gln	17	3,79
Glu	21	4,68
Gly	39	8,69
His	10	2,23
Ile	26	5,79
Leu	29	6,46
Lys	22	4,90
Met	4	0,89
Phe	25	5,57
Pro	25	5,57
Ser	31	6,90
Thr	25	5,57
Trp	6	1,34
Tyr	16	3,56
Val	35	7,80

FONTE: Adaptado de CARO *et al.* (1981).

A LPP é uma das lipases mais amplamente utilizadas em reações de biotransformação por apresentar baixo custo em comparação à outras lipases comerciais microbianas e animais. Além disso, a LPP também é considerada muito atraente para aplicações industriais devido à sua acessibilidade, alta estabilidade e ampla especificidade para a biotransformação de substratos não naturais (CABALLERO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2007).

Essa glicoproteína é uma das lipases mais promissoras na resolução de álcoois racêmicos e ácidos carboxílicos por meio da hidrólise enantiosseletiva dos ésteres correspondentes (LADNER; WHITESIDES, 1984; MIURA *et al.*, 2008). Também tem sido utilizada no pré-tratamento de águas residuais contaminadas por lipídios (MASSE *et al.*, 2001)

e, ainda, aplicadas em meios orgânicos objetivando-se a síntese de sabores e fragrâncias (GOGOI *et al.*, 2006), produção de biocombustíveis (RAMOS *et al.*, 2018), produtos farmacêuticos (ZHENG *et al.*, 2011), emulsificantes e cosméticos (PAULA *et al.*, 2007).

No entanto, o uso de enzimas na sua forma livre em processos industriais de larga escala não é muito atraente, devido ao seu alto custo de produção, baixa estabilidade operacional e dificuldade em separar o biocatalisador para sua reutilização em outros processos (DICOSIMO *et al.*, 2013). Uma estratégia que tem sido amplamente explorada para superar essas desvantagens é sua imobilização, que se executada adequadamente pode fornecer várias vantagens do ponto de vista industrial.

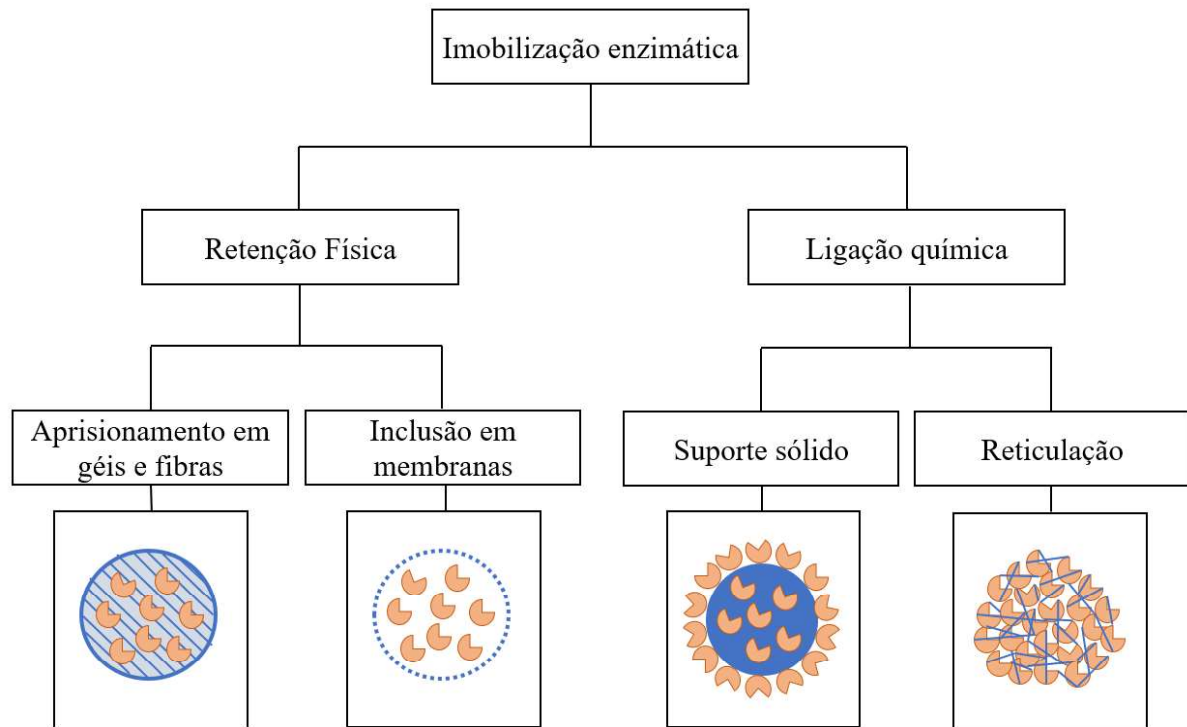
2.2. Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas referem-se à “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço” com retenção de sua atividade catalítica e possibilidade de recuperação e reutilização repetida e continuamente devido à robustez e insolubilidade no meio reacional (WINGARD, 1972).

Se a imobilização enzimática for bem sucedida, implicará em várias vantagens do ponto de vista industrial, tais como: aumento da estabilidade em comparação com a enzima livre; aumento da atividade volumétrica; possibilidade de projetar um reator enzimático de fácil uso e controle com processamento contínuo e em batelada; fácil recuperação do biocatalisador da corrente de produtos incluindo a reutilização em vários ciclos de reação (ADLERCREUTZ, 2013; BARBOSA *et al.*, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013). No entanto, o processo de imobilização apresenta algumas desvantagens, dentre elas: alteração da conformação da enzima em relação ao seu estado nativo; grande heterogeneidade do sistema de suporte enzimático, onde diferentes frações de proteínas imobilizadas podem existir com um número diferente de ligações ao suporte e possível perda de atividade enzimática durante a imobilização (MARTINEK; MOZHAIEY, 1987).

Em geral, os métodos de imobilização são classificados em duas categorias, como mostra a Figura 2-5: *i*) retenção física, em que as enzimas são submetidas ao aprisionamento em géis e fibras ou incluídas em membranas (encapsulamento e reatores de membranas) e *ii*) ligação química, na qual ocorre ligação entre a enzima e o suporte sólido (absorção e ligação covalente) ou reticulação enzimática (sem o uso de suportes) (ADLERCREUTZ, 2013; ARROYO, 1998; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Figura 2-5. Fluxograma dos métodos de imobilização enzimática.



A imobilização por meio de aprisionamento dentro de matrizes é usualmente realizada pela formação de uma malha constituída por polímeros (naturais ou sintéticos) em que o biocatalisador está envolvido nos interstícios desta estrutura. Esse arranjo em rede pode variar de formas esféricas a cilíndricas e os materiais envolvidos na preparação pode ser, por exemplo, alginato, géis de poliacrilamida, triacetato de celulose, ágar, gelatina e carragenina (ADLERCREUTZ, 2013; ARROYO, 1998; CAO, 2006; HANEFELD *et al.*, 2009; ILLANES, 2008; SHELDON; VAN PELT, 2013). O tamanho dos poros da matriz pode ser ajustado com a concentração do polímero utilizado, no entanto, existe a possibilidade de vazamento enzimático de baixa massa molecular da matriz e o tamanho dos poros pode dificultar a transferência de massa (ILLANES, 2008).

A técnica de imobilização em membranas permeáveis ou encapsulamento compreende o uso de membranas pré-formadas (reatores tipo fibra oca) ou a formação de membranas ao redor do biocatalisador pela técnica de lipossomo (ADLERCREUTZ, 2013; ARROYO, 1998; CAO, 2006; HANEFELD *et al.*, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013). Ambos os métodos resultam na retenção do biocatalisador dentro de um espaço definido por uma membrana semipermeável que pode ser atravessada pelo substrato e pelo produto, mas é impermeável ao biocatalisador (ILLANES, 2008).

O método de imobilização por ligação entre a enzima e suporte sólido ocorre por ligações covalentes (entre grupos reativos do suporte e biocatalisador), interações iônicas ou adsorção física. As enzimas são facilmente fixadas a vários materiais orgânicos ou inorgânicos, como resinas acrílicas, amido, celulose, quitosana, sílica, etc. (ADLERCREUTZ, 2013; ARROYO, 1998; HANEFELD *et al.*, 2009; ILLANES, 2008; SHELDON; VAN PELT, 2013). Sua principal vantagem consiste na facilidade e simplicidade do procedimento, com poucas mudanças na conformação estrutural da enzima; entretanto, a dessorção da enzima pode ocorrer por mudanças na força iônica e temperatura (CAO, 2006).

No caso das lipases, uma técnica popular que tem sido amplamente relatada é a imobilização por adsorção hidrofóbica em superfícies altamente hidrofóbicas (BASTIDA *et al.*, 1998; CIPOLATTI *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2013; PALOMO *et al.*, 2002). Isso ocorre porque a interação entre os grupos hidrofóbicos do suporte e da enzima induzem a abertura da tampa da lipase (a ativação interfacial) tornando o sítio ativo acessível ao substrato (BRADY *et al.*, 1990; MANOEL *et al.*, 2015; MILED *et al.*, 2001; SCHMID; VERGER, 1998; VERGER, 1997). Dentre as lipases imobilizadas em suporte sólido, destacam-se: *Candida antarctica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida rugosa*, lipase de pâncreas de porco e pâncreas bovino, entre outras (MENDES *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2019; VESCOVI *et al.*, 2016; VESCOVI *et al.*, 2017). Apesar dos excelentes resultados desta abordagem de imobilização, o uso de suportes pré-existent aumenta o custo final do biocatalisador. Reduzir o custo do biocatalisador pode ser uma abordagem interessante para tornar a aplicação de lipases imobilizadas ainda mais atraente. Nesse sentido, o grupo de pesquisa do Prof. Sheldon relatou o desenvolvimento da técnica de precipitação e reticulação enzimática (CLEA, do inglês cross-linked enzyme aggregate), na qual não há necessidade de utilizar o suporte de imobilização, já que este método envolve a reticulação após agregação e precipitação das enzimas induzidas naturalmente ou artificialmente (CAO *et al.*, 2000; CAO, 2006).

Na etapa de agregação e precipitação, a enzima é agregada e precipitada por um precipitante (sais, solventes orgânicos miscíveis com água, polímeros não iônicos, etc.) (CUI; JIA, 2015), pois os agentes precipitantes podem alterar o estado de hidratação da molécula enzimática ou alterar a constante dielétrica da solução, promovendo assim a sua precipitação. Os diferentes precipitantes induzem conformações distintas das enzimas nos agregados enzimáticos, que afetam as propriedades catalíticas do CLEA (LANFRANCHI *et al.*, 2017). Além dos agentes precipitantes, o pH durante a preparação dos agregados também pode influenciar a atividade recuperada (TALEKAR *et al.*, 2013). Isso ocorre, porque o pH do meio

influencia as interações intramoleculares da proteína pela geração de forças de repulsão eletrostáticas, além disso, altera o estado de ionização da proteína permitindo que a enzima assuma configuração tridimensional desfavorável à catálise. Se a proteína é precipitada nesta forma desfavorável e depois redissolvida no pH adequado, sua atividade é restaurada, mas se é entrecruzada nesta forma, os CLEAs podem ter baixa atividade (KARTAL *et al.*, 2011; SHELDON, 2011).

RAMOS *et al.* (2018) avaliaram a precipitação da LPP na presença de três agentes precipitantes (solução saturada de sulfato de amônio, acetona e etanol hidratado) utilizando a relação enzima/agente precipitante na proporção 1:3 (v/v). Durante a seleção do agente precipitante, os autores verificaram que a LPP foi totalmente precipitada com recuperação de 100% da atividade catalítica. No entanto, durante a preparação do CLEA, apenas o etanol proporcionou melhor atividade recuperada (3,5%) para o agregado de LPP. SCHOEVAART *et al.* (2004) investigaram a precipitação de uma ampla variedade de enzimas, incluindo lipases de diferentes fontes (*Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*), utilizando a relação enzima/agente precipitante na proporção 1:3 (v/v). Os autores verificaram que todas as enzimas avaliadas apresentaram recuperação de 100% de atividade para pelo menos um dos precipitantes avaliados após a re-solvatação, incluindo as lipases que apresentaram máxima precipitação e atividade recuperada na presença de acetona, acetonitrila, sulfato de amônia saturado, terc-butanol, etanol, propanol e polietilenoglicol. KARTAL *et al.* (2011) verificaram o efeito de quatro agentes precipitantes (etanol, terc-butanol, acetona e isopropanol) para a precipitação de lipase de *Candida rugosa* utilizando a relação enzima/agente precipitante na proporção 1:9 (v/v) e relataram que o isopropanol proporcionou máxima atividade recuperada para a enzima durante as análises de precipitação, no entanto, o etanol levou a melhores atividades recuperadas (8,5%) durante a preparação do CLEA. KIM *et al.* (2013) analisaram diferentes valores de pH para a preparação de CLEAs de desidrogenase e concluíram que as melhores atividades recuperadas para o agregado enzimático foram obtidas em solução com pH próximo ao neutro ou alcalino, enquanto os pH ácidos levaram a redução brusca da retenção catalítica.

Na etapa de reticulação para a formação dos CLEAs, os agregados são reticulados com um agente bifuncional (por exemplo, glutaraldeído) ou multifuncional (ex: polialdeído dextrano), geralmente com grupos amino na superfície da enzima. O glutaraldeído tem sido utilizado como agente de reticulação, uma vez que é barato e disponível comercialmente (RICHARDS; KNOWLES, 1968); entretanto, apresenta um tamanho relativamente pequeno, podendo ocupar o sítio ativo da enzima ou até mesmo bloquear a entrada de substâncias

macromoleculares (MIGNEAULT *et al.*, 2004). MAFRA *et al.* (2016) relataram a preparação de CLEA de catalase reticulados com glutaraldeído (25 a 200 mM) e observaram que a concentração de 50 mM de glutaraldeído produziu CLEA com retenção catalítica de 62% e maior estabilidade (aproximadamente 100% da atividade residual retida após 200 h a 40 °C). CUI *et al.* (2016) investigaram a preparação de agregados de LPB reticulados com glutaraldeído (0,5% a 2,5% (v/v)) durante 2 h a 4 °C e verificaram que a concentração de 1% (v/v) desse agente reticulante proporcionou ao CLEA de LPB retenção catalítica de 75%, enquanto as demais concentrações levaram a redução na recuperação da atividade. ZHEN *et al.* (2013) relataram que o CLEA de β -mananase preparado com glutaraldeído apresentou uma estrutura compacta com baixa flexibilidade das moléculas da enzima, expressando menor atividade recuperada (4,7%) em comparação com CLEAs preparados com polialdeído-dextrano (32%) e polialdeído-amido (21%), os quais apresentaram uma estrutura porosa.

O mecanismo de reação dos agentes de reticulação baseia-se na formação de ligações covalentes entre os seus grupos aldeídos e os resíduos de lisina das enzimas, para formarem uma base de Schiff. No entanto, existe a possibilidade dos grupos carboxil livres dos ácidos aspártico e glutâmico reagirem com polímeros ricos em grupos aminos (polilisina ou polietilenoiminas) para aumentar o número de possíveis locais de reticulação (WILSON *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 2011). WILSON *et al.* (2006) avaliaram a preparação de CLEA de lipases de *Alcaligenes* sp. e *Candida antarctica* utilizando o procedimento de tratamento prévio da enzima com polietilenoimina (PEI) ou sulfato de PEI-dextrano (SPD), seguido de precipitação com polietilenoglicol e reticulação com glutaraldeído. Os autores relataram que o CLEA apresentou elevada estabilidade na presença de solventes orgânicos, uma característica não verificada no CLEA dessas enzimas, quando o agregado é preparado pelo procedimento geral sem o tratamento da enzima com PEI ou SPD. Em outros casos, o PEI vêm sendo utilizado como agente de reticulação. VELASCO-LOZANO *et al.* (2014) estudaram a preparação de CLEA de lipase de *Candida rugosa* por ativação dos grupos carboxílicos com carbodiimida, seguido de reticulação com polietilenoimina (1,3 kDa). Os autores relataram que o CLEA apresentou 1,3 vezes mais atividade e termoestabilidade em relação ao CLEA preparados pelo método tradicional de reticulação com glutaraldeído, retendo 60% da atividade residual após 22 h a 50 °C.

Uma variável importante no estudo da preparação de CLEAs é a relação entre o agente de reticulação e a proteína, pois essa relação influencia a atividade e a morfologia dos agregados. A atividade residual do agregado enzimático apresenta um valor máximo ao alterar as concentrações do agente de reticulação (BARBOSA *et al.*, 2014; XUE; WOODLEY, 2012).

Esse efeito foi reportado por RAMOS *et al.* (2018) no preparo de CLEAs de LPP, usando diferentes concentrações de glutaraldeído (5 a 40 μmol de glutaraldeído/mg de proteína) na etapa de entrecruzamento. Os autores observaram que a LPP reticulada com 10 μmol de glutaraldeído/mg de proteína rendeu CLEAs com atividade recuperada de 40% e rendimento de imobilização de 78%, enquanto, concentrações superiores de glutaraldeído levaram a uma redução na retenção catalítica. Altas concentrações de agente de reticulação podem prejudicar a flexibilidade da enzima e resultar em uma alteração da rigidez, impedindo que o substrato alcance o sítio ativo e aumentando as limitações de transferência de massa interna (BARBOSA *et al.*, 2014; XUE; WOODLEY, 2012).

Quando a superfície da enzima tem um baixo conteúdo de grupos amino, proteínas sem atividade catalítica, chamados de *co-feeders* proteicos (por exemplo, albumina de soro bovino (BSA), proteínas de soja, etc.) são comumente usados para auxiliar na reticulação, podendo reduzir a lixiviação enzimática e as limitações de transferência de massa durante a reação de biotransformação (GUAUQUE TORRES *et al.*, 2014). CUI *et al.* (2016) investigaram a preparação de CLEAs de LPB segundo o procedimento de coagregação com BSA e os resultados comprovaram que os *co-feeders* proteicos melhoram a atividade recuperada do CLEA, atingindo valor de 75%, além de proporcionarem ao biocatalisador maior estabilidade operacional e retenção de 78% da atividade catalítica após 8 ciclos reacionais em batelada. Esse resultado também foi verificado por RAMOS *et al.* (2018) quando avaliaram a preparação de CLEA de LPP utilizando proteínas de soja como *co-feeder* proteicos (relação enzima/proteínas de soja na proporção 1:3). Os autores observaram que o CLEA de LPP apresentaram rendimento de imobilização em torno de 78% e atividade recuperada em torno de 40%. Além disso, a estabilidade operacional na reação de etanolise do óleo de soja mostrou que o rendimento de éster etílico de ácido graxo (EEAG) foi superior a 50% após dez ciclos de reação de 24 h.

Além dos *co-feeders* proteicos, vem sendo reportada a utilização de aditivos magnéticos funcionalizados com grupos aminos. Esta estratégia, além das vantagens discutidas anteriormente, pode contornar o problema da dificuldade de recuperação dos CLEAs (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011). KOPP *et al.* (2014) observaram que CLEAs de penicilina G-acilase preparados por coagregação com nanopartículas magnéticas e precipitação com polietilenoglicol apresentaram melhor desempenho com relação à atividade recuperada, além disso, apresentaram melhor estabilidade operacional e facilidade na recuperação do biocatalisador. KUMAR *et al.* (2014) reportaram que a lacase coagregada com nanopartículas magnética funcionalizadas com grupos aminos proporcionaram a formação de CLEA com

estrutura rígida e estável, além de alta atividade volumétrica, aumento da estabilidade térmica e operacional, resistência a condições extremas e facilidade na recuperação do biocatalisador. AMARAL-FONSECA *et al.* (2018) relataram a preparação de CLEA de amiloglucosidase por coagregação com nanopartículas magnéticas aminadas (SNMPs), usando polietilenoimina como auxiliar na etapa de reticulação com glutaraldeído. Os autores obtiveram agregados com cerca de 40% da atividade recuperada e estabilidade térmica aproximadamente 4 vezes maior que a enzima solúvel. Além disso, o CLEA apresentou estabilidade operacional, sendo reutilizado na sacarificação de amido em cinco ciclos de 6 h a 45 °C e mantendo dextrose equivalente superior a 85%.

Uma desvantagem importante a ser considerada no uso de CLEAs é a limitação por transferência de massa dentro de sua estrutura supramolecular altamente compacta (CUI; JIA, 2015). Alguns trabalhos vêm relatando algumas modificações do método original, com o objetivo de reduzir as limitações da transferência de massa intrapartículas. WANG *et al.*, (2011) realizou uma pequena mudança no procedimento original visando preparar CLEAs porosos (p-CLEAs). O procedimento envolve a coprecipitação da enzima com amido e a reticulação com glutaraldeído, seguida pela hidrólise do polissacarídeo presente na estrutura agregada utilizando uma α -amilase. Os autores verificaram que p-CLEAs de papaína preparados desta forma apresentaram tamanhos de poros maiores (permitindo reduzir a limitação de transporte de massa) e grandes superfícies em comparação aos CLEAs convencionais. Além disso, os p-CLEAs de papaína preparados com *co-feeders* proteicos (ovalbumina e albumina de soro bovino) e amido (0,3 a 0,4%, m/v) renderam 100% de retenção catalítica, demonstrando a viabilidade deste método de preparação de CLEA. Recentemente, CUI *et al.* (2017) relataram um novo procedimento para preparar CLEAs de LPB em microemulsão de líquidos iônicos hidrofóbicos, com o objetivo de reduzir os problemas de difusão dentro das estruturas supramoleculares dos CLEAs. Sob condições otimizadas, os autores obtiveram a preparação de estruturas esféricas com boa dispersibilidade e maior atividade de recuperação (84,6%) em comparação com a estrutura amorfa de CLEAs convencionais (52,8%).

Neste contexto, os procedimentos que descrevem a técnica de imobilização por precipitação e reticulação enzimática mostram as peculiaridades existentes para o preparo de agregados de diferentes enzimas, incluindo lipases, e conseqüentemente, comprovam o sucesso da síntese de CLEAs para aplicação em diversas reações de biotransformação (CUI *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2018; AMARAL-FONSECA *et al.*, 2018; TALEKAR *et al.*, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Lipase de pâncreas de porco tipo II, albumina de soro bovino (BSA), álcool terc-butílico, tributirina, polietilenoimina (PEI, Mn médio ~ 423), dodecil aldeído, TNBS (ácido trinitrobenzenossulfônico) e reagente de Bradford foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Solução de glutaraldeído (25% em H₂O) foi adquirida da Vetec Química Fina (Duque de Caixas, RJ, Brasil). Amido solúvel foi adquirido da PanReac Química (Barcelona, Espanha). Etanol anidro (99,8% P.A.) foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil). Proteínas de soja foi adquirida no mercado local. Nanopartículas magnéticas de sílica (SNMPs) funcionalizadas com grupos amina derivados de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) (136 ± 10 $\mu\text{mol amino/g}$) foram adquiridas da Kopp Technologies (São Carlos, SP, Brasil). α -Amilase (BAN 480L) da Novozymes A/S foi uma doação de LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS, Brasil). Todos os demais reagentes eram de grau analítico e usados sem nenhum tratamento prévio.

