

Esterificación quimioselectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas

Chemoselective transesterification of wood sterols by lipases

Andrés Illanes¹, Lorena Álvarez², Gregorio Álvaro³

Resumen

La esterificación selectiva de fitosteroles de madera representa una aplicación novedosa de las lipasas, que se inscribe dentro de una plataforma tecnológica de valoración del licor negro en el proceso Kraft. Los fitosteroles de madera son mezclas de esteroides y estanoles (esteroides saturados) donde más del 90% es β -sitosterol y β -sitostanol. Ambos productos tienen mercados potenciales diferentes por lo que el fraccionamiento de los fitosteroles que los contienen implica un valor agregado considerable. Ambas sustancias son muy similares, lo que impide su separación por métodos físicos, siendo la esterificación selectiva de esta mezcla con ésteres de ácidos grasos mediante lipasas quimioselectivas una interesante opción tecnológica para separarlas. Se evaluaron diversas lipasas comerciales en su capacidad de esterificar selectivamente los estanoles, seleccionándose una enzima inmovilizada y una no soportada. Se optimizó el proceso con la enzima inmovilizada obteniéndose grados de esterificación de estanoles por sobre el 90% y de esteroides en torno al 20%, lo que satisface el criterio de selectividad establecido. La enzima inmovilizada comercial tuvo baja estabilidad operacional debido a la desorción de la proteína por lo que se desarrollaron estrategias de inmovilización de la lipasa comercial no soportada, obteniéndose los mejores resultados con butil Sepabeads® como soporte. Con dicho biocatalizador se realizó la reacción de transesterificación en modalidad de lotes repetidos demostrándose la elevada estabilidad de la enzima y comprobándose que es posible realizar cinco lotes productivos sin merma de la conversión ni de la productividad, lo que satisface los criterios de rentabilidad del proceso. La tecnología ha sido transferida al sector productivo y se ha presentado una patente de invención sobre la elaboración del biocatalizador.

Palabras clave: lipasa, transesterificación enzimática, ésteres de estanol, enzima inmovilizada

Abstract

The chemoselective transesterification of wood sterols is a novel type application of lipases that is considered within a technological platform for the upgrading of black liquor from the Kraft pulping process. Wood sterols are a mixture of sterols and stanols (saturated sterols) in which more than 90% is represented by β -sitosterol and β -sitostanol. Both products are oriented to different markets, representing the fractiona-

1 Profesor Titular, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. aillanes@ucv.cl

2 Investigadora asociada, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. lorenaangelica@msn.com

3 Profesor Asociado. Departamento de Ingeniería Química. Universitat Autònoma de Barcelona. Gregorio.Alvaro@uab.cat

tion of the wood sterols a significant added value. Both substances are structurally similar which precludes its separation by physical operations, being its fractionation by chemoselective esterification with lipases a very appealing strategy. Several commercial lipases were evaluated in their capacity for the selective transesterification of stanols and two of them were selected: one immobilized and one non-supported. The process was optimized with the immobilized lipase obtaining more than 90% esterification of sterols with around 20% esterification of sterols, which satisfied the criterion of selectivity. The immobilized enzyme was however poorly stable because of protein desorption during the reaction; therefore, several strategies of immobilization of the non-supported lipase were developed, best results being obtained with butyl Sepabeads® as support. The selected biocatalyst was tested in the sequential batch reaction of transesterification, proving that the biocatalyst can be used for five sequential batches with very little loss of activity and insignificant reduction in conversion and productivity, which satisfies the profitability criterion of the process.

Key words: Lipase, enzymatic transesterification, wood sterols, stanol esters, immobilized enzyme.

Recibido: mayo 9 de 2008

Aprobado: mayo 21 de 2008

Introducción

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de acilglicérols conformados por ácidos grasos de cadena larga, que actúan preferentemente en interfaces agua-aceite y que, por lo general, disponen de una estructura peculiar en torno al sitio activo conocida como “tapadera” (Jensen y Hamosh, 1996; Nardini et ál., 2000). Esta definición, más bien fisiológica, no refleja el potencial catalítico de las lipasas que pueden también catalizar reacciones de remoción de ácidos carboxílicos de una gran variedad de compuestos. Más importante aún, las lipasas pueden catalizar en medios de baja actividad de agua reacciones reversas de esterificación de ácidos grasos y glicerol (y otros alcoholes) (Yadav y Devi, 2004), de interesterificación entre ésteres (Bloomer et ál., 1990; Osorio et ál., 2005) o entre ácidos carboxílicos y alcoholes (Reyes et ál., 1994), y transesterificación entre ésteres y alcoholes (Houssam et ál., 2004). Actualmente las lipasas son el grupo de enzimas más estudiadas como catalizadores en reacciones de síntesis, y no menos de un tercio de los trabajos publicados sobre el tema se refieren a ellas. En efecto, las lipasas son enzimas particularmente bien dotadas para actuar en ambientes no convencionales (no acuosos) como los usualmente requeridos

para llevar a cabo reacciones de síntesis (Klibanov, 1997; Hari Krishna y Karanth, 2002; Reetz, 2002).

Las lipasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza siendo sintetizadas por células animales (Houde et ál., 2004), vegetales (Caro et ál., 2002) y microbianas (Hasan et ál., 2006). Lipasas fungales de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, y lipasas bacterianas de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* y *Chromobacterium viscosum* son las de mayor relevancia tecnológica y se encuentran comercialmente disponibles, tanto en forma libre como inmovilizada (Jaeger y Reetz, 1998; Christensen et ál., 2003; Gupta et ál., 2004). La ubicuidad de las lipasas hace que continuamente se reporten nuevos organismos potencialmente productores (Wang et ál., 1995; Demirjian et ál., 2001; Gupta et ál., 2004; Hasan et ál., 2006) y fuentes metagenómicas (Henne et ál., 2000; Kourist et ál., 2007; Bertram et ál., 2008). De acuerdo con su origen, las lipasas poseen propiedades muy variadas en cuanto a especificidad, selectividad, tolerancia térmica y dependencia del pH (Saxena et ál., 2003). La naturaleza extracelular de muchas lipasas y las técnicas de ingeniería genética e ingeniería de proteínas hacen actualmente posible su producción en gran escala mediante la sobreexpresión en hospederos adecuados

(Misset et ál., 1994; Schmidt-Dannert, 1999; Svedensen, 2000; Cos et ál., 2005).

Las lipasas, a diferencia de las esterasas, son activadas en presencia de interfaces (activación interfacial) (Brzozowski et ál., 1991), y frecuentemente poseen una estructura peculiar en el sitio activo, ya que disponen de una cadena polipeptídica en su vecindad (tapadera o *lid*) que puede replegarse sobre el sitio activo, bloqueándolo. Esta característica condiciona la funcionalidad de la enzima a la existencia de un microambiente hidrofóbico que permita el desplegamiento de la tapadera dejando accesible el sitio activo (Petkar et ál., 2006; Secundo et ál., 2006). Puede considerarse que la enzima existe en un equilibrio configuracional entre una forma cerrada inactiva y una forma abierta (Thomas et ál., 2005), como se esquematiza en la figura 1. Tal equilibrio puede ser desplazado hacia la forma activa por la presencia de un microambiente hidrofóbico que puede ser una interfaz aceite-agua o una superficie hidrofóbica activa (Fernández-Lorente et ál., 2001; Palomo et ál., 2003-2005).

