



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ILVANIA COSTA VÉRAS**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE LIPASES MODIFICADAS  
PARA MELHORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO  
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Salvador  
2012

**ILVANIA COSTA VÉRAS**

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE LIPASES MODIFICADAS  
PARA MELHORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO  
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de mestra em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Astria Dias Ferrão Gonzales

Salvador  
2012

V479 Véras, Ilvania Costa

Expressão heteróloga de lipases modificadas para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel / Ilvania Costa Véras. – Salvador, 2012.

139 f.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Astria Dias Ferrão Gonzales.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Biodiesel. 2. Lipase. 3. Enzimas. I. Cunha, Vitor Hugo Moreau da. II. Gonzales, Astria Dias Ferrão. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 662.753



---

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**EXPRESSÃO HETEROLÓGA DE LIPASES MODIFICADAS  
PARA MELHORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO  
ENZIMÁTICA DE BIODIESEL.**

Elaborada por:

**ILVANIA COSTA VÉRAS.**

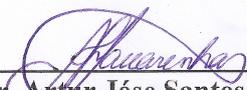
e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

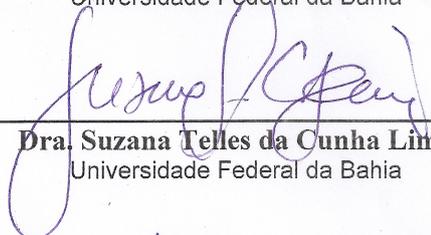
**MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

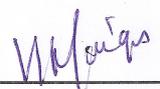
Salvador, Bahia, 10 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha**  
Orientador  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Artur José Santos Mascarenhas**  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Suzana Telles da Cunha Lima**  
Universidade Federal da Bahia

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Heiddy Márquez Alvarez**  
Universidade Estadual de Feira de Santana

Aos meus pais Sérgio e Ilvany, a minha irmã Ilda Maria e ao meu esposo Alan, pela fé e confiança demonstrada, pelo apoio incondicional e por terem tornado esse caminho mais fácil de ser percorrido, compartilhando comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, nesta etapa, em que, com a graça de Deus, está sendo vencida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre nos faz triunfar em Jesus Cristo nosso Senhor, e por meio de nós manifesta em todo o lugar a fragrância do seu conhecimento.

Ao meu esposo Alan Vêras pela revisão ortográfica, amor incondicional e mensagem de esperança.

Ao professor Dr. Vitor Hugo Moreau da Cunha pela orientação e confiança.

A professora Dra. Astria Dias Ferrão Gonzales pela co-orientação e incentivo.

Aos professores do mestrado em Biotecnologia da UFBA.

Aos meus colegas da turma 2010.2 do mestrado em Biotecnologia da UFBA.

Ao CNPq e a FAPESB que financiaram o projeto.

A Novozymes que doou as lipases.

As minhas alunas Laíra Landim, Karen Sadoyama e em especial Thamires Soares.

Aos meus queridos amigos Lorena Silva, Eduardo Muniz, Jane Rosado, Bernardo Bastos, Adriana Morato e Regina Torres pelo companheirismo.

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

VÉRAS, Ilvania Costa. Expressão heteróloga de lipases modificadas para melhoramento do processo de produção enzimática de biodiesel. 139 f. 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

## RESUMO

O biodiesel é uma fonte de energia ambientalmente menos impactante do que os combustíveis fósseis. Sua fabricação heterogênea por via enzimática é ambientalmente atraente pois exige menos passos para a purificação do que a catálise química atualmente usada industrialmente e permite a recuperação da lipase, que é o catalisador. Lipases já produzidas industrialmente para outros fins têm sido utilizadas para produção de biodiesel com pouco sucesso, uma vez que a presença de alcoóis de cadeia curta diminui drasticamente sua atividade, aumentando o tempo reacional. Outro fator relacionado ao seu uso é o seu alto custo de produção. Para reduzir os custos, estratégias como a imobilização enzimática (permite reutilização) e o uso de matérias-primas de baixo valor agregado podem ser usadas. Todavia, empregar óleos e gorduras residuais (OGRs) no atual processo alcalino de produção é um desafio, uma vez que, a alta acidez destes, facilita a produção de sabão e dificulta a remoção do subproduto glicerina o que não ocorre quando o catalisador é a lipase. No presente estudo, foi feita uma prospecção para avaliar o crescimento desta tecnologia no mundo. Paralelamente, lipases B de *Pseudozyma antarctica* mutantes foram projetadas por meio de substituição da região da tampa (lid), que cobre o sítio catalítico, por resíduos do aminoácido glicina. Estes mutantes foram submetidos à simulações de Dinâmica Molecular (DM). Os mutantes com substituições de 1 a 8 resíduos de glicina possuíram baixo valor de energia potencial sendo bons candidatos para os testes de expressão e atividade. O mutante *PantΔlidG3*, que possui sua tampa substituída por 3 resíduos de glicina, foi escolhido para os testes de expressão juntamente com a lipase selvagem de *Pseudozyma antarctica*. Tanto a lipase selvagem quanto a mutante foram expressas. Um novo e rápido método para produzir biodiesel é aqui exposto, utilizando matérias-primas residuais brutas. Esterificação de ácidos graxos livres (AGL) e transesterificação de triacilgliceróis (TAG) são simultaneamente conduzidos em um meio reacional onde AGL agem como surfactantes impedindo a inativação da enzima por alcoóis de cadeia curta e glicerol. Uma equação empírica foi deduzida para determinar o comportamento da cinética em toda produção de biodiesel em função do tempo. A partir dos dados obtidos nas condições experimentais utilizadas poderá então ser realizado um escalonamento para a viabilização do processo industrial de forma economicamente viável, ou seja, com uso de baixas temperaturas, menor quantidade de álcool e tempo reacional reduzido, que leva a um custeio baixo da produção do biodiesel pela lipase. Os estudos sobre os mecanismos da catálise enzimática requerem aprofundamento para permitir o desenvolvimento de lipases mais específicas para a síntese de biodiesel.

**Palavras-chave:** Biodiesel. Lipase. Enzimas.

VÉRAS, Ilvania Costa. Heterologous expression of lipase modified to improve the process for enzymatic production of biodiesel. 139 f. 2012. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

### ABSTRACT

Biodiesel is an energy source, environmentally friendly causing less impact than fossil fuels. Their heterogeneous manufacture by enzymatic route is environmentally attractive because it requires fewer steps for purification than chemical catalyst and allows recovery the lipase which is the catalyst. Lipases already produced industrially for other purposes have been used for the production of biodiesel with little success, since the presence of short chain alcohols dramatically decreases its activity, increasing reaction time. Another factor related is the high production cost. To reduce expenses strategies such as enzyme immobilization (allows reuse) and the use of raw materials with low added value is recommended. However, residual oil and fat employed in the current production process of alkali is a challenge, since the high acidity of these, facilitates the production of soap and hinders the removal of the glycerin by-product which does not occur when the catalyst is lipase. In the present study, we conducted a survey to assess growth of this technology in the world. In addition, *Pseudozyma antarctica* lipase B mutants were designed by replacing the region of the lid, which covers the catalytic site, to residues of glycine. These mutants were subjected to simulations of molecular dynamics (MD). The mutant replacements with 1-8 residues of glycine presented a low value of potential energy being a good candidate for testing expression and activity. The mutant Pant $\Delta$ lidG3, which has its lid replaced by three glycine residues was chosen for expression tests together with the wild type *Pseudozyma antarctica* lipase. Both the wild type and the lipase mutant were expressed. In addition a new and rapid method to produce biodiesel is shown here, using residual crude feedstock. Esterification of free fatty acids (FFA) and transesterification of triacylglycerols (TAG) are simultaneously carried out in a reaction medium where FFA act as surfactants preventing the inactivation of the enzyme by short-chain alcohols and glycerol. An empirical equation was derived to determine the kinetic behavior of the whole production of biodiesel a function of time. The data obtained in the experimental conditions can then be used for enabling scaling up for an industrial process economically viable, that is, using low temperatures, lower quantity of alcohol and reduced reaction time, which leads to a low cost of biodiesel production by lipase. Studies on the mechanisms of enzyme catalysis require study to enable the development of more specific lipases for the synthesis of biodiesel.

**Keywords:** Biodiesel. Lipase. Enzymes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE, ESTERIFICAÇÃO E INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADAS POR LIPASES.....	19
FIGURA 2 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES DO TIPO NÃO ESPECÍFICA E 1,3 ESPECÍFICA.....	20
FIGURA 3 - ESTRUTURA GERAL DE LIPASE B DE <i>PSEUDOZYMA ANTARCTICA</i> DERIVADA DA ESTRUTURA CRISTALINA 1TCA.....	22
FIGURA 4 - REAÇÃO GLOBAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLIACILGLICEROL COM ÁLCOOL.....	24
FIGURA 5 - ESQUEMA REACIONAL DA SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICEROL.....	25
FIGURA 6 - MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL (PERFIL NACIONAL).....	28
FIGURA 7 – REAÇÕES DE SAPONIFICAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (AGLs) (A) E COM ÊSTERES ALQUÍLICOS (B).....	29
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. COLI</i> POR ELETROPORAÇÃO.....	39
QUADRO 1 - LEGENDA DOS CÓDIGOS DA TABELA 1.....	42
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO ANUAL DE PATENTES DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL.....	43
FIGURA 10 - EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE PATENTES APROPRIADAS PELOS PRINCIPAIS PAÍSES DEPOSITANTES.....	43
FIGURA 11 - DETENTORES DE PATENTES DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL.....	44
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PRINCIPAL CADEIRA DE LIPASE B DE <i>P. ANTARCTICA</i> .....	70
FIGURA 13 - SEQUÊNCIA FASTA DA LIPASE B DE <i>P. ANTARCTICA</i> , TIPO SELVAGEM (TOPO) E O MUTANTE <i>PANTΔLIDG3</i> .....	71
FIGURA 14: LIPASE B DE <i>PSEUDOZYMA ANTARCTICA</i> INSERIDA EM UMA CAIXA D'ÁGUA DE 365.000 nm <sup>2</sup> CONTENDO 10.600 MOLÉCULAS DE ÁGUA APROXIMADAMENTE.....	72
FIGURA 15 - PERFIL DOS 20000 PS PARA A ENERGIA POTENCIAL CALCULADA POR DM.....	73
FIGURA 16 - ESTADO DA ENERGIA TOTAL E POTENCIAL (10 A 20 NS) DA SIMULAÇÃO DE DM DE LIPASES MUTANTES.....	74
FIGURA 17 - SDS-PAGE DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE LIPASE B DE <i>P. ANTARCTICA</i> EM <i>E. COLI</i> ROSETTA-GAMI 2 (DE3).....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DA LIPASE B DE <i>PSEUDOZYMA ANTARCTICA</i> .....	22
TABELA 2 - PESQUISA POR PALAVRAS-CHAVE E CÓDIGOS DE CLASSIFICAÇÃO EUROPÉIA .....	41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Fontes Renováveis de Energia e o Biodiesel.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Produção de Biodiesel .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Catálise Homogênea .....	16
2.2.2 Catálise Enzimática Heterogênea .....	17
<b>2.3 Lipases: enzimas de aplicação biotecnológica.....</b>	<b>17</b>
2.3.1 Reações catalisadas por lipases .....	18
2.3.2 Aspectos Estruturais das Lipases.....	19
2.3.3 Especificidade da Lipase Frente a Diferentes Substratos .....	20
<b>2.4 Lipase B de <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i> .....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Estrutura e mecanismo catalítico .....	21
2.4.2 Expressão funcional de lipase B de <i>Pseudozyma antarctica</i> em <i>Escherichia coli</i> ..	23
<b>2.5 Transesterificação Enzimática .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Efeitos dos Tipos de Alcoóis na Produção de Biodiesel .....	26
2.5.2 Uso de Solventes Orgânicos na Produção de Biodiesel .....	27
2.5.3 Produção de biodiesel usando matérias-primas com alto conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) .....	27
2.5.4 Lipases Imobilizadas .....	29
<b>2.6 Variantes de Lipases.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Modelagem Molecular clássica: Mecânica Molecular e Dinâmica Molecular.....</b>	<b>30</b>
<b>3 JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>32</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Objetivo geral.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Material .....</b>	<b>34</b>
5.1.1 Meios Utilizados para Crescimento e Transformação de Bactérias .....	34
5.1.2 Reagentes e Soluções Utilizados na Eletroforese Unidimensional de Proteínas.....	35
5.1.3 Soluções Utilizadas na Expressão das Proteínas Recombinantes .....	37
<b>5.2 Metodologia experimental .....</b>	<b>37</b>
5.2.2 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação .....	38
5.2.3 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante.....	39
5.2.4 Análise por SDS-PAGE.....	40
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1 Prospecção Tecnológica da Produção Enzimática de Biodiesel.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2 Artigo 1: One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media .....</b>	<b>45</b>

