CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA LIPASE DE UMA NOVA FONTE DE *Bacillus* sp. IMOBILIZADA EM POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO)

R. Y. CABRERA-PADILLA[1], M. C. LISBOA[1], M. A. O. SILVA[1], A. T. FRICKS[1,2], E. FRANCESCHI[1,2], A. S. LIMA[1,2], D. P. SILVA[1,2] e C. M. F. SOARES [1,2].

[1] Universidade Tiradentes, Departamento de engenharia de processos
[2] Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa
E-mail para contato: yndiracp@yahoo.com.br

RESUMO – As poucas abordagens existentes para a imobilização de lipases de *Bacillus* e *Geobacillus* em suportes, evidenciam o enorme potencial inexplorado desse grupo de biocatalisadores. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar a imobilização da lipase pelo método de adsorção física de uma nova fonte de *Bacillus* sp. (ITP-001) no biopolímero poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e a avaliação das propriedades bioquímicas.A atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al*., 1999, com algumas modificações. . A eficiência de imobilização foi de 25% para uma razão mássica enzima/substrato de 0,3g/g. O pH ótimo da lipase imobilizada foi 4,0 e a temperatura ótima foi 37°C. A taxa constante de inativação e o tempo de meia-vida para a enzima imobilizada foram determinadas a 37°C e 60°C, os valores calculados foram de k_d = 0,0038 h^{-1} e $t_{1/2}$ = 182,41 h; k_d = 0,0066 h^{-1} e $t_{1/2}$ = 105,02 h, respectivamente para as temperaturas. Os parâmetros cinéticos obtidos foram K_m igual à 49,10 mM e V_{max} igual á 205,03 U/g. A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi testada em 14 ciclos de reutilização com manutenção de mais de 50% de sua atividade inicial após 8 reusos.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas de fontes microbianas atualmente estão recebendo mais atenção devido a suas potenciais aplicações em indústrias tais como detergente, óleoquimica, síntese orgânica, laticínios, modificações de óleo e graxas, curtume, farmacêutica e tratamento de esgoto (Sharma *et al* ., 2001; Gupta *et al*., 2007). Em geral, lipases de *Bacillus* sp. imobilizadas não foram estudadas profundamente e na maioria dos casos, apenas as características básicas das enzimas têm sido relatadas. De forma geral, estas enzimas na forma livre foram testadas em reações químicas, suas estruturas foram elucidadas ou teoricamente modeladas. E subsequentemente, estudos recentes foram iniciados quanto ao uso de diferentes suportes para a imobilização desta lipase de *Bacillus* sp. (Guncheva e Zhiryakova, 2011).

Por exemplo, a lipase de *Geobacillus* thermocatenulatus (BTL2) foi imobilizada covalentemente em agarose-CNBr-agarose ou glioxil-agarose (Godoy *et al*., 2010). E em outro estudo foi avaliada a imobilização da lipase alcalina extracelular termotolerante, *Bacillus coagulans* BTS-3 (Pahujani *et al*., 2008). Os relatos mais antigos na literatura sobre a imobilização de lipases oriundas de *Bacillus* são relatados por Kanwar *et al*., (2006) e Nawani *et al*., (2006). No primeiro estudo a lipase *Bacillus coagulans* MTCC-6375 foi imobilizada em dodecil methacrilato e no segundo estudo a lipase *Bacillus* sp. termofílico foi imobilizada em sílica e em esferas de HP-20.

A imobilização é uma poderosa ferramenta para a modificação de propriedades catalíticas das enzimas para fins industriais. As lipases imobilizadas apresentam algumas vantagens em relação às lipases na forma livre, como: estabilidade térmica e química, facilidade de manuseio, fácil recuperação e reutilização. Algumas abordagens foram aplicadas para a imobilização de lipases de *Bacillus* sp. e *Geobacillus* sp. em diferentes suportes, oferecendo assim boas perspectivas ainda a ser explorado para este amplo grupo de biocatalisadores (Kanwar *et al*., 2006; Pahujani *et al*., 2008; Godoy *et al*., 2010).

Dentre os suportes, os polímeros naturais e sintéticos pertencem a uma classe muito importante para aplicação da técnica de imobilização de enzimas (Mateo *et al*., 2000). Um exemplo de polímeros naturais, é o poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) o qual leva algumas vantagens em relação aos sintéticos, pois apresentam de forma geral baixo custo e é biodegradável, portanto causa quase nenhum dano ao meio ambiente (Dalla-Vecchia *et al*., 2004).