Como consecuencia de su estructura, las lipasas están especialmente condicionadas para actuar en medios no convencionales, tales como sistemas bifásicos y monofásicos en presencia de solventes orgánicos (Cui et ál., 1997; Matsumoto et ál., 2001; Plou et ál., 2002; Alcántara et ál., 2005; Li et ál., 2007), líquidos iónicos (Wassercheid y Keim, 2000; Madeira Lau et ál., 2000; Kamal y Chouhan, 2004; Ha et ál., 2007), en medios supercríticos (Laudani et ál., 2007) y gaseosos (Cameron et ál., 2002) donde el contenido de agua puede ser muy escaso exacerbándose de este modo su potencial de síntesis por sobre el de hidrólisis. La actividad del agua es una variable clave en estos medios de reacción siendo deseable su control durante la reacción de síntesis (Berglund 2001). La actividad de agua no sólo afecta la actividad y estabilidad de las lipasas, sino que también su enantioselectividad (Matsumoto et ál., 2001; Wehtje and Adlercreutz, 1997; Bornscheuer 2002). A fin de poder actuar eficientemente en tales medios, se requiere de lipasas activas y estables que se desempeñen con alta selectividad, lo que puede lograrse mediante diferentes es-

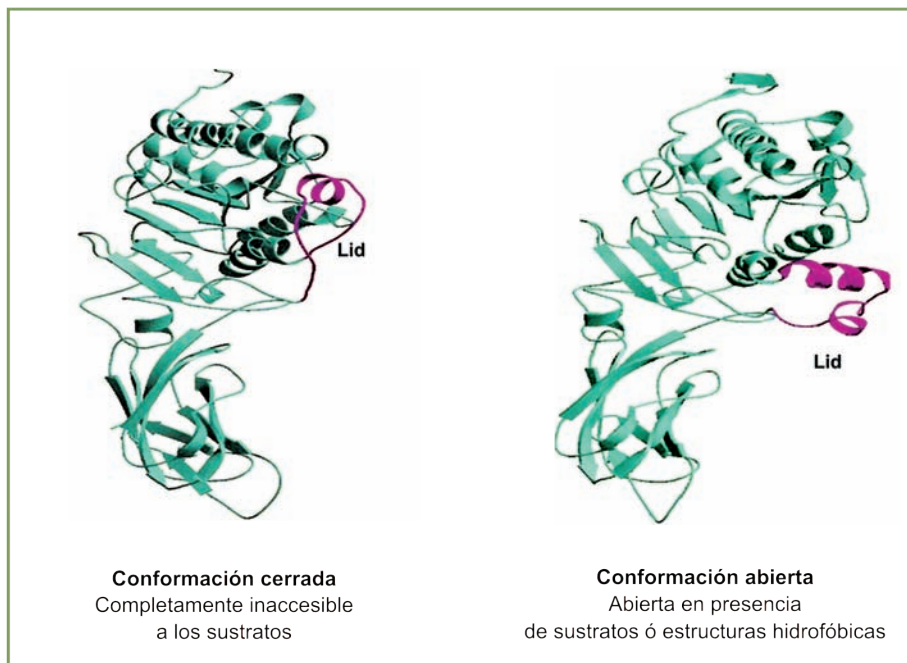


Figura 1. Esquema de las diferentes conformaciones presentada por las lipasas.

trategias que contemplan desde técnicas de ingeniería de proteínas: mutagénesis sitio dirigida (Magnusson et ál., 2001; Rotticci et ál., 2001) y evolución acelerada (Petrounia y Arnold, 2000; Jaeger et ál., 2001; Fujii et ál., 2005; Nakagawa et ál., 2007), hasta técnicas de ingeniería del biocatalizador: inmovilización a soportes mediante adsorción (Manjón et ál., 1991; Balcao et ál., 1996; Villeneuve et ál., 2000; Hiol et ál., 2000) y enlace covalente (Hung et ál., 2003; Salis et ál., 2003; Hsu et ál., 2004; Palomo et ál., 2002, 2003, 2005; de Lathouder et ál., 2005; Petkar et ál., 2006), y auto-inmovilización mediante entrecruzamiento y agregación por cristalización (CLEC) (Lalonde et ál., 1995; Rajan y Abraham, 2008) o precipitación (CLEAs) (López-Serrano et ál., 2002; Schoevaart et ál., 2004; Wilson et ál., 2006; Yu et ál., 2006), que permiten incrementar la estabilidad del biocatalizador y su eficiencia de uso (Sharma et ál., 2001). La inmovilización de lipasas mediante enlace covalente presenta la ventaja de evitar la desorción de la enzima e incrementar su estabilidad térmica; sin embargo, la desorción no es significativa cuando se trabaja a bajas actividades de agua, en cuyo caso la inmovilización por adsorción es una alternativa interesante. CLEA de lipasas han mostrado ser biocatalizadores de excelentes propiedades, con la ventaja sobre los CLEC de su menor costo por no requerirse de una enzima de alta pureza. Han sido empleados con éxito en la producción de biodiesel (Kumari et ál., 2007) y de ibuprofeno en cuyo caso la enantioselectividad de la enzima se vio incrementada debido a la inmovilización (Yu et ál., 2004).

Las lipasas son enzimas robustas que pueden catalizar una amplia gama de reacciones químicas, muchas de las cuales son de alto impacto o potencial tecnológico (Straathof et ál., 2002). Aún teniendo en la actualidad un mercado de menor tamaño que las proteasas y las amilasas (Hasan et ál., 2006), las lipasas representan las enzimas de mayor potencial comercial, vinculado a sus aplicaciones en síntesis orgánica (Saxena et ál., 1999). Las lipasas han sido empleadas en su potencial hidrolítico en

forma convencional en diversas aplicaciones en el área alimentaria (Seitz 1974; Tombs 1995; Jaeger y Reetz, 1998) y más recientemente en la formulación de detergentes y productos de limpieza (Sharma et ál., 2001), y en el proceso de pulpaje de madera (Jaeger y Reetz, 1998). Su mayor potencial sin embargo radica en sus aplicaciones a la industria de síntesis orgánica donde existe un gran número de reacciones de interés factibles de ser catalizadas por lipasas (Faber 1997; Kazlauskas y Bornscheuer, 1998), aprovechando sus excelentes cualidades de selectividad y especificidad en la producción de compuestos quirales enantioméricamente puros (tales como productos farmacéuticos y agroquímicos), y en la resolución cinética de mezclas racémicas respectivamente (Archelas y Furstoss 1997; Roberts y Williamson 1997; Rubin y Dennis 1997; Jaeger y Reetz 1998; Roberts 1998; Ghanem y Aboul-Enein 2004-2005). Artículos de revisión muy completos sobre este aspecto han sido publicados recientemente (Houde et ál., 2004; Hasan et ál., 2006). Particularmente relevante es la aplicación de lipasas en la producción de biodiesel mediante transesterificación de aceites naturales, lo que permite reducir el consumo de combustibles fósiles y la emisión de CO₂ (Knothe et ál., 2005; Li et ál., 2007). El estado tecnológico actual de la producción enzimática de biodiesel ha sido recientemente analizado (Salis et ál., 2007).

El gran desarrollo de los aspectos relativos a la producción y utilización de lipasas experimentado en los últimos años permite pronosticar que nuevas aplicaciones serán vigorosamente desarrolladas en los próximos años en el campo de la síntesis orgánica. El presente trabajo se refiere precisamente a una de aquellas aplicaciones novedosas, cual es la transesterificación selectiva de fitosteroles de madera mediante lipasas.

La industria de celulosa es de gran relevancia para la economía chilena. El proceso Kraft de producción de pulpa de celulosa produce diversos residuos, entre ellos el licor negro, que debe necesariamente ser tratado o valorizado para reducir su impacto ambiental

(Johansson, 1982). Se ha desarrollado en Chile una plataforma tecnológica para el fraccionamiento y aprovechamiento integral de este residuo, como lo muestra la figura 2.