<b>6.3 Patente 1: “PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE”</b> .....	<b>51</b>
<b>6.4 Variantes de lipases</b> .....	<b>70</b>
<b>6.5 Simulações de Dinâmica Molecular</b> .....	<b>71</b>
<b>6.6 Patente 2: “VARIANTES DE LIPASES, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE VARIANTES DE LIPASES”</b> .....	<b>75</b>
<b>6.7 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação</b> .....	<b>105</b>
<b>6.8 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante</b> .....	<b>105</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>108</b>
<b>ANEXO A – Artigo 2: Thermodynamic analysis of the kinetics reactions of the production of FAME and FAEE using Novozyme 435 as catalyst</b> .....	<b>116</b>
<b>ANEXO B – Patente 3: “PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES POR CATÁLISE POR LIPASE EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE”</b> .....	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Países com controle rigoroso na emissão de poluentes têm seguido os princípios da química verde, definida como utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou geração de produtos e sub-produtos tóxicos, que são nocivos à saúde humana ou ao ambiente (ANASTAS & WILLIAMSON, 1996; ANASTAS & EGHBALI, 2010). Tecnologias de energia renovável, como o biodiesel, oferecem uma excelente oportunidade para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa e do aquecimento global, seguindo os princípios da química verde (PANWAR, KAUSHIK & KOTHARI, 2011).

O crescimento da economia e da população tem gerado uma diminuição da qualidade ambiental em todo mundo. Ao longo das últimas três décadas, o aumento da urbanização e industrialização, ao mesmo tempo que disponibiliza uma melhor qualidade de vida, por outro lado, vem causando pressão sobre os recursos de combustíveis fósseis (KELEŞ, 2011). Baseado em necessidades econômicas e sociais, investigações por novas fontes alternativas de energia têm fomentado pesquisas em tecnologias renováveis. Entram em foco as fontes limpas de energia, partindo de recursos sustentáveis que minimizam impactos ambientais e com ínfima produção de resíduos secundários (PANWAR, KAUSHIK & KOTHARI, 2011).

A introdução do biodiesel na matriz energética do Brasil em 2005 originou amplos benefícios ambientais, econômicos e sociais. A lei 11.097/2005 tornou obrigatória, desde 2008, a adição do biocombustível no diesel (B2 - 2% de biodiesel e 98% de diesel de petróleo) em todo território nacional. Atualmente essa mistura é de 5% (Resolução nº 6/2009 - CNPE), os motores que já utilizam-na emitem menos 57% de gases poluentes (APROBIO, 2012). O Brasil obteve um ganho de aproximadamente US\$ 5,2 bilhões na balança comercial, porque deixou de importar 7,9 bilhões de litros de diesel no período desde o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), em dezembro de 2004, até o fim de 2011 (BRASIL, 2012; MME, 2011). As estratégias sociais do PNPB são operacionalizadas pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), onde a inserção de agricultores na cadeia de produção do biodiesel é garantida através da concessão do Selo Combustível Social às empresas produtoras que promovem a inclusão social e o desenvolvimento regional (SAF/MDA, 2010).

O biodiesel é um biocombustível definido pela National Biodiesel Board como ésteres mono-alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de fontes renováveis como óleos

vegetais (triglicerídeos) ou gorduras animais, para uso em motores de ignição por compressão (motores de ciclo diesel), e é considerado como um dos promissores substitutos aos combustíveis fósseis. O seu uso traz vantagens ambientais como: baixas emissões de CO; evita o aumento da quantidade total de CO<sub>2</sub> na atmosfera, pois o CO<sub>2</sub> pode ser reciclado por fotossíntese, minimizando o impacto sobre o efeito estufa (CVENGROS & CVENGROSOVÁ, 1994; SHIMADA *et al.*, 1999; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; ZHANG *et al.*, 2003); redução da maioria das emissões de gases e de particulados totais de um motor (KNOTHE *et al.*, 2005; HOEKMAN & ROBBINS, 2012).

A principal forma utilizada atualmente para produzir biodiesel é através do processo de transesterificação de triglicerídeos, uma reação química estimulada por um catalisador (ácidos, bases fortes ou enzimas) envolvendo óleos vegetais (ou gorduras animais) e um álcool comum (etanol ou metanol), para produzir ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerina como sub-produto (ZHANG *et al.*, 2003). Em termos mundiais o metanol é o álcool mais utilizado por ser mais barato (KNOTHE *et al.*, 2005). No Brasil, a maioria do biodiesel fabricado utiliza como matéria-prima o óleo de soja (ANP, 2012), metanol e um catalisador alcalino, sendo que na Europa, a fonte de triglicerídeo mais usada é o óleo de canola (DEMIRBAS, 2008).

O emprego de catalisadores alcalinos tem uma real necessidade de usar matérias-primas com um certo grau de pureza, o que onera em 60 a 80 % os custos de produção (ATADASHI *et al.*, 2012). Além disso, em seu processo industrial são esperados inconvenientes como: alto consumo energético, necessidade de remoção do catalisador alcalino, dificuldade em recuperar o glicerol e formação de sabão (SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2003). Seria ideal um sistema de produção no qual fosse possível fazer uso de óleos e gorduras residuais (OGRs) para mitigar o preço do produto final e, ao mesmo tempo, reciclar compostos que seriam possivelmente descartados na natureza.

Recentemente, pesquisas para a introdução de catalisadores enzimáticos na produção de biodiesel têm sido conduzidas em todo o mundo. Parte dos problemas encontrados com os catalisadores alcalinos podem ser superados pelos métodos enzimáticos para fabricação de biodiesel. Estes utilizam as lipases (EC 3.1.1.3), que são enzimas do tipo carboxilesterase, que catalisam a hidrólise e a síntese de ligações ésteres de acilgliceróis de cadeia longa liberando ou consumindo ácidos graxos e glicerol (JAEGER & EGGERT, 2002). Todavia, os métodos enzimáticos ainda não têm sido utilizados em escala industrial porque o custo da enzima é elevado e os efeitos causados pelo excesso de metanol (necessário para que a reação ocorra) e

glicerol (produzido durante a reação) na enzima são, até então, negativos (SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2006; ROYON *et al.*, 2007).

O presente trabalho vem se desenvolvendo com o desígnio de produzir catalisadores enzimáticos específicos para o meio reacional da produção de biodiesel, capazes de serem usados em OGRs, através da expressão heteróloga, purificação e imobilização de lipases.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fontes Renováveis de Energia e o Biodiesel

Hoje, os combustíveis fósseis (petróleo, carvão e gás natural) produzem a maior parte da energia que utilizamos. Em consequência do fato destes combustíveis estarem sendo produzidos pelo calor e pressão da matéria orgânica fossilizada subterrânea, o seu consumo torna-se mais rápido do que a sua produção. Por esse motivo, os combustíveis fósseis são considerados não-renováveis, ou seja, eles não são substituídos logo após seu consumo (DEMIRBAS, 2008).

A humanidade não pode continuar baseando as suas atividades no consumo de recursos energéticos finitos. As fontes de energia renováveis como a biomassa, hidroelétrica, hidrogênio, eólica, solar (térmica e fotovoltaica), geotérmica e marinha irão desempenhar um papel significativo no futuro abastecimento energético mundial (EREC, 2006). Estima-se que em 2040 cerca de metade da oferta mundial de energia será proveniente de energias renováveis, e a produção de eletricidade a partir dessas fontes será mais de 80% do total global de distribuição de energia elétrica (EWEA, 2005; EREC, 2006).

Dois tipos de combustíveis renováveis, também conhecidos como verdes ou biocombustíveis a partir da biomassa, têm atingido maturidade técnica e aceitação no mercado: o biodiesel e o etanol (SCHARMER, 1999). O biodiesel como combustível alternativo tem muitas vantagens sobre os combustíveis convencionais principalmente por ser produzido a partir de material biodegradáveis, podendo ser usado como combustível em motores do ciclo diesel sem grandes modificações no motor (RYAN, 2004; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009; MA & HANNA, 1999).

Comparado com o diesel de petróleo, este biocombustível tem um perfil mais favorável, pois está relacionado com uma menor emissão de gases poluentes, tais como monóxido de carbono (CO), material particulado (fuligem) e hidrocarbonetos não oxidados (não queimados) presentes na queima do diesel (SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Desta forma o biodiesel é um combustível que tem uma correlação positiva com o desenvolvimento sustentável, conservação da energia, gestão, eficiência e preservação ambiental (AGARWAL, 2007).

## 2.2 Produção de Biodiesel

### 2.2.1 Catálise Homogênea

No processamento industrial químico convencional a síntese de biodiesel é obtida por uma reação de transesterificação alcalina ou ácida (MA & HANNA, 1999; AL-ZUHAIR, 2005; LI *et al.*, 2006). Os catalisadores básicos mais utilizados são NaOH e KOH (FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; MA & HANNA, 1999; SHIMADA *et al.*, 1999; WATANABE *et al.*, 2000). Ácidos fortes tais como o sulfúrico, clorídrico e organossulfônicos são geralmente utilizados como catalisadores ácidos, não obstante apresentam uma grande desvantagem por necessitarem de temperaturas reacionais muito altas. Sua principal vantagem em relação aos catalisadores básicos é a ausência da formação de sabão na reação (MA & HANNA, 1999; RANGANATHAN *et al.*, 2008).

Os catalisadores alcalinos apresentam transesterificações mais rápidas e com alta conversão de triacilgliceróis aos seus correspondentes ésteres do que os catalisadores ácidos (FREEDMAN, PRYDE & MOUNTS, 1984; FREEDMAN, BUTTERFIELD & PRYDE, 1986; MA & HANNA, 1999; WATANABE *et al.*, 2000). São menos corrosivos para os equipamentos industriais do que os ácidos, sendo mais utilizados nas indústrias (FREEDMAN, BUTTERFIELD & PRYDE, 1986; MA & HANNA, 1999).