3.2. Procedimento geral de preparação do CLEA

Na etapa de precipitação, etanol (3,0 mL) foi adicionado a 1,0 mL de uma mistura homogênea contendo LPP (5,0 mg de proteína mL⁻¹) e *co-feeders* (15 mg mL⁻¹) preparados em tampão fosfato de sódio (5,0 mM, pH 7,0). A mistura foi mantida a 4 °C em agitador orbital com agitação de 150 rpm durante 30 min. Após esse período, glutaraldeído (5 μmoles de glutaraldeído/mg de proteína total) foi adicionado e a etapa de reticulação prosseguiu por 2,5 h (RAMOS *et al.*, 2018), como mostra a Figura 3-1. Os CLEAs preparados com *co-feeders* foram separados por centrifugação a 10.400 g por 10 min a 4 °C, enquanto os CLEAs preparados com nanopartículas magnéticas de sílica (SNMPs) como aditivo foram separados por um campo magnético externo. O precipitado (CLEAs de LPP) foi lavado duas vezes com 3,0 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) e finalmente ressuspenso em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (5,0 mM, pH 7,0). As medidas de atividades hidrolíticas (tributirina como substrato) na solução inicial de enzima, sobrenadante final, sobrenadantes de lavagem e suspensão de CLEA foram usadas para calcular os seguintes parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI), atividade recuperada (AR) e rendimento global (RG) usando as seguintes equações:

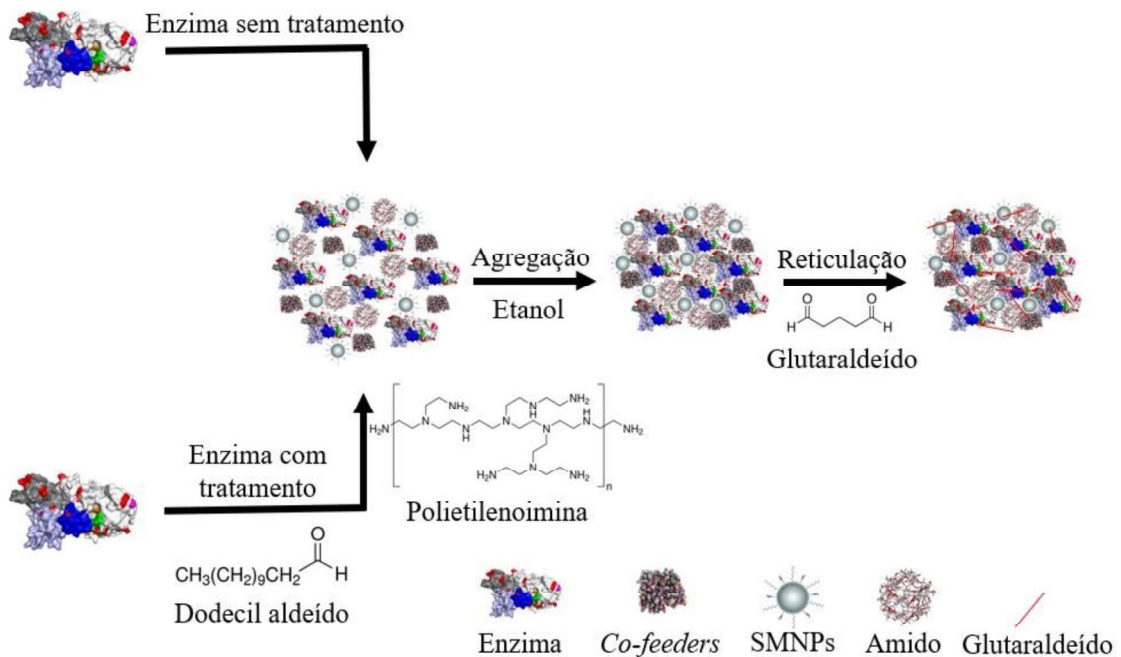
$$RI = \left(\frac{A_i - (A_{\text{sobre}} + A_{\text{Lav}})}{A_i} \right) \times 100 \quad (3-1)$$

$$AR = \left(\frac{A_{\text{derivado}}}{A_i - (A_{\text{sobre}} + A_{\text{Lav}})} \right) \times 100 \quad (3-2)$$

$$RG = \left(\frac{A_{\text{derivado}}}{A_i} \right) \times 100 \quad (3-3)$$

onde A_i é a atividade inicial; A_{derivado} é a atividade dos CLEAs, A_{sobre} é a atividade do sobrenadante e A_{Lav} é a atividade dos sobrenadantes das lavagens.

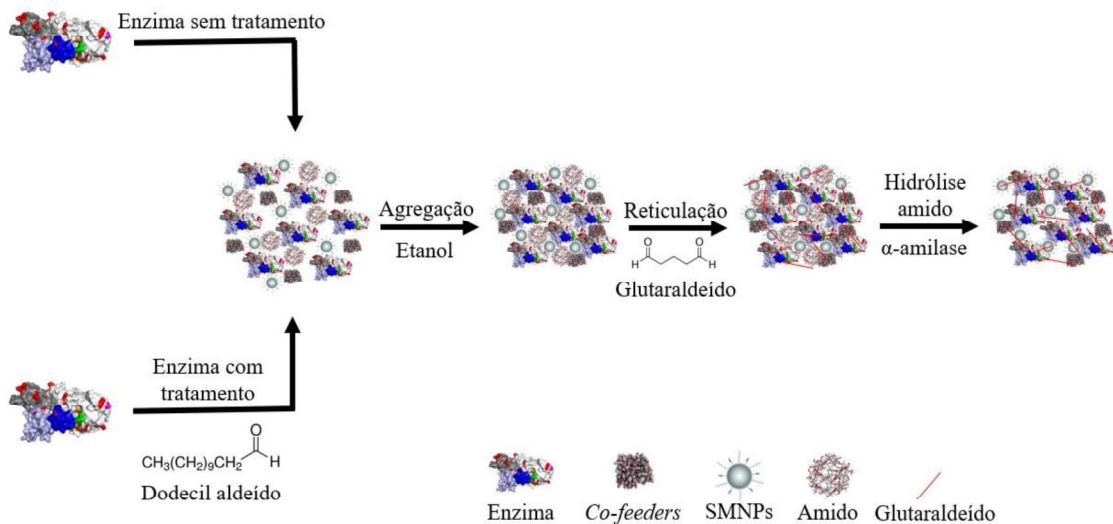
Figura 3-1. Procedimento geral de preparação de CLEAs convencionais.



CLEAs magnéticos porosos (pm-CLEAs) foram preparados pelo procedimento geral descrito acima, mas adicionando amido solúvel como agente formador de poros na mistura da solução enzimática, como mostra a Figura 3-2. Na etapa de precipitação, 3,0 mL de etanol foram adicionados a 1 mL de uma mistura homogênea contendo LPP (5,0 mg de proteína mL⁻¹), *co-feeders* proteicos ou aditivos (7,5 mg de BSA ou proteínas de soja e 7,5 mg de SNMPs) e amido solúvel (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% e 1,0%, m/v) preparado em tampão fosfato de sódio (5,0 mM, pH 7,0). A mistura foi mantida a 4 °C em agitador orbital a 150 rpm durante 30 min.

Após este período, adicionou-se glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg de proteína total) e prosseguiu-se a reticulação durante 2,5 h. O precipitado foi recuperado por separação magnética, lavado e ressuspensão em 3,0 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0). Foi adicionado um volume de 100 μ L de α -amilase de *Bacillus licheniformes* (BAN 480L) e a suspensão foi incubada a 25 $^{\circ}$ C durante 2 h de modo a hidrolisar o amido em dextrinas, maltose e glicose (WANG *et al.*, 2011). Após esse tempo, os CLEAs foram recuperados por separação magnética, ressuspensos em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (5,0 mM, pH 7,0) e armazenados a 4 $^{\circ}$ C. As atividades hidrolíticas foram medidas para calcular os parâmetros de imobilização, como descrito acima.

Figura 3-2. Procedimento para a preparação de CLEAs magnéticos porosos pm-CLEA.



3.3. Determinação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3.4. Ensaio de Atividade Padrão

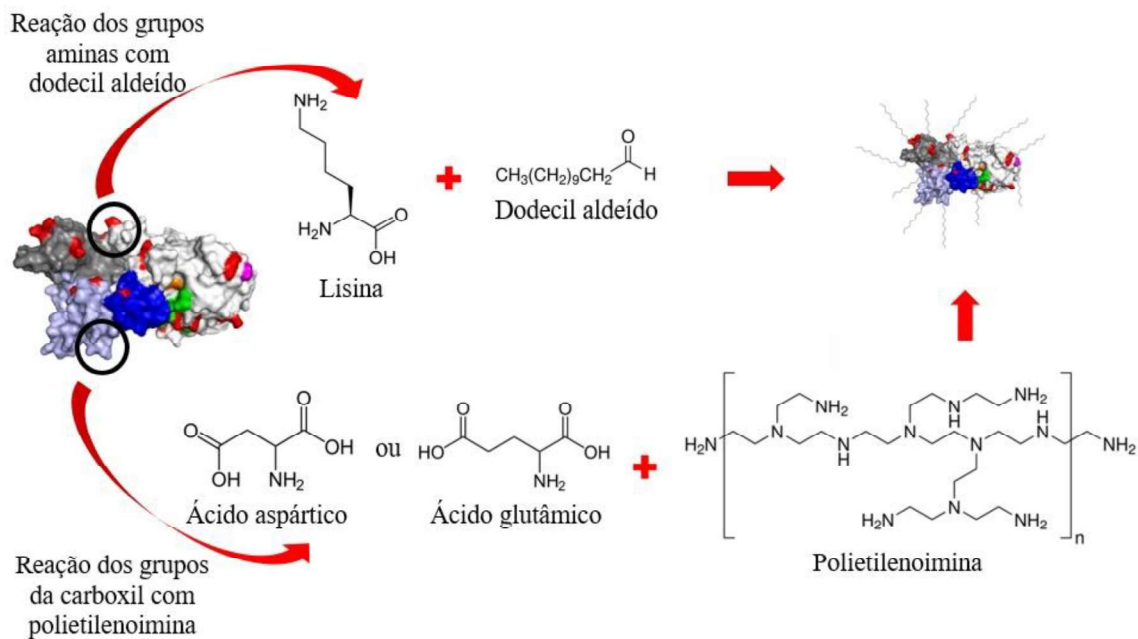
A atividade hidrolítica foi medida de acordo com BEISSON *et al.* (2000) com pequenas modificações. Resumidamente, um volume de 100 μ L de solução enzimática (ou CLEA ressuspendido) foi adicionado a uma mistura de 1,5 mL de tributirina, 6,0 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5) e 16,5 mL de água destilada. A reação hidrolítica foi realizada a 37 $^{\circ}$ C, agitação de 500 rpm durante 5 min. A hidrólise da tributirina foi monitorizada num titulador

Titrimo 907 (Metrohm, Herisau, Suíça) utilizando uma solução de KOH 20 mM para manter o pH da reação a 7,5. A atividade hidrolítica foi calculada considerando o consumo de KOH para neutralizar o ácido butírico liberado no meio reacional. Uma unidade de tributirina (TBU) foi definida como a velocidade de reação necessária para libertar 1 μmol de ácido butírico por minuto nas condições descritas.

3.5. Modificação química ou física da superfície da lipase

Em alguns casos, antes do procedimento de precipitação, a LPP foi incubada com polietilenoimina (PEI, mistura de oligômeros com um Mn médio de aproximadamente 423) e/ou dodecil aldeído, como mostra a Figura 3-3.

Figura 3-3. Modificação química ou física da superfície da lipase de pâncreas de porco (LPP) com dodecil aldeído e polietilenoimina.



O tratamento com PEI foi realizado de acordo com WILSON *et al.* (2006), adicionando 50 μL de solução de PEI (100 mg mL^{-1}) em uma solução homogênea de LPP (5 mg mL^{-1}) preparada em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH final 7,0). O meio reacional foi incubado a 25 $^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm durante 60 min. Em seguida, a solução enzimática foi dialisada em membrana de celulose (massa molecular de corte de 14 kDa) a 4 $^\circ\text{C}$ durante 16 h contra excesso de água para remover o excesso de agente modificador de superfície.

Para o tratamento com dodecil aldeído, adicionou-se 181 μL de uma solução deste aldeído (831 mg mL^{-1}) a 30 mL de uma solução de LPP (5 mg mL^{-1}) preparada em tampão carbonato de sódio (100 mM, pH 10,0) para a razão mássica 1:1 (dodecil aldeído:LPP). A solução foi incubada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm durante 180 min. Neste caso, tanto a LPP não modificada como a LPP tratada com PEI foram modificadas com dodecil aldeído. Após este período, adicionou-se borohidreto de sódio (1 mg mL^{-1} de solução) à solução e a reação prosseguiu durante 30 min. No final, a solução enzimática foi dialisada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 h contra o excesso de água para remover o excesso de agentes modificadores de superfície e redutores.

A modificação da superfície das enzimas foi avaliada pelo método colorimétrico do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) (SNYDER; SOBOCINSKI, 1975). Soluções contendo TNBS (0,01%, v/v) e LPP modificada e não modificada ($0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas em tampão borato de sódio (100 mM, pH 9,0) e incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Depois, mediu-se a absorbância a 420 nm e relacionou-se com a concentração de grupos amino utilizando uma curva padrão construída com glicina como aminoácido padrão, como ilustrado no Apêndice A (Figura A1).

3.6. Caracterização da LPP Livre e Imobilizada

3.6.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da LPP e na estabilidade térmica

A atividade enzimática da enzima imobilizada ou livre foi determinada em diferentes valores de pH a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando diferentes tampões com uma concentração de 100 mM: acetato de sódio a pH 5,0, fosfato de sódio (valores de pH de 6,0 a 8,0) ou carbonato de sódio (pH 9,0 e 10,0). Uma solução em branco nas mesmas condições (mas sem enzima) foi utilizada para verificar se havia hidrólise química (ácida ou alcalina) nos valores de pH avaliados.

Para determinar a temperatura de atividade ótima da lipase livre ou imobilizada, mediu-se a atividade enzimática utilizando tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,5, em uma faixa de temperaturas de 10 a $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para ensaios de estabilidade, a LPP livre e imobilizada foram incubadas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,0) durante 10 h sob agitação a 150 rpm. Em intervalos de tempo regulares, amostras foram retiradas para medição da atividade hidrolítica.

3.6.2. Determinação do fator de efetividade

As velocidades iniciais de reação foram medidas a 40 °C e pH 7,5 utilizando diferentes concentrações de tributirina (19,28; 38,35; 57,2; 112,5; 217,9 e 284,4 mM) para LPP livre e imobilizada. O fator de efetividade (η) para cada forma de LPP nas concentrações de tributirina avaliadas foi determinado usando a seguinte equação:

$$\eta = \frac{V_{\text{derivado}}}{V_{\text{Livre}}} \quad (3-4)$$

onde V_{derivado} e V_{livre} são as velocidades iniciais de reação catalisada pela mesma quantidade de enzima (LPP livre e CLEAs de LPP, respectivamente).

3.6.3. Microscopia eletrônica de varredura com aplicação de campo elétrico (MEV-FEG) dos CLEAs de LPP

A morfologia da superfície dos CLEAs e pm-CLEAs foi estudada por microscopia eletrônica de varredura com aplicação de campo elétrico (MEV-FEG) usando um microscópio eletrônico JEOL JSM6701F (Alemanha) operado a 2 kV. As amostras foram impregnadas com silício e secas em um dessecador por 24 horas antes de serem escaneadas sob vácuo.

3.7. Reutilização de biocatalisadores em hidrólise de tributirina

O desempenho de LPP livre e pm-PS-CLEA (CLEAs porosos de LPP preparados com proteínas de soja e SNMPs) foi avaliado na hidrólise de uma solução de tributirina 74,2 mM a 37 °C e pH 7,5 por 4 h sob agitação a 500 rpm. O meio reacional foi composto por 6 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5), 16,5 mL de água destilada, 0,5 mL de tributirina e uma carga enzimática de 70 TBU/g tributirina (para LPP livre e imobilizada).

Os ensaios de reutilização foram realizados nas mesmas condições acima usando o pm-PS-CLEA como biocatalisador. Entre cada ciclo, os CLEAs foram recuperados por separação magnética e lavados com água destilada.

3.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm \sigma$ (desvio padrão médio). Análises de variância entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Influência de *co-feeders* na preparação de CLEAs

As proteínas inertes, albumina de soro bovino (BSA) e proteínas de soja (PS), foram avaliadas como *co-feeders*, e as nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos amino (SNMPs) foram empregadas para produzir CLEAs magnéticos. A Tabela 4-1 mostra que o uso de *co-feeders* proteicos (BSA ou PS) permitiu atingir atividades recuperadas em torno de 6,5 e 15,7 vezes maiores do que aquela obtida para os CLEAs preparados sem qualquer aditivo (*co-feeder* proteicos ou SNMPs). Embora os *co-feeders* tenham contribuído para a preparação de CLEAs mais ativos, o rendimento de imobilização na presença de PS foi reduzido de aproximadamente 65% para 51%, enquanto na presença de BSA o rendimento de imobilização aumentou de aproximadamente 65% para 94%.

Os CLEAs preparados com SNMPs também mostraram um aumento na atividade recuperada (8,4 vezes), sem diminuição significativa no rendimento de imobilização (de 65% para 63%). No entanto, uma combinação de *co-feeders* proteicos (BSA ou PS) e SNMPs (razão mássica de 1:1) mostrou ser a melhor estratégia, particularmente no caso de BSA/SNMP, que rendeu CLEAs com rendimento de imobilização de aproximadamente 70% e atividade recuperada de 25,43% (em torno de 17 vezes maior do que na ausência de *co-feeders* (onde a atividade recuperada foi de apenas 1,45%)). Além da melhoria na atividade recuperada, esses CLEAs possuem propriedades magnéticas que permitem sua fácil recuperação aplicando um campo magnético externo (Figura 4-1).

Vários estudos mostram que CLEAs coagregados com *co-feeders* proteicos (BSA ou PS) exibem melhor desempenho com relação à lixiviação enzimática durante a etapa de lavagem e redução das limitações de transferência de massa durante a reação, principalmente usando substratos macromoleculares (CUI *et al.*, 2016; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; SAMOYLOVA *et al.*, 2018; TALEKAR *et al.*, 2012). Esses melhores desempenhos estão relacionados aos grupos aminos dos resíduos de lisina presentes na superfície da estrutura desses *co-feeders* que auxiliam na formação de ligações covalentes entre a enzima e a proteína inerte formando a matriz do CLEA (KOPP *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2006). Vale ressaltar que as SNMPs também forneceram aos CLEAs essas melhorias, uma vez que elas são funcionalizadas com grupos aminos primários derivados do reagente de funcionalização (3-aminopropiltrióxissilano).

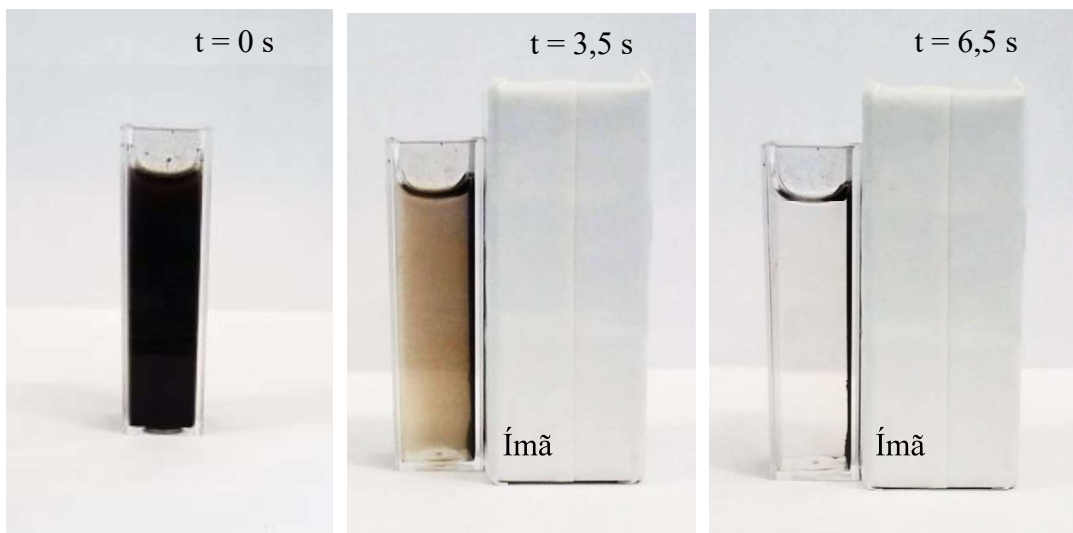
Além disso, o uso de *co-feeders* pode reduzir ou evitar problemas de difusão, aumentando a atividade recuperada (CUI *et al.*, 2016).

Tabela 4-1. Avaliação da adição de nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizada com grupos aminos (SNMPs) e *co-feeders* proteicos (BSA e PS) na preparação de CLEAs de lipase de pâncreas de porco (LPP). Os valores são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão (σ).

CLEAs	AR ^a \pm σ (%)	RI ^b \pm σ (%)	RG ^c \pm σ (%)
CLEA-LPP ^d	1,45 \pm 0,08	65,25 \pm 3,52	0,93 \pm 0,003
CLEA-LPP-BSA ^e	9,40 \pm 0,11	93,69 \pm 1,50	9,45 \pm 0,39
CLEA-LPP-PS ^f	22,81 \pm 1,16	51,42 \pm 0,35	10,72 \pm 0,34
CLEA-LPP-SNMPs ^g	12,27 \pm 0,77	63,04 \pm 2,42	7,72 \pm 0,24
CLEA-LPP-BSA-SNMPs ^h	25,43 \pm 0,21	69,69 \pm 1,20	20,30 \pm 0,52
CLEA-LPP-PS-SNMPs ⁱ	32,84 \pm 1,76	45,25 \pm 1,07	16,40 \pm 1,12

Nota: ^a Atividade recuperada; ^b Rendimento de imobilização; ^c Rendimento global; CLEA preparado ^d sem *co-feeders* e com: ^e Albumina de soro bovino (BSA); ^f Proteínas de soja (PS); ^g Nanopartículas magnéticas de sílica (SNMPs); ^h Proporção mássica BSA/SNMPs de 1:1; ⁱ Relação mássica PS/SNMPs de 1:1. Condições do ensaio: precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) e coagregação sem e com *co-feeders* (relação proteína totais/massa *co-feeders* de 1:3) durante 30 min, seguida de reticulação com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg de proteína total) durante 2,5 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm.

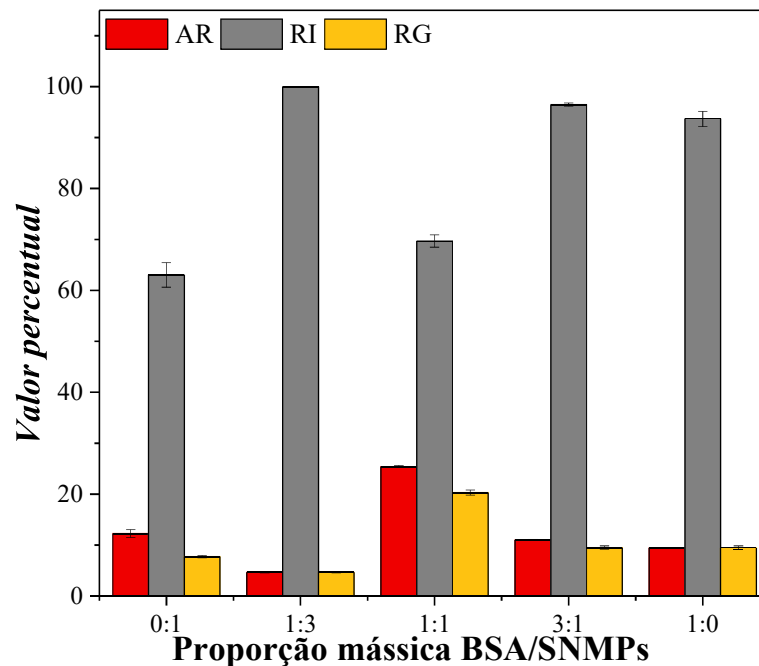
Figura 4-1. Imagens da separação magnética do CLEA pela aplicação de um campo magnético externo: (a) suspensão CLEA, (b) campo magnético capturando o CLEA, e (c) CLEA separado da suspensão.