La fracción pesada luego de la destilación del *pitch*, es una mezcla de esteroides saturados (estanoles) y mono-insaturados, cuyas estructuras se muestran en la figura 3. Dicha mezcla tiene un gran potencial por cuanto los ésteres de estanol han demostrado reducir las lipoproteínas de baja densidad en el colesterol sanguíneo lo que las convierte en agentes anticolesterolémicos (Nguyen, 1999; Lichtenstein y Deckelbaum, 2001). Productos basados en dichos ésteres, producidos por esterificación química de fitosteroides se encuentran en el mercado desde hace unos años y han tenido gran aceptación pública⁴. Los ésteres de estanoles han sido considerados superiores a los de esteroides, de modo que su separación de la mezcla resulta beneficiosa desde esa perspectiva pero, más aún, por cuanto los esteroides pueden ser empleados como materia prima por la industria farmacéutica en la producción de drogas esteroidales. En efecto, los esteroides de madera ofrecen algunas ventajas respecto a los esteroides de soya, actualmente empleados, en cuanto a disponibilidad y composición más homogénea, según se desprende de los datos presentados en la tabla 1.

El fraccionamiento de los fitosteroides de madera en una fracción rica en esteroides orientada a la industria farmacéutica, y una fracción rica en estanoles orientada a la producción de alimentos saludables es de gran relevancia tecnológica y representa el objetivo del presente trabajo. Dada la similitud estructural y química entre esteroides y estanoles (esteroides insaturados) que puede apreciarse en la figura 3, no resulta factible separar estos componentes ni siquiera empleado la sofisticada tecnología de destilación molecular.

La esterificación no específica de fitosteroides de madera puede llevarse a cabo por

vía química⁵; sin embargo, la esterificación enzimática con ésteres de ácidos grasos empleando lipasas tiene la potencial ventaja de una alta especificidad y moderadas condiciones de operación, características deseables tanto desde la perspectiva misma del proceso productivo como desde una perspectiva ambiental. La esterificación selectiva de la fracción de estanoles en los fitosteroides de madera mediante lipasas aparece entonces como una opción tecnológica relevante ya que los compuestos esterificados y no esterificados pueden ser convenientemente separados mediante destilación molecular. El presente trabajo se refiere a la selección y evaluación de biocatalizadores enzimáticos para la transesterificación selectiva de la fracción de estanoles en los fitosteroides de madera.

Materiales y métodos

Materiales

Lipasas QL y QLG fueron proporcionadas por Meito Sangyo Co., Ltd. (Japón). Lipasa QL es producida en forma extracelular por *Alcaligenes* sp. PL-266, y Lipasa QLG corresponde a un preparado de Lipasa QL inmovilizado en tierra de diatomeas granulada (celita tipo G). Accurel MP-1000 ® fue proporcionado por Membrana GmbH Accurel Systems, glioxil agarose y polietilenimina-glioxil agarose por Iberagar, Portugal, octil agarose por Amersham Pharmacia Biotech, EE.UU.; Cellite 580® por Celite Chile S.A., Eupergit C® y Eupergit C250L® por Röhm Pharma Polymers, Alemania; quitosano por Sigma Co, EE.UU., butil Sepabeads® y octadecil Sepabeads® por Resindion S.R.L, Italia. Todos los reactivos y solventes usados fueron de grado analítico. Los esteroides de madera y metil ésteres de ácidos grasos utilizados en la reacción de transesterificación fueron proporcionados por Härting S.A., Chile.

4 www.benecol.com

5 www.freshpatents.com/Phytosterol-esterification-product-and-method-of-make-same-dt20070628ptan20070148311.php

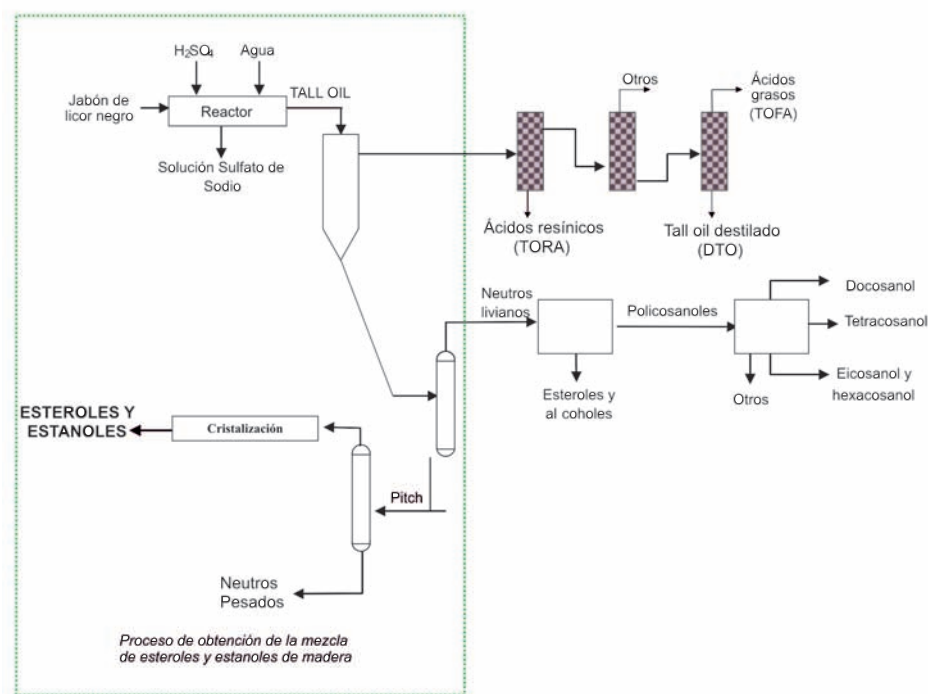


Figura 2. Esquema del proceso de revalorización del jabón de licor negro desarrollado por la empresa Härting S.A. El recuadro muestra el proceso de obtención de la mezcla de esteroles y estanoles de madera.

Tabla 1. Composición media de la mezcla de esteroles y estanoles en fitosteroles de madera y de soya

Compuesto	Porcentaje en peso	
	Fitosteroles de madera	Fitosteroles de soya
β -sitosterol	75	50
Campesterol	7	25
Stigmasterol	< 1	20
Brasicasterol	-	3
β -sitostanol	15	2
Campestanol	2	< 1

Métodos

La proteína en la solución enzimática fue determinada mediante Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino como estándar. La determinación de la proteína inmovilizada se realizó por diferencia entre el contenido to-

tal de proteína en la solución enzimática inicial contactada y la proteína final soluble una vez terminado el proceso de inmovilización.

La actividad de hidrólisis de la enzima libre e inmovilizada se determinó mediante el método de Fukuda (Fukuda et ál., 1996) basado en

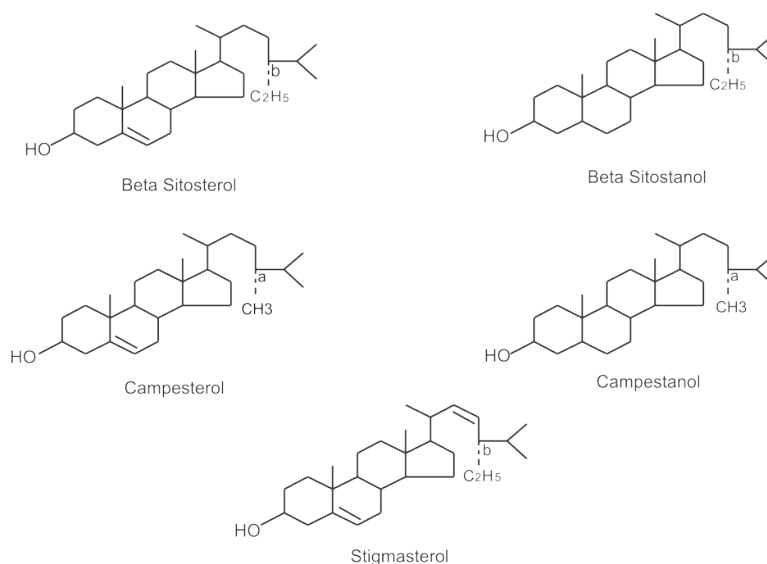


Figura 3. Estructura química de esteroides y estanoles de madera.

la medición de la velocidad inicial de hidrólisis de p-nitrofenil acetato mediante cuantificación espectrofotométrica a 320 nm del p-nitrofenol producido. Una unidad internacional (UI) de actividad se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto a partir de p-nitrofenil acetato 0,24mM a pH 7,0 y 30 $^{\circ}\text{C}$.