Ainda assim, alguns inconvenientes são encontrados na catálise básica como: dificuldades em recuperar o glicerol; o catalisador alcalino tem que ser removido do produto; gasto intensivo de energia; óleos que contém ácidos graxos livres e/ou água são incompletamente transesterificados; água durante a reação leva à ocorrência de hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos graxos livres; formação de sabão causa aumento da viscosidade e interfere na separação do glicerol; requer tratamento de águas residuais alcalinas (FREEDMAN, PRYDE & MOUNTS, 1984; NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; MA & HANNA, 1999; WATANABE *et al.*, 2000; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; AL-ZUHAIR, 2005).

Por causa dos inconvenientes supracitados, a catálise enzimática é uma opção interessante para a fabricação de biodiesel em escala industrial porque pode reduzir os custos da produção (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

### 2.2.2 Catálise Enzimática Heterogênea

Enzimas são proteínas com atividade catalítica. São utilizadas industrialmente para os mais diversos fins: na produção de alimentos, bebidas e medicamentos, no tratamento de tecidos e couro, produção de testes diagnósticos, entre outros. Mais recentemente tem se tentado aplicar enzimas na produção de biocombustíveis como o biodiesel.

As enzimas aplicadas na produção de biodiesel são as lipases. Porém, ainda não foram encontradas condições economicamente viáveis para que se faça o uso industrial da catálise enzimática na produção de biodiesel. Vários estudos têm sido conduzidos com dois objetivos: produzir lipases mais específicas para esse fim e otimizar as condições reacionais para as reações conduzidas com as enzimas disponíveis comercialmente, como foi realizado no presente trabalho.

### 2.3 Lipases: enzimas de aplicação biotecnológica

As lipases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3) e atuam sobre ligações éster (E.C.3.1). Esta nomenclatura é codificada pela NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). A enzima em estudo é a triacilglicerol lipase (E.C.3.1.1.3), cuja definição clássica descreve como glicerol éster hidrolases, que atua sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; JAEGER & EGGERT, 2002; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004).

As lipases podem ser extraídas de tecidos de plantas e animais ou produzidas por fermentação através de microrganismos (fungos, leveduras e bactérias), que são facilmente cultiváveis (PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004). As derivadas de microrganismos encontram imensa aplicação industrial, pois podem catalisar uma grande variedade de reações hidrolíticas e de síntese (SAXENA *et al.*, 1999; PAIVA, BALCÃO & MALCATA, 2000; CARVALHO *et al.*, 2003; HAMA *et al.*, 2006; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004).

Os parâmetros ideais para o uso de uma lipase específica dependem da sua origem bem como da sua formulação (JAEGER & REETZ, 1998; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009). Lipases de fungos e bactérias são as mais usadas nas reações de transesterificação de óleos e gorduras. As fontes fúngicas têm sido valorizadas porque, em sua

maioria, não são tóxicas, sendo GRAS (Generally Regarded as Safe) reconhecidas pelo FDA (Food and Drugs Administration) por não levar risco à saúde humana (SOUZA & SOMMER, 2002). Além disso, suas lipases são extracelulares, sendo mais fácil a purificação e recuperação (SAXENA *et al.*, 1999). No entanto as lipases bacterianas podem ser obtidas mais rapidamente, visto que bactérias apresentam, em geral, um crescimento celular mais rápido do que os fungos (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999).

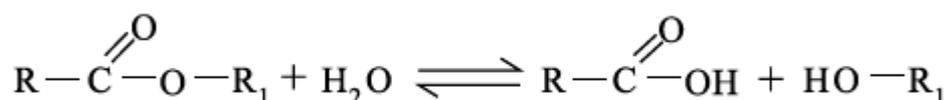
Verificou-se que o rendimento máximo de produção do biodiesel é influenciado fortemente pela origem da lipase, atividade de água ideal, temperatura de reação, imobilização ou não da enzima, escolha do álcool, tempo da reação, estabilidade da enzima e razão molar do óleo (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

As pesquisas realizadas com lipases microbianas têm despertado o interesse das indústrias biotecnológicas por serem biocatalisadores importantes e possuírem diversas aplicações. Atualmente as indústrias têm feito uso das lipases como catalisadores na química fina ou para fabricação de outros produtos como: alimentos, detergentes, couros, têxteis, cosméticos, perfumarias, farmacêuticos, agroquímicos, oleoquímicos, entre outros. Isto está relacionado principalmente por seu rápido desenvolvimento tecnológico, versatilidade e facilidade de produção em massa (HASAN, SHAH & HAMEED, 2006).

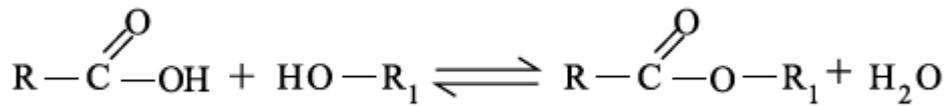
### 2.3.1 Reações catalisadas por lipases

As lipases realizam reações em meios aquosos (hidrólise) e não aquosos (esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise) (Figura 1) (JAEGER & EGGERT, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 1999; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004). Isto ocorre por causa da capacidade de utilizar vários substratos, não requerer cofatores, ter alta estabilidade para extremos de temperatura, pH e solventes orgânicos bem como apresentar uma alta químio-régio-enantioseletividade (JAEGER & REETZ, 1998; SAXENA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001).

#### Reação de Hidrólise

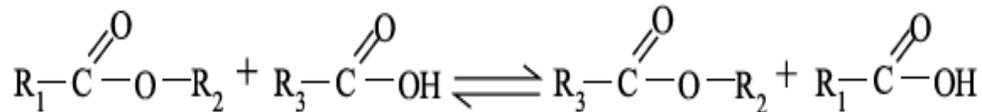


### Reação de Esterificação



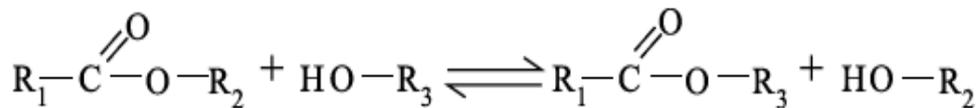
### Reação de Interesterificação

*Acidólise (reação de éster com ácido)*



### Transesterificação

a) reação de éster com álcool



b) reação de éster com éster

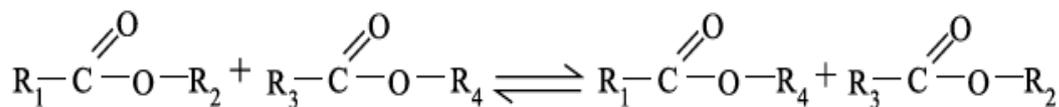


Figura 1 - Esquema das reações de hidrólise, esterificação e interesterificação catalisadas por lipases.

### 2.3.2 Aspectos Estruturais das Lipases

A estrutura terciária das lipases é geralmente formada por um entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase, possuindo uma arquitetura comum composta por uma sequência de 8 diferentes fitas  $\beta$  paralelas ligadas por seis  $\alpha$ -hélices (OLLIS *et al.*, 1992; PETERSEN, 1996; JAEGER & REETZ, 1998).

O sítio ativo é formado por cadeias laterais de resíduos dos aminoácidos serina (Ser), ácido aspártico (ou glutâmico) (Asp/Glu) e histidina (His), que representam a tríade catalítica composta por uma rede de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos citados (OLLIS *et al.*, 1992; JAEGER & REETZ, 1998; GUPTA, GUPTA & RATHI, 2004).

Uma superfície entrelaçada, constituída por uma sequência peptídica em  $\alpha$ -hélice, conhecida como “tampa” anfipática ou “lid”, dá acesso e protege o sítio catalítico da lipase

(VERGER, 1997; JAEGER & REETZ, 1998). Quando a tampa interage com a interface lipídio/água sofre uma mudança conformacional para sua “forma aberta” (VERGER, 1997; JAEGER & REETZ, 1998) expondo a tríade catalítica agora acessível ao substrato (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998).

A face da tampa voltada para o sítio catalítico possui cadeias laterais hidrofóbicas, que facilitam a interação da lipase com a interface de lipídios (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998; JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999). Já a superfície oposta é razoavelmente hidrofílica, estabilizada por interações com a superfície da enzima (YAHYA, ANDERSON & MOO-YOUNG, 1998). Todavia, não são todas as lipases que apresentam esta ativação interfacial (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999).

### 2.3.3 Especificidade da Lipase Frente a Diferentes Substratos

Para a aplicação da lipase no campo comercial é necessário a sua classificação quanto à especificidade (CASTRO & ANDERSON, 1995). As enzimas distinguem os grupos funcionais situados em diferentes regiões do mesmo substrato pela sua estrutura tridimensional, desta forma geralmente há duas classes de lipases: não-específicas e 1,3-específicas (Figura 2) (TOMBS, 1995; CASTRO & ANDERSON, 1995).

As lipases 1,3-específicas (regiosseletivas) clivam ácidos graxos das posições terminais do glicerol e formam como sub-produtos ácidos graxos livres, 1,2(2,3)-diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis (PAQUES & MACEDO, 2006).

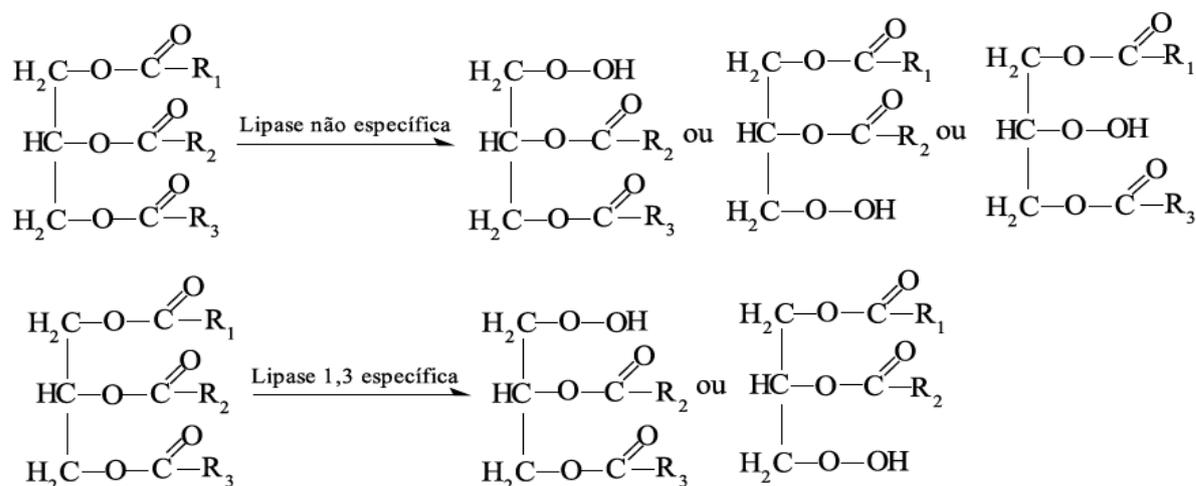


Figura 2 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (Fonte: PAQUES & MACEDO, 2006, p.94).

Já as lipases não-específicas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis para ácidos graxos livres e glicerol de forma aleatória, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (CASTRO & ANDERSON, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Estas não possuem especificidade com relação à natureza da ligação éster ou a posição em que este está esterificado no glicerol (CASTRO & ANDERSON, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003 ).