Como a combinação de BSA e SNMPs (proporção mássica 1:1 para relação BSA e SNMP e 1:3 para enzima total/*co-feeders* + aditivo) proporcionou melhores resultados em termos de atividade recuperada foram também avaliadas outras proporções mássicas de BSA/SNMPs. A Figura 4-2 mostra que as combinações de BSA/SNMPs com razões de 1:3 e 3:1 resultaram em rendimentos de imobilização de aproximadamente 100%, no entanto, as atividades recuperadas apresentaram valores inferiores a 10%. Provavelmente, as nanopartículas (muito rígidas) tenham causado algum efeito negativo na conformação enzimática ao reagir com a enzima, ou sua multifuncionalidade produziu uma estrutura mais compacta do CLEA. A LPP é uma proteína formada por uma única cadeia polipeptídica (~50 kDa), dividida em dois domínios com funções específicas (Figura 2-4). O domínio N-terminal (resíduos de 1 a 336) contém a tríade catalítica (Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷ e His²⁶⁴), e o domínio C-terminal (resíduos de 337 a 449) está envolvido na ligação da colipase, uma pequena proteína (~10 kDa) que ancora a lipase à interface água-lipídio (HERMOSO *et al.*, 1996). Esta lipase apresenta uma flexibilidade intrínseca na posição relativa aos seus domínios N e C-terminal (uma pequena rotação em volta dos resíduos 334-335). A propriedade do domínio N-terminal de mover-se independentemente da tampa (segmento Cys²³⁸ – Cys²⁶²), colipase e C-terminal pode ter implicações funcionais à medida que a LPP se liga à interface água-lipídio (HERMOSO *et al.*, 1996). Além disso, a tampa e a sequência de resíduos 77-86 (ambos críticos para a ativação da lipase - abrindo a tampa) contém resíduos de Lys (Lys²⁴⁰ e Lys²⁸¹, respectivamente). O envolvimento desses resíduos de Lys em ligações covalentes com o glutaraldeído pode afetar negativamente a atividade da enzima.

Assim, as razões mássicas de 1:3 relacionados à enzima/(BSA + SNMPs) e 1:1 de BSA/SNMPs foram selecionadas para os experimentos seguintes.

Figura 4-2. Efeito da proporção mássica de BSA/SNMPs sobre os parâmetros de imobilização (AR - atividade recuperada, RI - rendimento de imobilização e RG - rendimento global) da lipase de pâncreas porco (LPP) na preparação de CLEAs.



Nota: Condições de ensaio: precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3), coagregação com aditivos (relação enzima/massa total de aditivos de 1:3), reticulação com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total), temperatura 4 °C, 30 min de precipitação/agregação e reticulação de 2,5 h sob agitação a 150 rpm.

4.2. Tratamento da superfície da LPP

A modificação da superfície da LPP com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído levou a uma perda de cerca de 30% da atividade, onde as atividades específicas (U/mg proteína) foram $27,54 \pm 0,67$, $19,44 \pm 0,53$ e $19,63 \pm 0,18$, para enzima não modificada, enzima tratada com PEI ou aldeído, respectivamente. A Tabela 4-2 mostra que a modificação com dodecil aldeído reduziu em aproximadamente 30% a absorbância da amostra pelo método colorimétrico do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS). Isto significa que cerca de 344 μ mol de grupos amino/g de proteína foram modificados após este tratamento. A superfície da LPP é rica em grupos aminos primários (Figura 2-4). A cadeia A (domínios N e C-terminais) tem 22 resíduos Lys e o terminal amino, enquanto a cadeia B (colipase) tem 4 resíduos Lys (o número de resíduos Lys foi obtido a partir da sequência primária do complexo lipase-colipase - Código PDB 1ETH). Assim, particularmente a modificação pelo dodecil aldeído reduziu os grupos aminos disponíveis, mas não comprometeu a reticulação da enzima com glutaraldeído devido aos grupos amino primários livres ainda disponíveis na superfície enzimática. Apesar disso, as

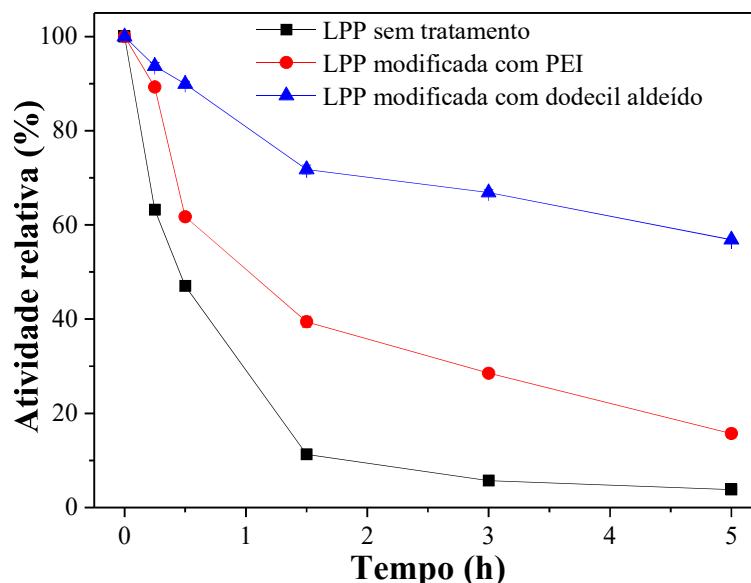
lipases modificadas foram mais estáveis que a LPP não modificada (Figura 4-3). Particularmente, a LPP tratada com dodecil aldeído apresentou maior estabilidade em relação à enzima não modificada (atividades residuais após 5 h de incubação a 40 °C e pH 8 (tampão fosfato 100 mM) em torno de 57% e 4%, respectivamente).

Tabela 4-2. Avaliação do tratamento da lipase de pâncreas de porco (LPP) com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído usando o método colorimétrico do ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) para a determinação dos grupos aminos.

Tratamento de LPP	Abs 420nm $\pm \sigma$	[Grupos aminos] $\pm \sigma$ (μmol grupos aminos/g proteína)
Nenhum	0,821 \pm 0,068	1102,01 \pm 90,61
PEI	0,981 \pm 0,069	1316,51 \pm 92,31
Dodecil aldeído	0,565 \pm 0,012	757,85 \pm 15,91

Nota: Condições dos ensaios (i) tratamento com PEI: 50 μL de solução de PEI (100 mg mL^{-1}) foram adicionados em 1 mL de uma solução de LPP (5 mg mL^{-1}) preparada em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7.0), seguido por incubação a 25 °C por 60 min e agitação de 150 rpm. (ii) tratamento com dodecil aldeído: 181 μL de uma solução de dodecil aldeído (831 mg mL^{-1}) foram adicionados em 30 mL de uma solução de LPP (5 mg mL^{-1}) preparada em tampão carbonato de sódio (100 mM, pH 10.0), seguida por incubação a 25 °C por 180 min e agitação de 150 rpm. Após cada tratamento, a solução de enzima foi dialisada contra excesso de água destilada em membranas de celulose (massa molecular de corte de 14 kDa) a 4 °C por 16 h. Após diálise, a modificação da superfície da enzima foi avaliada pelo método colorimétrico do TNBS: soluções de TNBS 0,01% (v/v), contendo LPP modifica e não modificada (0.01 mg mL^{-1}) foram preparadas em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 9,0 e incubadas a 25 °C por 30 min. Em seguida, as absorbâncias das soluções foram medidas em 420 nm e, então, relacionadas com a concentração de grupos aminos usando uma curva padrão construída com glicina como aminoácido padrão.

Figura 4-3. Inativação térmica da LPP livre não modificada e modificada com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído.



Nota: Condições do ensaio: 40 °C e pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM) e soluções enzimáticas contendo 5 mg de proteína mL⁻¹.

A Tabela 4-3 mostra o efeito do tratamento da superfície da LPP com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído sobre o rendimento de imobilização e atividade recuperada. Todos os tratamentos proporcionaram 100% de rendimento de imobilização, mas as atividades recuperadas dos biocatalisadores não apresentaram melhoria em relação aos CLEAs preparados com LPP sem nenhum tratamento. Os CLEAs preparados com LPP tratados com PEI produziram a menor atividade recuperada (7,17%), provavelmente devido à formação de estruturas mais compactas promovidas pela intensa reticulação. Além disso, o caráter catiônico desse polímero pode ter levado à formação de uma camada hidrofílica na superfície da enzima, prejudicando a difusão do substrato para o sítio ativo. Por outro lado, o tratamento da superfície da LPP com dodecil aldeído (aldeído hidrofóbico) permitiu uma atividade recuperada em torno de 20%, pois esse composto provavelmente criou uma camada hidrofóbica na superfície da enzima, auxiliando na etapa de agregação, ainda que os grupos aminos na superfície da enzima estejam em concentrações reduzidas para a etapa de reticulação. Como a combinação de ambos os tratamentos permitiu um pequeno aumento na atividade recuperada, apenas o tratamento da superfície com dodecil aldeído foi escolhido para outros ensaios experimentais.

Tabela 4-3. Avaliação do tratamento da lipase do pâncreas de porco (LPP) com polietilenoimina (PEI) e dodecil aldeído quanto aos parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR). Os valores são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão (σ).

LPP tratada	AR $\pm \sigma$ (%)	RI $\pm \sigma$ (%)
PEI	7,17 \pm 0,32	99,50 \pm 1,00
Dodecil aldeído	20,08 \pm 0,72	99,00 \pm 2,00
PEI seguido de Dodecil aldeído	25,64 \pm 1,37	99,60 \pm 2,00

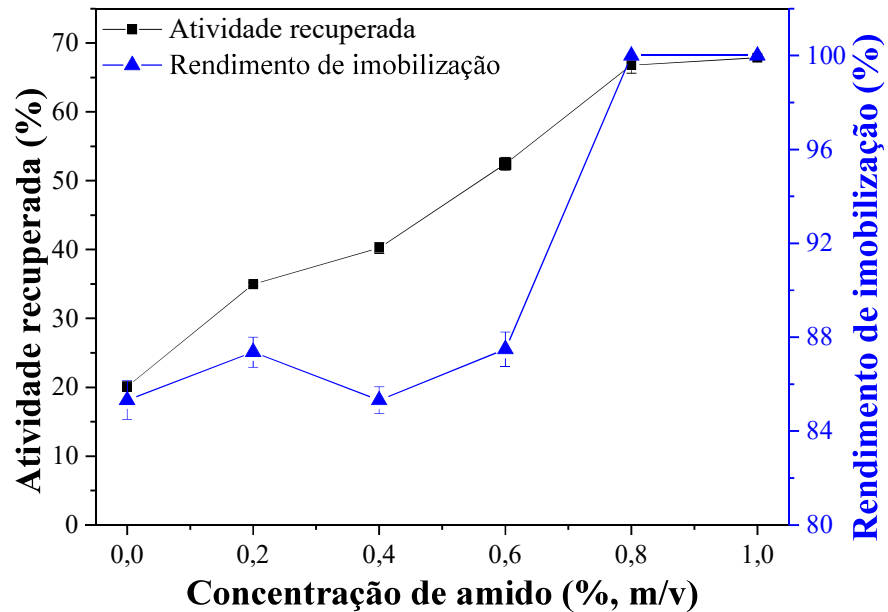
Nota: Condições de preparação do CLEA: tratamento da superfície da LPP com PEI e dodecil aldeído, precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3), coagregação com *co-feeders* (relação mássica de 1:1,5:1,5 para PPL/BSA/SNMPs), reticulação com glutaraldeído (5 μ mol de glutaraldeído/mg de proteína total), temperatura de 4 °C, 30 min de precipitação/agregação e reticulação de 2,5 h sob agitação de 150 rpm.

4.3. Preparação de CLEAs magnéticos usando amido nas etapas de agregação e reticulação

A influência da concentração de amido no rendimento de imobilização e atividade recuperada dos CLEAs de LPP é mostrada na Figura 4-4. A adição de amido proporcionou aumentos significativos no rendimento de imobilização até uma concentração de 0,6% (m/v), mas apenas as concentrações de 0,8 e 1% (m/v) resultou em 100% de imobilização. A atividade recuperada aumentou para todas as concentrações de amido, atingindo uma retenção catalítica máxima de 67% (mais do que o dobro da atividade recuperada sem amido) quando se utilizou 0,8% de amido durante a preparação do CLEA. Assim, 0,8% (m/v) de amido foi selecionado para a preparação de CLEAs de LPP.

TALEKAR *et al.* (2012) reportaram o uso de amido na preparação de CLEAs porosos (p-CLEAs) de invertase de *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que o uso de amido levou à formação de uma superfície porosa não uniforme, resultando em melhor transferência de massa e minimização de problemas de difusão. Além disso, concluíram que a concentração de 0,4% (m/v) de amido levou a retenção de 100% do potencial catalítico da enzima ao agregado enzimático, demonstrando a viabilidade deste método de preparação de agregados enzimáticos.

Figura 4-4. Efeito da concentração de amido no rendimento de imobilização e atividade recuperada dos CLEAs de LPP.



Nota: Condições do ensaio: tratamento da superfície de LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume etanol de 1:3), coagregação com *co-feeders* (proporção mássica LPP/BSA/SNMPs de 1:1,5:1,5 e concentração de amido de 0,2 a 1%, m/v), reticulação com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total), temperatura de 4 °C, 30 min de precipitação/agregação e reticulação de 2,5 h e agitação de 150 rpm, seguido de incubação com α -amilase a 25 °C, agitação de 150 rpm durante 2 h.

4.4. Influência do tempo de tratamento com glutaraldeído na preparação de CLEAs de LPP

A Tabela 4-4 mostra a influência do tempo de reticulação com glutaraldeído na preparação de CLEAs de LPP. Os resultados mostraram que não houve nenhum efeito significativo na atividade recuperada, sendo as ARs iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (em torno de 66%) para todos os tempos de reticulação estudados. Além disso, a incubação dos CLEAs em tampão fosfato de sódio com alta força iônica (100 mM, pH 7,0) durante 12 horas mostrou que a enzima imobilizada apresentou alta estabilidade e baixa lixiviação da LPP da matriz do CLEA para o sobrenadante (80 a 90% de atividade recuperada no CLEA). Assim, o tempo de reticulação de 15 h foi escolhido para realizar outros ensaios, pois, segundo GUAUQUE TORRES *et al.* (2013) o maior período de reticulação proporciona maior estabilidade ao agregado.

Tabela 4-4. Influência de diferentes tempos de reticulação com glutaraldeído na atividade recuperada (AR) do CLEA de LPP.

Tempo (h)	AR (%)
3 h (0,5 h de precipitação + 2.5 h de reticulação)	64,52a*
5.5 h (0,5 h de precipitação + 5 h de reticulação)	65,53a
10.5 h (0,5 h de precipitação + 10 h de reticulação)	66,10a
15.5 h (0,5 h de precipitação + 15 h de reticulação)	66,75a

Nota: A análise de variância para médias de atividade recuperada (AR) pelo teste de Tukey a 5% de significância não mostrou diferença estatisticamente significativa (letra sobrescrita igual). Condições do ensaio: tratamento da superfície de LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação entre solução enzimática/volume de etanol de 1:3) na presença da proporção mássica LPP/BSA/SNMPs de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) durante 0,5 h a 4 sob agitação a 150 rpm, seguido de tratamento com glutaraldeído (10 μ moles de aldeído/mg de proteína total). No final, o amido foi hidrolisado com α -amilase a 25 °C durante 2 h sob 150 rpm.

4.5. Seleção de aditivos para a preparação de CLEAs de LPP usando 0,8% (m/v) de amido como agente formador de poros

A influência da presença de *co-feeders* proteicos (BSA ou PS) e nanopartículas magnéticas de sílica (SNMPs) na preparação de CLEAs de LPP usando amido (0,8%, m/v) como agente formador de poros é mostrada na Tabela 4-5. As atividades recuperadas de todos os CLEAs preparados na presença de amido aumentaram aproximadamente duas vezes após a hidrólise do amido utilizando α -amilase de *Bacillus licheniformes*, alcançando 81% de atividade recuperada quando o CLEA de LPP foi preparado na presença de uma mistura de PS e SNMPs.

Tabela 4-5. Avaliação de diferentes aditivos na preparação de CLEAs magnéticos porosos (pm-CLEAs) da lipase de pâncreas de porco (LPP). Os valores do parâmetro de imobilização referente a atividade recuperada (AR) são expressos como média de triplicatas \pm desvio padrão (σ).

Aditivos	Atividades recuperadas de CLEAs magnéticos (AR \pm σ (%))	
	Antes da hidrólise do amido com α -amilase	Depois da hidrólise do amido com α -amilase
SNMPs ^a	24,46 \pm 0,24	54,01 \pm 0,64
BSA + SNMPs ^b	28,18 \pm 0,67	66,55 \pm 0,01
SP + SNMPs ^c	36,77 \pm 0,38	81,02 \pm 0,16

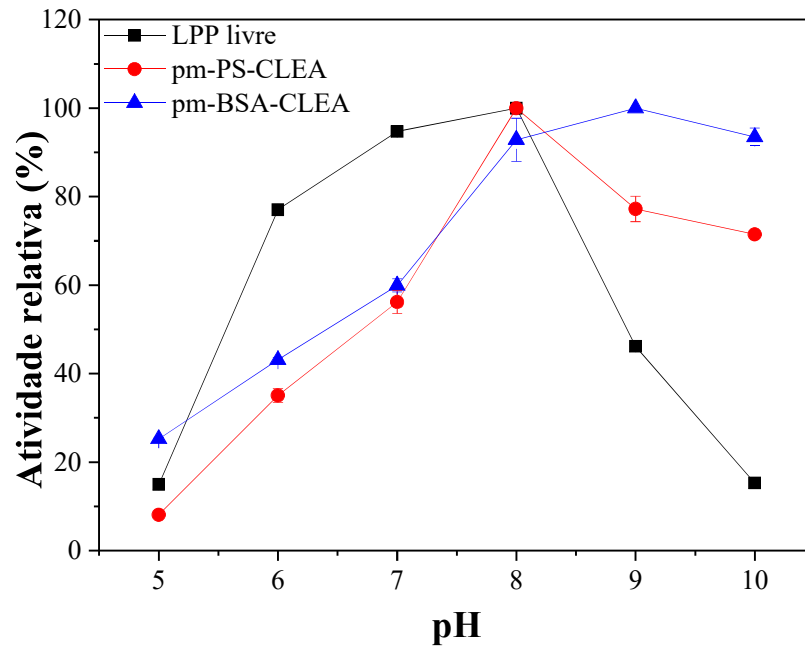
Nota: ^a Nanopartícula magnética de sílica; ^b Relação mássica albumina de soro bovino/nanopartículas magnéticas de sílica de 1:1; ^c Relação mássica proteínas de soja/nanopartículas magnéticas de sílica de 1:1. Condições de ensaio: tratamento da superfície de LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume etanol de 1:3) na presença de aditivos (proporção LPP/massa total de aditivos de 1:3) e amido (0,8%, m/v), temperatura de 4 °C, agitação de 150 rpm durante 0,5 h, seguido por tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg de proteína total) por 15 h. No final, o amido foi hidrolisado com α -amilase a 25 °C, agitação de 150 rpm durante 2 h.

4.6. Caracterização da LPP livre e imobilizada

4.6.1. Efeito do pH, temperatura e velocidade de agitação na atividade hidrolítica e estabilidade térmica

O efeito do pH no perfil cinético da LPP livre e imobilizada (pm-CLEA) é mostrado na Figura 4-5. O valor de pH para a máxima atividade da LPP livre (32,2 \pm 0,65 U/mg proteína) e pm-PS-CLEA (24,13 \pm 0,35 U/mg de proteína) foi semelhante (pH 8,0), enquanto para pm-BSA-CLEA (19,14 \pm 0,13 U/mg de proteína) foi alterado para 9,0. Em valores de pH mais altos, a enzima livre apresentou grande redução na atividade, enquanto as enzimas imobilizadas retiveram uma alta porcentagem de atividade mesmo em pH 10. Dessa forma, em condições alcalinas, os pm-CLEAs foram muito mais ativos que a enzima solúvel em termos absolutos. CUI *et al.* (2016) também relataram comportamento similar para os CLEAs da lipase de pâncreas bovino (acima de 90% de atividade na faixa de pH de 8,0 a 10,0).

Figura 4-5. Perfil de atividade versus pH para LPP livre e imobilizada.

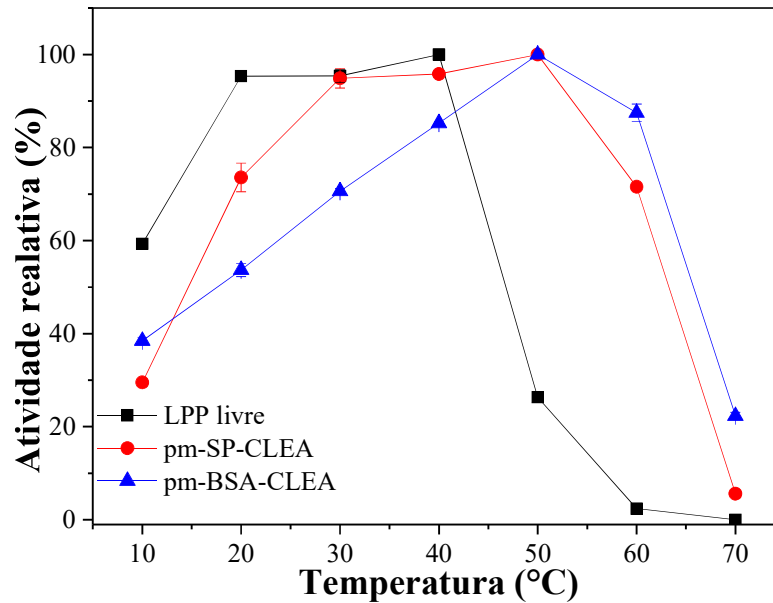


Nota: Condições de preparo dos pm- (PS ou BSA) -CLEAs: tratamento de superfície da LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) em presença de LPP/BSA ou PS/SNMPs em razão mássica de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) por 0,5 h, seguido de tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg de proteína total) por 15 h a 4 °C, agitação de 150 rpm, seguido de tratamento com α -amilase a 25 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 h. Condições dos ensaios para influência do pH: hidrólise de tributirina (concentração de 217,9 mM) a 40 °C e diferentes valores de pH durante 5 min sob agitação de 500 rpm.