O potencial de aplicação do PHBV na agroindústria na área médica foi recentemente estudado, e no caso do uso deste suporte para a imobilizaçao de enzimas para a aplicação na biocatálise o único estudo descrito na literatura foi realizado por este grupo. Neste artigo, a lipase obtida por outra fonte microbiana, a *Candida rugosa* (LCR), foi imobilizada em PHBV e obteve um rendimento de imobilização de 30% e uma boa estabilidade térmica e operacional (Cabrera-Padilla *et al*., 2012). Consequentemente, o PHBV tornou-se uma boa alternativa para ser utilizada como suporte para imobilização de enzimas, devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil adsorção, propriedades não tóxicas e além disso, é considerado ecologicamente correto.

Portanto este trabalho tem como objetivo o uso do polímero natural PHBV como suporte de imobilização da lipase produzida em fermentação submersa por uma nova linhagem de *Bacillus* sp. (ITP-001) por adsorção física, e por fim assim, avaliar as propriedades bioquímicas do derivado imobilizado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção da lipase purificada

A nova linhagem de *Bacillus* sp. (ITP-001) foi isolada de um solo contaminado por petróleo na cidade de Carmópolis, localizada no estado de Sergipe, Brasil, e mantida sob

refrigeração em tubos inclinados com meio YPD composto por (%, p/v): glicose (2,0), extrato de levedura (1,0), peptona (1,0) e Agar (2,5).

A fermentação submersa foi conduzida à 37ºC e 170 rpm, em Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura, ajustado à pH 7 com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, composto por (%, p/v): KH_2PO_4 (0,1), $MgSO_4.7H_2O$ (0,05), $NaNO_3$ (0,3), extrato de levedura (0,6), peptona (0,13), amido (2,0), Triton X-100 (1,0) e óleo de coco (4,0), acrescido após 72 horas de fermentação (Feitosa *et al.*, 2010). O caldo fermentado, obtido com 144 h de fermentação, foi centrifugado à 3000 rpm por 30 minutos e as proteínas foram precipitadas com $(NH_4)_2SO_4$ a 80% de saturação. A fase aquosa foi dialisada em membrana com massa de corte 12.000 Da contra água ultra-pura durante 12 horas à 4ºC e purificada em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por 20% de Polietilenoglicol 8000, 18% de Fosfato de potássio, 6% de NaCl à pH 6 e temperatura de 4ºC. A fase de fundo do SAB, que continha a enzima foi dialisada e liofilizada à -50°C. Após esta etapa a enzima foi mantida em frasco fechado e mantida à 4°C (Barbosa *et al.,* 2011a).

2.2. Imobilização da enzima

A lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) foi imobilizada em PHBV por adsorção física com algumas modificações do método descrito por Soares *et al*., 2004. O procedimento consistiu na mistura de 20 ml de hexano com 2 g do suporte em agitação vigorosa a temperatura ambiente durante 2 h, e em seguida foi adicionado 20 ml da solução enzimática (0,6g de lipase solubilizada em 20 ml de solução tampão fosfato pH 7,0) à suspensão hexano-suporte e mantida em agitação por mais 2 h. Após o término deste período, o derivado imobilizado (enzima-suporte) foi incubado por 24 h a 4°C. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo através de repetidas lavagens com hexano. A secagem da lipase imobilizada foi realizada a vácuo por 1 h e estocada à 4°C.

2.3. Atividade hidrolítica da lipase

A atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al*., 1999, com modificações.

O substrato foi preparado pela emulsão de 50 ml de azeite de oliva e 50 ml de goma arábica a 7% em solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). Em frascos Erlenmeyer foram adicionados: 5 ml de substrato, 2 ml de solução tampão fosfato de sódio e 0,1g de enzima. Os frascos foram incubados a 37°C por 5min para a LCR livre e para a LCR imobilizada por 10 min em banho termostatizado com agitação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,01M, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade (U) da atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para libera 1μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em U/g.

2.4. Recuperação

Rendimento de imobilização: O rendimento de imobilização (RI) foi determinado pela unidade de atividade lipolítica total presente no suporte (U_S) e unidades de atividade lipolítica oferecida para imobilização (U_o), como pode ser visto na Equação 1.

$$RI\ (\%) = \frac{U_s}{U_o}\ x\ 100 \qquad (1)$$

2.5. Propriedades bioquímicas da enzima

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da lipase: O efeito do pH na atividade da enzima imobilizada foi estudada utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 2.3. A faixa de pH variou entre 3,0 e 9,0.

A influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi determinada em pH 4,0 nas temperaturas de 30 a 90°C. As atividades relativas foram calculadas conforme a metodologia descrita no item 2.3.

Estabilidade térmica: O efeito da temperatura na estabilidade da lipase (ITP-001) imobilizada foi determinada por meio da incubação da enzima (0,1 g massa seca) à 37 e 60°C em meio-aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 4,0) por 4 horas. Em tempos pré-estabelecidos, foram retiradas as amostras e imediatamente resfriadas. Em seguida, a atividade residual foi determinada como descrito no item 2.3. A constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para a lipase *Bacillus sp.* (ITP-001) imobilizada, foram calculadas como descrito por Da Rós *et al.*, 2010.

Determinação dos parâmetros cinéticos: Para a determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações entre 37 e 2232 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas com diferentes proporções de azeite de oliva (1 a 70%) e solução aquosa de goma arábica (7% p/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase imobilizada foram determinadas. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados mediante ajuste não linear com o auxilio do programa Origin® 8,0.

Estabilidade operacional: A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi determinada em reações de hidrólise em bateladas consecutivas com reutilização do derivado imobilizado. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (0,1 g). E foram realizadas bateladas de 1 h a 37°C e pH 4,0. A cada batelada, lipase *Bacillus sp.* (ITP-001) imobilizada foi lavada com o hexano para remoção dos excessos de reagentes e produtos eventualmente retidos no suporte. Após 30 minutos, a lipase imobilizada foi reutilizada aplicando o método de hidrólise do azeite de oliva conforme descrito no item 2.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. A imobilização da enzima

A influência do carregamento no processo de imobilização da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) no suporte foi verificada mediante as diferentes razões mássicas de enzima/suporte (0,15; 0,225; 0,3; 0,375; 0,45 g/g), conforme apresentado na Figura 1, e a granulometria do suporte PHBV foi entre 60 > X ≥ 200 mesh. Observa-se que a atividade da enzima imobilizada aumentou significativamente à medida que aumentou a razão enzima/suporte (0,15-0,3 g/g). E a partir do carregamento da enzima superior a 0,3 (p/p) verificou-se a diminuição substancial da atividade relativa devido provavelmente a saturação do suporte pela enzima. Portanto, a razão mássica do derivado imobilizado estabelecida para a determinação dos parâmetros cinéticos foi de 0,3 grama de lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) por grama do suporte PHBV. E o rendimento de imobilização foi de 25%, cujo o valor é próximo ao obtido com lipase de outra fonte microbiana (Cabrera-Padilla *et al*., 2012).

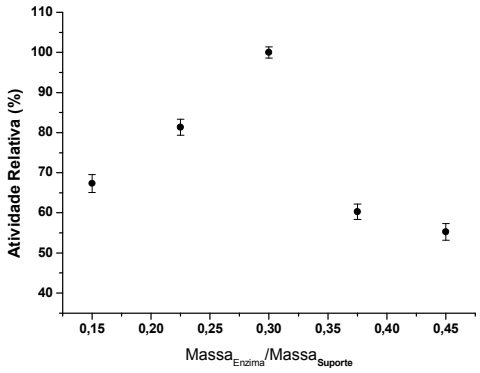

Figura 1 - Atividade relativa em função da variação da relação enzima/suporte para a imobilização da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) em PHBV.

3.2. Propriedades bioquímicas da enzima imobilizada

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da lipase: O perfil do efeito do pH sobre a atividade da lipase imobilizada foi estudada na faixa de 3,0-9,0. Na Figura 2 observa-se que as maiores atividades foram alcançadas em pH ácido na faixa de 3,0-5,0, com a atividade máxima em pH 4,0 e com a perda de atividade em pHs superiores a 5,0. O valor do pH da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) livre foi 7,0 superior ao obtido pela enzima imobilizada (4,0) (Barbosa *et al*., 2011b). A enzima imobilizada mostrou uma mudança ácida no estudo do efeito do pH e foi obtido a maior estabilidade a pH 4,0. O microambiente de uma enzima pode influenciar nas suas propriedades, uma enzima em solução pode ter um pH ótimo diferente do que da enzima imobilizada dependendo das cargas de superfície da matriz. Os suportes policatiónicos tendem a deslocar o pH ótimo das enzimas imobilizadas para meios

com maiores acidez e segundo a literatura o suporte PHVB apresenta um radial catiônico (Yigitoglu e Temocin, 2010; e Mendes *et al*, 2012). Assim, a atividade máxima em pH ácido obtida neste estudo deve-se provavelmente ao radical catiônico descrito por Mendes *et al.,* 2012. Para outras fontes de lipase e diferentes tipos de suportes o comportamento semelhante foi observado, por exemplo, para a lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em casca de ovo de galinha por ligação cruzada com glutaraldeído foi verificado a mudança do perfil do pH quando compara a enzima livre (Karimpil *et al*., 2011).