As lipases para produção de biodiesel a partir de triacilgliceróis não devem ser regioseletivas, para que todos os di e monoacilgliceróis (intermediários da reação de transesterificação) possam ser convertidos para ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e também para catalisar a esterificação de ácidos graxos livres (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

#### 2.4 Lipase B de *Pseudozyma (Candida) antarctica*

Lipase B de *Pseudozyma antarctica* (PalB), anteriormente chamada de lipase B de *Candida antarctica*, destaca-se dentre os membros da família das lipases. Sua importância para indústria de biotecnologia deve-se às suas características biocatalíticas para conversão indiscriminada de substratos (LARSEN, 2009; UPPENBERG *et al.*, 2004). Isto inclui a seletividade e estabilidade em solventes orgânicos. No entanto, apesar de sua importância para síntese orgânica e biotecnológica, apenas recentemente PalB foi acrescida ao pequeno grupo de lipases alvos selecionadas para engenharia de proteínas (LUTZ, 2004).

##### 2.4.1 Estrutura e mecanismo catalítico

PalB é uma enzima extracelular isolada dos basidiomicetos da levedura *Pseudozyma antarctica*, com peso molecular de 33kDa e um Ponto Isoelétrico (PI) de 6,0. Sua sequência (DNA e aminoácidos) e estrutura cristalina foram resolvidas em 1994, revelando que esta enzima tem um típico entrelaçado de  $\alpha/\beta$  hidrolase com o sítio ativo formado pela tríade catalítica Ser105-Asp187-His244 (UPPENBERG *et al.*, 1994, 1995). PalB tem uma alta termoestabilidade, estável em pH alcalino e químio-régio-enantioseletividade (KIRK & CHRISTENSEN, 2002).

A reação natural de PalB é de hidrolisar ésteres e sua forma imobilizada tem sido conhecida como o biocatalisador mais comum na reação de transesterificação para a produção de biodiesel (LUTZ, 2004; XU *et al.*, 2008). Apesar de a PalB ser uma lipase 1,3-específica

(KIRK & CHRISTENSEN, 2002), ela realiza migração alquila, ou seja, converte 1,2 (2,3)-diglicilglicerol em 1,3-diacilglicerol, que é seu substrato preferido, contudo tal a etapa não é determinante de taxa para esta enzima (TURKAN & KALAY, 2006).

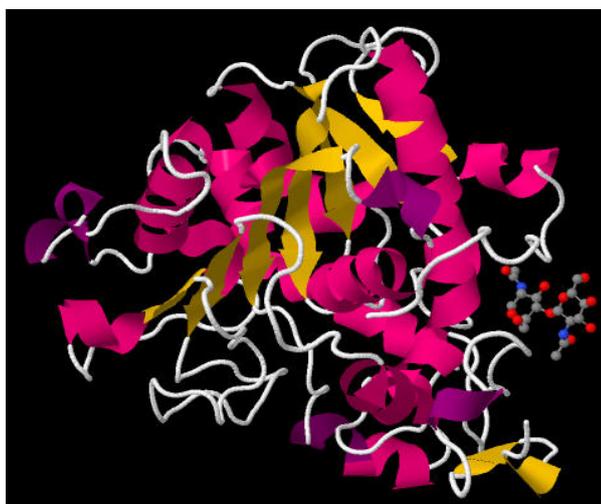
**Tabela 1 - Características da lipase B de *Pseudozyma antarctica***

Peso molecular (kDa)	33
Ponto isoelétrico (pI)	6,0
pH ótimo	7
Atividade específica (IU/mg)	435
Termoestabilidade a 70°C <sup>a</sup>	15[0]
pH estabilidade <sup>b</sup>	7-10
Ativação interfacial	Não
Especificidade posicional para triacilglicerol	1-3 específica

<sup>a</sup> Uma atividade residual após incubação a 60°C em tampão tris 0,1 M (pH 7.0) por 20 min e 120 min. <sup>b</sup> pH no qual a atividade maior que 75% é mantida após incubação de 20h em temperatura ambiente.

Fonte: KIRK & CHRISTENSEN, 2002, p. 446.

Lipases “típicas” apresentam ativação interfacial e são menos adaptadas para a catálise em meios orgânicos do que PalB que é uma lipase “atípica” (SALIS *et al.*, 2003). Este fato é explicado devido a necessidade de grandes mudanças conformacionais na região da tampa (lid) quando as lipases “típicas” são convertidas de uma conformação fechada para uma conformação aberta, exigindo grande mobilidade interna diferente com o que ocorre com PalB (SALIS *et al.*, 2003).



**Figura 3 - Estrutura geral de lipase B de *Pseudozyma antarctica* derivada da estrutura cristalina 1TCA (UPPENBERG *et al.*, 1994) retirada do Protein Data Bank (www.rcbs.org).**

PalB não apresenta uma tampa comum, mas uma hélice pequena com grande mobilidade que pode agir como uma tampa. Também, expressa plena atividade, tanto em soluções aquosas quanto em meios orgânicos, devido a sua forte estereoespecificidade sobre substratos quirais (UPPENBERG *et al.*, 1994). Apoderando-se deste privilégio, variantes de lipases com atividade aumentada em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituição de aminoácidos na região da tampa (lid) para que esta seja removida ou tenha seu tamanho diminuído, tal como o da PalB.

#### 2.4.2 Expressão funcional de lipase B de *Pseudozyma antarctica* em *Escherichia coli*

Anteriormente, PalB foi expressa com sucesso em sistemas eucarióticos como *Aspergillus oryzae* (HOEGH *et al.*, 2005), *Pichia pastoris* (ROTTICCI-MULDER *et al.*, 2001) e em *Saccharomyces cerevisiae* (ZHANG *et al.*, 2003). Todavia, uma expressão heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*) seria muito vantajoso devido à simplicidade do processo, crescimento rápido da bactéria, baixo custo do meio utilizado, cultivo bem caracterizado, cultivo com alta densidade celular e genética bem conhecida (LARSEN, 2009).

Houve várias tentativas para expressão funcional de PalB em *E. coli*, sendo que o primeiro relato de sucesso aconteceu em 2006 (LIU *et al.*, 2006). Existem alguns problemas que são potenciais para a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*: não há modificações pós-traducionais (glicosilação, pontes dissulfeto), uso de diferentes códons e formação de corpos de inclusão (JUNG & PARK, 2008).

A glicosilação não foi necessária para o correto enovelamento de PalB (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). Porém, a formação de pontes dissulfeto é um passo crucial para o enovelamento e função de PalB (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008; XU *et al.*, 2008). O citoplasma de *E. coli* em condições normais encontra-se no estado reduzido, dificultando a formação das três pontes dissulfeto presentes em PalB, que são responsáveis pela sua conformação funcional (UPPENBERG *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2006; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). Para permitir a correta formação destas pontes dissulfeto é necessário direcionar esta enzima para o espaço periplasmático (BLANK *et al.*, 2006).

Outro inconveniente é que a sequência de PalB contém vários códons raros que não são normalmente utilizados por *E. coli*, havendo a necessidade de otimização da produção desses códons (JUNG & PARK, 2008; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008).

Adicionalmente, a temperatura tem um profundo efeito sobre a quantidade de expressão da enzima ativa (LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008). PalB é funcionalmente ativa quando a temperatura da expressão ocorre em torno de 15 a 25°C (XU *et al.*, 2008; LARSEN, BORNSCHEUER & HULT, 2008; SEO *et al.*, 2009).

No presente trabalho, uma cepa especial de *E. coli* foi usada. A cepa Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) de células eletrocompetentes combina as vantagens de suavizar a preferências de códons e aumentar a formação de pontes dissulfeto no citoplasma quando proteínas heterólogas são expressas em *E. coli*. Esses mutantes *trxB/gor* são compatíveis com vetores resistentes a kanamicina, e carregam a resistência a clorafenicol no plasmídeo (pRARE2), que a abastece com sete tRNAs raros. DE3 indica que a cepa possui um gene oriundo do profago ( $\lambda$ DE), e portanto, carrega uma cópia cromossômica do gene da RNA polimerase T7 sobre controle do promotor *lacUV5*. Tais cepas são adequadas para a produção de proteínas de genes alvos clonados em vetores pET por indução com IPTG. Genótipo:  $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F' [lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (CamR, StrR, TetR)$ .

## 2.5 Transesterificação Enzimática

A transesterificação (também chamada de alcoólise) é uma reação química estimulada por um catalisador (ácidos, bases ou enzimas), envolvendo óleos vegetais (ou gorduras animais) e um álcool comum (etanol ou metanol), para produzir metilésteres de ácidos graxos (MEAG) – biodiesel – e como co-produto a glicerina (ZHANG *et al.*, 2003; MA & HANNA, 1999). A reação é mostrada na Figura 4:

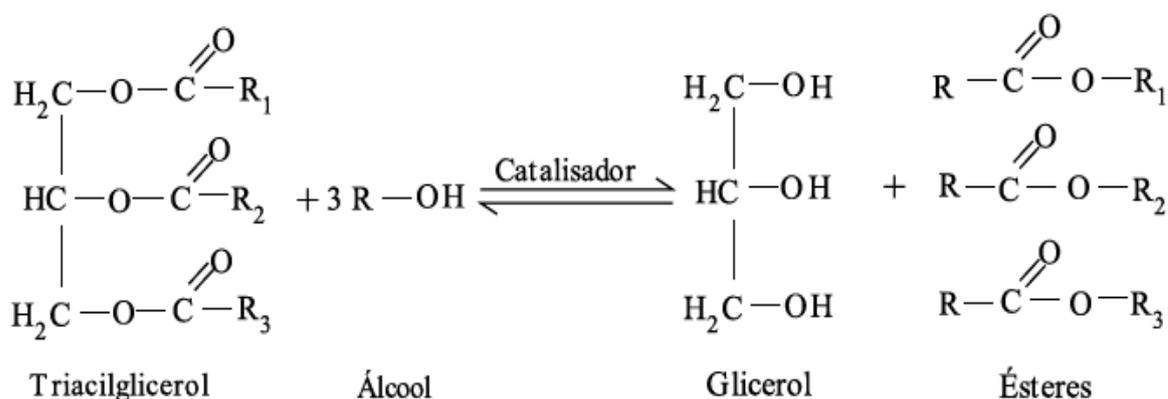


Figura 4 - Reação global da reação de transesterificação de triglicilglicerol com álcool.

O óleo vegetal utilizado possui triacilgliceróis (TAG) como principal componente, constituído por três ácidos graxos de cadeia longa ligados ao glicerol (ZHANG *et al.*, 2003). A estequiometria desta reação requer 3 moles de álcool para 1 mol de triglicerídeo para um rendimento de 3 moles de éster de ácido graxo (biodiesel) e 1 mol de glicerol (FREEDMAN, PRYDE & MOUNTS, 1984; MA & HANNA, 1999).

A transesterificação envolve etapas de conversões consecutivas e reversíveis. A Figura 5 representa as etapas do mecanismo reacional da síntese de biodiesel. Nota-se que metanol foi o insumo utilizado. Deste modo MEAG são obtidos e representam o biodiesel. Na primeira etapa (Figura 5a) ocorre a conversão dos TAG em diacilgliceróis (DAG). Logo após (Figura 5b) os DAG são convertidos em monoacilgliceróis (MAG). Na terceira etapa (Figura 5c) os MAG são convertidos em gliceróis. Uma molécula de éster (metílico) é liberada em cada etapa anterior (FREEDMAN, BUTTERFIELD & PRYDE, 1986; MA & HANNA, 1999; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001; ZHANG *et al.*, 2003).