A Figura 4-6 mostra o efeito da temperatura sobre a atividade da LPP livre e imobilizada. A temperatura em que há máxima atividade dos CLEAs magnéticos porosos (pm-PS-CLEA e pm-BSA-CLEA) apresentou alteração em relação à LPP livre, sendo deslocada de 40 °C (LPP livre) para cerca de 50 °C, sugerindo que a enzima imobilizada é mais termicamente estável do que a enzima livre em altas temperaturas. A 60 °C, pm-BSA-CLEA e pm-PS-CLEA apresentaram atividades específicas de $28,0 \pm 0,6$ U/mg de proteína e $20,0 \pm 0,8$ U/mg de proteína, respectivamente, enquanto a LPP livre apresentou uma atividade de $2,0 \pm 0,1$ U/mg de proteína. Mais uma vez, nestas condições, a enzima imobilizada foi muito mais ativa do que a enzima livre. As diferenças entre estes dois biocatalisadores aumentaram com o aumento de temperatura, observa-se que a 70 °C, a enzima livre é totalmente inativa, enquanto que o pm-BSA-CLEA reteve mais de 20% de atividade. Estes resultados mostram que o pm-BSA-CLEA apresentou maior estabilidade de sua estrutura sob condições muito drásticas em relação à enzima livre, uma vez que a imobilização produziu forte rigidificação da estrutura enzimática. Assim, o novo biocatalisador apresentou melhor desempenho catalítico em condições drásticas

do que a enzima livre e é um novo exemplo de como a atividade recuperada pode ser alterada dependendo das condições de determinação da atividade (RODRIGUES *et al.*, 2013).

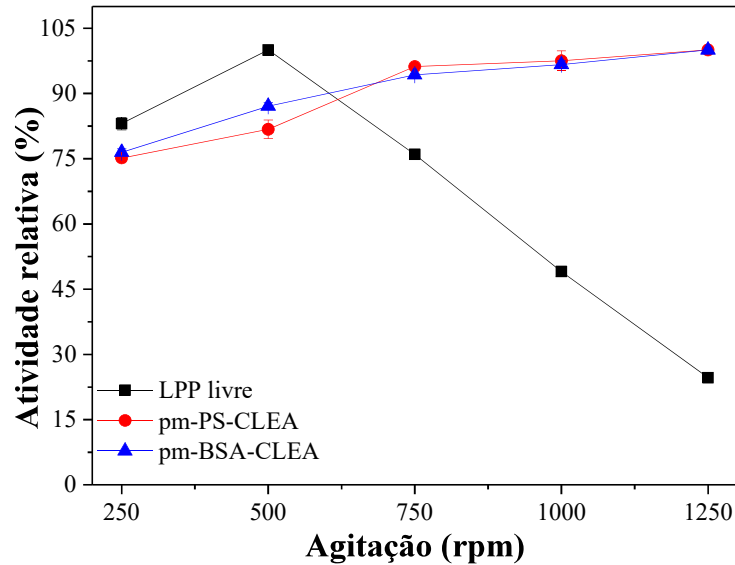
Figura 4-6. Perfil de atividade de LPP em relação a temperatura.



Nota: Condições de preparação dos pm- (BSA ou PS) -CLEAs: tratamento de superfície da LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) em presença de LPP/BSA ou PS/SNMPs em razão mássica de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) por 0,5 h, seguido por tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total) por 15 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm, seguido de hidrólise do amido com α -amilase a 25 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 h. Condições dos ensaios para influência da temperatura: hidrólise da tributirina (concentração de 217,9 mM), pH 8,0, temperatura variando de 10 a 70 °C durante 5 min sob agitação de 500 rpm.

A Figura 4-7 mostra o efeito da velocidade de agitação no comportamento cinético da LPP livre e imobilizada. A LPP livre apresentou atividade catalítica máxima em 500 rpm e, em seguida, a atividade diminuiu, enquanto as atividades dos CLEAs magnéticos porosos aumentaram continuamente dentro do intervalo avaliado. Assim, enquanto a enzima livre é exposta a bolhas de gás e tensão de cisalhamento, e isso produz sua inativação, a enzima imobilizada é protegida dentro da partícula sólida porosa e retém alta atividade catalítica (BARBOSA *et al.*, 2013), e apenas os efeitos positivos da redução da transferência de massa externa são observados.

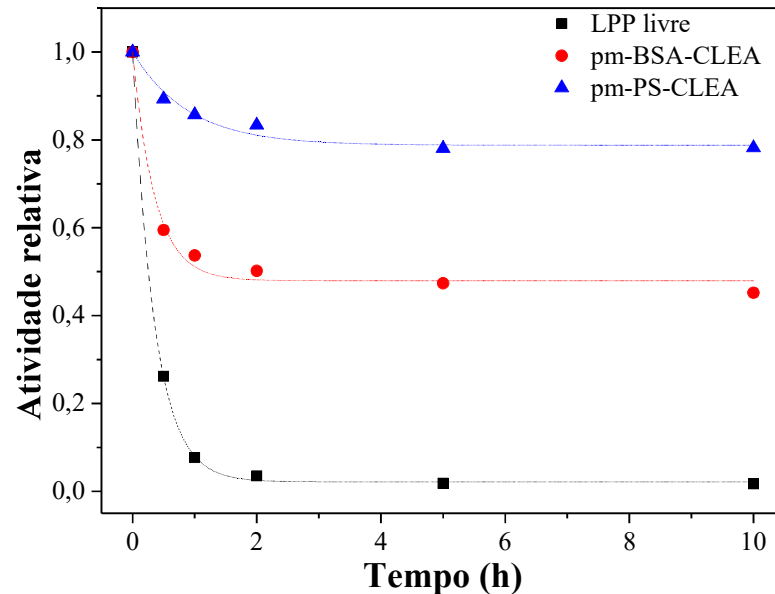
Figura 4-7. Efeito da agitação no desempenho catalítico das LPP livre e imobilizadas.



Nota: Condições de preparação dos pm- (BSA ou PS) -CLEAs: tratamento de superfície da LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) em presença de LPP/BSA ou PS/SNMPs em razão mássica de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) por 0,5 h, seguido por tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total) por 15 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm, seguido de hidrólise do amido com α -amilase a 25 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 h. Condições dos ensaios para influência da agitação: hidrólise da tributirina (concentração de 217,9 mM) a 40 °C e pH 8,0 durante 5 min sob diferentes velocidades de agitação (250, 500, 750, 1000 e 1250 rpm).

A Figura 4-8 mostra o perfil de inativação da LPP livre e imobilizada. Pode-se verificar que o pm-PS-CLEA exibiu alta estabilidade a 40 °C e pH 8,0, retendo cerca de 80% após 10 h de incubação. O pm-BSA-CLEA foi ligeiramente menos estável, mas ainda reteve cerca de 50% da atividade inicial após 10 h de incubação, enquanto a LPP livre foi totalmente inativada após 2 h de incubação. As maiores estabilidades dos CLEAs magnéticos porosos são indicativos de ligações cruzadas covalentes eficientes, estabelecidas na estrutura supramolecular dos CLEAs, tornando mais rígidas as moléculas da enzima e impedindo mudanças tridimensionais distorcíveis em altas temperaturas. Os perfis bifásicos das curvas de inativação sugerem que os CLEAs magnéticos porosos de LPP têm uma fração de moléculas de enzima mais reticuladas e, portanto, mais termicamente estáveis. Provavelmente, esta seja a fração das moléculas de LPP diretamente ligadas à nanopartícula, onde os efeitos de estabilização devem ser maiores devido a maior rigidez da nanopartícula em comparação com uma proteína (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Figura 4-8. Perfil de inativação térmica da LPP livre e imobilizada a 40 °C e pH 8,0 sob agitação de 150 rpm.



Nota: Condições de preparação dos pm- (BSA ou PS) -CLEAs: tratamento de superfície da LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) em presença de LPP/BSA ou PS/SNMPs em razão mássica de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) por 0,5 h, seguido por tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total) por 15 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm, seguido de hidrólise do amido com α -amilase a 25 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 h. Condições do ensaio de inativação térmica: hidrólise da tributirina (217,9 mM) a 40 °C e pH 8,0 durante 5 min sob agitação de 500 rpm.

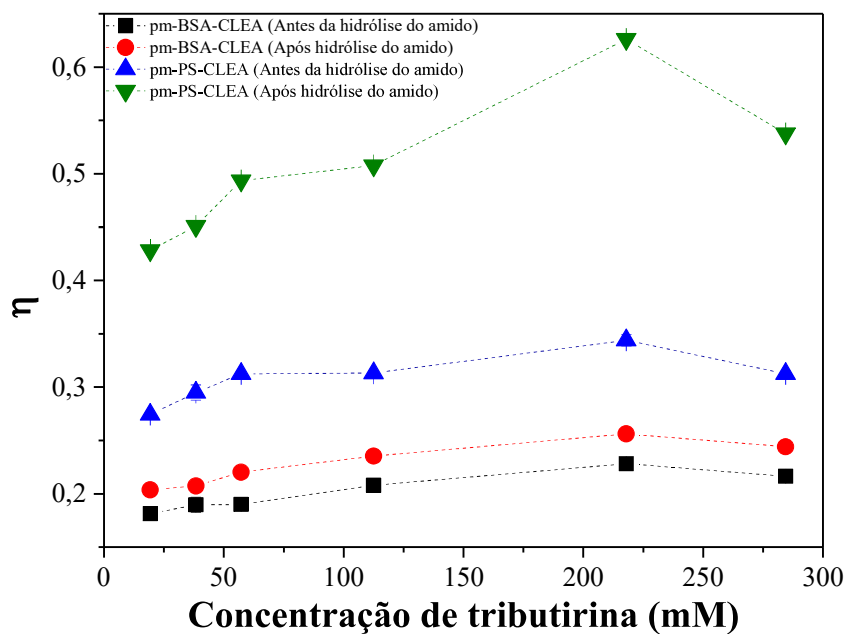
4.6.2. Determinação de fatores de efetividade

CLEAs preparados na presença de amido como agente formador de poros foram avaliados quanto aos seus fatores de efetividade.

A Figura 4-9 mostra a evolução dos fatores de efetividade (η = atividade observada do CLEA/atividade de uma quantidade equivalente de LPP livre) em concentrações crescentes de tributirina. Esses fatores foram muito mais altos após a hidrólise do amido, principalmente para os CLEAs preparados na presença de proteínas de soja e SNMPs, já que a PS levou a formação de agregados com estrutura desordenada e maior números de interstícios na rede devido a presença de uma mistura de proteínas com diferente massa molecular que apresentam variações de hidrofobicidade e hidrofiliidade. As imagens MEV-FEG dos CLEAs antes da hidrólise do amido (Figura 4-10) mostram uma superfície bastante lisa e não porosa, o que pode resultar em sérios problemas de transferência de massa. Por outro lado, imagens de CLEAs após hidrólise de amido mostram superfície não uniforme e porosa devido à remoção das moléculas de amido

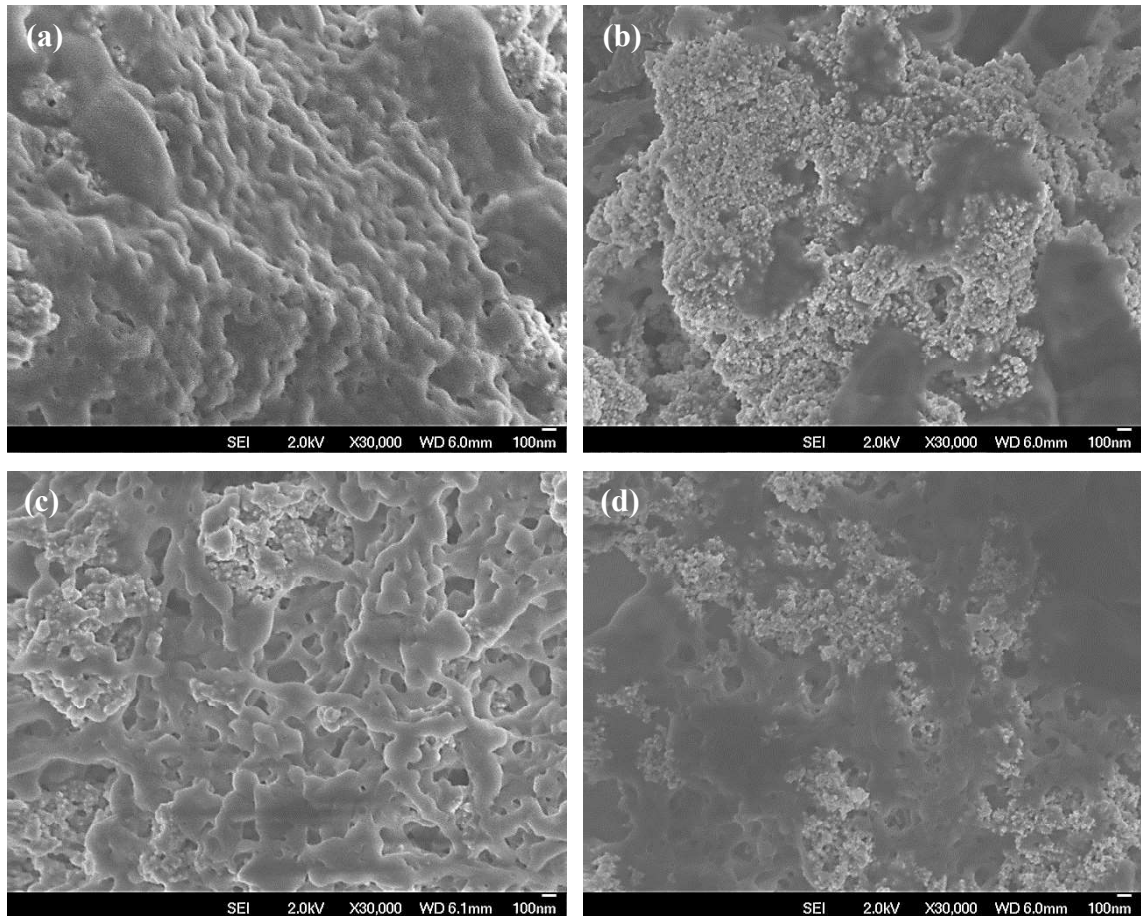
da estrutura do agregado enzimático, o que poderia explicar os fatores de efetividade maiores (em torno de $\eta = 0,65$), principalmente para CLEAs preparados na presença de proteínas de soja e SNMPs. Por outro lado, a LPP coagregada com BSA e SNMPs (pm-BSA-CLEAs) não apresentou aumento significativo na atividade observada, mesmo utilizando o amido como agente produtor de poros. Esses resultados mostraram que a combinação de SNMPs e proteínas de soja como auxiliares na etapa de agregação e amido como agente formador de poros foi uma boa estratégia para reduzir problemas de transferência de massa dentro da estrutura supramolecular do CLEA.

Figura 4-9. Fatores de efetividade (η) para CLEAs de LPP.



Nota: Condições de preparação dos pm- (BSA ou PS) -CLEAs: tratamento de superfície da LPP com dodecil aldeído (relação mássica LPP/dodecil aldeído de 1:1), agregação/precipitação com etanol (relação solução enzimática/volume de etanol de 1:3) em presença de LPP/BSA ou PS/SNMPs em razão mássica de 1:1,5:1,5 e amido (0,8%, m/v) por 0,5 h, seguido por tratamento com glutaraldeído (5 μ moles de glutaraldeído/mg proteína total) por 15 h a 4 °C sob agitação de 150 rpm, seguido de hidrólise do amido com α -amilase a 25 °C sob agitação de 150 rpm durante 2 h. Condições do ensaio de determinação do η : hidrólise da tributirina (19,28; 38,35; 57,2; 112,5; 217,9 e 284,4 mM) a 40 °C e pH 8,0 durante 5 min sob agitação de 500 rpm.

Figura 4-10. Imagens MEV-FEG de pm-CLEAs de lipase de pâncreas de porco coagregadas com (a) SNMPs e albumina de soro bovino (pm-BSA-CLEA), (b) SNMPs e proteínas de soja (pm-PS-CLEA), seguido por tratamento com α -amilase (c e d, respectivamente).

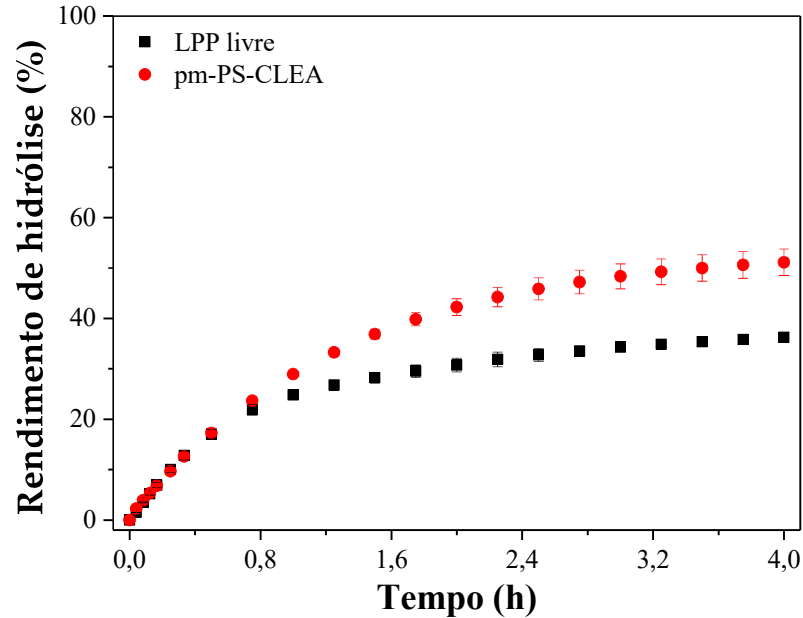


Nota: Todos os CLEAs foram preparados sob as mesmas condições, a única diferença entre ambos foi se o amido (agente formador de poros) não foi hidrolisado (a e b) ou foi hidrolisado (c e d) com α -amilase.

4.7. Avaliação da hidrólise da tributirina e reutilização do biocatalisador

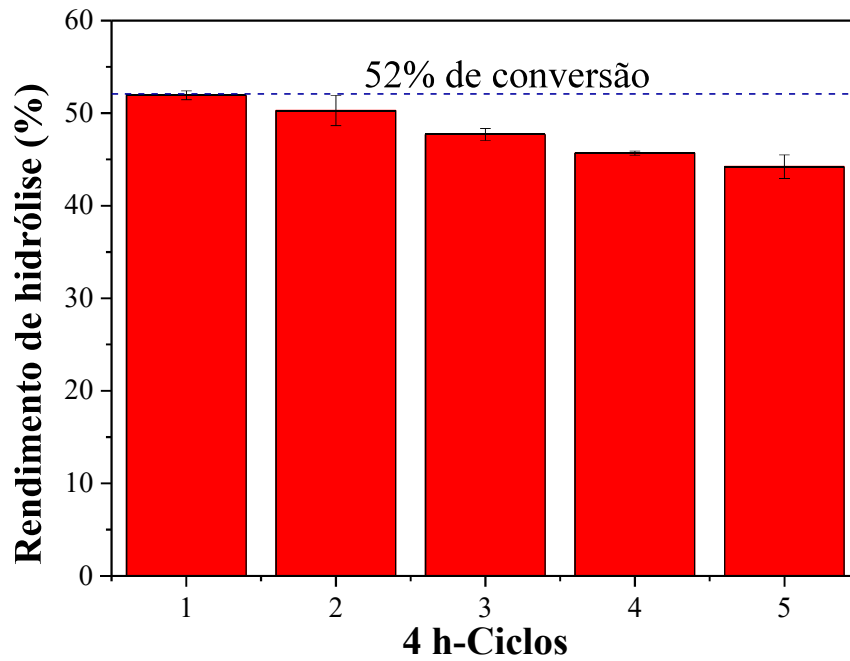
A Figura 4-11 mostra o perfil da reação de hidrólise da tributirina catalisada pela LPP livre e pm-PS-CLEA. A figura mostra como as velocidades instantâneas de hidrólise diminuem rapidamente para a enzima livre, comportamento não verificado para a enzima imobilizada. O rendimento após 4 h de reação foi 36 e 52% usando LPP livre e pm-PS-CLEA, respectivamente. Estes resultados confirmaram a baixa estabilidade da LPP livre em relação à enzima imobilizada.

Figura 4-11. Rendimento da hidrólise de tributirina em função do tempo de reação a 37 °C e pH 7,5, agitação de 500 rpm catalisada pela LPP livre e pm-PS-CLEA (74,22 mM de tributirina e 70 TBU/g de tributirina). O rendimento foi calculado como porcentagem do ácido butírico liberado (em μmol) em relação ao valor teórico total.



A Figura 4-12 mostra que, após cinco bateladas de 4 h, o rendimento de hidrólise da tributirina diminuiu apenas 7% (de 52% para 45%). Além da elevada estabilidade mecânica e operacional, observou-se que a recuperação do pm-PS-CLEA foi facilitada com a separação magnética. Deve-se considerar que a enzima livre foi bastante instável a 40 °C (Figura 4-6), enquanto a enzima imobilizada pode ser reutilizada por cinco ciclos reacionais sem alterações significativas. Além disso, a di- e monobutirina, intermediários da hidrólise, têm alguns efeitos detergentes que aparentemente não têm efeitos muito deletérios na estabilidade da enzima, mesmo a 37 °C (DALAL *et al.*, 2007; HERMOSO *et al.*, 1996; RHIM *et al.*, 1998).

Figura 4-12. Ensaio de reutilização (4h-Ciclos) do pm-PS-CLEA na hidrólise de tributirina (74,22 mM) a 37 °C, pH 7,5 e agitação de 500 rpm. Meio reacional: 6 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,5), 16,5 mL de água destilada, 0,5 mL de tributirina e 70 TBU/g de tributirina.



5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A coagregação da lipase de pâncreas de porco (LPP) com *co-feeders* proteicos (principalmente proteínas de soja) e nanopartículas magnéticas de sílica funcionalizadas com grupos aminos, usando amido como agente formador de poros, produziu CLEAs magnéticos porosos (pm-CLEAs) de LPP com alta retenção de atividade (cerca de 80% de atividade recuperada) e alto fator de efetividade (até 60% da atividade livre equivalente) devido às suas estruturas porosas. Os pm-CLEAs foram altamente estáveis (cerca de 80% da atividade retida após 10 h a 40 °C e pH 8,0) e facilmente separados por um campo magnético externo, evitando a formação de grandes aglomerados convencionalmente observados por separação por centrifugação, o que pode agravar problemas de transferência de massa nas estruturas compactas dos CLEAs. Além disso, os CLEAs magnéticos porosos coagregados com proteínas de soja e nanopartículas magnéticas (pm-PS-CLEAs) apresentaram bom desempenho e reutilização na hidrólise de tributirina para cinco ciclos de 4 h.