El pretratamiento de la lipasa de *Alcaligenes sp.* PL-266 con NaIO_4 se realizó conforme a lo previamente reportado por Wilson et al. (2006), con el fin de impedir la agregación enzimática y producir una mayor apertura del sitio activo previo a la inmovilización.

Los soportes empleados en la inmovilización, y algunas de sus características principales se muestran en la tabla 2.

La inmovilización en Cellite 580®, quitosano, Eupergit C®, Eupergit C250L®, polietilimina -glicoxil agarose, octil agarose, butil Sepabeads®, octadecil- Sepabeads y Accurel -1000 ® se realizó contactando entre 0,25 y 50 mg de lipasa pretratada por g de soporte hasta que la concentración de proteínas en la

solución alcanzó un valor constante, para luego retener los sólidos en filtro Millipore N° 3 y lavarlos con abundante agua destilada hasta eliminar toda la proteína no inmovilizada. La inmovilización en glicoxil agarose se realizó de acuerdo con lo previamente reportado por Guisán et ál. (1997).

Las reacciones de transesterificación en medio anhidro se llevaron a cabo en un reactor Eurostar de 2 L con agitación a 200 rpm en las condiciones indicadas para cada experimento. Los fitosteroides de madera fueron disueltos en los ésteres de ácidos grasos en una relación másica 1:5, iniciándose la reacción mediante la adición de la lipasa en la cantidad y condiciones establecidas en cada experimento. Se tomaron muestras en forma periódica para su análisis por cromatografía de gases, y luego de 30 h de reacción el biocatalizador fue recuperado, lavado con hexano y secado a temperatura ambiente para eliminar el solvente. Finalmente se determinó el porcentaje de recuperación del biocatalizador y su actividad esterásica remanente. La determinación de esteroides y estanoles se realizó por cromatografía gaseosa

Tabla 2. Soportes preseleccionados para la inmovilización de lipasa QL

Soporte	Tipo de interacción con la enzima
Cellite 580®	Adsorción
Glioxil agarose	Unión covalente multipuntual
Eupergit C®	Unión covalente multipuntual
Eupergit C250L®	Unión covalente multipuntual
Quitosano	Unión covalente multipuntual
Poletilenimina -glioxil agarose	Adsorción iónica
Octil agarose	Adsorción interfacial hidrofóbica
Butil Sepabeads®	Adsorción interfacial hidrofóbica
Octadecil Sepabeads®	Adsorción interfacial hidrofóbica
Accurel MP-1000 ®	Adsorción interfacial hidrofóbica

utilizando un cromatógrafo HP 6890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA) equipado con un detector de ionización (FID) y columna HP-5 (fenil metil silicona entrecruzada al 5%) 30 cm · 0,25 mm · 0,88 µm. Se utilizó helio 68,4 (64 cm/s) como gas transportador y colesterol como patrón interno. La cuantificación del grado de transesterificación, definida como porcentaje de conversión, se determinó a partir de la desaparición de estanoles y esteroides libres (no esterificados) en la mezcla reactante. Los porcentajes de conversión de los estanoles y de los esteroides libres a los respectivos productos esterificados a distintos tiempos de reacción de transesterificación en las condiciones antes mencionadas se determinaron mediante la Ec. 1:

$$X = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1}$$

donde:

C_0 = concentración inicial de estanoles (o esteroides) en la mezcla reactante.

C_t = concentración de estanoles (o esteroides) libres en la mezcla reactante a tiempo t de transcurrida la reacción.

X = porcentaje de conversión de estanoles (o esteroides) a los respectivos ésteres.

Resultados y discusión

La conceptualización del proceso de transesterificación enzimática selectiva de fitosteroides de madera se presenta en la figura 4. La mezcla de fitosteroides de madera es transesterificada selectivamente en un reactor enzimático (RE) con lipasa y metil o etil ésteres de ácidos grasos produciéndose la esterificación selectiva de los estanoles, como lo muestra la figura 5. Luego de la reacción, la mezcla es separada mediante destilación a vacío (DV), obteniéndose por tope los ácidos grasos y el alcohol, y por fondo la mezcla de estanoles esterificados y esteroides no esterificados, los que pueden ser ahora separados por destilación molecular (DM), obteniéndose por tope los esteroides no esterificados que pueden ser recuperados para su uso como materia prima en la producción de hormonas esteroidales mediante bioconversión, y por fondo los estanoles esterificados que pueden ser recuperados para su uso en la formulación de alimentos nutracéuticos.

Selección de lipasas

Diferentes preparados de lipasas comerciales disponibles fueron caracterizados en su capacidad de catalizar la reacción de transesterificación de fitosteroides de madera con ésteres de

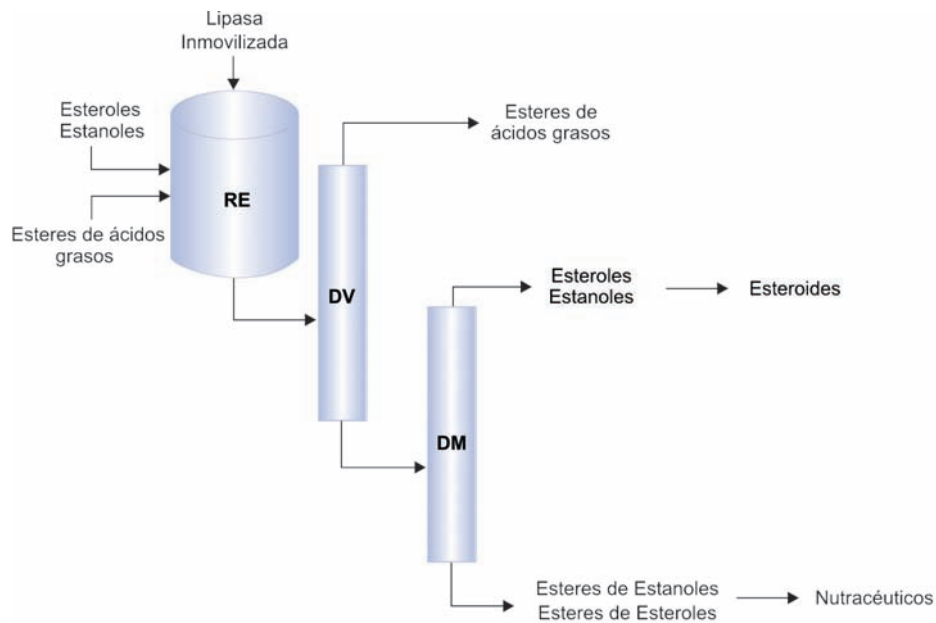


Figura 4. Conceptualización del proceso de transesterificación enzimática selectiva de fitosteroles de madera. RE: reactor enzimático; DV: destilador a vacío; DM: destilador molecular.