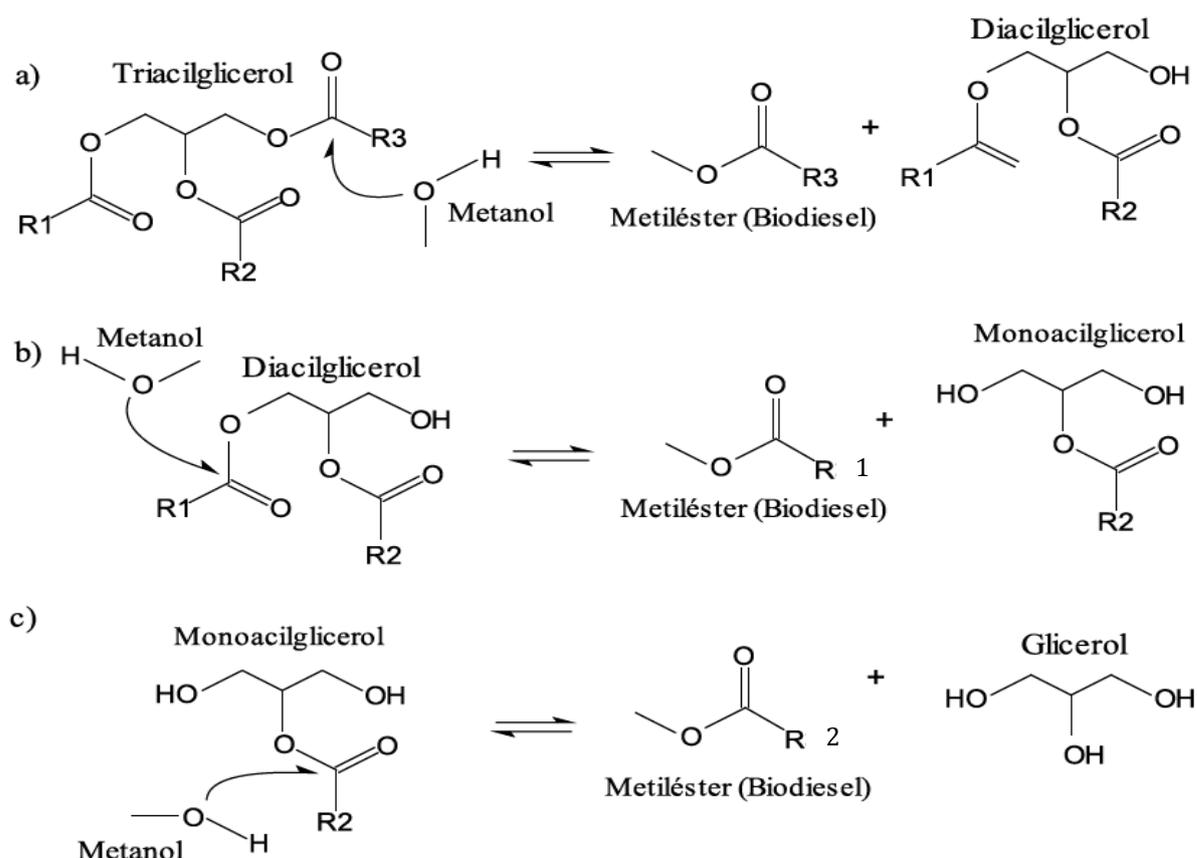


Figura 5 - Esquema reacional da síntese de Biodiesel por transesterificação de triacilglicerol.

A utilização das lipases na síntese de biodiesel tem vantagens sobre os catalisadores químicos, pois apresenta maior rendimento (mais de 98%), menor gasto de energia, redução da quantidade de água residual (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009), recupera o glicerol de forma mais simples e com melhor qualidade (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; FUKUDA, KONDO & NODA, 2001), proporciona a transesterificação de glicerídeos com maior conteúdo de ácidos graxos e a transesterificação total dos ácidos graxos livres (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

Em contrapartida, a atual tecnologia utilizada para biocatálise ainda não alcançou condições ideais para ser aplicada em escala industrial (ROYON *et al.*, 2007). Se o custo das lipases não fosse tão elevado e elas fossem reaproveitadas após o término do processo, teríamos condições que viabilizariam o uso industrial da biocatálise (JAEGER & EGGERT, 2002).

#### 2.5.1 Efeitos dos Tipos de Alcoóis na Produção de Biodiesel

Entre os alcoóis escolhidos na transesterificação o etanol e o metanol são usados com maior frequência, especialmente este último por seu baixo custo e suas vantagens físicas e químicas (polar e álcool de cadeia curta) (MA & HANNA, 1999; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009). Na prática, a relação molar entre álcool/óleo precisa ser maior que 3:1, ou seja, o excesso de álcool é usado para conduzir o equilíbrio a um rendimento máximo de ésteres (MA & HANNA, 1999), além de aumentar a velocidade da alcóolise (WATANABE *et al.*, 2000).

No meio reacional o excesso de metanol ( $>1.5$  mol/L) permanece como gotas insolúveis dispersas no óleo (SHIMADA *et al.*, 1999). O contato da lipase com estas gotas de metanol é suficiente para inativar a referida enzima, com consequente diminuição da metanólise, sendo a inativação enzimática irreversível (SHIMADA *et al.*, 1999; SHIMADA *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2000). Algumas estratégias são adotadas para solucionar este problema como: adição de metanol em etapas (passo-a-passo) (WATANABE *et al.*, 2000), que apresenta-se efetiva para a completa conversão e evitar inativação da lipase; uso de solventes orgânicos que permite uma melhor dissolução do metanol no meio (NELSON, FOGLIA & MARMER, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001).

Quando a redução da emissão de gases estufa está em questão a origem do álcool tem grande destaque. Hoje a maior parte do metanol provém de fonte fóssil (gás natural ou carvão). Contudo, o objetivo principal do uso do biodiesel é a redução da dependência de combustíveis fósseis. Para isso, o etanol é largamente produzido a partir de fontes renováveis, contribuindo para diminuição dos gases de efeito estufa (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

### 2.5.2 Uso de Solventes Orgânicos na Produção de Biodiesel

Para que os catalisadores enzimáticos sejam ecológica, econômica e energeticamente superiores aos catalisadores tradicionais, a utilização de um método enzimático reacional livre de solventes orgânicos (*t*-butanol, *n*-hexano, éter de petróleo) deve ser meta para a futura produção industrial (SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; CHEN & WU, 2003; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

O risco de explosão, o aumento do reator para acomodar solventes e reagentes e a necessidade de remoção do solvente por destilação ou extração, necessitando de maior gasto energético, tornam o uso de solventes orgânicos inviáveis para a aplicação industrial (SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 2002; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009). Em contrapartida, a produção de biodiesel em um sistema livre de solvente é caracterizada por um menor rendimento de ésteres, necessitando ser otimizada para tornar-se viável (FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009).

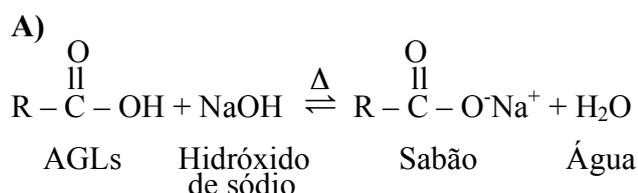
### 2.5.3 Produção de biodiesel usando matérias-primas com alto conteúdo de ácidos graxos livres (AGL)

A eleição da matéria-prima para a fabricação de biodiesel é fortemente influenciada pelos arranjos produtivos locais. Além disso tem importância essencial, uma vez que seu impacto sobre os custos de produção é altamente expressivo, em torno de 60-75% (ATADASHI *et al.*, 2012). Embora o Brasil possua uma diversidade de matérias-primas para produção de biodiesel (dendê, girassol, pinhão manso, macaúba, canola, linhaça, gergelim, dentre outras), a soja é a oleaginosa mais utilizada (75,74%) (Figura 6) (ANP, 2012; RAMOS, 2006). Considerada uma oleaginosa com baixo teor de óleo por unidade de peso, sua liderança é favorecida em razão do custo-benefício. O óleo da soja é um subproduto do processamento de seu farelo protéico, o qual possui alta demanda comercial (DALL'AGNOL, 2007).

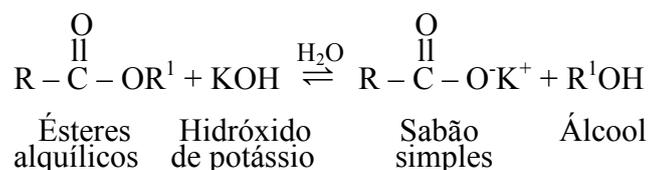


Figura 6 - Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (perfil nacional). Mês de referência: Março/2012. Fonte: ANP - Boletim Mensal de Biodiesel, Abril de 2012.

Matérias-primas alternativas, como óleos e gorduras residuais (OGRs), têm sido empregadas visando reduzir o custo da produção do biodiesel, tornando-o um combustível comercialmente competitivo (VÉRAS *et al.*, 2011). OGRs são interessantes ambiental e economicamente, uma vez que estão relacionados com aproveitamento de um resíduo que é normalmente descartado diretamente em esgoto doméstico (RAMOS, 2006). Todavia, a catálise alcalina – principal método de produção de biodiesel – exige a utilização de óleos com alto grau de pureza, baixos teores de ácidos graxos livres (AGL) e umidade. OGRs possuem altas taxas de AGLs ocasionando inconvenientes na catálise alcalina: formação de sabão (Figura 7), consumo do catalisador alcalino, baixa eficiência catalítica, aumento da viscosidade do biodiesel e formação de géis, tornando a purificação do biodiesel bruto complicada (ATADASHI *et al.*, 2012). Esses problemas podem ser minimizados consideravelmente através da aplicação da catálise heterogênea que usa catalisadores sólidos ou enzimas.



**B)**



**Figura 7 – Reações de saponificação com ácidos graxos livres (AGLs) (A) e com ésteres alquílicos (B). Fonte: ATADASHI *et al.*, 2012.**

#### 2.5.4 Lipases Imobilizadas

O elevado custo da lipase é uma das principais desvantagens da catálise enzimática (BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996; SHIMADA *et al.*, 1999; ISO *et al.*, 2001; JAEGER & EGGERT, 2002; FJERBAEK, CHRISTENSEN & NORDDAHL, 2009) e é um problema crucial para a utilização do processo enzimático na produção industrial de biodiesel (WATANABE *et al.*, 2000; KUMARI *et al.*, 2009). Uma estratégia para reduzir o custo da lipase seria a imobilização enzimática – uma técnica que permite a utilização do catalisador enzimático repetidamente (ISO *et al.*, 2001; KUMARI *et al.*, 2009).

Algumas funções designadas como vantagens da técnica de imobilização são: separar fisicamente a enzima do meio de reação para manter a conformação tridimensional da enzima cataliticamente ativa em meio orgânico (BALCÃO, PAIVA & MALCATA, 1996); facilitar a recuperação do catalisador para posterior reutilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000; KUMARI *et al.*, 2009); aumentar a estabilidade, com aumento do tempo de vida útil do catalisador (JAEGER, DIJKSTRA & REETZ, 1999; VILLENEUVE *et al.*, 2000); impedir a inativação da enzima por substâncias químicas (VILLENEUVE *et al.*, 2000); dispersar homoganeamente a enzima no meio orgânico, o que é essencial, para uma eficiente reação enzimática (CASTRO & ANDERSON, 1995).