Para trabalhos futuros propõe-se:

- Avaliar a utilização de polietilenoimina (PEI) como agente reticulador em substituição ao glutaraldeído;
- Analisar a utilização do PEI como polímero estabilizador da estrutura do pm-CLEA;
- Realizar um estudo sistêmico para avaliar a utilização de bactérias como agente formador de poros durante a precipitação e reticulação da lipase de pâncreas de porco (LPP);
- Utilizar *co-feeders* hidrofóbicos para promover ativação interfacial;
- Realizar um estudo de estabilidade em diferentes solventes orgânicos;
- Aplicar o pm-CLEA em reações de biotransformação em meio orgânico utilizando reator de fluxo em vórtice e reator tipo cesta.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406–6436, 2013.
- AMARAL-FONSECA, M.; KOPP, W.; LIMA, R. De; GIORDANO, C.; FERN, R.; TARDIOLI, P. W. Preparation of magnetic cross-linked amyloglucosidase aggregates: solving some activity problems, **Catalysts**, v. 8, p. 496, 2018.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23–39, 1998.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 27, n. 01, p. 15–29, 2010.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486–493, 1998.
- BBC RESEARCH. Global markets for enzymes in industrial applications: Staff report, 2018. Disponível em: < <https://www.marketresearch.com/BCC-Research-v374/Global-Enzymes-Industrial-Applications-11838491/>>. Acesso em Janeiro de 2019.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 2, p. 133–153, 2000.
- BERGER, M.; SCHNEIDER, P. Lipases in organic solvents: the fatty acid chain length profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 641–645, 1991.
- BOMMARIUS, A. S. Stabilizing biocatalysts. **Chemical Society Reviews**, p. 6534–6565, 2013.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis, **Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73–81, 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.

- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767, 1990.
- BYUN, H.-G.; EOM, T.-K.; JUNG, W.-K.; KIM, S.-K. Lipase catalyzed production of monoacylglycerols by the esterification of fish oil fatty acids with glycerol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 5, p. 491–496, 2007.
- CABALLERO, V.; BAUTISTA, F. M.; CAMPELO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A.; HIDALGO, J. M.; LUQUE, R.; MACARIO, A.; GIORDANO, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 334–342, 2009.
- CAO, L. Carrier-bound immobilized enzymes. **Wiley**, 2006.
- CAO, L.; RANTWIJK, F. Van; SHELDON, R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. **Organic Letters**, v. 2, n. 10, p. 1361–1364, 2000.
- CARO, J.; BOUDOUARD, M.; BONICEL, J.; GUIDONI, A.; DESNUELLE, P.; ROVERY, M. Porcine pancreatic lipase - completion of the primary structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 671, p. 129–138, 1981.
- CASTRO, H. F. De; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Dos; AGUIAR, C. L. De. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, 2015.
- CIPOLATTI, E. P.; PINTO, M. C. C.; ROBERT, J. M.; SILVA, T. P.; BERALTO, T. C.; SANTOS JR, J. G. F.; CASTRO, R. P. V.; FERNANDEZ-LAFLUENTE, R.; MANOEL, E. A.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 46727, p. 1–13, 2018.
- CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 15–28, 2015.
- CUI, J. D.; LIU, R. L.; LI, L. B. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 610–615, 2016.
- CUI, J.; LIN, T.; FENG, Y.; TAN, Z.; JIA, S. Preparation of spherical cross-linked lipase aggregates with improved activity, stability and reusability characteristic in water-in-ionic liquid microemulsion. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, n. 7, p. 1785–1793, 2017.
- DALAL, S.; KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Preparation and characterization of combi-CLEAs

- catalyzing multiple non-cascade reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 3–4, p. 128–132, 2007.
- DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6437–74, 2013.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197–212, 2010.
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 232–237, 2003.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; MARC, J. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 632–644, 2011.
- FUKUSAKI, E.; SATODA, S.; SENDA, S.; OMATA, T. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2,3-epoxy-1-tridecanol and its application to facile synthesis of (+)-disparlure. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 1, p. 3–4, 1999.
- GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.
- GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure / enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 786, p. 1721–1754, 2007.
- GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; MAN, Y. B. C. 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.
- GODFREY, T. Lipases for industrial use. **Lipid Technology**, v. 7, p. 58–61, 1995.
- GOGOI, S.; HAZARIKA, S.; RAO, P. G.; DUTTA, N. N. Esterification of lauric acid with lauryl alcohol using cross-linked enzyme crystals: Solvent effect and kinetic study. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 5, p. 343–351, 2006.
- GUAUQUE TORRES, M. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 36–43, 2014.
- 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, p. 18–23, 2013.
- GUIMARÃES, J.; GIORDANO, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TARDIOLI, P. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine

- pancreas lipase with Magnetic Properties. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2993, 2018.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, 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.; XU, Y.; MA, H.; ZHANG, Q.; EVANS, D. G.; DUAN, X. Effect of surface hydrophobicity / hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p. 780–786, 2006.
- HE, W. Sen; ZHU, H.; CHEN, Z. Y. Plant Sterols: chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 3047–3062, 2018.
- HERMOSO, J.; PIGNOL, D.; KERFELEC, B.; CRENON, I.; CHAPUS, C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. Lipase activation by nonionic detergents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 18007–18016, 1996.
- HILLS, M. J.; KIEWITT, I.; MUKHERJEE, K. D. Cross-linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1042, p. 237–240, 1990.
- ILLANES, A. Enzyme biocatalysis - Principles and applications. **Springer**, 2008.
- JACHMANIA, I.; SCHULTE, E.; MUKHERJEE, K. D. Substrate selectivity in esterification of less common fatty acids catalysed by lipases from different sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 563–567, 1996.
- JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396–403, 1998.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.
- JAMIL, F.; AL-HAJ, L.; AL-MUHTASEB, A. H.; AL-HINAI, M. A.; BAAWAIN, M.; RASHID, U.; AHMAD, M. N. M. Current scenario of catalysts for biodiesel production: a critical review. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 267–297, 2018.
- JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production e a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
- KARTAL, F.; JANSSEN, M. H. A.; HOLLMANN, F.; SHELDON, R. A.; KILINC, A. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 71, n. 3–4, p. 85–89, 2011.

- KHALAF, N.; GOVARDHAN, C. P.; LALONDE, J. J.; PERSICHETTI, R. A.; WANG, Y.; MARGOLIN, A. L. Cross-linked enzyme crystals as highly active catalysts in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 7863, n. 9, p. 5494–5495, 1996.
- KHORSHIDI, K. J.; LENJANNEZHADIAN, H.; JAMALAN, M.; ZEINALI, M. Preparation and characterization of nanomagnetic cross-linked cellulase aggregates for cellulose bioconversion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 539–546, 2016.
- KIM, M. H.; PARK, S.; KIM, Y. H.; WON, K.; LEE, S. H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 209–214, 2013.
- KOPP, W.; DA COSTA, T. P.; PEREIRA, S. C.; JAFELICCI JR, M.; GIORDANO, R. C.; MARQUES, R. F. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 38–46, 2014.
- KRISHNA, S. H.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. **Tetrahedron**, v. 13, p. 2693–2696, 2002.
- KUMAR, V. V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates — Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. **Science of The Total Environment**, v. 487, p. 830–839, 2014.
- LADNER, W. E.; WHITESIDES, G. M. Lipase-catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols'. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 14, p. 7250–7251, 1984.
- LANFRANCHI, A. E.; GRILL, B.; RAGHOEBAR, Z.; VAN, S.; SHELDON, R.; STEINER, K.; GLIEDER, A. Production of hydroxynitrile lyase from *D. tyermanii* (DtHNL) in *Komagataella phaffii* and its immobilization as CLEA to generate a robust biocatalyst. **ChemBioChem**, v. 19, p. 312–316, 2017.
- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; ALONSO, N.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: a simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1839–1842, 2005.
- LOWE, M. E. Molecular mechanisms of rat and human pancreatic. **American Society for Nutritional Sciences**, n. March, p. 549–557, 1996.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Biotechnology and genetic engineering reviews present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–217, 1985.
- MADHAVAN, A.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioresource technology strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1304–1313, 2017.
- MAFRA, A. C. O.; KOPP, W.; BELTRAME, M. B.; GIORDANO, R. L. C.; RIBEIRO, M. P.

- A.; TARDIOLI, P. W.; DE LIMA CAMARGO GIORDANO, R.; ARRUDA RIBEIRO, M. P.; TARDIOLI, P. W. Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 107–116, 2016.
- MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, 2015.
- MARTINEK, K.; MOZHAEV, V. V. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. **Advances in Enzymology**, v. 57, p. 179-249, 1987.
- MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 145–155, 2001.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. D. L. C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 160–167, 2013.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.
- MIGNEAULT, I.; DARTIGUENAVE, C.; BERTRAND, M. J.; WALDRON, K. C. Glutaraldehyde : behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, **BioTechniques**, v. 37, n. 5, 2004.
- MILED, N.; BEISSON, F.; CARO, J.; CARO, A.; ARONDEL, V.; VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4, p. 165–171, 2001.
- MIURA, T.; UMETSU, S.; KANAMORI, D.; TSUYAMA, N.; JYO, Y.; KAWASHIMA, Y.; KOYATA, N.; MURAKAMI, Y.; IMAI, N. Convenient synthesis of Z-monoacetates of 2-alkylidene-1,3-propanediols. **Tetrahedron**, v. 64, p. 9305–9308, 2008.
- O'HAGAN, D.; ZALDI, N. A. The resolution of tertiary α -acetylene- acetate esters by the lipase from *Candida cylindracea*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 5, n. 6, p. 1111–1118, 1994.
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the

- open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 279–286, 2002.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119–131, 1999.
- PASSARELLA, D.; ANGOLI, M.; GIARDINI, A.; LESMA, G.; SILVANI, A.; DANIELI, B. Concise total synthesis of (±)-aloperine and 6-epi-aloperine. **Organic Letters**, v. 4, n. 17, p. 2925–2928, 2002.
- PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, p. 971–982, 2011.
- PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281–288, 2007.
- PEIRCE, S.; RUSSO, M. E.; ISTICATO, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO₂ capture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 127, p. 188–195, 2017.
- PRASAD, S.; ROY, I. Converting enzymes into tools of industrial importance. **Recent Patents on Biotechnology**, p. 33–56, 2018.
- RAMOS, M. D.; MIRANDA, L. P.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; KOPP, W.; TARDIOLI, P. W. 1,3-Regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 4, p. 910–920, 2018.
- RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, 2015.
- RANGHEARD, M.; LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media : a simI le test for the determination of lipase fatty acid specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1004, p. 20–28, 1989.
- RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, p. 33–37, 2012.
- RHIM, J.-W.; GENNADIOSB, A.; WELLERC, C. L.; CEZEIRATD, C.; HANNA, M. A. Soy protein isolate–dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v. 8, n. 3, p. 195–203, 1998.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. De; ALICE, M.; COELHO, Z.; GUIMAR, D. M. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.
- RICHARDS, F. M.; KNOWLES, J. R. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent.

Journal of Molecular Biology, v. 37, p. 1968, 1968.

- RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; LIMA, M. L. B.; FREIRE, D. M. G.; DA SILVA, I. J.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; DE SANT'ANA, H. B.; MACEDO, A. C.; GONÇALVES, L. R. B. Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 129, p. 12–24, 2018.
- RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.
- SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C. De; ARAÚJO, P. H. H. De; OLIVEIRA, D. De. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 95–105, 2017.
- SAMOYLOVA, Y. V.; SOROKINA, K. N.; PILIGAEV, A. V.; PARMON, V. N. Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus thermosphaericus* esterase for application in malathion removal from wastewater. **Catalysts**, v. 8, n. 4, p. 1–19, 2018.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513–521, 1958.
- SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases : Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.
- SCHOEVAART, R.; WOLBERS, M. W.; GOLUBOVIC, M.; OTTENS, M.; KIEBOOM, A. P. G.; RANTWIJK, F. Van; WIELEN, L. A. M. Van Der; SHELDON, R. A. Preparation, optimization, and structures of cross-Linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 754–762, 2004.
- SEGURA, R. L.; BETANCOR, L.; PALOMO, J. M.; HIDALGO, A.; FERN, G.; TERRENI, M.; CORT, A.; FERN, R.; GUI, J. M. Purification and identification of different lipases contained in PPL commercial extracts: A minor contaminant is the main responsible of most esterase activity purification and identification of different lipases contained in PPL commercial extracts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 817–823, 2017.
- SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**, v. 351, p. 207–213, 2006.
- 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. Cross-Linked Enzyme Aggregates as industrial biocatalysts abstract : **Organic Process Research & Development**, v. 213, n. 1, p. 213–223, 2011.

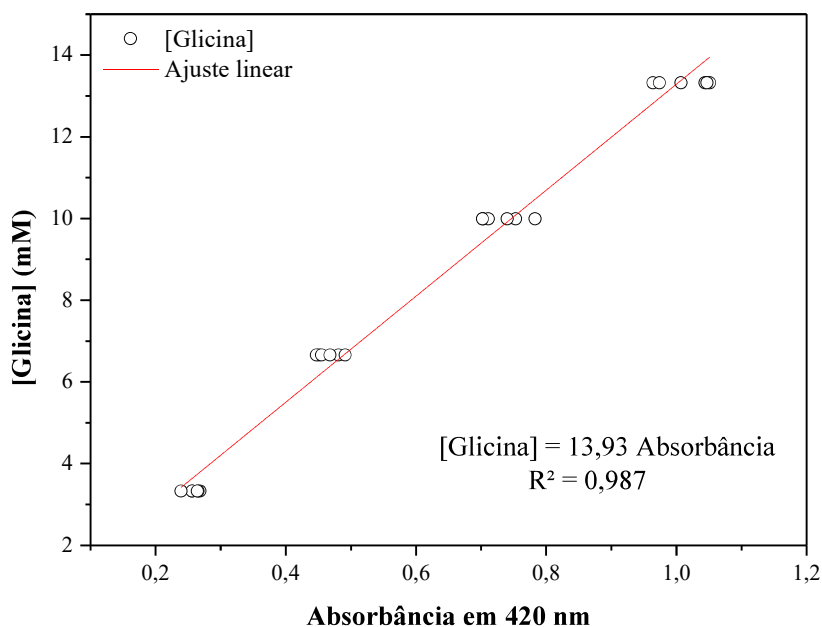
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SILVEIRA, E. A.; MORENO-PEREZ, S.; BASSO, A.; SERBAN, S.; PESTANA-MAMEDE, R.; TARDIOLI, P. W.; SANCHEZ-FARINAS, C.; CASTEJON, N.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ROCHA-MARTIN, J.; GUI SAN, J. M. Biocatalyst engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems. **Journal of Biotechnology**, v. 289, p. 126–134, 2019.
- SNYDER, S. L.; SOBOCINSKI, P. Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. **Analytical Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 284–288, 1975.
- STERGIOU, P.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**. 2013.
- TALEKAR, S.; JOSHI, A.; JOSHI, G.; KAMAT, P.; HARIPURKAR, R.; KAMBALE, S. Parameters in preparation and characterization of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**. v. 3, p. 12485–12511, 2013.
- TALEKAR, S.; SHAH, V.; PATIL, S.; NIMBALKAR, M. Porous crosslinked enzyme aggregates (p-CLEAs) of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 8, p. 1575–1579, 2012.
- UHLIG, H. Industrial enzymes and their applications. New York: John Wiley & Sons; 1998.
- VAN TILBEURGH, H.; EGLOFF, M. P.; MARTINEZ, C.; RUGANI, N.; VERGER, R.; CABBILLAU, C. ©1993 Nature Publishing Group. **Nature**, v. 362, p. 814–820, 1993.
- VELASCO-LOZANO, S.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; GUI SÁN, J. M.; FAVELA-TORRES, E. Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 1896–1903, 2014.
- VERGER, R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.
- VESCOVI, V.; GIORDANO, R. L. C.; MENDES, A. A.; TARDIOLI, P. W. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 212, 2017.
- VESCOVI, V.; JIMENEZ, M.; ANDERSON, R.; JR, B.; CARRERO, D.; AUGUSTO, F.; SANTANA, M.; PIVA, J.; MARIANA, C.; MACHADO, S.; KASUYOSHI, V.; LIMA, R. De; GIORDANO, C.; TARDIOLI, P. W. Lipase - catalyzed production of biodiesel by hydrolysis of waste cooking oil followed by esterification of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 1615–1624, 2016.
- VESCOVI, V.; SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

- VULFSON, E. N. Lipases: their structure, biochemistry and application; Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, 1994, p. 271.
- WANG, M.; JIA, C.; QI, W.; YU, Q.; PENG, X.; SU, R.; HE, Z. Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3541–3545, 2011.
- WANG, Y.; REN, H.; ZHAO, H. Expanding the boundary of biocatalysis: design and optimization of *in vitro* tandem catalytic reactions for biochemical production. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, p. 1–15, 2018.
- WILSON, L.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ILLANES, A.; GUISÁN, J. M.; PALOMO, J. M. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 750–755, 2006.
- WILSON, L.; ILLANES, A.; PESSELA, B. C. C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 558–562, 2004.
- WINGARD, L. B. (1972) Enzyme Engineering, Interscience Publishers, New York.
- XAVIER MALCATA, F.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 12, p. 890–910, 1990.
- XUE, R.; WOODLEY, J. M. Bioresource Technology Process technology for multi-enzymatic reaction systems. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 183–195, 2012.
- YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M.; MAEDA, H. Poly-lysine supported cross-linked enzyme aggregates with efficient enzymatic activity and high operational stability. **Catalysis Science & Technology**, p. 1256–1261, 2011.
- YEO, S.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp. YY62 which hydrolyzes t-butyl esters effectively. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 44, p. 147–152, 1998.
- ZHEN, Q.; WANG, M.; QI, W.; SU, R.; HE, Z. Preparation of b-mannanase CLEAs using macromolecular cross-linkers Qiannan. **Catalysis Science & Technology**, v. 3, p. 1937–1941, 2013.
- ZHENG, C.; WANG, J.; LI, X.; LIU, B.; WU, Q.; LIN, X. Regioselective synthesis of amphiphilic metoprolol – saccharide conjugates by enzymatic strategy in organic media. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 123–127, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva padrão da absorvância vs. concentração de grupos aminos



Figura A1. Curva padrão “absorvância vs. concentração de grupos aminos” usando glicina como aminoácido padrão. Condições do ensaio: soluções de TNBS 0,01% (v/v) contendo glicina (0,25; 0,5; 0,75; e 1,00 mg mL⁻¹) foram preparadas em tampão borato de sódio 100 mM, pH 9,0 e incubadas a 25°C por 30 min. Em seguida, a absorvância foi medida em 420 nm. A concentração de grupos aminos foi determinada pela relação estequiométrica de glicina e grupos aminos presentes neste aminoácido.



APÊNDICE B – Artigo previamente publicado: GUIMARÃES, J.; GIORDANO, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TARDIOLI, P. Evaluation of Strategies to Produce Highly Porous Cross-Linked Aggregates of Porcine Pancreas Lipase with Magnetic Properties. *Molecules*, v. 23, n. 11, p. 2993, 2018.

Article

Evaluation of Strategies to Produce Highly Porous Cross-Linked Aggregates of Porcine Pancreas Lipase with Magnetic Properties

José Renato Guimarães¹, Raquel de Lima Camargo Giordano¹,
Roberto Fernandez-Lafuente^{2,*}  and Paulo Waldir Tardioli^{1,*} 

¹ Graduate Program in Chemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, SP-310, São Carlos 13565-905, Brazil; renatoge74@gmail.com (J.R.G.); raquel@ufscar.br (R.d.L.C.G.)

² Departamento de Biocatálisis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC Madrid, 28049 Madrid, Spain

* Correspondence: rfl@icp.csic.es (R.F.-L.); pwtardioli@ufscar.br (P.W.T.);
Tel.: +34-915-954-941 (R.F.-L.); +55-16-335-193-62 (P.W.T.)

Received: 7 November 2018; Accepted: 14 November 2018; Published: 16 November 2018



Abstract: The preparation of highly porous magnetic crosslinked aggregates (pm-CLEA) of porcine pancreas lipase (PPL) is reported. Some strategies to improve the volumetric activity of the immobilized biocatalyst were evaluated, such as treatment of PPL with enzyme surface-modifying agents (polyethyleneimine or dodecyl aldehyde), co-aggregation with protein co-feeders (bovine serum albumin and/or soy protein), use of silica magnetic nanoparticles functionalized with amino groups (SMNPs) as separation aid, and starch as pore-making agent. The combination of enzyme surface modification with dodecyl aldehyde, co-aggregation with SMNPs and soy protein, in the presence of 0.8% starch (followed by hydrolysis of the starch with α -amylase), yielded CLEAs expressing high activity (immobilization yield around 100% and recovered activity around 80%), high effectiveness factor (approximately 65% of the equivalent free enzyme activity) and high stability at 40 °C and pH 8.0, i.e., PPL CLEAs co-aggregated with SMNPs/bovine serum albumin or SMNPs/soy protein retained 80% and 50% activity after 10 h incubation, respectively, while free PPL was fully inactivated after 2 h. Besides, highly porous magnetic CLEAs co-aggregated with soy protein and magnetic nanoparticles (pm-SP-CLEAs) showed good performance and reusability in the hydrolysis of tributyrin for five 4h-batches.

Keywords: silica magnetic nanoparticles; bovine serum albumin; soy protein; starch; protein surface modifiers

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) are enzymes whose natural function is the hydrolysis of triglycerides at the water-lipid interface releasing free fatty acids, diglycerides, monoglycerides and glycerol [1–4]. However, in vitro, they are also able to catalyze esterification and transesterification reactions (acidolysis, alcoholysis and interesterification) in organic media (with restricted water content) [1–5]. This wide lipase specificity, added to their excellent chemo-, regio- and enantioselectivities and/or specificities, have been exploited for several important biotechnological applications in the pharmaceutical, food and agrochemical industries [6–12]. Among lipases, porcine pancreas lipase (PPL) is widely used in biotransformation reactions in organic media for several industrial applications because of its high selectivity, high solvent tolerance, high catalytic activity, and thermal stability at high temperatures under low water concentrations [8,13–16].

However, the use of enzymes in their soluble form for large-scale industrial processes is not very attractive, because of their high production cost and low operational stability [17]. A strategy that has been widely exploited to overcome these drawbacks is their immobilization on solid supports, which, if properly performed, can provide several advantages from an industrial point of view, such as enabling continuous and batch processing, improved stability compared to the free enzyme, increased volumetric activity, easy recovery from product stream, and reuse for several cycles [17–22].

There are a great number of techniques and supports suitable for enzyme immobilization. In general, some criteria are followed in their choice regarding to high activity of the immobilized enzyme, high stability against temperature and organic solvents, low cost of immobilization, and low toxicity of the immobilization reagents and supports [17,18,23–25].

In the case of lipases, a popular technique that has been widely reported is their immobilization by hydrophobic adsorption on highly hydrophobic surfaces [26–32]. This is because the lipases have a peculiar mechanism, called interfacial activation, a phenomenon that allows the enzyme to exist in two forms in equilibrium: a closed form, in which a lid (polypeptide chain) covers the enzyme active site, and an open form, in which the lid is moved away allowing the lipase to adsorb to hydrophobic surfaces (e.g., drops of oils, air bubbles, etc.) [33–36] and turning the active site accessible to the substrate [36]. The immobilization on these supports involves and stabilizes the open form of the lipase [37]. Despite the excellent results of this immobilization approach, the use of pre-existing supports increases the final cost of the biocatalyst. Saving biocatalyst cost can be an interesting approach to turn the applied utilization of immobilized lipases still more attractive. In this sense, Sheldon has reported a free-carrier technique for immobilizing enzymes, the crosslinked enzyme aggregates (CLEA) [38]. It allows using non-purified enzyme or even co-immobilizing different enzymes [38,39]. However, it also presents some problems, such as low operational mechanical resistance of the biocatalyst, difficulty of particle recovery, and high intra-particle diffusion limitations [20,40].