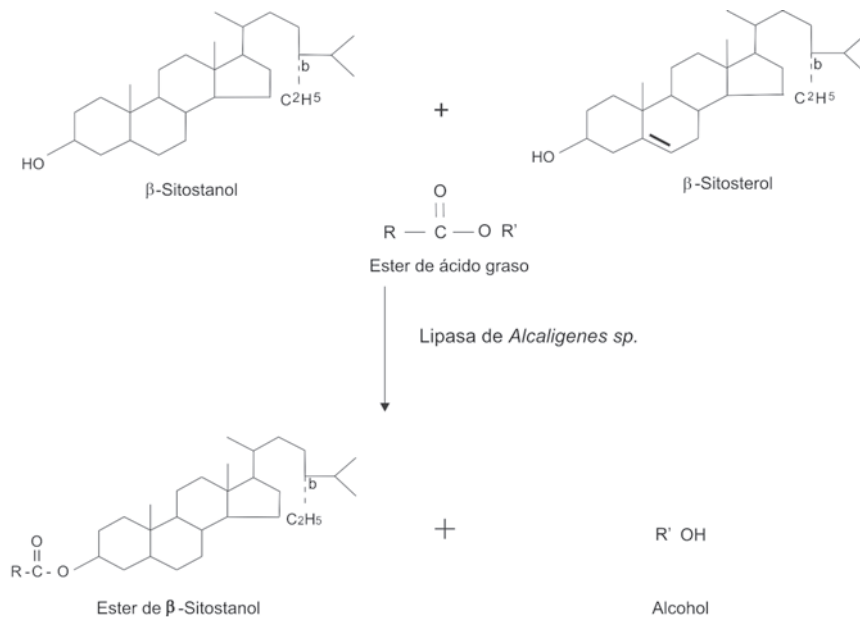


Figura 5. Reacción de transesterificación enzimática selectiva de fitosteroles de madera.

ácidos grasos, seleccionándose los diecinueve que se muestran en la tabla 3 (Martínez et ál., 2004).

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de transesterificación selectiva de estanoles en los fitosteroles, considerando como selectivas

a aquellas enzimas capaces de transesterificar más de un 80% de los estanoles presentes y menos de un 30% de los esteroides presentes. De todas las enzimas analizadas solamente los preparados QLG y QL de *Alcaligenes sp* satisficieron el criterio de selectividad establecido

Tabla 3. Enzimas comerciales con capacidad de transesterificar fitosteroles de madera

Enzima	Fuente	Proveedor	Presentación
Lipase QLG	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas granuladas
Lipase QLC	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas
Lipase QL	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	Polvo crudo
Lipase SL	<i>Pseudomona cepacia</i> SL-25	Meito Sangyo	Polvo crudo
Lipase UL	<i>Rhizopus sp.</i> Q 119	Meito Sangyo	Polvo crudo
Lipase TL	<i>Pseudomona stutzeri</i> PL-836	Meito Sangyo	Polvo crudo
Lipase PLG	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas granuladas
Lipase PLC	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas
Lipase ALG	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas granuladas
Lipase ALC	<i>Achromobacter sp.</i>	Meito Sangyo	Inmovilizada en tierra de diatomeas
Lipolyve AN	<i>Aspergillus niger</i>	Lyven	Polvo soluble en agua
Lipolyve CC	<i>Candida cylindracea</i>	Lyven	Polvo soluble en agua
Lipolyve R	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lyven	Polvo soluble en agua
Lipase PS-D "Amano" I	<i>Pseudomona cepacia</i>	Amano	Inmovilizada en tierra de diatomeas
Lipase PS-C "Amano" I	<i>Pseudomona cepacia</i>	Amano	Inmovilizada en partículas cerámicas
Lipase PS-C "Amano" II	<i>Pseudomona cepacia</i>	Amano	Inmovilizada en partículas cerámicas
Validase Fungal Lipase 8000	<i>Rhizopus oryzae</i> (ATCC 1996)	Valle y Research	Polvo crudo
Lipolase 100 T		Novo	Inmovilizada
Lipozyme		Novo	Inmovilizada

(Fuenzalida et ál., 2006) por lo que fueron seleccionadas para los estudios posteriores.

Selección del agente de esterificación

Metil y etil ésteres de ácidos grasos de aceites comerciales de coco, girasol y raps (colza) fueron evaluados bajo el criterio de mayor productividad (g de ésteres de estanoles producidos

por unidad de volumen de reacción y de tiempo) atendiendo a satisfacer en todos los casos el criterio de selectividad. La reacción fue realizada en condiciones previamente establecidas como adecuadas para la transesterificación no selectiva de fitosteroles (Martínez et ál., 2004): 5% de lipasa respecto a fitosteroles de madera, 60 °C, 20 mbar de presión y actividad inicial de agua del biocatalizador 0,75. La reacción de transesteri-

ficación ocurre en medio anhidro (sin adición de agua) actuando el propio sustrato (éster de ácidos grasos) como solvente y debe necesariamente conducirse a vacío para remover el alcohol (metanol o etanol) producido dado su marcado efecto inhibitorio sobre la actividad de lipasa (reacciones realizadas a presión atmosférica conducen a conversiones por debajo del 40%). De los seis agentes de esterificación empleados, los mejores resultados fueron obtenidos con metil ésteres de aceite de raps el que fue seleccionado para los estudios posteriores. En general se obtuvieron mejores resultados con metil que con etil ésteres con la ventaja adicional de la mayor volatilidad del alcohol correspondiente, lo que facilita su eliminación del reactor enzimático.

Optimización de la reacción de transesterificación con lipasa QLG

Se realizó un diseño experimental considerando las variables y los rangos de trabajo indicados en la tabla 4 empleando la lipasa QLG de *Alcaligenes sp* inmovilizada en Cellite G®. La función objetivo por optimizar fue la productividad específica, bajo la restricción del cumplimiento del criterio de selectividad antes indicado. Las condiciones operacionales óptimas obtenidas se entregan en la mencionada tabla 4. En tales condiciones se obtuvo un 93% de esterificación de estanoles y un 23% de esterificación de esteroides. La cinética de transesterificación en las condi-

ciones óptimas se presenta en la figura 6. Como puede apreciarse, la especificidad por estanoles no es absoluta, y en verdad se trata de una resolución de tipo cinético ya que, dado suficiente tiempo, más del 40% de los esteroides pueden ser también esterificados. Resultados similares fueron obtenidos con la lipasa soluble de *Alcaligenes sp* (lipasa QL) excepto que la esterificación tanto de estanoles como esteroides fue algo inferior: 88 y 20% respectivamente.

Aunque los resultados obtenidos con QLG fueron satisfactorios y cumplieron los requisitos de selectividad establecidos, la estabilidad operacional de la enzima, evaluada en lotes sucesivos de reacción, fue sorprendentemente baja, debido a la desorción de casi el 90% de la proteína enzimática durante el primer lote, lo que fue comprobado mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). Ello no era anticipable ya que, no obstante que la inmovilización en Cellite es sólo por adsorción, la condición del medio de reacción es virtualmente anhidra. En tal circunstancia, el uso de enzima inmovilizada es de escaso interés ya que puede lograrse esencialmente el mismo resultado con la enzima soluble (cuyo costo es inferior). No obstante, la economía del proceso hace necesaria la recuperación de la enzima y un ciclo de vida útil no inferior a cinco lotes. Se planteó entonces la opción de inmovilizar la lipasa QL a fin de obtener un biocatalizador más estable y factible de ser recuperado al cabo de la reacción.

Tabla 4. Variables, rangos de trabajo y condiciones óptimas obtenidas en la optimización de la reacción de transesterificación con lipasa QLG de fitosteroides de madera (EM) con metiléster de ácidos grasos de aceite de raps (MEAG)

Variable	Rango de Estudio	Valor óptimo
Razón QLG-EM (g/g)	0,01 - 0,1	0,03
Razón MEAG/EM (g/g)	1 - 5	5
Temperatura (°C)	50 - 80	70
Presión (mbar)	20 - 100	50
Actividad de agua inicial	0,11 - 0,95	0,75

Inmovilización de lipasa QL

La inmovilización de lipasas es un tema de gran actualidad y diversos sistemas han sido propuestos recientemente (Petkar et ál., 2006; Wilson et ál., 2006; Chiou et ál., 2007; Sheldon et ál., 2007; Rodrigues et ál., 2008). La naturaleza hidrofóbica del sitio activo de la lipasa sugiere el uso de matrices hidrofóbicas para su inmovilización (Wilson et ál., 2005; Mateo et ál., 2007); no obstante, se evaluaron diversos sistemas de inmovilización, resumiéndose los resultados obtenidos en la tabla 5. Como puede apreciarse, los mejores resultados se obtuvieron en la inmovilización en soportes hidrofóbicos (octadecil Sepabeads®, butil Sepabeads® y octil agarose) observándose incluso el fenómeno de activación interfacial, siendo seleccionados para los estudios posteriores octil agarose y butil Sepabeads®. La actividad específica pudo ser sustancialmente incrementada al aumentar la carga de proteína al soporte, según se muestra en la tabla 6; sin embargo, en estas condicio-

nes no se observó el fenómeno de activación interfacial.