A enzima comercial lipase B da *Candida antarctica* (Novozym435) utilizada neste estudo em reações para produção de biodiesel, é imobilizada em resina acrílica macroporosa, que é um suporte rígido e estável (PETKAR *et al.*, 2006).

#### 2.6 Variantes de Lipases

As lipases, em sua maioria, atuam sobre micelas, sendo capazes de fazer a hidrólise da

gordura em AGL, DAG, MAG e glicerol. Estas micelas possuem o seu interior preenchido por lipídios (substrato) e o meio externo é formado por água, local onde a lipase está solúvel.

Para que a lipase possa exercer sua função catalítica é necessário um sistema de emulsão onde haja uma interface lipídio-água. Por esse motivo, a tampa que cobre o sítio ativo da maioria das lipases funciona como uma interconexão entre o meio aquoso e o meio orgânico.

Muitos processos reacionais industriais não são viáveis nesta condição. Em alguns casos, a lipase deve exercer sua ação em um meio homogêneo composto pelos lipídios substratos e por um receptor de acila que pode ser água em pequenas quantidades ou um álcool (WATANABE *et al.*, 2000; SHIMADA *et al.*, 1999). Co-solventes podem ser adicionados para garantir uma mistura homogênea entre os lipídios substratos e o álcool (FERRÃO-GONZALES *et al.*, 2011; ROYON *et al.*, 2007; ISO *et al.*, 2001). Nesses casos especiais, as lipases precursoras não exercem a função catalítica adequadamente devido ao fato das mesmas terem desenvolvido, durante o processo evolutivo das espécies que as originaram, características próprias para funcionarem em sistema emulsificado. Por isso, as lipases disponíveis comercialmente não são adequadas para estes processos industriais.

A remoção da tampa presente nas lipases deverá exercer ação positiva sobre sua função em meio orgânico homogêneo ou contínuo. Para manter a integridade dos outros domínios protéicos das lipases variantes, diversas modificações podem ser apresentadas para garantir uma ligação adequada entre aminoácidos localizados imediatamente anteriores a região da tampa com os imediatamente posteriores na estrutura primária da proteína. O aminoácido glicina pode ser um bom candidato para compor esta referida ligação devido a sua alta mobilidade e pequena cadeia lateral, quando comparado aos outros aminoácidos.

Desta forma, lipases variantes com atividade aumentada de hidrólise, esterificação e transesterificação em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituições dos aminoácidos na região caracterizada como “lid” ou tampa das lipases precursoras.

## 2.7 Modelagem Molecular clássica: Mecânica Molecular e Dinâmica Molecular

A Modelagem Molecular surgiu da necessidade de se representar a estrutura da matéria no nível molecular (SANTOS, 2001). Atualmente, é possível a interpretação das relações

entre a estrutura e atividade biológica de moléculas, pois a Modelagem Molecular possui ferramentas que auxiliam na construção, visualização, análise e armazenamento de modelos de sistemas moleculares complexos (SILVA, 2006). De modo geral, duas aproximações têm sido usadas nos cálculos de Modelagem Molecular, são elas a clássica, como Mecânica Molecular (MM) e Dinâmica Molecular (DM), e a aproximação quântica, que inclui os métodos *ab initio* e semi-empíricos (SILVA, 2006; SANT'ANNA, 2009). Todavia, a preferência entre estes dois métodos é motivada pelo atributo que se anseia avaliar, pela precisão, bem como pela capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009).

A MM caracteriza as moléculas como uma coleção de átomos unidos por forças harmônicas (SILVA, 2006). Para prever a estrutura e energia das moléculas, são desprezados os movimentos dos elétrons e considerados os movimentos nucleares. A energia total das moléculas pode ser calculada pela soma individual de parâmetros chamados de forças potencias (campo de força) (NAMBA, 2008). Essas forças podem ser referentes às interações ligantes (comprimento de ligação, ângulo de ligação e ângulo diedro) e não-ligantes (eletrostáticas e de van der Waals - RODRIGUES, 2001). Para estruturas moleculares que possuam valores de parâmetros que se afastam dos valores de referência são atribuídos penalidades energéticas: quanto maior o desvio, maior a penalidade energética e maior a energia (SILVA, 2006; SANT'ANNA, 2009).

A energia cinética dos átomos permite a ocorrência de colisões intermoleculares e o alcance variado de conformações estáveis pelas moléculas (SANT'ANNA, 2009). Estas oscilações moleculares podem ser simuladas por equações de movimento da Dinâmica Molecular, uma vez que sejam conhecidos os potenciais de interação entre estas partículas bem como as equações que regem seu movimento (MARTÍNEZ, 2007; NAMBA, 2008). Algumas propriedades dependentes do tempo (difusão, dobramento de cadeias moleculares, distribuição de moléculas de solvente ao redor de um soluto) podem ser estudadas através do uso da evolução temporal dos movimentos moleculares, para isso a DM serve-se dos princípios de Mecânica Estatística (MARTÍNEZ, 2007; SANT'ANNA, 2009).

### 3 JUSTIFICATIVAS

A escassez de combustíveis fósseis tem trazido a tona a necessidade de desenvolvimento de formas renováveis de energia. Entre elas, o biodiesel tem se mostrado bastante viável, embora padeça de entraves para satisfazer a adição cada vez maior de biodiesel ao diesel. Esta demanda não poderá ser atendida sem melhorias na capacidade de produção e aproveitamento de novas matérias-primas por vias economicamente viáveis. A catálise alcalina é o processo que domina o mercado. No entanto, é consenso na comunidade científica e produtiva que novos processos devem ser desenvolvidos para aproveitamento de maior gama de matérias-primas. O processo de produção enzimática, por exemplo, traz diversos benefícios como a diminuição de passos de lavagem, a plena recuperação do catalisador e a possibilidade de uso de material com alta acidez, como resíduos graxos (OGRs). Adicionalmente, a inibição observada nas lipases comerciais pelos álcoois usados na síntese de biodiesel fazem com que grandes quantidades de catalisadores e longos tempos de reação sejam requeridos, tornando o processo economicamente inviável. Este projeto prevê o desenvolvimento de processos laboratoriais, escalonáveis para fins industriais, de processos de expressão heteróloga, purificação e imobilização de enzimas lipases para serem aplicadas como catalisadores economicamente viáveis na síntese de biodiesel. Estas alternativas serão importantes no desenvolvimento da produção de biodiesel por rota etílica, assim como para o aproveitamento de matérias-primas de baixo custo como resíduos graxos e óleos com alta acidez. Tais estratégias trazem como principal benefício o aumento da viabilidade econômica da produção de biodiesel.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Produzir catalisadores enzimáticos específicos para o meio reacional da produção de biodiesel, capazes de serem usados em OGRs, através da expressão heteróloga de lipases.

### 4.2 Objetivos específicos

- Prospectar o crescimento e desenvolvimento da tecnologia de produção enzimática de biodiesel no mundo do ano de 1990 até o ano de 2011.
- Produzir etil esterres de ácidos graxos por catálise enzimática a partir de um processo de adição única de álcool, sem acréscimo de co-solventes e curto tempo reacional.
- Desenhar clones de lipases a partir da sequência da lipase B de *Pseudozyma antarctica*.
- Avaliar a estabilidade dos clones de lipases desenhados por Dinâmica Molecular
- Expressar lipase B de *Pseudozyma antarctica* selvagem e mutante em sistema de alta saída.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Meios Utilizados para Crescimento e Transformação de Bactérias

- Meio Lúria-Bertani (LB) – Líquido (SABROOK *et al.*,v.3, A 2.2)

Triptona	10g
NaCl	10g
Extrato de levedura	5g
Água destilada (q.s.p)	1.000 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 mol/L. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min.

- Meio Lúria-Bertani (LB) com ágar (SABROOK *et al.*,v.3, A 2.2)

Este meio foi preparado conforme o LB descrito anteriormente, adicionando-se apenas 2% de ágar.

- Meio GYT (SABROOK *et al.*,v.3, A 2.2)

Glicerol 10%	10 mL
Extrato de levedura	0,125g
Triptona	0,25g
Água ultrapura (q.s.p)	100 mL

Os reagentes foram dissolvidos em água ultra-pura. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 min e estocado a 4°C.

- Meio SOB (SABROOK *et al.*,v.3, A 2.3)

Triptona	20g
Extrato de levedura	5g
NaCl	0,58g
KCl	0,18g
Água ultra-pura (q.s.p)	1.000 mL

A solução foi aultoclavada a 120°C durante o período de 20 min e, posteriormente, adicionou-se 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.

- Meio SOC (SABROOK *et al.*,v.3, A 2.3)

Este meio foi feito conforme o SOB, descrito anteriormente, adicionando-se 20mM de glicose.

### 5.1.2 Reagentes e Soluções Utilizados na Eletroforese Unidimensional de Proteínas

- Gel de Concentração 5% (5 mL) (SABROOK *et al.*,v.3, A 8.43)

Água	3,4 mL
Acrilamida 30%	830 $\mu$ L
Tris 1 M pH 6,8	630 $\mu$ L
SDS 10%	50 $\mu$ L
PSA 10%	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

- Gel de Separação 12% (10 mL) (SABROOK *et al.*,v.3, A 8.43)

Água	3,3 mL
Acrilamida 30%	4,0 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L
PSA 10%	100 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L

- Acrilamida 30%

Acrilamida 29%	14,5g
Bisacrilamida 1%	0,5g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

Guardar a solução ao abrigo da luz.

- Tris 1M pH 6,8

Tris	6,06g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

- Tris 1,5M pH 8,8

Tris	9,08g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

- SDS 10%

SDS	5g
Água ultra-pura (q.s.p)	50 mL

Guardar em temperatura ambiente.

- PSA 10%

PSA	0,1g
Água ultra-pura (q.s.p)	1 mL

Estocar em alíquotas de 100  $\mu$ L em freezer.

- Tampão de corrida 10X concentrado

Tris 25 mM	30,28g
Glicina 250 mM	187,67g
SDS 0,1%	10g
Água ultra-pura (q.s.p)	1.000 mL

Diluir antes de usar.

- Tampão de amostra

Tris 50 mM pH 6,8	0,06g
SDS 2%	0,2g
Azul de bromofenol 0,1%	0,01g
Glicerol 10%	1 mL
Água (q.s.p)	10 mL

Misturar os reagentes e adicionar DTT 1M ou  $\beta$ -mertaptoetanol 1 $\mu$ L/mL de tampão na hora que for usar.

- Solução Corante Azul de Coomassie

Azul de Coomassie Brilhante	0,25g
Metanol:Ácido acético glacial	100 mL

- Solução Metanol:Ácido acético glacial

Metanol	500 mL
Água	400 mL
Ácido acético glacial	100 mL

- Solução Descorante

Metanol 50% (v/v)
Água 40% (v/v)
Ácido Acético Glacial 10% (v/v)

### 5.1.3 Soluções Utilizadas na Expressão das Proteínas Recombinantes

- Solução de IPTG 1mM

IPTG	1g
Água ultra-pura	4,19 mL

- Solução estoque de Kanamicina 50 µg/mL

Kanamicina	250 mg
Água ultra-pura	5 mL

A solução foi esterilizada por filtração em sistema Milipore 0,22 µm. Aplicar 0,5 mL para 500 mL de meio.