The immobilization of enzymes as CLEAs is a simple technique. In a first step, the enzyme is aggregated and precipitated by a precipitant (salts, water-miscible organic solvents, non-ionic polymers, etc.), and in a second step the aggregates are crosslinked with bifunctional (e.g., glutaraldehyde) or multifunctional (e.g., polyaldehyde dextran) agents usually via the amino groups on the enzyme surface [12,41–44]. When the enzyme surface has a low content of amino groups, co-feeders are commonly used to aid the crosslinking, such as proteins (bovine serum albumin, soy protein, etc.) [15,45–49], polyethyleneimine [50,51], and so on. CLEAs of several enzymes have been reported [12,15,47,52–55], including bovine and porcine pancreas lipases. Cui et al. [56] reported the co-aggregation of bovine pancreas lipase with bovine serum albumin (BSA, 0.05 g L⁻¹) as co-feeder, followed by crosslinking with 1% *w/w* glutaraldehyde, reaching 75% catalytic retention. Ramos et al. [15] reported the immobilization of porcine pancreas lipase as CLEAs using ethanol as precipitant (enzyme solution: ethanol volume ratio of 1:3), soy protein as co-feeder (enzyme protein:co-feeder mass ratio of 1:3), and glutaraldehyde as cross-linker (5 μmol of glutaraldehyde groups/mg total protein). These conditions allowed reaching an immobilization yield around 60% and an activity recovery of around 40%.

An important drawback to be considered in the use of CLEAs is the mass transfer limitation within their highly compact supramolecular structure [56]. Some works have reported some modifications of the original method aiming to reduce intra-particle mass transfer limitations, such as the use of starch as pore-making agent. Wang et al. [57] developed a new strategy for the preparation of porous CLEAs (p-CLEAs), which involves co-precipitation of the enzyme with starch and further crosslinking, followed by hydrolysis of the polysaccharide from the aggregate structure by α-amylase. The authors reported that p-CLEAs of papain prepared in this way had larger pore sizes (enabling to reduce mass transport limitation) and large surface compared to the conventional CLEAs. Besides that, p-CLEAs of papain prepared with protein feeders (ovalbumin and BSA) and starch (0.3–0.4%, *w/v*) yielded 100% catalytic potential, demonstrating the feasibility of this CLEA preparation method. Recently, Cui et al. [58] reported a new procedure to prepare CLEAs of pancreas lipases in hydrophobic ionic

liquid microemulsion aiming to reduce diffusion problems within the CLEA structures. Under optimized conditions, the authors reported the preparation of spherical structures with good dispersity and greater recovery activity (84.6%) compared to the amorphous structure of conventional CLEAs (52.8%).

Other problem of CLEAs is the difficulty of their handling [20], problem that may be solved co-aggregating enzymes and magnetic nanoparticles to produce a magnetic CLEA [59–62]. This may have also other positive effects on the CLEA (porosity, stability) but involve the use of a “support”.

In this context, this work evaluated some strategies to prepare porous magnetic CLEAs of PPL, aiming to produce biocatalysts with decreased mass transfer limitation, ease of recovery without separation by centrifugation, and increased thermal and mechanical stabilities. A set of experiments was carried out to choose the protein co-feeders, mass ratio between magnetic nanoparticles and protein co-feeder, concentration of starch as pore making agent, and modification of the enzyme surface using polyethyleneimine or hydrophobic polyaldehydes. For the best PPL CLEAs, their activities and thermal stabilities, performance in the tributyrin hydrolysis, and reusability were characterized.

2. Results and Discussion

2.1. Influence of Co-Feeders in the Preparation of CLEAs

Bovine serum albumin (BSA) and soy protein (SP) were evaluated as co-feeders, and silica magnetic nanoparticles functionalized with amino groups (SMNPs) were employed to produce magnetic CLEAs. Table 1 shows that when using protein co-feeders (BSA or SP), the recovered activities of CLEAs were around 6.5 and 15.7 times higher than when prepared without any co-feeder. Although the co-feeders allowed the preparation of more active CLEAs, the immobilization yield in the presence of SP was reduced from around 65% to 51%, while in the presence of BSA the immobilization yield was increased from around 65% to 94%.

CLEAs prepared with SMMPs also showed an increase in the recovered activity (8.4 times), with no significant decrease in the immobilization yield (from 65% to 63%). However, a combination of protein co-feeders and SMNPs (mass ratio of 1:1) showed to be the best strategy, particularly in the case of BSA/SMMPs, which yielded CLEAs with immobilization yield around 70% and recovered activity of 25.43% (around 17 times higher than that in the absence of co-feeders (where recovered activity was only 1.46%)). Besides the improvement in the recovered activity, these CLEAs have magnetic properties, which allow their easy recovery applying an external magnetic field (Figure 1).

Table 1. Evaluation of the addition of silica magnetic animated nanoparticles (SMNPs) and different protein co-feeders in the preparation of CLEAs of porcine pancreas lipase (PPL). The values are expressed as average of triplicates \pm standard deviation (σ).

CLEAs of PPL	RA ^a $\pm \sigma$ (%)	IY ^b $\pm \sigma$ (%)	GY ^c $\pm \sigma$ (%)
PPL CLEA ^d	1.46 \pm 0.08	65.25 \pm 3.52	0.93 \pm 0.003
PPL BSA-CLEA ^e	9.40 \pm 0.11	93.69 \pm 1.50	9.45 \pm 0.39
PPL SP-CLEA ^f	22.81 \pm 1.16	51.42 \pm 0.35	10.72 \pm 0.34
PPL SMNPs-CLEA ^g	12.27 \pm 0.77	63.04 \pm 2.43	7.72 \pm 0.24
PPL BSA-SMNPs-CLEA ^h	25.43 \pm 0.21	69.69 \pm 1.2	20.30 \pm 0.52
PPL SP-SMNPs-CLEA ⁱ	32.84 \pm 1.76	45.25 \pm 1.07	16.40 \pm 1.12

^a Recovered activity; ^b Immobilization yield; ^c Global yield; CLEA prepared ^d without co-feeders and with: ^e Bovine serum albumin (BSA); ^f Soy protein (SP); ^g Silica magnetic nanoparticles (SMNPs); ^h BSA/SMNPs mass ratio of 1:1; ⁱ SP/SMNPs mass ratio of 1:1. Assay conditions: precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) and co-aggregation without and with co-feeders (enzyme protein/co-feeder mass ratio of 1:3) for 30 min, followed by crosslinking with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 2.5 h at 4 °C under 150 rpm stirring.

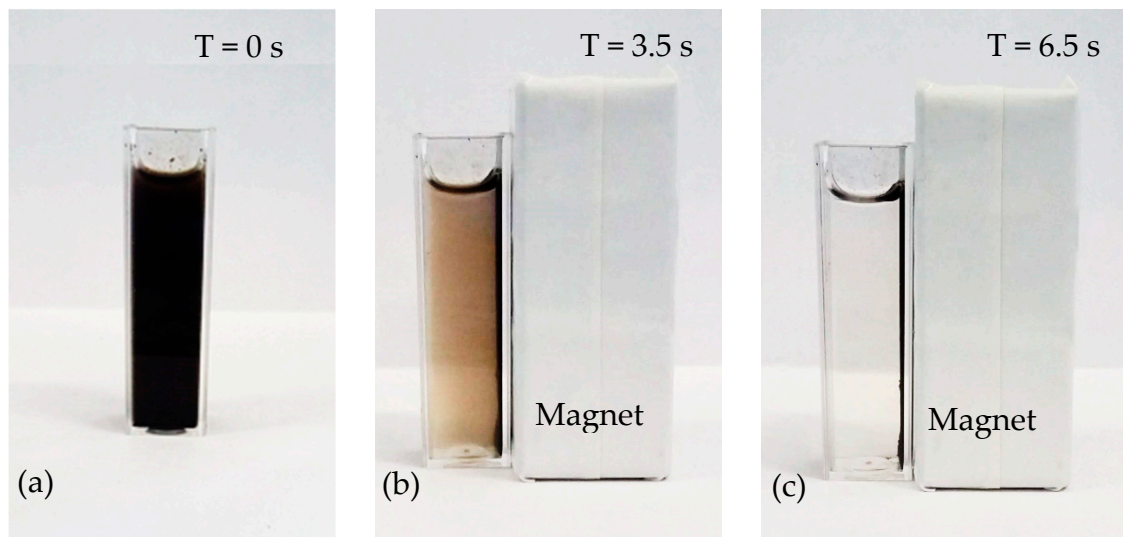


Figure 1. Images of magnetic CLEA separation by applying an external magnetic field: (a) CLEA suspension, (b) magnetic field capturing the CLEA, and (c) CLEA separated from the suspension.

Several studies have showed that CLEAs co-aggregated with protein co-feeders (BSA or SP) exhibit better performance regarding to enzyme leaching during washing steps and reduced mass transfer limitations during the reaction, mainly using macromolecular substrates [15,45,54,63]. These better performances are related to the surface amino groups from lysine residues present in the structure of these protein co-feeders, aiding the establishment of covalent bonds between the enzyme and the feeder forming the CLEA matrix, thus reducing enzyme leaching [45,53,63,64]. It is noteworthy that SMNPs also provided to the CLEAs these improvements, since they are functionalized with primary amino groups derived from the functionalization reagent (3-aminopropyltriethoxysilane). Besides, the use of co-feeders can reduce or avoid diffusion problems by diluting the active enzyme, increasing the recovered activity [47].

As the combination of BSA and SMNPs (mass ratio of 1:1 to a total enzyme/BSA + SMNPs mass ratio of 1:3) did provide better results in terms of recovered activity and immobilization yield, other BSA/SMNPs mass ratios were also evaluated. Figure 2 shows that combinations of BSA/SMNPs with mass ratios of 1:3 and 3:1 yielded immobilization yields close to 100%; but decreasing the recovered activities below 10%. Perhaps the very rigid nanoparticles have a more negative effect on enzyme conformation when reacting with the enzyme, or their multifunctionality produced a somehow closer CLEA structure. PPL is a single polypeptide chain (~50 kDa) divided into two domains with specific functions (Figure 3). The *N*-terminal domain (residues from 1 to 336) contains the catalytic triad (Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷, and His²⁶⁴), and the *C*-terminal domain (residues from 337 to 449) is involved in the colipase binding, a small protein (~10 kDa) which anchors the lipase to the water-lipid interface [65]. This lipase presents an intrinsic flexibility in the relative position of their *N*- and *C*-terminal domains (a small rotation around residues 334–335). This property of the *N*-terminal domain to move independently from the lid (Cys²³⁸–Cys²⁶² segment), colipase, and the *C*-terminal domain may have functional implications as the lipase molecule binds the water-lipid interface [65]. Besides, the lid and the loop comprising residues 77–86 (both critical to the lipase activation—opening the lid) contain a Lys residue (Lys²⁴⁰ and Lys⁸¹, respectively). The involvement of these Lys residues in covalent links with glutaraldehyde may negatively affect the enzyme activity.

Thus, the mass ratios enzyme/(BSA + SMNPs) of 1:3 and BSA/SMNPs of 1:1 were chosen for further set of experiments.

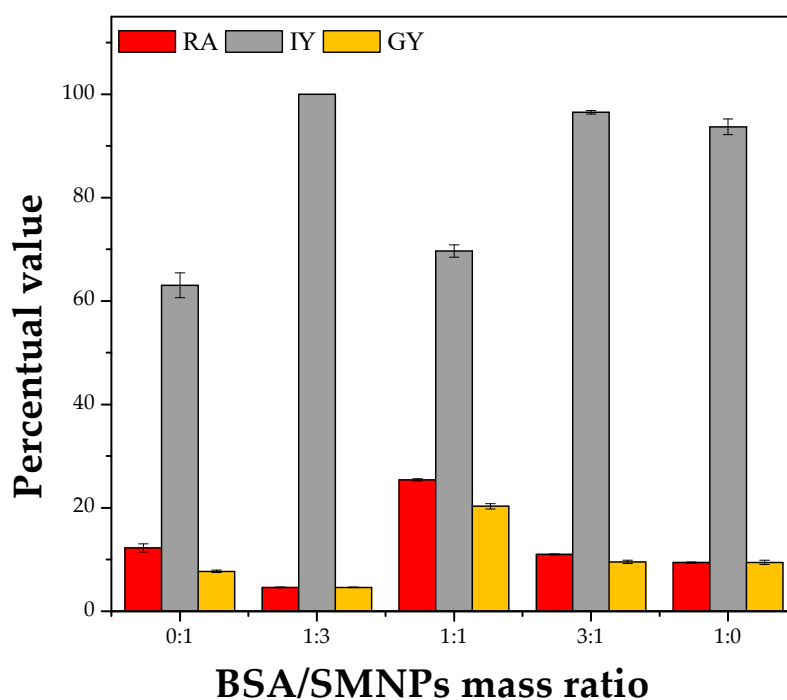


Figure 2. Effect of the BSA/SMNPs mass ratio on the immobilization parameters (RA—recovered activity, IY—immobilization yield, and GY—global yield) of porcine pancreas lipase (PPL) as CLEAs. Assay conditions: precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3), co-aggregation with additives (enzyme/total additives mass ratio of 1:3), crosslinking with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein), temperature of 4 $^{\circ}$ C, 30 min precipitation/aggregation and 2.5 h crosslinking under 150 rpm stirring.

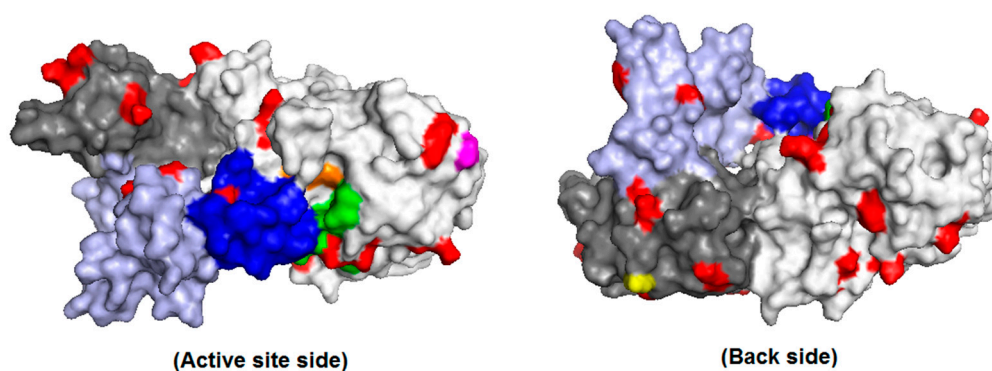


Figure 3. Three-dimensional structure of porcine pancreas lipase-colipase complex made with the program PyMol (The PyMol Molecular Graphics System; Version 2.1.0; Schrödinger, LLC). The complex (only chains A and B) is shown as surface mode from PDB structure (access code 1ETH). Chains A (N-terminal domain in light gray and C-terminal domain in dark gray) and B (colipase in light blue) are shown, and amino acid residues are highlighted in red (Lys), orange (Ser¹⁵³, Asp¹⁷⁷, and His²⁶⁴ catalytic triad), magenta (N-terminal), yellow (C-terminal), blue (lid-Cys²³⁸-Cys²⁶² segment), and green (loop—residues 77–88).

2.2. Treatment of PPL Surface

The modification of the PPL surface with polyethyleneimine (PEI) and dodecyl aldehyde did lead to a loss of around 30% of the activity, where the specific activities (U/mg protein) were 27.54 ± 0.67 , 19.44 ± 0.53 and 19.63 ± 0.18 , for the unmodified enzyme, PEI or aldehyde treated enzyme, respectively. Table S1 in the Supplementary Materials shows that the modification reduces by approximately 30% the color obtained using TNBS titration. This means that around 344 μ mol amino groups/g protein

have been modified after this treatment. The surface of PPL is rich in primary amino groups (Figure 3). The chain A (N- and C-terminal domains) has 22 Lys residues and the amino terminal, while chain B (colipase) has 4 Lys residues (both number of Lys residues was obtained from the primary sequence of the lipase-colipase complex—PDB code 1ETH). Thus, particularly the low modification of amino groups by dodecyl aldehyde does not compromise the crosslinking of the enzyme with glutaraldehyde in the CLEA preparation because of the free primary amino groups still available in the enzyme surface. Despite that, the modified lipases were more stable than the non-modified LPP (Figure 4). Particularly, the PPL treated with dodecyl aldehyde showed much greater stability than the non-modified enzyme (residual activities after 5 h incubation at 40 °C and pH 8 (100 mM phosphate buffer) around 57% and 4%, respectively). This modification is under study in our research group.

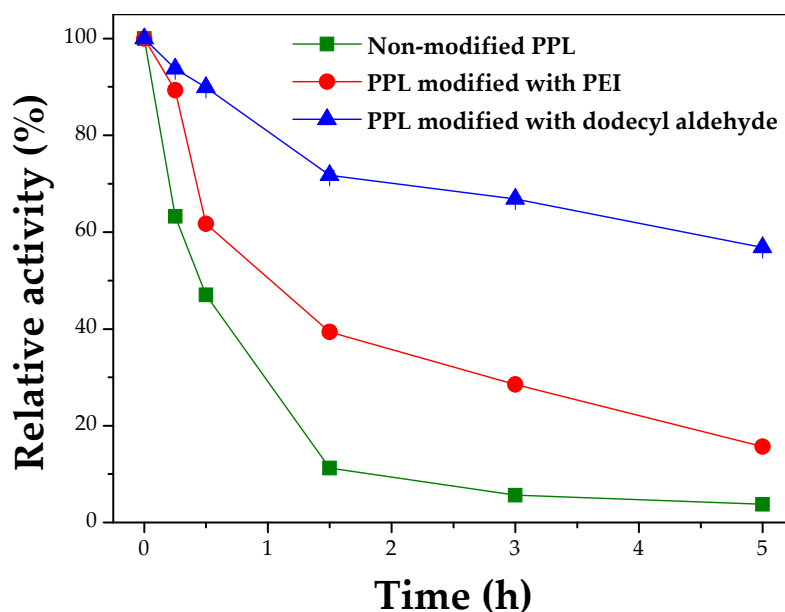


Figure 4. Thermal inactivation of free PPL non-modified and modified with polyethyleneimine (PEI) and dodecyl aldehyde. Assay conditions: 40 °C and pH 8.0 (100 mM phosphate buffer) and enzyme solutions containing 5 mg protein/mL.

Table 2 shows the effect of the treatment of the PPL surface with polyethyleneimine (PEI) and dodecyl aldehyde on the immobilization yield and recovered activity. All treatments allowed 100% immobilization yield, but the recovered activity of the biocatalysts did not show any improvement related to the CLEAs prepared with PPL without any treatment.

Table 2. Evaluation of the treatment of porcine pancreas lipase (PPL) with polyethyleneimine (PEI) and dodecyl aldehyde on the immobilization parameters IY (immobilization yield) and RA (recovered activity). The values are expressed as mean of triplicates \pm standard deviation (σ).

PPL Treatment with	RA \pm σ (%)	IY \pm σ (%)
PEI	7.17 \pm 0.32	99.50 \pm 1.00
Dodecyl aldehyde	20.08 \pm 0.72	99.00 \pm 2.00
PEI followed by Dodecyl aldehyde	25.64 \pm 1.37	99.60 \pm 2.00

Note: CLEA preparation conditions: treatment of PPL surface with PEI and dodecyl aldehyde, precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3), co-aggregation with co-feeder (PPL/BSA/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5), crosslinking with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein), temperature of 4 °C, 30 min precipitation/aggregation and 2.5 h crosslinking under 150 rpm stirring.

The CLEAs prepared with PPL treated with PEI yielded the lowest recovered activity (7.17%), probably due to the formation of more compact structures promoted by the intense crosslinking. Besides, the cationic character of this polymer could form a hydrophilic layer on the enzyme surface, impairing substrate partition from the bulk to the active site. On the other hand, the treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (a hydrophobic aldehyde) allowed a recovered activity of around 20%, because this compound probably did created a hydrophobic layer on the enzyme surface, aiding in the aggregation step, even although the amino groups in the enzyme surface will be decreased for the crosslinking step. As the combination of both treatments did allow a small increase in the recovered activity, only the surface treatment with dodecyl aldehyde was chosen for further experiments.

2.3. Preparation of Magnetic CLEAs Using Starch in the Aggregation and Crosslinking Steps

The influence of the starch concentration on the immobilization yield and recovered activity of CLEAs of PPL is shown in Figure 5. The addition of starch provided significant increases in the immobilization yield until a concentration of 0.6% (*w/v*), but only the concentrations of 0.8 and 1% (*w/v*) yielded 100% immobilization. The recovered activity increased for all starch concentrations, reaching maximum catalytic retention of 67% (more than doubling of the activity recovered without starch) when 0.8% starch was used during CLEA preparation. Thus, 0.8% (*w/v*) of starch was selected for the preparation of CLEAs of PPL.

Talekar et al. [12] reported the evaluation of starch on porous CLEAs (p-CLEAs) of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* and found that the use of starch led to the formation of a non-uniform porous surface, resulting in better mass transfer and minimization of diffusion problems. Besides that, they concluded that 0.4% (*w/v*) starch concentration yielded 100% catalytic potential, demonstrating the feasibility of this enzyme aggregate preparation method.

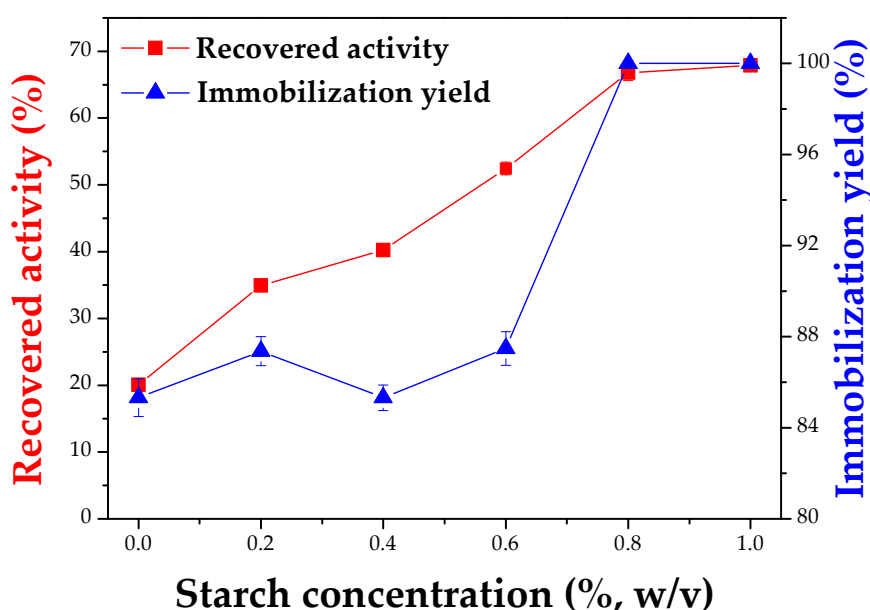


Figure 5. Effect of starch concentration on immobilization yield and recovered activity of PPL CLEAs. Assay conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3), co-aggregation with co-feeder (PPL/BSA/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch concentration from 0.2 to 1%, *w/v*), crosslinking with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein), temperature of 4 $^{\circ}$ C, 30 min precipitation/aggregation and 2.5 h crosslinking stirred at 150 rpm and incubation with α -amylase at 25 $^{\circ}$ C stirred at 150 rpm for 2 h.