Lipasa QL inmovilizada en butil Sepabeads® a una carga de 1,75 mg proteína/g fue seleccionada como el biocatalizador más adecuado para realizar la reacción de transesterificación, por tener la mayor actividad específica a un rendimiento de inmovilización aún bastante alto. Adicionalmente, el biocatalizador obtenido es robusto y fácil de manipular. La estabilidad operacional del biocatalizador seleccionado fue entonces evaluada en la transesterificación de fitosteroles de madera en la modalidad de lotes sucesivos, empleando las mismas condiciones operacionales evaluadas como óptimas con lipasa QLG. A modo de ejemplo, en la figura 6 se muestra la cinética de la reacción del segundo lote. Los resultados obtenidos en los lotes sucesivos se resumen en la tabla 7. Como puede apreciarse, la recuperación del biocatalizador fue muy alta, y la desorción de proteína desde la matriz fue insignificante. Luego de

Tabla 5. Inmovilización de lipasa QL. R_P: rendimiento de inmovilización de proteína (mg proteína inmovilizada/mg proteína contactada); R_E: rendimiento de inmovilización enzimática (unidades de actividad, UI*, expresadas en el biocatalizador por unidad de actividad enzimática contactada); AE: actividad específica (unidades de actividad expresadas en el biocatalizador por unidad de masa de biocatalizador)

SopORTE	R _P (%)	R _E (%)	AE (UI/g)
Cellite 580®	80	55	12
Glioxil agarose	37	10	16
Polietilenimina -glioxil agarose	56	47	10
Eupergit C®	52	38	8
Eupergit C250L®	56	39	9
Quitosano	44	33	7
Accurel MP-1000 ®	80	104	22
Octil agarose	100	165	35
Butil Sepabeads®	88	169	36
Octadecil Sepabeads®	96	149	32

* 1 UI fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto desde una solución 0,24 mM de p-nitrofenil acetato a pH 7,0 y 30 °C

Tabla 6. Inmovilización de lipasa QL en octil agarose y butil Sepabeads® a cargas de proteína crecientes (C_p) (mg de proteína contactados/g de soporte). R_p : rendimiento de inmovilización de proteína (mg proteína inmovilizada/mg proteína contactada); R_E : rendimiento de inmovilización enzimática (unidades de actividad, UI*, expresadas en el biocatalizador por unidad de actividad enzimática contactada); AE: actividad específica (unidades de actividad expresadas en el biocatalizador por g de biocatalizador). LIO: lipasa inmovilizada en octil agarose; LIB: lipasa inmovilizada en butil Sepabeads®.

C_p (mg/g)	R_p (%)		R_E (%)		AE (IU/g)	
	LIO	LIB	LIO	LIB	LIO	LIB
0,25	100	88	165	169	35	36
0,75	68	57	78	72	33	29
1	60	46	77	64	42	35
1,25	57	48	71	62	47	39
1,5	51	47	67	62	54	47
1,75	57	47	66	64	55	64
2	50	46	52	54	55	58
2,5	52	40	41	24	61	36
3	50	43	35	21	63	38
5	34	28	21	16	64	40
10	20	16	11	7	64	41

cinco lotes sucesivos, el comportamiento del reactor se mantuvo con muy escasa variación satisfaciendo los criterios de selectividad con una elevada esterificación de estanoles. A partir del lote 6, sin embargo, el grado de esterificación de estanoles (y también de esteroles) se redujo significativamente, llegando a un nivel por debajo de lo aceptable. Los resultados obtenidos han sido validados a través de varias corri-

das del reactor y son satisfactorios por cuanto el biocatalizador puede ser empleado por cinco lotes productivos antes de ser descartado. El proceso está siendo escalado a nivel piloto y transferido a la industria. Hay, sin embargo, espacio para una sustancial mejora del proceso ya que las condiciones operacionales con la lipasa QL inmovilizada en butil Sepabeads® no han sido aún optimizadas.

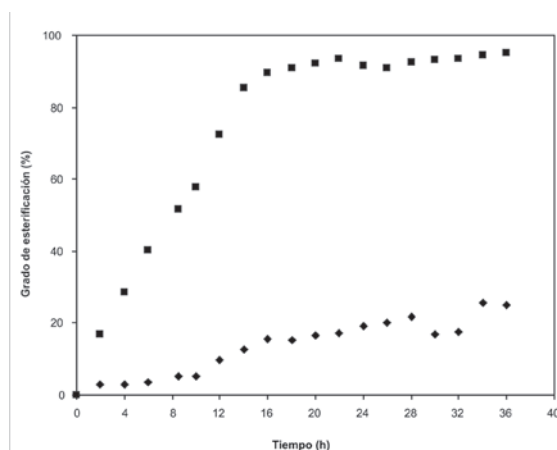


Figura 6. Cinética de esterificación de fitosteroles de madera con lipasa QLG en condiciones óptimas. ■ : estanoles; ◆ : esteroles.

Tabla 7. Operación del reactor de transesterificación en la modalidad de lotes sucesivos con lipasa QL inmovilizada en butil Sepabeads® a 0,03 g enzima/g fitosteroles de madera; 5 moles ésteres de ácidos grasos / mol fitosteroles de madera, 70 °C, 50 mbar y actividad de agua inicial del biocatalizador 0,75.

Lote N°	Esterificación (%)		Razón de esterificación estanol/esterol	Recuperación del biocatalizador (%)	
	Estanoles	Esteroles		Por lote	Acumulativo
1	95	32	3,0	93	93
2	93	30	3,2	96	89
3	96	28	3,4	96	86
4	92	31	3,0	93	80
5	100	27	3,7	91	73
6	73	19	3,8	95	69
7	74	23	3,2	89	61
8	70	11	6,4	91	56
9	66	12	5,5	94	53
10	56	7	8,0	89	46

Conclusiones

La esterificación selectiva de fitosteroles de madera es una aplicación novedosa de las lipasas que ha sido exitosamente aplicada a la separación de fitosteroles de madera en una fracción rica en ésteres de estanoles, orientada a la industria de alimentos saludables, y una fracción rica en esteroles no esterificados, orientada a la industria farmacéutica.

Entre un elevado número de lipasas comerciales disponibles evaluadas se seleccionaron dos lipasas, provenientes ambas de *Alcaligenes* sp, que satisfacían el criterio de selectividad de transesterificación de los estanoles presentes en los fitosteroles de madera.

Luego de optimizado el proceso con la enzima comercial inmovilizada, se obtuvieron conversiones de estanoles superiores al 90% con conversiones de esteroles en torno al 20%, lo que satisfizo ampliamente el criterio de selectividad establecido.