## 5.2 Metodologia experimental

### 5.2.1 Simulações de Dinâmica Molecular

Para investigar a estrutura da lipase B selvagem de *Pseudozyma antarctica* e seus 10 mutantes, foram efetuadas simulações de DM. Este método consiste em resolver as equações de Newton acopladas para todas as partículas do sistema. Para isso, foi usado um programa tipo “core” (programa que realiza cálculos científicos), o GROMACS 4.0. A minimização de

energia para a otimização da estrutura foi feita utilizando-se do campo de força GROMOS 96. O campo de força é um conjunto de equações e parâmetros que descreve o comportamento dos átomos. Cada campo de força tem particularidades para descrever melhor as propriedades moleculares do sistema a ser simulado. Para realizar a minimização de energia, é preciso determinar uma caixa onde a proteína está imersa. A simulação foi realizada em caixas cúbicas de aproximadamente  $365.000 \text{ nm}^3$  contendo em torno de 10.600 moléculas de água.

O algoritmos de minimização usados foram: o “Steepest-descent” com restrição de posição (position restrained) de ligantes e critério de convergência de  $100.00 \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ , seguido por “Steepest-descent” sem restrição de posição, o método dos Gradientes Conjugados e finalmente, o método Quazi-Newton Rapson até uma energia de  $1.00 \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ . Os sistemas minimizados foram então submetidos às simulações de DM em duas etapas. Inicialmente, foi feita uma DM com restrição de posição de 500 ps à 300 K para todo o sistema, exceto as moléculas de água, para assegurar um equilíbrio das moléculas do solvente em torno dos resíduos da proteína. Posteriormente, foram realizados 20.000 ps de DM sem restrição de posição à 300K, usando 2 fs como tempo de integração e um corte de 10 Å para interações de longa distância. Um total de 300 conformações foram obtidas durante cada simulação. Nesta etapa, as listas dos vizinhos foram atualizadas a cada 500 passos, aos resíduos de Arg e Lys foram atribuídas cargas positivas e aos resíduos de Glu e Asp foram atribuídas cargas negativas. Para analisar as estruturas geradas após as etapas de otimização e DM, foram usados os programas VMD e Swiss-Pdbviewer. Gráficos da variação da energia total, distância, variação de RMSD e ligações de hidrogênio formadas durante as simulações de DM foram gerados pelo programa Origin. Imagens qualitativas espaciais de RMSD foram geradas pelo programa MolMol e as figuras dos quadros de simulação de DM foram gerados pelo programa PyMol.

### 5.2.2 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de *E. coli* por eletroporação

A linhagem bacteriana para produção de células competentes foi a Rosetta-gami<sup>TM</sup> 2(DE3) Competent cells (Novagen®, catálogo 71351). O esquema abaixo ilustra a metodologia (Figura 8). O vetor de expressão usado foi o pET-28b(+) (Novagen®, catálogo 69258). Para introdução do DNA plasmidial em *E. coli* foi feita a técnica de transformação por eletroporação (Figura 8). Esse método foi descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989.

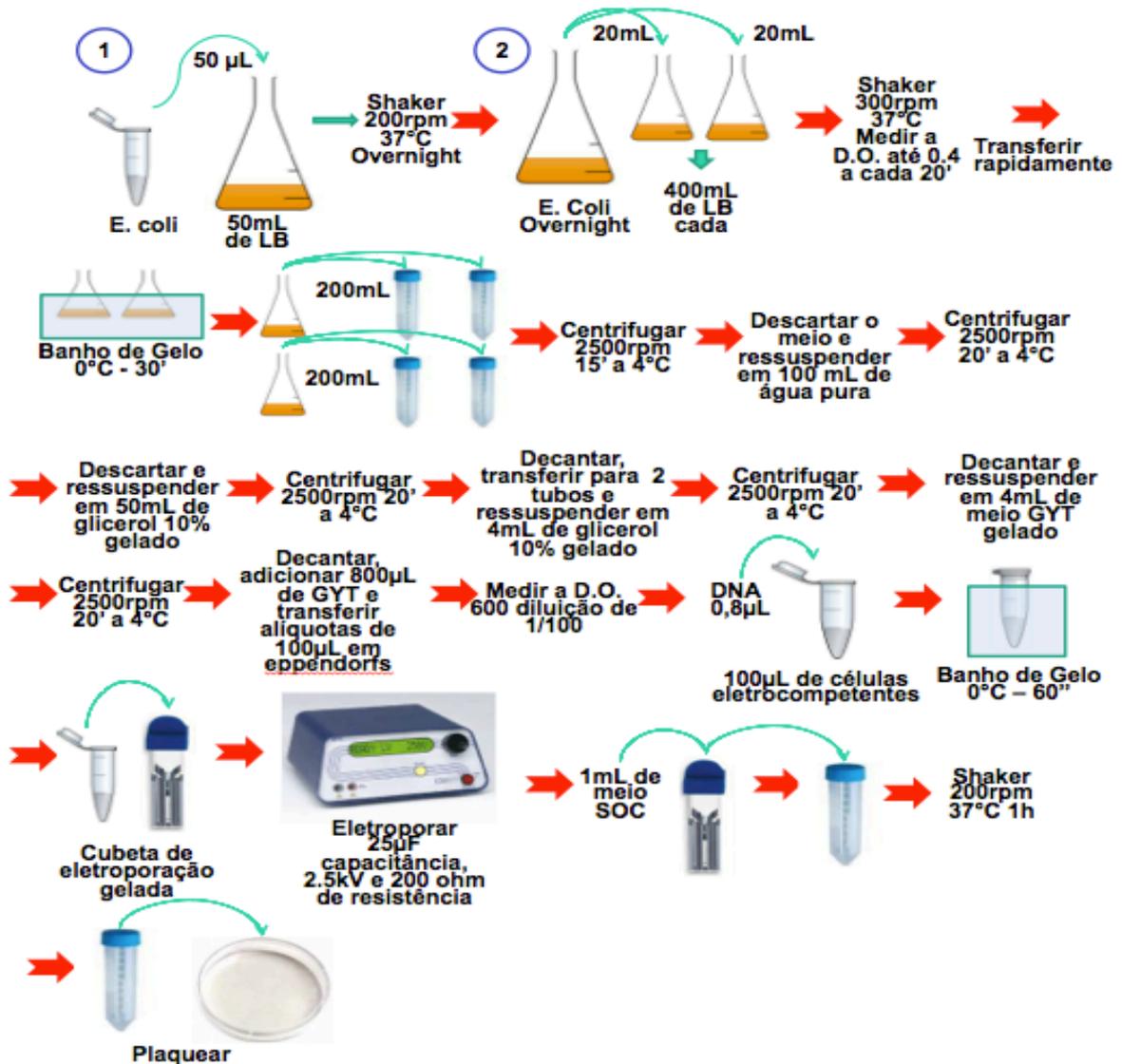


Figura 8 - Fluxograma do procedimento experimental utilizado para transformação de *E. coli* por eletroporação.

### 5.2.3 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante

Cepas de *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3) foram usadas para expressar PalB selvagem e mutante (pET-28b (+) PalB). Para fazer o pré-inóculo, uma colônia de uma placa recém semeada foi usada para inocular 10 mL de meio LB suplementado com o antibiótico kanamicina (50 µg/mL). Incubou-se por no máximo 16h em shaker à 37°C e 200 rpm. A partir desta pré-cultura, uma alíquota de 1 mL foi usada para inocular 100 mL de LB suplementado com kanamicina (50 µg/mL) em frascos de 500 mL. O inóculo foi incubado a 37°C e 200 rpm até uma Densidade Ótica (D.O) a 600 nm entre 0.5 e 0.6. Posteriormente, a cultura foi

resfriada em gelo e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranoside) foi adicionado para uma concentração final de 1 mM e a expressão da proteína foi realizada a 25°C por 20 horas e a 37°C durante 3 horas.

#### 5.2.4 Análise por SDS-PAGE

As proteínas totais das amostras foram visualizadas por eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%. As amostras da expressão foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi usado. Junto ao pellet adicionou-se 20  $\mu$ L de tampão de amostra com DTT (Ditiotreitol) (agente redutor). Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos. Em seguida, 5  $\mu$ L de cada amostra foram aplicados nos poços do gel. O marcador de padrão de peso molecular de proteína (Benck Mark Protein ladder, Invitrogen) utilizado como referência foi de 10 a 220 kDa. Por último a cuba é fechada e ligada a uma fonte de energia.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Prospecção Tecnológica da Produção Enzimática de Biodiesel

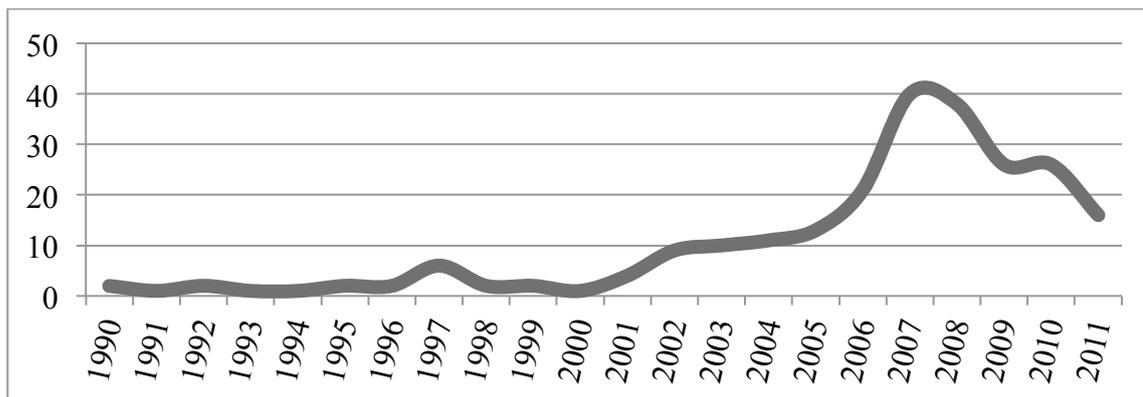
A evolução anual de patentes da produção enzimática de biodiesel aponta o panorama do desenvolvimento desta tecnologia no mundo. Uma prospecção de patentes que abordavam a produção enzimática de biodiesel foi realizada em maio de 2012. A busca foi feita através do Banco Europeu de Patentes, o Espacenet®, utilizando-se das palavras-chave e códigos constantes na Tabela 2. Para o estudo estatístico aqui representado foram identificadas 236 patentes.

**Tabela 2 - Pesquisa por Palavras-chave e Códigos de Classificação Européia<sup>1</sup>**

Palavras-chave										Códigos										Espacenet®
Lipase*	Ethyl ester*	Ethyl methyl ester*	Biologic* diesel*	Biocatalys*	Enzym*	Transesterif*	Biodies*	C10L1	C10G3	C11B13	C11C3	C11C3/00B	C11C3/02	C11C3/04	C11C3/08	C11C3/10	C12N9	Quantidade		
					X												X	26.148		
						X	X											453		
	X				X													325		
					X						X							141		
		X			X													138		
					X		X											125		
					X											X		83		
X							X											67		
			X		X													65		
					X										X			44		
X	X				X													42		
					X							X						42		
					X			X										38		
X								X										34		
					X	X	X											14		
					X									X				11		
					X					X								10		

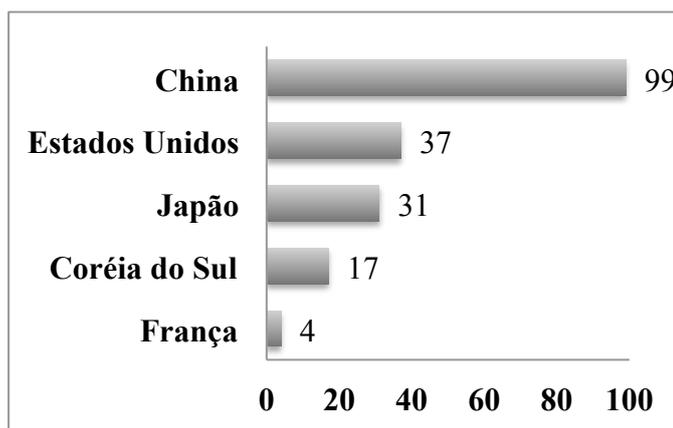
<sup>1</sup> Pesquisa realizada na base Worldwide em 29 de maio de 2012. Item: Keyword(s) no título ou no resumo. Classificação Européia.