A influência da temperatura na atividade relativa da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada foi avaliada no pH 4,0 entre 30 e 90°C. Na Figura 3 pode-se observar que a temperatura ótima foi de 37 °C, e nas demais temperaturas avaliadas a atividade relativa variou cerca de 15%. A temperatura ótima para enzima da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) na forma livre foi 80°C, a qual foi determinada por Barbosa *et al*. (2011b). O mesmo perfil de variação de temperatura foi observado para o mesmo tipo de suporte (PHBV), contudo com outra enzima a lipase *Candida rugosa* (LCR) (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012). A literatura relata também outros perfis, como por exemplo as temperaturas ótimas para lipase de *Bacillus* sp. termofílico na forma livre e imobilizada em sílica e esferas de HP-20 60ºC e 65ºC, respectivamente (Nawani *et al*., 2006).

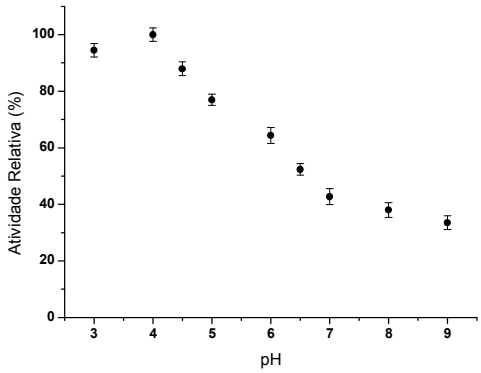

Figura 2 - Efeito do pH na atividade hidrolítica relativa da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada em PHBV, denominada (PHBV-ITP).

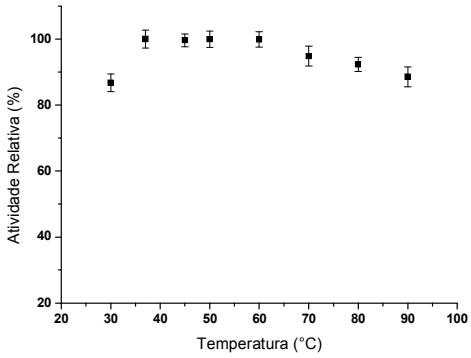

Figura 3 - Influencia da temperatura na atividade relativa da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada. Ensaios realizados a pH 4,0.

<u>Estabilidade térmica</u>: Foi determinada pela medição da atividade residual em função do tempo para as temperaturas de 37°C e 60 °C. Na Figura 4 podemos observar que a lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada em PHBV apresenta uma boa estabilidade térmica para ambas as temperaturas estudadas, observando-se um aumento na estabilidade comparada aos resultados da enzima livre determinada por Barbosa *et al*. (2011b). A boa estabilidade térmica observado neste derivado estudado (lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada em PHBV), também foi em nosso estudo anterior (LCR imobilizada em PHBV) (Cabrera-Padilla *et al.*, 2012). E também foi descrito por Nawani *et al*. (2006) que a estabilidade térmica da lipase de *Bacillus* sp termofílica foi aumentada após a sua imobilização em sílica e esferas de HP-20. Dosanjh e Kaur, (2002) relataram também que o processo de imobilização melhorou a

estabilidade térmica da lipase proveniente de *Bacillus* sp. por ligação cruzada sobre uma superfície hidrofóbica.

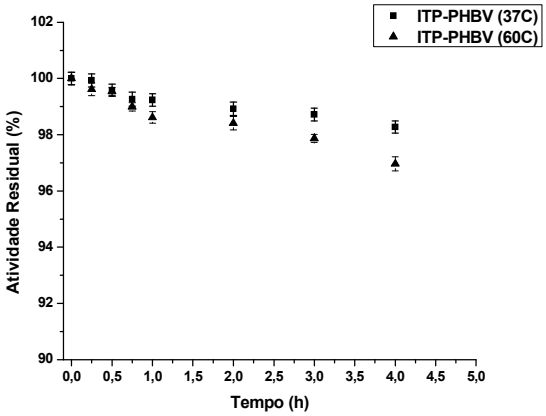

Figura 4 - Estabilidade térmica da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada (incubadas em 37 e 60°C).