2.4. Influence of Time of Glutaraldehyde Treatment in the Preparation of PPL CLEAs

The influence of the glutaraldehyde treatment time of the PPL CLEAs on the recovered activity was analyzed, and results pointed that this has not influence on the recovered activities, which were statistically equal by the Tukey test (around 66%). The incubation of the PPL CLEAs in phosphate buffer at high ionic strength for 12 h showed high stability against leaching (80 to 90% recovered activity). Despite this, 15 h crosslinking time was chosen for further assays [66].

2.5. Selection of Additives for Preparation of PPL CLEAs Using 0.8% (w/v) Starch as Pore-Making Agent

The influence of the presence of protein feeders (BSA, SP) and silica magnetic nanoparticles (SMNPs) in the preparation of PPL CLEAs using starch (0.8%, w/v) as pore-making agent is shown in Table 3. The recovered activities of all CLEAs prepared in the presence of starch increased more than twice after starch hydrolysis with α -amylase to wash away starch molecules, reaching 81% recovered activity when the PPL CLEA was prepared in the presence of a mix of SP and SMNPs. CLEAs prepared only with SMNPs were less stable when incubated at high ionic strength (59.8% recovered activity) than those prepared with BSA plus SMNPs and SP plus SMNPs (91% recovered activities). In view of these results, porous magnetic CLEAs (hereinafter abbreviated as pm-CLEA) prepared with SP plus SMNPs (pm-SP-CLEA) and BSA plus SMNPs (pm-BSA-CLEA) were selected to evaluate the effect of temperature, pH, agitation rate, and substrate concentration on the relative activity of this immobilized enzyme.

Table 3. Evaluation of different additives in the preparation of porous magnetic CLEAs (pm-CLEAs) of porcine pancreas lipase (PPL). The values of the immobilization parameter RA (recovered activity) are expressed as average of triplicates \pm standard deviation (σ).

Additives	Recovered Activities of Magnetic CLEAs (RA \pm σ (%))	
	Before Starch Hydrolysis with α -Amylase	After Starch Hydrolysis with α -Amylase
SMNPs ^a	24.46 \pm 0.24	54.01 \pm 0.64
BSA + SMNPs ^b	28.18 \pm 0.67	66.55 \pm 0.01
SP + SMNPs ^c	36.77 \pm 0.38	81.02 \pm 0.16

^a Silica magnetic nanoparticles; ^b Bovine serum albumin/silica magnetic nanoparticles mass ratio of 1:1; ^c Soy protein/silica magnetic nanoparticles mass ratio of 1:1. Assay conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of additives (PPL/total additives mass ratio of 1:3) and starch (0.8%, w/v) as pore-making agent for 0.5 h at 4 °C under 150 rpm stirring, followed by treatment with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 15 h. At the end, starch was hydrolyzed with α -amylase at 25 °C for 2 h under 150 rpm.

2.6. Characterization of Free and Immobilized PPL

Effect of pH, Temperature and Agitation Rate on Hydrolytic Activity and Thermal Stability

The effect of pH on the kinetic profile of free and immobilized PPL (pm-CLEA) is shown in Figure 6. The pH values where maximum activities for free PPL (32.2 \pm 0.65 U/mg protein) and pm-SP-CLEA (24.13 \pm 0.35 U/mg protein) were found were similar (around pH 8.0), while for pm-BSA-CLEA (19.14 \pm 0.13 U/mg protein) was shifted to 9.0. At higher pH values free enzyme rapidly decrease the activity, while the immobilized enzymes retained a high percentage of activity even at pH 10. That way, at alkaline conditions, pm-CLEAs were much more actives than the soluble counterpart in absolute terms. Cui et al. [45] also reported similar behavior for CLEAs of bovine pancreas lipase (above 90% activity in the pH range from 8.0 to 10.0).

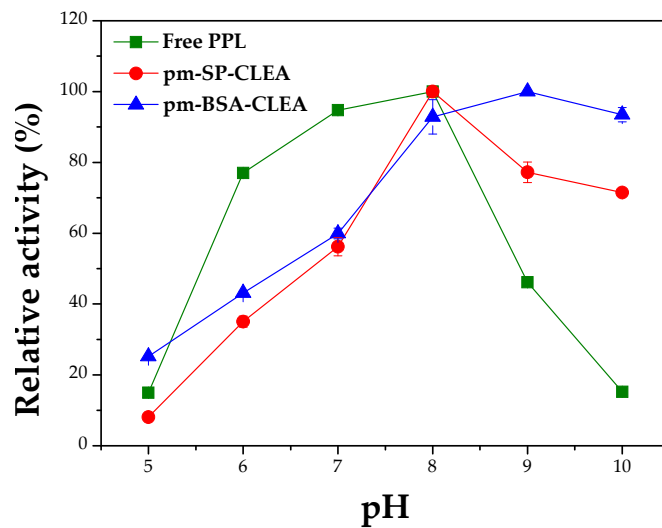


Figure 6. Profile of activity vs. pH for free and immobilized PPL. pm-(SP or BSA)-CLEA preparation conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of PPL/BSA/SMNPs or PPL/SP/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch (0.8% *w/v*) for 0.5 h, followed by treatment with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 15 h at 4 °C under 150 rpm stirring, and treatment with alpha-amylase at 25 °C under 150 rpm stirring for 2 h. Activity assay conditions: hydrolysis of tributyrin (217.9 mM concentration) at 40 °C and different pH values for 5 min under 500 rpm stirring.

Figure 7 shows the effect of temperature on the activities of free and immobilized PPL. The temperature where the maximum activities of the porous magnetic CLEAs (pm-SP-CLEA and pm-BSA-CLEA) were detected was shifted from 40 °C (free PPL) to around 50 °C, suggesting that the immobilized enzyme is more thermally stable than the free PPL at high temperatures.

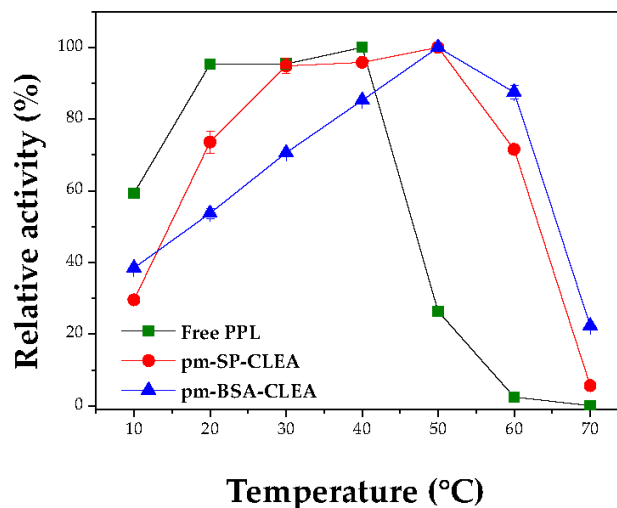


Figure 7. Activity profiles of PPL vs. temperature. pm-(BSA or SP)-CLEA preparation conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of PPL/BSA/SMNPs or PPL/SP/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch (0.8% *w/v*) for 0.5 h, followed by treatments with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 15 h at 4 °C under 150 rpm stirring, and with α -amylase at 25 °C under 150 rpm stirring for 2 h. Activity assay: hydrolysis of tributyrin solution pH 8.0 (217.9 mM concentration), temperature ranging from 10 to 70 °C for 5 min under 500 rpm stirring.

At 60 °C, pm-BSA-CLEA and pm-SP-CLEA presented specific activities of 28.0 ± 0.6 U/mg protein and 20.0 ± 0.8 U/mg protein, respectively, while free PPL showed an activity of 2.0 ± 0.1 U/mg protein. Again, at these conditions the immobilized enzyme becomes much more active than the free enzyme. Differences increase at higher temperature, e.g., at 70 °C the free enzyme is fully inactive while pm-BSA-CLEA retained more than 20% of the activity. These results show that the pm-BSA-CLEA presented greater stability in its structure under very drastic conditions than that of the free PPL since the immobilization produced a strong rigidification of the enzymatic structure.

Thus, the new biocatalyst presented better catalytic performance under drastic conditions than the free enzyme and is a new example on how the recovered activity may be altered depending on the activity determination conditions [22].

Figure 8 shows the effect of the stirring rate on the kinetic behavior of the free and immobilized PPL. Free PPL showed maximum catalytic activity at 500 rpm and then, the activity decreased, while the activities of the porous magnetic CLEAs continuously increased within the interval evaluated. Thus, while the free enzyme is exposed to gas bubbles and this produces its inactivation, the immobilized enzyme is protected inside the solid porous particle and retained very high activity [19], and only the positive effects of the reduction of external mass transfer is observed.

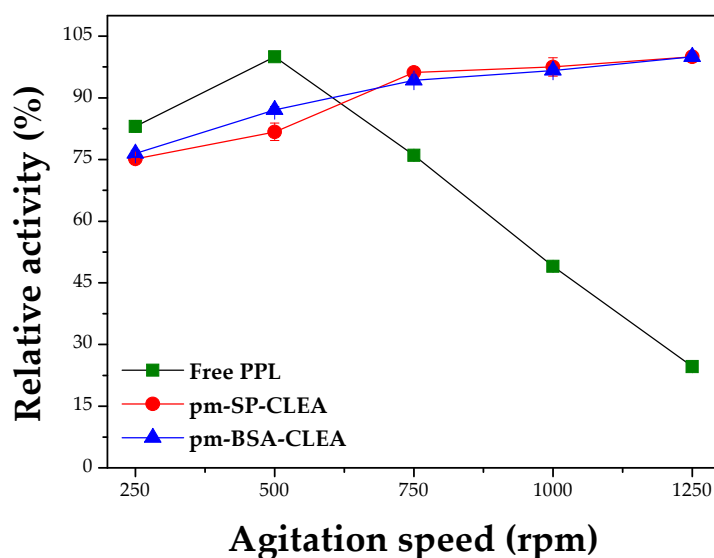


Figure 8. Effect of the agitation on the catalytic performance of free and immobilized PPL. Conditions of pm-(BSA or SP)-CLEA preparation: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of PPL/BSA/SMNPs or PPL/SP/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch (0.8% *w/v*) for 0.5 h, followed by treatments with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 15 h at 4 °C under 150 rpm stirring, and with α -amylase at 25 °C under 150 rpm stirring for 2 h. Activity assay conditions: hydrolysis of tributyrin solution (217.9 mM concentration) at 40 °C and pH 8.0 for 5 min under different agitation velocities (250, 500, 750, 1000 and 1250 rpm).

Figure 9 shows the inactivation profiles of free and immobilized PPL. It can be seen that pm-SP-CLEA exhibited high stability at 40 °C and pH 8.0, retaining around 80% of activity after 10 h incubation. The pm-BSA-CLEA was slightly less stable, but still retained around 50% of the initial activity after 10 h incubation, while free PPL was fully inactivated after 2 h incubation. The highest stabilities of the porous magnetic CLEAs are indicative of efficient covalent cross-links established in the supramolecular structure of the CLEAs, turning the enzyme molecules more rigid and preventing distortional tridimensional changes at high temperatures. The biphasic profiles of the inactivation curves suggest that the porous magnetic CLEAs of PPL have a fraction of enzyme molecules more cross-linked and thereby more thermally stable. Perhaps this is the fraction of the PPL molecules

directly attached to the nanoparticle, where stabilization effects should be higher counting by the higher rigidity of the nanoparticle compared to a protein [22].

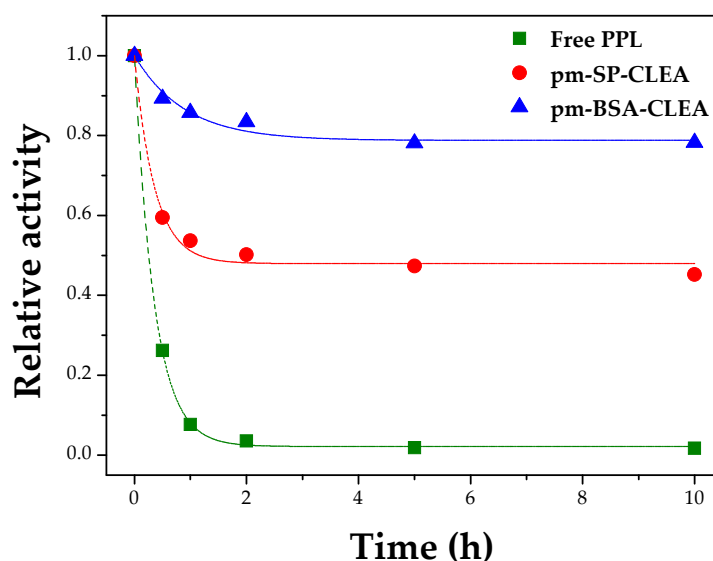


Figure 9. Thermal inactivation profiles of free and immobilized PPL at 40 °C and pH 8.0 under 150 rpm stirring. Biocatalyst preparation conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of PPL/BSA/SMNPs or PPL/SP/SMNPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch (0.8% *w/v*) for 0.5 h, followed by treatments with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein), for 15 h at 4 °C under 150 rpm stirring, and with α -amylase at 25 °C for 2 h. Activity assay conditions: hydrolysis of 217.9 mM tributyrin solution at 40 °C and pH 8.0 for 5 min under 500 rpm stirring.

2.7. Determination of Effectiveness Factors

CLEAs prepared in presence of starch as pore-making agent were evaluated as their effectiveness factors. Figure 10 shows that the evolution of the effectiveness factors (η = observed activity of CLEA/activity of an equivalent amount of free PPL) at growing concentrations of tributyrin. These factors were much higher after washing away the starch, mainly for CLEAs prepared in presence of soy protein and SMNPs. SEM-FEG images of CLEAs before starch hydrolysis (Figure 11) show a quite smooth and non-porous surface, which may result in serious mass transfer problems.

On the other hand, images of CLEAs after starch hydrolysis show non-uniform and porous surface due to removal of the starch molecules from the structure of the enzyme aggregate, which could explain the higher effectiveness factors (around $\eta = 0.65$), mainly for CLEAs prepared in presence of soy protein and SMNPs. On the other hand, PPL co-aggregated with BSA and SMNPs (pm-BSA-CLEAs) did not show significant increase in the observed activity, even using starch as pore-making agent. These results showed that the combination of SMNPs and soy protein as aids in the aggregation step and starch as pore-making agent was a good strategy to reduce mass transfer problems within the supramolecular structure of the CLEA.

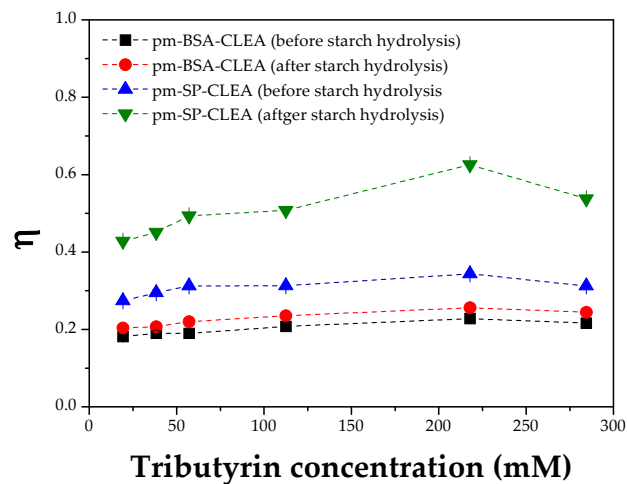


Figure 10. Effectiveness factors (η) for CLEAs of PPL. Biocatalyst preparation conditions: treatment of PPL surface with dodecyl aldehyde (PPL/dodecyl aldehyde mass ratio of 1:1), aggregation/precipitation with ethanol (enzyme solution/ethanol volume ratio of 1:3) in presence of LPP/BSA/SMNPs or LPP/SP/SMMMPs mass ratio of 1:1.5:1.5 and starch (0.8% *w/v*) for 0.5 h, followed by treatment with glutaraldehyde (5 μ moles of glutaraldehyde/mg total protein) for 15 h at 4 °C under 150 rpm. Starch was washed away by hydrolysis with α -amylase at 25 °C for 2 h under 150 rpm stirring. Activity assay conditions: hydrolysis of tributyrin solutions (19.28, 38.35, 57.2, 112.5, 217.9 and 284.4 mM) at 40 °C and pH 8.0 for 5 min under 500 rpm stirring.

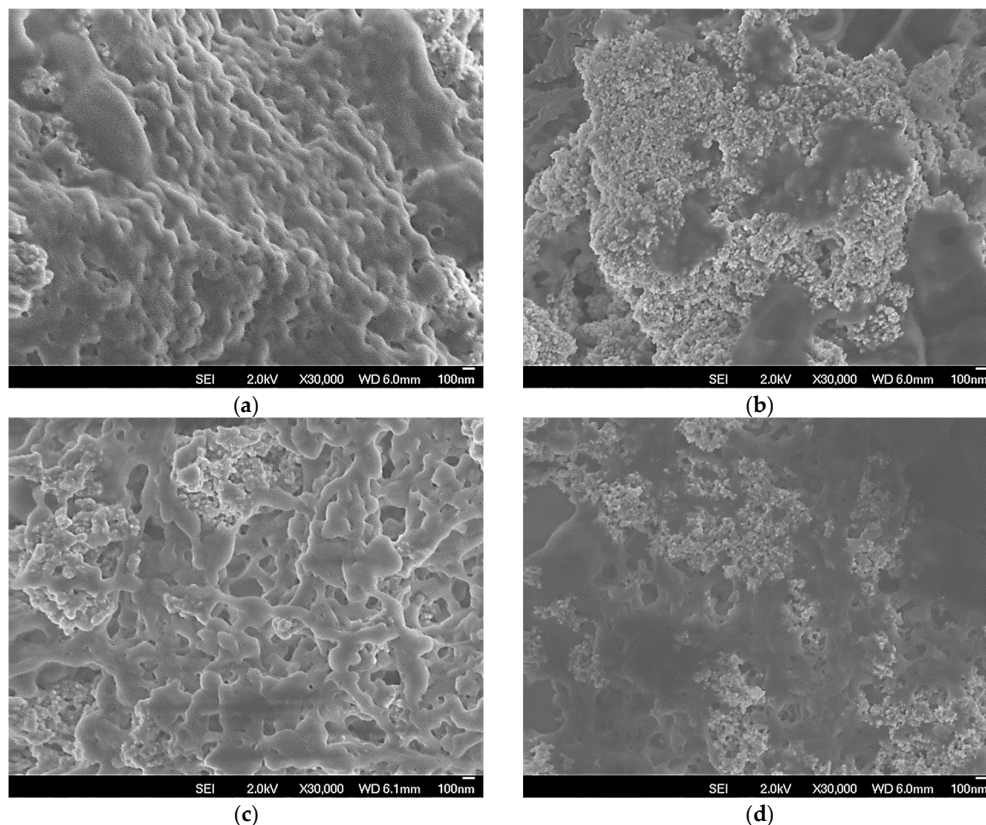


Figure 11. SEM-FEG images of pm-CLEAs of porcine pancreas lipase co-aggregated with (a) SMNPs and bovine serum albumin (pm-BSA-CLEA), (b) SMNPs and soy protein (pm-SP-CLEA), followed by treatment with α -amylase (c,d, respectively). All CLEAs were prepared under the same conditions, the only difference is if the starch (pore-making agent) was not hydrolyzed (a,b) or was hydrolyzed (c,d) with α -amylase.

2.8. Evaluation of Tributyrin Hydrolysis and Biocatalyst Reuse

Figure 12 shows the reaction course of the hydrolysis of tributyrin catalyzed by free PPL and pm-SP-CLEA. Figure 12 shows how the reaction catalyzed by free enzyme rapidly started to lose linearity, but this is not so obvious using the immobilized enzyme. The yields after 4 h of reaction were 36% and 52% using free PPL and pm-SP-CLEA, respectively. These results confirmed the lower stability of free PPL compared to the immobilized counterpart.

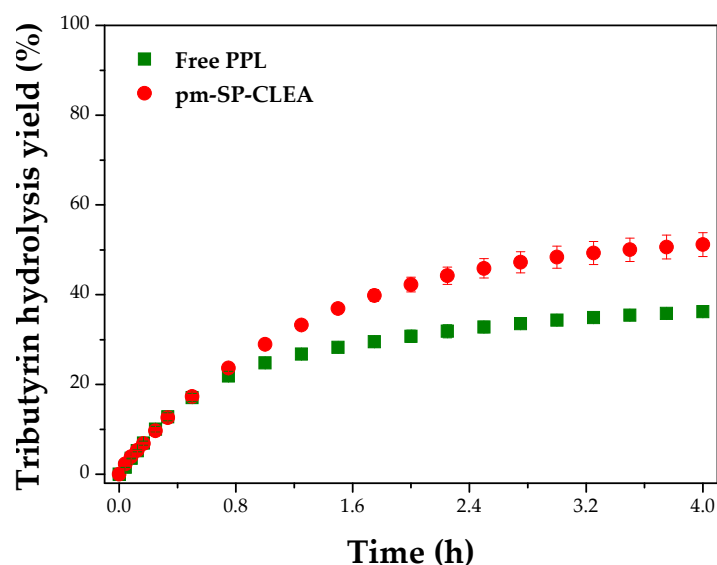


Figure 12. Yield of the hydrolysis of tributyrin with the reaction time at 37 °C and pH 7.5 stirred at 500 rpm catalyzed by free PPL and pm-SP-CLEA (74.22 mM tributyrin and 70 TBU/g tributyrin). Yield was calculated as percentage of butyric acid released (in μ moles) in relation to the total theoretical value.

Figure 13 shows that after five 4 h-batches, the yield of tributyrin hydrolysis decreased only 7% (from 52% to 45%). Besides the good operational mechanical stability, it is noticed that the recovery of the pm-SP-CLEA was very ease using a magnetic separation.

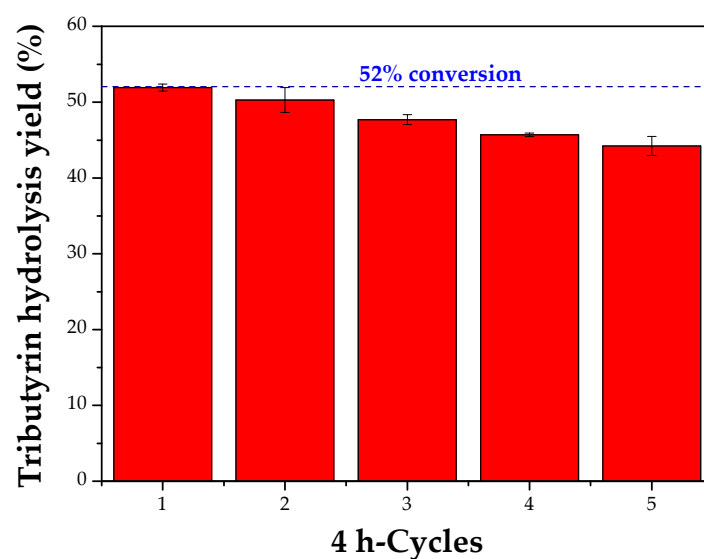


Figure 13. Reuse assay (4 h-batches) of the pm-SP-CLEA in the hydrolysis of tributyrin (74.22 mM) at 37 °C and pH 7.5 stirred at 500 rpm. Reaction medium: 6 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.5), 16.5 mL distilled water, 0.5 mL tributyrin, and 70 TBU/g tributyrin.