La enzima inmovilizada comercial exhibió una baja estabilidad debido a la desorción de la proteína por lo que se desarrollaron estrategias de inmovilización de la lipasa comercial no soportada, obteniéndose los mejores resultados con butil Sepabeads®, un soporte hidrofóbico que promueve la adecuada configuración del sitio activo de la enzima. La estabilidad del biocatalizador seleccionado fue evaluada en la reacción de transesterificación de fitosteroles de madera en la modalidad de lotes repetidos lográndose un ciclo productivo de 5 lotes sin pérdida significativa de actividad enzimática ni reducción de conversión, productividad y selectividad, lo que satisface los criterios de rentabilidad del proceso. Los resultados han sido transferidos al sector productivo encontrándose en marcha el escalamiento del proceso a nivel piloto. Ha sido presentada una patente de invención referida al proceso de elaboración del biocatalizador obtenido por inmovilización de la lipasa de *Alcaligenes* sp PL-266 a un soporte hidrofóbico activado con grupos butilo (Álvarez et ál., 2007).

Agradecimientos

Trabajo realizado en el marco del Proyecto FONDEF DOOI-1096-0

Referencias bibliográficas

- Alcántara, A.; Domínguez de María, P.; Fernández, M.; Hernaiz, M.; Sanchez-Montero, J.; Sinisterra, J. 2004. Resolution of racemic acids, esters and amines by *Candida rugosa* lipase in slightly hydrated organic media. *Food Technology and Biotechnology* 42 (4): 343-354.
- Alvarez, L.; Iturra, V.; Olivares, A.; Chamy, R.; Markovits, A.; Illanes, A.; Keller, M.; Berrios M.; Markovits, A.; Fuenzalida, M. 2007. Proceso de inmovilización de lipasa de *Alcaligenes* SP.PL-266 sobre un soporte de un polímero orgánico poroso insoluble que contiene grupos activos butilo en su superficie. Número de solicitud de patente: 200401847.
- Archelas, A.; Furstoss, R. 1997. Synthesis of enantiopure epoxides through biocatalytic approaches. *Annual Reviews in Microbiology* 51: 491-525.
- Balcao V.; Paiva A.; Malcata F. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 392-398.
- Berglund P. 2001. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*. 18: 13-22.
- Bertram, M.; Hildebrandt, P.; Weiner, D.; Patel, J.; Bartnek, F.; Hitchman, T.; Bornscheuer, U. 2008. Characterization of lipases and esterases from metagenomes for lipid modification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (1): 47-53.
- Bloomer, S.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. 1990. Triglyceride interesterification by lipases. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (8): 519-524.
- Bornscheuer, U. 2002. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (6): 543-547.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brzozowski, A.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.; Dodson, G.; Lawson, M.; Turkenburg, J.; Bjorkling, F.; Hugenjensen, B.; Patkar, S.; Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.
- Cameron, P.; Davison, B.; Frymier, P.; Barton, J. 2002. Direct transesterification of gases by "dry" immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering* 78 (3): 251-256.
- Caro, Y.; Pina, M.; Turon, F.; Guilbert, S.; Mougeot, E.; Fetsch, D.; Attwool, P.; Graille, J. 2002. Plant lipases: biocatalytic aqueous environment in relation to optimal catalytic activity in lipase-catalyzed synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 77 (6): 693-703.
- Chiou, S.; Hung, T.; Giridhar, R.; Wu, W. 2007. Immobilization of lipase to chitosan beads using a natural cross-linker. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 37: 265-275.
- Christensen, M.; Andersen, L.; Husum, T.; Kirk, O. 2003. Industrial lipase immobilization. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105: 318-321.
- Cos, O.; Resina, D.; Ferrer, P.; Montesinos, J.; Valero, F. 2005. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal* 26: 86-94.
- Cui, Y.; Wei, D.; Yu J. 1997. Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. *Biotechnology Letters* 19: 865-868.
- De Lathouder, K.; Marques Fló, T.; Kapteijn, F.; Moulijn, J. (2005). A novel structured bioreactor: development of a monolithic stirrer reactor with immobilized lipase. *Catalysis Today* 105: 443-447.
- Demirjian, D.; Moris-Varas, F.; Cassidy, C. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 144-151.
- Faber, K. 1997. *Biotransformations in organic chemistry*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Fernández-Lorente, G.; Terreni, M.; Mateo, C.; Bastida, A.; Fernández-Lafuente, R.; Dalmases, P.; Huguet, J.; Guisán, J. 2001. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 389-396.
- Fuenzalida, M.; Markovits, A.; Martínez, I. 2006. Process for producing sterol or stanol esters by enzymatic transesterification in solvent and water free media. *EP 1285969 B1*. Noviembre 10, 2006.
- Fujii, R.; Nakagawa, Y.; Hiratake, J.; Sogabe, A.; Sakata, K. 2005. Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa*

- lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Engineering Design and Selection* 18 (2): 93-101.
- Fukuda, K.; Kuwahata, O.; Kirokawa, Y.; Yanagiuchi, T.; Wakai, Y.; Kitamoto, K.; Inohue, Y.; Kimura, A. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate-hydrolyzing esterase Gene (EST2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82: 8-15.
- Ghanem, A.; Aboul-Enein H. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry* 15 (21): 331-3351.
- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. 2005. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* 17: 1-15.
- Guisan, J.; Bastida, A.; Blanco, R.; Fernandez-Lafuente, R.; Garcia-Junceda, E. 1997. Immobilization of enzymes on glyoxyl supports: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. En: Bickerstaff, G. (ed). *Immobilization of enzymes and cells*. NJ: Humana Press Inc. pp. 277-288.
- Gupta, R.; Gupta, N.; Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 763-781.
- Ha, S.; Lan, M.; Lee, S.; Hwang, S.; Koo, Y. 2007. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 480-483.
- Hari Krishna, S.; Karanth, N. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews* 44 (4): 499-591.
- Hasan, F.; Shah, A.; Hameed, A. 2006. Industrial applications of lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.
- Henne, A.; Schmitz, R.; Gottschalk, G.; Daniel, R. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *E.coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3113-3116.
- Hiol, A.; Jonzo, M.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Co-meau, L. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 421-430.
- Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118(1-3): 155-170.
- Houssam, E.; Perrard, A.; Pierre, A. 2004. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: bi-bi ping-pong kinetics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30 (3-4): 137-150.
- Hsu, A.; Jones, K.; Foglia, T.; Marmer, W. 2004. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnology Letters* 26: 917-921.
- Hung, T.; Giridhar, R.; Chiou, S.; Wu, W. 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 26: 69-78.
- Jaeger, K.; Reetz, M. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16: 396-403.
- Jaeger, K.; Eggert, T.; Eipper, A.; Reetz, M. 2001. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalyst. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 519-530.
- Jensen, R.; Hamosh, M. 1996. Selectivity of lipases, types and determination. En: Malcata, F.K. (ed.). *Engineering of/with lipases*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 17-29.
- Johansson, A. 1982. By-product recovery and valorization in the kraft industry- a review of current trends in the recovery and use of turpentine and tall-oil derivatives. *Biomass*. 2 (2): 103-113.
- Kamal, A.; Chouhan, G. 2004. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure 1,2-diols employing immobilized lipase in the ionic liquid [bmim]PF₆. *Tetrahedron Letters* 45: 8801-8805.
- Kazlauskas, R.; Bornscheuer, U. 1998. Biotransformations with lipases. En: Rehm, H.; Pihler, G.; Stadler, A. (eds.). *Biotechnology* 8. New York: Wiley-VCH. pp. 37-192.
- Klibanov, A. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* 15: 97-101.
- Koeller, K.M.; Wong, C.H. 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232-240.
- Knothe, G.; Van Gerpen, J.; Krahl, J. 2005. *The biodiesel handbook*. Champaign: AOCS Press.
- Kourist, R.; Hari Krishna, S.; Patel, J.; Bartnek, F.; Hitchman, T.; Weiner, D.; Bornscheuer, U. 2007. Identification of a metagenome-derived esterase with high enantioselectivity in the kinetic resolution of arylaliphatic tertiary alcohols. *Organic and Biomolecular Chemistry* 5: 3310-3313.
- Kumari, V.; Shah, S.; Gupta, M. 2007. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high