A partir do ajuste linear do logaritmo neperiano da atividade hidrolítica em função do tempo, foram calculados os valores da constante da taxa de inativação (*kd*) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), para o biocatalisador imobilizado em temperaturas de 37 °C (k_d = 0,0038 h^{-1}; $t_{1/2}$ = 182,41 h) e 60 °C (k_d = 0,0066 h^{-1}; $t_{1/2}$ = 105,02 h).

<u>Determinação dos parâmetros cinéticos</u>**:** A cinética do biocatalisador imobilizado (PHBV-ITP) foi investigada em várias concentrações de substrato da emulsão de azeite de oliva (a 37°C, pH 4,0). A equação de Michaelis-Menten foi usada para ajustar os parâmetros cinéticos, K_m aparente e V_{max} aparente, com o auxilio do programa Origin ® 8 (Figura 5). Os valores aparentes de K_m e V_{max} da lipase *Bacillus sp*. imobilizada (ITP-001 imobilizada) foram de 49,10 mM e 205 U/g, respectivamente. A lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada em PHBV apresentou uma diminuição no K_m aparente e um aumento na V_{max} aparente comparado aos parâmetros da lipase *Bacillus sp*. livre (ITP-001 livre) imobilizada, K_m =76,85 mM e V_{max} =110 U/g, (Barbosa *et al.*, 2011b), essas mudanças nos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max} aparentes) sugere que a imobilização da ITP-001 por adsorção resulta em uma maior afinidade pelo substrato e uma melhor acessibilidade do sítio ativo, possivelmente devido ao preparo do suporte durante o processo de imobilização. Em trabalho publicado recentemente pelo grupo adotou-se a mesma metodologia para determinação dos parâmteros cinéticos da lipase de *Candida rugosa* livre (K_m=835,59 mM, V_{max}=4354,61 U/g) e imobilizada em PHBV (K_m=213,18 mM, V_{max}=318,62 U/g) Cabrera-Padilla *et al*., (2012). Pahujani *et al*.,(2008), para lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 imobilizada em nylon-6 ativado com glutaraldeído mediante ligação covalente, relataram os valores de K_m = 4 mM e V_{max} = 10 mol / min / mL, enquanto que para a forma livre, o V_{max} foi de 0,72 mmol / min / ml e o K_m foi de 3,8 mM.

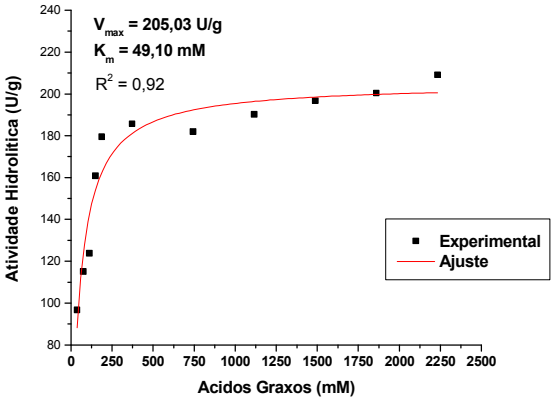

Figura 5 - Atividade hidrolítica da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizada em suporte PHBV em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37ºC, pH 4,0).

Estabilidade operacional: A Figura 6 apresenta a variação na atividade relativa do biocatalisador imobilizado depois de vários ciclos de reutilização. A reutilização da lipase imobilizada foi testada e verificou-se que retém até 50% de sua atividade inicial até 8 reutilizações. Embora a atividade da enzima imobilizada diminuiu um pouco com cada reação sucessiva, isto pode ser devido à liberação da lipase da superfície do PHBV durante as múltiplas etapas de imersão, separação e lavagem com hexano empregada durante a reação de reciclagem, pois a enzima somente é ligada por forças de interações fracas (Yadav e Jadhav., 2005). Resultados semelhantes foram reportados em nosso estudo como utra enzima, onde também foi observado decréscimo da atividade para LCR imobilizada no mesmo suporte (PHBV) (Cabrera-Padilla *et al*., 2012). Sugerindo que a lipase *Bacillus sp*. imobilizada imobilizada em PHBV pode ser mais adequado para aplicações industriais devido à sua fácil recuperação a partir da reação do sistema e eficiente reutilização.