It should be considered that free enzyme was quite unstable just at 3 °C more (Figure 9), while the immobilized enzyme can be reused for many cycles without significant changes. Moreover, di- and monobutylin have some detergent effects that apparently have not very deleterious effects on enzyme stability even at 37 °C [67–69].

3. Materials and Methods

Lipase from porcine pancreas type II (PPL), bovine serum albumin (BSA), *tert*-butyl alcohol, tributyrin, polyethyleneimine (PEI, average $M_n \sim 423$), dodecyl aldehyde, and Bradford reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Glutaraldehyde solution (25% in H_2O) was purchased from Vetec Química Fina (Duque de Caixas, RJ, Brazil). Soluble starch was purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain). Anhydrous ethanol (99.8% P.A.) was purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). Soy protein was acquired from local market. Silica magnetic nanoparticles (SMNPs) functionalized with amine groups derived from 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ($136 \pm 10 \mu\text{mol amino/g}$) were purchased from Kopp Technologies (São Carlos, SP, Brazil).

3.1. General Procedure of CLEA Preparation

In the precipitation step, ethanol (3.0 mL) was added to 1.0 mL of a homogeneous mixture containing PPL ($5.0 \text{ mg of protein mL}^{-1}$) and co-feeders (15 mg mL^{-1}) prepared in 5.0 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The mixture was maintained at 4 °C in an orbital shaker at 150 rpm stirring for 30 min. After this time, glutaraldehyde (5 $\mu\text{moles of glutaraldehyde groups/mg total protein}$) was added and the crosslinking step proceeded for 2.5 h [12]. CLEAs prepared with protein co-feeders were separated by centrifugation at 10,400 g for 10 min at 4 °C, while CLEAs prepared with silica magnetic nanoparticles (SMNPs) as additive were separated by an external magnetic field. The precipitate (CLEAs of PPL) was washed twice with 3.0 mL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), and finally resuspended in 1.0 mL of 5.0 mM phosphate buffer (pH 7.0). Measures of hydrolytic activities (tributyrin as substrate) in the initial enzyme solution, final supernatant, washing supernatants, and CLEA suspension were used to calculate the following immobilization parameters: immobilization yield (IY), recovered activity (RA), and global yield (GY) using the following equations:

$$IY = \frac{A_i - (A_{\text{super}} + A_{\text{washes}})}{A_i} \times 100 \quad (1)$$

$$RA = \frac{A_{\text{Derivative}}}{A_i - (A_{\text{super}} + A_{\text{washes}})} \times 100 \quad (2)$$

$$GY = \frac{A_{\text{derivative}}}{A_i} \times 100 \quad (3)$$

where A_i is the initial activity; $A_{\text{Derivative}}$ is the activity of the CLEAs, A_{super} is the activity of the supernatant and A_{washes} is the activity of the washing supernatants.

3.2. Preparation of Porous Magnetic CLEAs (pm-CLEAs)

Porous magnetic CLEAs (pm-CLEAs) were prepared by the general procedure described above but adding to the enzyme solution SMNPs and soluble starch as pore forming agent. In the precipitation step, 3.0 mL of ethanol were added to 1 mL of a homogeneous mixture containing PPL ($5.0 \text{ mg of protein mL}^{-1}$), protein feeder/additive (7.5 mg of BSA or soy protein and 7.5 mg of SMNPs), and soluble starch (0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8% and 1.0%, *w/v*) prepared in 5.0 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The mixture was maintained at 4 °C in an orbital shaker stirred at 150 rpm for 30 min. After, glutaraldehyde (5 $\mu\text{moles of glutaraldehyde/mg total protein}$) was added and the crosslinking step proceeded for 2.5 h. The precipitate was recovered by magnetic separation, washed, and resuspended in 3.0 mL of 5 mM phosphate buffer (pH 7.0). A volume of 100 μL α -amylase was added and the

suspension was incubated at 25 °C for 2 h in order to hydrolyze starch into dextrans, maltose and glucose, which can be easily washed away [42]. After this time, the CLEAs were recovered by magnetic separation, resuspended in 1.0 mL of phosphate buffer (5.0 mM, pH 7.0), and stored at 4 °C. Hydrolytic activities were measured to calculate the immobilization parameters, as described above.

3.3. Protein Assay

Protein concentration was determined by Bradford's method [70], using bovine serum albumin (BSA) as standard protein.

3.4. Standard Activity Assay

Hydrolytic activity was measured according to Beisson et al. [71] with minor modifications. Briefly, a volume of 100 µL of enzymatic solution (or resuspended CLEA) was added into a mixture of 1.5 mL of tributyrin, 6.0 mL of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and 16.5 mL of distilled water. The hydrolytic reaction was carried out at 37 °C, stirred at 500 rpm for 5 min. The tributyrin hydrolysis was monitored in a Titrino 907 titrator (Metrohm, Herisau, Switzerland) using a 20 mM KOH solution to keep the pH of reaction at 7.5. The hydrolytic activity was calculated considering the consumption of KOH to neutralize the butyric acid released in the reaction medium. One tributyrin unit (TBU) was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of butyric acid per minute under the conditions described.

3.5. Chemical or Physical Modification of the Lipase Surface

In some instances, before the precipitation step, PPL was incubated with polyethyleneimine (PEI, oligomer mixture with an average Mn of 423) and/or dodecyl aldehyde.

The treatment with PEI was performed according to Wilson et al. [49], adding 50 µL of PEI solution (100 mg mL⁻¹) in a homogeneous PPL solution (5 mg mL⁻¹) prepared in 5 mM phosphate buffer (final pH 7.0). The reaction medium was incubated at 25 °C and stirred at 150 rpm for 60 min. At the end, the enzyme solution was dialyzed in a dialysis tubing cellulose membrane (typical molecular weight cut-off of 14 kDa) at 4 °C for 16 h against excess of water to remove excess of surface modifying agent.

For the treatment with dodecyl aldehyde, 181 µL of this aldehyde solution (831 mg mL⁻¹) were added to 30 mL of a PPL solution (5 mg mL⁻¹) prepared in 100 mM sodium carbonate buffer (pH 10.0) to give a dodecyl aldehyde:PPL mass ratio of 1:1. The solution was incubated at 25 °C under 150 rpm stirring for 180 min. In this case, both non-modified PPL and PPL treated with PEI were modified with dodecyl aldehyde. After, sodium borohydride (1 mg mL⁻¹ solution) was added to the solution and the reaction proceeded for 30 min. At the end, the enzyme solution was dialyzed at 4 °C for 16 h against excess of water to remove excess of surface modifying and reducing agents.

The enzyme surface modification was evaluated by the colorimetric TNBS method [72]. Solutions of 0.1% (v/v) TNBS containing modified and non-modified PPL (0.01 mg mL⁻¹) were prepared in 100 mM sodium borate pH 9.0 and incubated at 25 °C for 30 min. After, the absorbance was measured at 420 nm and it was related to amino group concentration using a standard curve constructed with glycine as standard amino acid (Figure S1).

3.6. Characterization of Free and Immobilized PPL

Effect of pH and Temperature on PPL Hydrolytic Activity and Thermal Stability

The enzymatic activity of immobilized or free enzyme was determined at different pH values and 37 °C, using 100 mM of different buffers: sodium acetate at pH 5.0, sodium phosphate at pH values from 6.0 to 8.0 or sodium carbonate at pH 9.0 and 10.0. A blank solution at same conditions (but without enzyme) was utilized to discount acid or alkaline chemical hydrolyses.

To determinate the optimum activity temperature of free or immobilized lipase, the enzymatic activity was measured using 100 mM sodium phosphate at pH 7.5 in a temperature range from 10 to 70 °C.

For stability assays, free and immobilized PPL were incubated at 40 °C and 100 mM phosphate buffer pH 8.0 for 10 h under 500 rpm stirring. At regular time intervals, samples were withdrawn for measurement of hydrolytic activity.

3.7. Determination of Effectiveness Factor

Initial reaction rates were measured at 40 °C and pH 7.5 using different tributyrin concentrations (19.28, 38.35, 57.2, 112.5, 217.9, and 284.4 mM) for free and immobilized PPL. Effectiveness factor (η) for each form of PPL and tributyrin concentration was determined using the following equation:

$$\eta = \frac{V_{\text{imm}}}{V_{\text{free}}} \quad (4)$$

where, V_{imm} and V_{free} are the rates of the reaction catalyzed by the same amount of enzyme (free PPL and CLEAs of PPL, respectively).

3.8. Biocatalyst Reuse in Hydrolysis of Tributyrin

The performance of free PPL and pm-SP-CLEA was evaluated in the hydrolysis of a 74.2 mM tributyrin solution at 37 °C and pH 7.5 for 4 h under stirring at 500 rpm. The reaction medium was composed by 6 mL sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.5), 16.5 mL distilled water, 0.5 mL tributyrin, and an enzyme load of 70 TBU/g tributyrin (for free and immobilized PPL).

Reuse assays were carried out at the same conditions above using pm-SP-CLEAs as biocatalyst. Between each cycle, the CLEAs were recovered by magnetic separation and washed with distilled water.

3.9. Scanning Electron Microscopy with Field Emission Gun (SEM-FEG) of PPL CLEAs

The surface morphology of the CLEAs and pm-CLEAs was studied by scanning electron microscopy with field emission gun (SEM-FEG) using a JEOL JSM6701F (Germany) electron microscope operated at 2 kV. The samples were impregnated with silicon and dried in a desiccator for 24 h before being scanned under vacuum.

3.10. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate. The results were expressed as an average \pm standard deviation (σ). Analyses of variance between averages were performed by Tukey test at 5% significance.

4. Conclusions

The co-aggregation of porcine pancreas lipase (PPL) with protein feeder (mainly soy protein) and silica magnetic nanoparticles activated with amino groups, using starch as pore-making agent, yielded porous magnetic CLEAs (pm-CLEAs) of PPL with high retained activity (around 80% recovered activity) and high effectiveness factor (up to 60% of the equivalent free activity) due to their porous structures. The pm-CLEAs were high stable (around 80% of retained activity after 10 h at 40 °C and pH 8.0) and easily separated by an external magnetic field, thus avoiding the formation of large clusters conventionally observed by centrifugation separation, which can aggravate mass transfer problems in the compacted CLEA structures. Besides, porous magnetic CLEAs co-aggregated with soy protein and magnetic nanoparticles (pm-SP-CLEAs) showed good performance and reusability in the hydrolysis of tributyrin for five 4h-batches. The use of magnetic nanoparticles can permit to immobilize the enzyme on its surface providing some extra-rigidification via multipoint covalent attachment [73], also may produce some order in the immobilized molecules that can provide some advantages [74].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/11/2993/s1>.

Author Contributions: J.R.G. performed all experimental assays; R.d.L.C.G., R.F.-L. and P.W.T. design and supervise all experiments, as well as write/revise the manuscript with help of J.R.G. as part of his Master in Chemical Engineering. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding: This work was financed by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #2016/10636-8), National Council for Scientific and Technology Development (CNPq, grant #405889/2016-0), and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001. We also gratefully recognize all support from the Project CTQ2017-86170-R (MINECO, Spain).

Acknowledgments: The authors thank Cristiane Sanchez Farinas and Viviane Faria Soares from Embrapa Instrumentação São Carlos (São Carlos, Brazil) for the SEM-FEG analyses and LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, Brazil) for providing the α -amylase BAN 480L from Novozymes A/S.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C.; Aguiar, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 146–156. [[CrossRef](#)]
2. Jaeger, K.E.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390–397. [[CrossRef](#)]
3. Kapoor, M.; Gupta, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555–569. [[CrossRef](#)]
4. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627–662. [[CrossRef](#)]
5. He, W.S.; Zhu, H.; Chen, Z.Y. Plant Sterols: Chemical and enzymatic structural modifications and effects on their cholesterol-lowering activity. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3047–3062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235–251. [[CrossRef](#)]
7. Jamil, F.; Al-Haj, L.; Al-Muhtaseb, A.H.; Al-Hinai, M.A.; Baawain, M.; Rashid, U.; Ahmad, M.N.M. Current scenario of catalysts for biodiesel production: A critical review. *Rev. Chem. Eng.* **2018**, *34*, 267–297. [[CrossRef](#)]
8. Mendes, A.A.; Oliveira, P.C.; Castro, H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *78*, 119–134. [[CrossRef](#)]
9. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 119–131. [[PubMed](#)]
10. SÁ, A.G.A.; Meneses, A.C.; Araújo, P.H.H.; Oliveira, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *69*, 95–105. [[CrossRef](#)]
11. Sarmah, N.; Revathi, D.; Sheelu, G.; Yamuna Rani, K.; Sridhar, S.; Mehtab, V.; Sumana, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol. Prog.* **2018**, *34*, 5–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Talekar, S.; Shah, V.; Patil, S.; Nimbalkar, M. Porous cross-linked enzyme aggregates (p-CLEAs) of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1575–1579. [[CrossRef](#)]
13. Byun, H.G.; Eom, T.K.; Jung, W.K.; Kim, S.K. Lipase catalyzed production of monoacylglycerols by the esterification of fish oil fatty acids with glycerol. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2007**, *12*, 491–496. [[CrossRef](#)]
14. Caballero, V.; Bautista, F.M.; Campelo, J.M.; Luna, D.; Marinas, J.M.; Romero, A.A.; Hidalgo, J.M.; Luque, R.; Macario, A.; Giordano, G. Sustainable preparation of a novel glycerol-free biofuel by using pig pancreatic lipase: Partial 1,3-regiospecific alcoholysis of sunflower oil. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 334–342. [[CrossRef](#)]
15. Ramos, M.D.; Miranda, L.P.; Giordano, R.L.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Kopp, W.; Tardioli, P.W. 1,3-Regiospecific ethanolysis of soybean oil catalyzed by crosslinked porcine pancreas lipase aggregates. *Biotechnol. Prog.* **2018**, *34*, 910–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vescovi, V.; Santos, J.B.C.; Tardioli, P.W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. *Biocatal. Biotransform.* **2017**, *35*, 298–305. [[CrossRef](#)]

17. DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A.J.; Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437–6474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406–6436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Barbosa, O.; Torres, R.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2433–2462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885–2904. [[CrossRef](#)]
21. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisán, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463. [[CrossRef](#)]
22. Rodrigues, R.C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Fernández-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290–6307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Santos, J.C.S.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2413–2432. [[CrossRef](#)]
24. Sheldon, R.A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Xavier Malcata, F.; Reyes, H.R.; Garcia, H.S.; Hill, C.G.; Amundson, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 890–910. [[CrossRef](#)]
26. Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernández-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486–493. [[CrossRef](#)]
27. Cicolatti, E.P.; Pinto, M.C.C.; Robert, J.M.; Silva, T.P.; Beralto, T.C.; Santos, J.G.F.; Castro, R.P.V.; Fernandez-Lafuente, R.; Manoel, E.A.; Pinto, J.C.; et al. Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *46727*, 1–13. [[CrossRef](#)]
28. Mendes, A.A.; Castro, H.F.; Andrade, G.S.S.S.; Tardioli, P.W.; Giordano, R.D.L.C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 160–167. [[CrossRef](#)]
29. 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. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19*, 279–286. [[CrossRef](#)]
30. Paula, A.V.; Urioste, D.; Santos, J.C.; Castro, H.F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 281–288. [[CrossRef](#)]
31. Rios, N.S.; Pinheiro, M.P.; Lima, M.L.B.; Freire, D.M.G.; Silva, I.J.; Rodríguez-Castellón, E.; Sant’Ana, H.B.; Macedo, A.C.; Gonçalves, L.R.B. Pore-expanded SBA-15 for the immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B: Application in esterification and hydrolysis as model reactions. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *129*, 12–24. [[CrossRef](#)]
32. Vescovi, V.; Giordano, R.L.C.; Mendes, A.A.; Tardioli, P.W. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. *Molecules* **2017**, *22*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J.P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L.; et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **1990**, *343*, 767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Miled, N.; Beisson, F.; Caro, J.; Caro, A.; Arondel, V.; Verger, R. Interfacial catalysis by lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11*, 165–171. [[CrossRef](#)]

35. Schmid, R.D.; Verger, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633. [[CrossRef](#)]
36. Verger, R. Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–38. [[CrossRef](#)]
37. Manoel, E.A.; Santos, J.C.S.; Freire, D.M.G.; Rueda, N.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *71*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Cao, L.; Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. Cross-Linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of Penicillin Acylase. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Langen, L.M.; Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 273–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wilson, L.; Illanes, A.; Pessela, B.C.C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 558–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Magro, L.; Hertz, P.F.; Fernandez-Lafuente, R.; Klein, M.P.; Rodrigues, R.C. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: A potential biocatalyst for grape juice clarification. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 27242–27251. [[CrossRef](#)]
42. Kim, M.H.; Park, S.; Kim, Y.H.; Won, K.; Lee, S.H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *97*, 209–214. [[CrossRef](#)]
43. López-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Alonso, N.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J.M. Co-aggregation of Enzymes and Polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1839–1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Samoylova, Y.V.; Sorokina, K.N.; Piligaev, A.V.; Parmon, V.N. Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus thermosphaericus* esterase for application in malathion removal from wastewater. *Catalysts* **2018**, *8*, 154. [[CrossRef](#)]
45. Cui, J.D.; Liu, R.L.; Li, L.B. A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates of bovine pancreatic lipase using bovine serum albumin as an additive. *Korean J. Chem. Eng.* **2016**, *33*, 610–615. [[CrossRef](#)]
46. 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*. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *72*, 18–23. [[CrossRef](#)]
47. Mafra, A.C.O.; Beltrame, M.B.; Ulrich, L.G.; Giordano, R.L.C.; Ribeiro, M.P.A.; Tardioli, P.W. Combined CLEAs of invertase and soy protein for economically feasible conversion of sucrose in a fed-batch reactor. *Food Bioprod. Process.* **2018**, *110*, 145–157. [[CrossRef](#)]
48. Mahmood, S.S.; Yusof, F.; Jami, M.S.; Khanahmadi, S. Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease. *Bioresour. Bioprocess.* **2016**. [[CrossRef](#)]
49. Tirunagari, H.; Basetty, S.; Rode, H.B.; Fadnavis, N.W. Crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of phytase with soymilk proteins. *J. Biotechnol.* **2018**, *282*, 67–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gupta, K.; Jana, A.K.; Kumar, S.; Jana, M.M. Solid state fermentation with recovery of Amyloglucosidase from extract by direct immobilization in cross linked enzyme aggregate for starch hydrolysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2015**, *4*, 486–492. [[CrossRef](#)]
51. Wilson, L.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Illanes, A.; Guisán, J.M.; Palomo, J.M. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 750–755. [[CrossRef](#)]
52. Araujo-Silva, R.; Mafra, A.; Rojas, M.; Kopp, W.; Giordano, R.; Fernandez-Lafuente, R.; Tardioli, P. Maltose production using starch from cassava bagasse catalyzed by cross-linked β -amylase aggregates. *Catalysts* **2018**, *8*, 170. [[CrossRef](#)]
53. Cruz, J.; Barbosa, O.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R.; Ortiz, C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2012**, *80*, 7–14. [[CrossRef](#)]

54. Mafra, A.C.O.; Kopp, W.; Beltrame, M.B.; Giordano, R.L.C.; Ribeiro, M.P.A.; Tardioli, P.W.; Lima Camargo Giordano, R.; Arruda Ribeiro, M.P.; Tardioli, P.W. Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *133*, 107–116. [[CrossRef](#)]
55. Shah, S.; Sharma, A.; Gupta, M.N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Anal. Biochem.* **2006**, *351*, 207–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cui, J.D.; Jia, S.R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *35*, 15–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wang, M.; Jia, C.; Qi, W.; Yu, Q.; Peng, X.; Su, R.; He, Z. Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3541–3545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Cui, J.; Lin, T.; Feng, Y.; Tan, Z.; Jia, S. Preparation of spherical cross-linked lipase aggregates with improved activity, stability and reusability characteristic in water-in-ionic liquid microemulsion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2017**, *92*, 1785–1793. [[CrossRef](#)]
59. Jafari Khorshidi, K.; Lenjannezhadian, H.; Jamalan, M.; Zeinali, M. Preparation and characterization of nanomagnetic cross-linked cellulase aggregates for cellulose bioconversion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91*, 539–546. [[CrossRef](#)]
60. Kopp, W.; Costa, T.P.; Pereira, S.C.; Jafelicci, M.; Giordano, R.C.; Marques, R.F.C.; Araújo-Moreira, F.M.; Giordano, R.L.C. Easily handling penicillin G acylase magnetic cross-linked enzymes aggregates: Catalytic and morphological studies. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 38–46. [[CrossRef](#)]
61. Kumar, V.V.; Sivanesan, S.; Cabana, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates—Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. *Sci. Total Environ.* **2014**, *487*, 830–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Peirce, S.; Russo, M.E.; Istatico, R.; Fernández-Lafuente, R.; Salatino, P.; Marzocchella, A. Structure and activity of magnetic cross-linked enzyme aggregates of bovine carbonic anhydrase as promoters of enzymatic CO₂ capture. *Biochem. Eng. J.* **2017**, *127*, 188–195. [[CrossRef](#)]
63. Guauque Torres, M.P.; Foresti, M.L.; Ferreira, M.L. CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity. *Biochem. Eng. J.* **2014**, *90*, 36–43. [[CrossRef](#)]
64. Rhim, J.W.; Gennadiosb, A.; Wellerc, C.L.; Cezeiratd, C.; Hanna, M.A. Soy protein isolate–dialdehyde starch films. *Ind. Crops Prod.* **1998**, *8*, 195–203. [[CrossRef](#)]
65. Hermoso, J.; Pignol, D.; Kerfelec, B.; Crenon, I.; Chapus, C.; Fontecilla-camps, J.C. Lipase activation by nonionic detergents. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18007–18016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Dalal, S.; Kapoor, M.; Gupta, M.N. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, *44*, 128–132. [[CrossRef](#)]
67. Hirata, D.B.; Albuquerque, T.L.; Rueda, N.; Virgen-Ortíz, J.J.; Tacias-Pascacio, V.G.; Fernandez-Lafuente, R. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *133*, 117–123. [[CrossRef](#)]
68. Hirata, D.B.; Albuquerque, T.L.; Rueda, N.; Sánchez-Montero, J.M.; Garcia-Verdugo, E.; Porcar, R.; Fernandez-Lafuente, R. Advantages of heterofunctional octyl supports: Production of 1,2-dibutyryl by specific and selective hydrolysis of tributyrin catalyzed by immobilized lipases. *Chem. Select* **2016**, *1*, 3259–3270. [[CrossRef](#)]
69. Virgen-Ortíz, J.J.; Tacias-Pascacio, V.G.; Hirata, D.B.; Torrestiana-Sanchez, B.; Rosales-Quintero, A.; Fernandez-Lafuente, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, *96*, 30–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
71. Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. Methods for lipase detection and assay: A critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 133–153. [[CrossRef](#)]
72. Snyder, S.L.; Sobocinski, P.Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 284–288. [[CrossRef](#)]

73. Cipolatti, E.P.; Valério, A.; Henriques, R.O.; Moritz, D.E.; Ninow, J.L.; Freire, D.M.G.; Manoel, E.A.; Fernandez-Lafuente, R.; De Oliveira, D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 104675–104692. [[CrossRef](#)]
74. Baniukevic, J.; Hakki Boyaci, I.; Goktug Bozkurt, A.; Tamer, U.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 281–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).