- free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy Fuels* 21 (1): 368-372.
- Lalonde, J.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Martinez, A.; Visuri, K.; Margolin, A. 1995. Crystals of *Candida rugosa* lipase: highly efficient catalyst for the resolution of chiral esters. *Journal of the American Chemical Society* 117: 6845-6849.
- Laudani, C.; Habulin, M.; Knez, Ž.; Della Porta, G.; Reverchon, E. 2007. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench scale packed-bed reactor study. *Journal of Supercritical Fluids* 41: 74-81.
- Li, X.; Xu, H.; Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 98 (4): 764-771.
- Lichtenstein, A.; Deckelbaum, R. 2001. Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. *Circulation* 103: 1177.
- López-Serrano, P.; Cao, L.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. 2002. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters* 24: 1379-1383.
- Madeira Lau, R.; Van Rantwijk, F.; Seddon, R.; Sheldon, R. 2000. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* 2: 4189-4192.
- Magnusson, A.; Hult, K.; Holmquist, M. 2001. Creation of an enantioselective hydrolase by engineered substrate-assisted catalysis. *Journal of the American Chemical Society* 123: 4354-4355.
- Manjon, A.; Iborra, J.; Arocas, A. 1991. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. *Biotechnology Letters* 13: 339-345.
- Martínez, I.; Markovits, A.; Chamy, R.; Markovits, A. 2004. Lipase-catalyzed solvent-free transesterification of wood sterols. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 112: 55-62.
- Mateo, C.; Palomo, J.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.; Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1451-1463.
- Matsumoto, T.; Takahashi, S.; Kaieda, M.; Ueda, M.; Tanaka, A.; Fukuda, H.; Kondo, A. 2001. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (4): 515-520.
- Misset, O.; Gerritse, G.; Jaeger, K.; Winkler, U.; Colson, C.; Schanck, K.; Lesuisse, E.; Dartois, V.; Blaauw, M.; Ransac, S.; Dijkstra, B. 1994. The structure-function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Engineering* 7 (4): 523-529.
- Nakagawa, Y.; Hasegawa, A.; Hiratake, J.; Sakata, K. 2007. Engineering of *Pseudomonas aeruginosa* lipase by directed evolution for enhanced amidase activity: mechanistic implication for amide hydrolysis by serine hydrolases. *Protein Engineering, Design and Selection* 20 (7): 339-346.
- Nardini, M.; Lang, D.; Liebeton, K.; Jaeger, K.; Dijkstra, B. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family L1 of bacterial lipases. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31219-31225.
- Nguyen, T. 1999. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *Journal of Nutrition*. 129: 2109-2112.
- Osorio, N.; Gusmão, J.; Da Fonseca M.; Ferreira-Dias S. 2005. Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor *European Journal of Lipid Science and Technology* 107 (7-8): 455-463.
- Palomo, J.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. 2002. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 775-783.
- Palomo, J.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Guisán, J.; Fernández-Lafuente, R. 2003. Modification of *Mucor miebei* lipase properties via directed immobilization on different heterofunctional epoxy resins. Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyryl-2-phenylacetic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21: 201-210.
- Palomo, J.; Ortiz, C.; Fernández-Lorente, G.; Fuentes, M.; Guisán, J.; Fernández-Lafuente, R. 2005. Lipase-lipase interaction as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 447-454.
- Petkar, M.; Lali, M.; Caimi, P.; Daminati, M. 2006. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39: 83-90.
- Petrounia, L.; Arnold, F. 2000. Designed evolution of enzymatic properties. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 325-330.
- Plou, F.; Cruces, M.; Ferrer, M.; Fuentes, G.; Pastor, E.; Bernabé, M.; Morten Christensen, M.; Comelles, F.;

- Parra, J.; Ballesteros, A. 2002. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *Journal of Biotechnology* 96: 55-66.
- Rajan, A.; Abraham, T. 2008. Studies on crystallization and cross-linking of lipase for biocatalysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 (2): 87-94.
- Reetz, M. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (2): 145-150.
- Reyes, H.; Hill, C.; Amundson, C. 1994. Interesterification reactions catalyzed by a lipase immobilized on a hydrophobic support. *Journal Food Processing and Preservation* 18 (2): 119-132.
- Roberts, S.; Williamson, N. 1997. Use of enzymes for the preparation of biologically active natural products analogues in optically active form. *Current Organic Chemistry* 1: 1-20.
- Roberts, S. 1998. Preparative biotransformations: the employment of enzymes and whole-cells in synthetic organic chemistry. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 1: 157-170.
- Rodrigues, D.; Mendes, A.; Adriano, W.; Gonçalves, L.; Giordano, R. 2008. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 51: 100-108.
- Rotticci, D.; Rotticci-Mulder, J.; Denman, S.; Norin, T.; Hult, K. 2001. Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *Chem Bio Chem.* 2: 766-770.
- Rubin, B.; Dennis, E. 1997. Lipases part B. Enzyme characterization and utilization. *Methods in Enzymology* 286. San Diego: Academic Press.
- Salis, A.; Monduzzi, M.; Solinas, V. 2007. Use of lipases for the production of biodiesel. En: Polaina, J.; MacCabe, A. (eds). *Industrial enzymes structure, function and applications*. Netherlands: Springer. pp. 317-339.
- Saxena, R.; Ghosh, P.; Gupta, R.; Davidson, S.; Bradoo, S.; Gulati, R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77: 101-115.
- Saxena, R.; Sheoran, A.; Giri, B.; Sheba Davidson, W. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52: 1-18.
- Schmidt-Dannert, C. 1999. Recombinant lipases for biotechnological applications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7: 2123-2130.
- Schoevaart, R.; Wolbers, M.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kieboom, A.; Van Rantwijk, F.; Van der Wielen, L.; Sheldon, R. 2004. Preparation, optimization and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering* 87:754-762.
- Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Gatti-Lafranconi, P.; Brocca, S.; Lotti, M.; Jaeger, K.; Puls, M.; Eggert, T. 2006. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 39: 166-170.
- Seitz, E. 1974. Industrial application of microbial lipases: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 51 (2): 12-16.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. 2001. Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-662.
- Sheldon, R.; Sorgedraeger, M.; Janssen, M. 2007. Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chemistry Today* 25 (1): 62-67.
- Straathof, A.; Panke, S.; Schmid, A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 548-556.
- Svedensen, A. 2000. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 223-238.
- Thomas, A.; Allouche, M.; Basyn, F.; Brasseur, R.; Kerflec, B. 2005. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. *Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 40074-40083.
- Tombs, M. 1995. Enzymes in the processing of fats and oils. En: Tucker, G.; Woods, L. (eds). *Enzymes in food processing*. London: Blackie Academic Professional. pp. 268-291.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J.; Graille, J.; Haas, M. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9: 113-148.
- Wang, Y.; Srivastava, K.; Shen, G.; Wang, H. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 5384). *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79: 433-438.
- Wasserscheid, P.; Keim, W. 2000. Ionic liquids - new "solutions" for transition metal catalysis. *Angewandte Chemie* 39 (21): 3772-3789.
- Wehtje, E.; Adlercreutz, P. 1997. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnology and Bioengineering* 55: 798-806.

- Wilson, L.; Palomo, J.; Fernández-Lorente, G.; Illanes, A.; Guisán, J.; Fernández-Lafuente, R. 2005. Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *Alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (7): 975-980.
- Wilson, L.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Illanes, A.; Guisán, J.; Palomo, J. 2006. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: a simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 750-755.
- Yadav, G.; Devi, K. 2004. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. *Chemical Engineering Science* 59 (2): 373-383.
- Yu, H.; Wu, J.; Ching, C. 2004. Kinetic resolution of ibuprofen catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquids. *Chirality* 17 (1): 16-21.
- Yu, H.; Chen, H.; Wang X.; Ching, C. 2006. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: application to *Candida rugosa* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43 (1-4): 124-127.