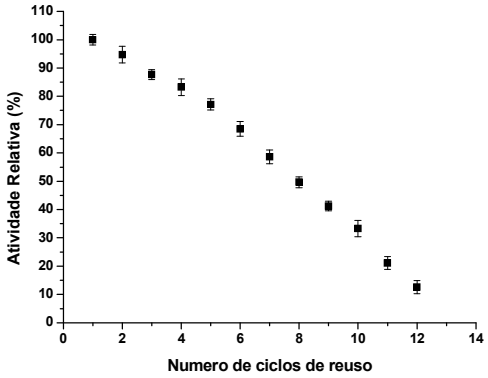

Figura 6 - Atividade relativa da lipase *Bacillus sp*. (ITP-001) imobilizado em função dos ciclos de reuso.

4. CONCLUSÃO

No presente estudo, a lipase de *Bacillus* sp. foi imobilizada em PHBV por adsorção física, cuja a melhor relação enzima/suporte foi 0,3 g/g atingindo o rendimento de imobilização de 25%. A lipase imobilizada em PHBV apresentou uma boa estabilidade térmica nas duas temperaturas estudadas e também foi verificado que o biocatalisador imobilizado pode ser reutilizado até oito vezes mantendo 50% de sua atividade inicial.

5. REFERENCIAS

BARBOSA J.M.P.; SOUZA R.L.; FRICKS A.T.; ZANIN G.M.; SOARES C.M.F.; LIMA A.S. Purification of lipase produced by a new source of Bacillus in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. *J. Chromatography B*, v. 879, p. 3853–3858, 2011a.

BARBOSA, J.M.P.; SOUZA R.L.; MELO, C.M.; FRICKS, A.T.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Biochemical characterisation of lipase from a new strain *Bacillus* sp. ITP-001. *Quimica Nova*. 2011b (Article impress).

CABRERA-PADILLA, R.Y.; LISBOA, M.C.; FRICKS, A.T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A.S.; SILVA, D.P.; SOARES, C.M.F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate): a new eco-friendly support. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 39(2), p. 289-298, 2012.

DA RÓS, P.C.M.; SILVA, G.A.M.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technol*. v.101, p.5508–5516, 2010.

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

DOSANJH, N.S.; KAUR, J. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp. *Biotechnol. Appl. Biochem*, v. 36, p. 7–12, 2002.

FEITOSA, I.C.; BARBOSA, J.M.P.; ORELANA, S.C.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. *Acta Scienctarum Technol*. v. 32, p. 27-31, 2010.

GODOY, C.A.; DE LAS RIVAS, B.; FILICE, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; PALOMO, J.M. Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers. *Process Biochem*. v.45, p.534–541, 2010.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, v. 68, p. 1-21, 2011.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans:* statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem*. v.42, p.518–526, 2007.

KANWAR, S.S.; CHAUHAN, G.S.; CHIMNI, S.S.; KUMAR, Y.; RAWAT, G.S.; KAUSHAL, R.K. Methacrylic acid and dodecyl methyacrylate (MAc-DMA) hydrogel for enhanced catalytic activity of lipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375. *J. App. Polym. Sc*. v.100, p.1420–1426, 2006.

KARIMPIL, J.J.; MELO, J.S.; D'SOUZA, S.F. Hen egg white as a feeder protein for lipase immobilization. *J. Mol. Catal. B-Enzym*, v. 71, p. 113–118, 2011.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment. *Enz. Microbiol. Technol.* v.26, p. 509-515, 2000.

MENDES, J.B.E.; RIEKES, M.K.; OLIVEIRA, V.M.; MICHEL, M.D.; STULZER, H.K., KHALIL, N.M.; ZAWADZKI, S.F.; MAINARDES, R.M.; FARAGO, P.V. PHPV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes. *The Scientific World J*. Volume 2012, Article ID 542937, 13 pages doi:10.1100/2012/542937

NAWANI, N.; SINGH, R.; KAUR, J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron. J. Biotechnol*, v. 9, p. 559–565.

PAHUJANI, S.; KANWAR, S.S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Bioresour. Technol*. v.99, p.2566–2570, 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization anp applications of lipases. *Biotechnol. Adv*., *Oxford,* v.19, p.627–662, 2001.

SOARES, C.M.F; DE CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v.77-79, p.745-758, 1999.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; DE CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v.113 p.307-319, 2004.

YADAV, G.D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in non-aqueous medium. *Micropor. Mesopor. Mater*, v.86, p.215–222, 2005.

YIGITOGLU, M.; TEMOCIN, Z. Immobilization of Candida rugosa lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, v. 66, p. 130–135, 2010.