**Figura 9 - Evolução Anual de Patentes da Produção Enzimática de Biodiesel**

Dentre os principais países depositantes, a China detém o maior número de patentes nessa área (Figura 10), seguida pelos Estados Unidos, Japão, Coréia do Sul e França. Em percentuais a participação da China equivale a 41,9%.

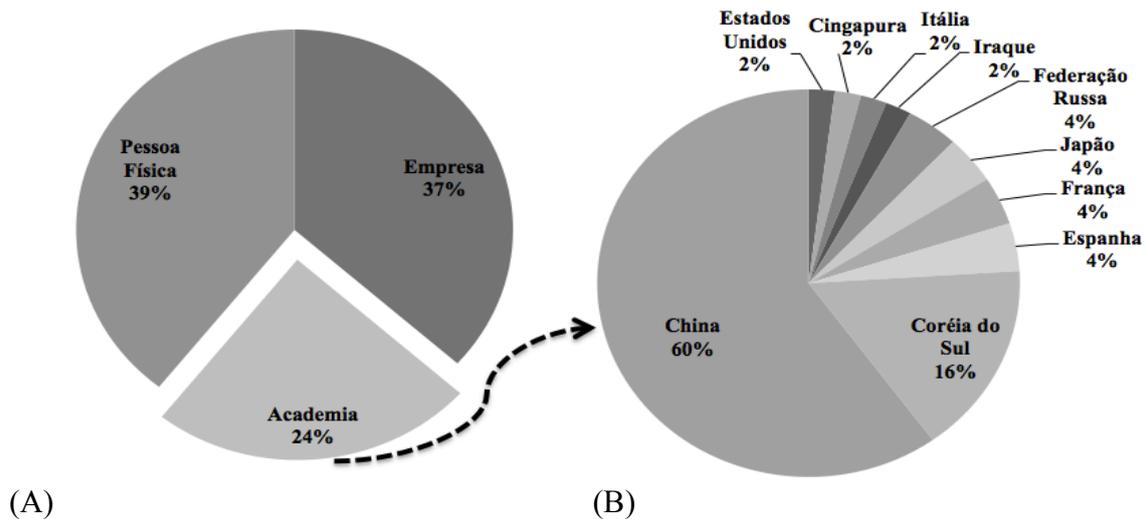


**Figura 10 - Evolução do número de patentes apropriadas pelos principais países depositantes.**

Segundo dados da Agência Internacional de Energia – IEA (2010), a China assume o primeiro lugar no consumo de energia mundial, ultrapassando os Estados Unidos, por ter sido menos atingida pela crise financeira mundial. O país também é o maior emissor de gases de efeito estufa, responsável por 22% das emissões globais, e isso pode justificar a sua liderança no pesado investimento em tecnologias relacionadas ao Biodiesel (INPI, 2010) pois o país está buscando maneiras de limitar o crescimento das emissões de CO<sub>2</sub>.

O perfil da titularidade das patentes da produção enzimática de biodiesel é apresentado na Figura 11. Verifica-se uma maior tendência de proteção da tecnologia por pessoas físicas (39%) (Figura 11 A), todavia há um equilíbrio com as outras duas vertentes: empresas e

academias. Dentre as academias depositantes (Figura 11 B), 60% foram chinesas, destas a Universidade de Tsinghua, que tem um forte programa de engenharia e ciência aplicada, contribuiu com 20 patentes.



**Figura 11 - Detentores de patentes da produção enzimática de biodiesel: (A) por tipo de depositante (pessoa física, academia e empresas), (B) detalhe da localização das academias por país.**

Há uma parceria da Coppe-UFRJ com a Universidade de Tsinghua, em Pequim, através do Centro China-Brasil de Mudanças Climáticas e Tecnológicas Inovadoras para Energia, inaugurado em 2009 (COPPE-UFRJ, 2010). O Centro China-Brasil tem o objetivo de promover cooperações tecnológicas e acadêmicas com ênfase nas áreas de energia e meio ambiente, incluindo tecnologias limpas e desenvolvimento sustentável. Um dos projetos envolve a utilização do bagaço da cana-de-açúcar destinados das indústrias de Etanol para produção de Biodiesel (JORNAL DA CIENCIA; COPPE-UFRJ, 2010). A China quer se tornar referência na área da produção de biodiesel e faz destaque para utilização da lipase como principal catalisador na geração de energia.

## 6.2 Artigo 1: One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media

Author's personal copy

Bioresource Technology 102 (2011) 9653–9658



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)



### One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media

Ilvania C. Vêras<sup>b</sup>, Frederico A.L. Silva<sup>a</sup>, Astria D. Ferrão-Gonzales<sup>a</sup>, Vitor Hugo Moreau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Biotecnologia (NuBiotec), Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Biointeração – ICS – Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 9 June 2011

Received in revised form 1 August 2011

Accepted 2 August 2011

Available online 10 August 2011

##### Keywords:

Biodiesel

Enzymatic production

Lipase

Solvent-free medium

One-step

#### ABSTRACT

This work aims to demonstrate the enzymatic production of fatty acid ethyl ester biodiesel from highly acidic feedstock in a single-step reaction, without co-solvents and avoiding the inhibition of the enzyme by ethanol and glycerol. Additionally, an empirical equation is proposed to predict the kinetics of the production reaction as a function of the used feedstock and catalyst concentration. Biodiesel production from highly acidic feedstock perform via simultaneous esterification of free fatty acids and transesterification of triacylglycerols. Enzymatic catalysis is one of the most promising alternative technologies for the biodiesel production. Increasing of the enzymatic bioactivity is crucial for the success of such process in industrial scale. Currently, stepwise addition of the alcohol or the use of co-solvents have been proposed to avoid enzyme inhibition, such strategies add downstream processes to the production. These results can be applied to the development economical-viable enzymatic production of biodiesel in industrial scale.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Biodiesel has become an important renewable fuel as an alternative to petroleum-based energy. Biodiesel is considered a carbon-neutral fuel because the carbon present in its exhaust originally comes from the plant taking in atmospheric carbon and fixing it. Considering the existing restrictions on greenhouse gas emissions, biodiesel provides significant advantages compared with petroleum-based fuels. Biodiesel consists either of fatty-acids-methyl-esters (FAME) from methanolysis reactions or fatty-acids-ethyl-esters (FAEE) when using ethanolysis reactions. Industrial sources routinely produce biodiesel from vegetable oil using alkaline transesterification of triacylglycerols (TAG), which generates glycerol as a by-product and requires additional purification steps. Additionally, the presence of even a small amount of contaminating free fatty acid (FFA), less than 4%, impairs the transesterification reaction by forming soaps when alkaline catalyst is added (Ma and Hanna, 1999; Fukuda et al., 2001).

*Abbreviations:* FA, fatty acid; FFA, free fatty acid; FAEE, fatty acid ethyl ester; FAME, fatty acid methyl ester; TAG, triacylglycerol; HAWF, high-acidity waste feedstock; POFA, palm oil fatty acid; CRO, chicken residual oil; TLC, thin layer chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography.

\* Corresponding author at: Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia – LBE Faculdade de Tecnologia e Ciências – FTC Av. Luiz Vianna Filho, 8812, Mod.I, sala 504 CEP: 41741-590, Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 3281 8193.

E-mail address: [vhmoreau@pq.cnpq.br](mailto:vhmoreau@pq.cnpq.br) (V.H. Moreau).

The high cost of feedstock for biofuel production can represent up to 95% of the total cost of production and acts as one of the main bottlenecks to its universal production and consumption (Kulkarni and Dalai, 2006; Zhang et al., 2003). Most Biodiesel plants are currently using refined edible vegetable oils as their main feedstock; therefore, the cost of refined vegetable oils contributes to most of the overall production cost. Thus, the price of biofuel feedstock controls the global price of biodiesel (Lam et al., 2010). Using low cost feedstocks, such as waste cooking oil and other high-acidity fats, can reduce this cost (Lou et al., 2008; Watanabe et al., 2005; Zafropoulos et al., 2007), but these sources can form soap during alkaline-catalyzed transesterification, which inhibits the biofuel production reaction (Zhang and Jiang, 2008). Furthermore, large amounts of soap can aggregate and prevent the separation of glycerol from biodiesel (Demirbas, 2009; Zhang and Jiang, 2008). Acid-catalyzed transesterification has been proposed as a method for biodiesel production from high-acid oils. Many chemical methods have been developed to produce biodiesel by esterification of FFAs (Berchmans and Hirata, 2008; Lou et al., 2008; Zafropoulos et al., 2007; Zhang and Jiang, 2008). Both processes provide the opportunity to use low-cost, high-acidity substrates for biodiesel production (Cavalcanti-Oliveira et al., 2011; Kusdiana and Saka, 2004).

Recently, researchers have proposed methods to produce biodiesel by enzymatic transesterification using immobilized lipases as the catalytic agent. Lipases (E.C.3.1.1.3) have become popular in the last 10 years because they are active in mild reaction conditions

while also generating fewer undesirable by-products. These enzymatic reactions make the recovery of biofuel products easy and are insensitive to the presence of FFA (Kulkarni and Dalai, 2006). The catalysts can also be recovered after reaction, which lowers the cost of biofuel production. Although lipase-catalyzed biodiesel production has certain advantages, the process has not been fully implemented on an industrial scale due to the high cost of enzymes, slow reaction rates and the deactivation of enzymes due to reaction by-products (Bajaj et al., 2010). The large amount of enzyme needed for each reaction makes this process extremely expensive. Paired with long reaction times of about 24 h, these systems are cost-prohibitive to industrial producers. Commercial lipases are inhibited by the polar coating effect that short-chain alcohols, such as methanol and ethanol, and glycerol have on the surface of the enzyme, which decrease their interaction with TAG (Fu and Vasudevan, 2010; Lara and Park, 2004; Tan et al., 2010). To avoid this inhibition, strategies such as the use of co-solvents like *t*-butanol (Ferrão-Gonzales et al., 2011; Fu and Vasudevan, 2010; Lara and Park, 2004; Li et al., 2006; Royon et al., 2007), the use of longer-chain alcohols (for instance, *n*-butanol) as acyl acceptors (Iso et al., 2001) and the stepwise addition of short-chain alcohols, as methanol and ethanol (Hama et al., 2007; Matassoli et al., 2009; Wang et al., 2010) have been suggested; however, such strategies require additional downstream processing that makes production more expensive and time-consuming. Presently, there are no processes that produce biodiesel in an industrially-viable manner and with a one-step addition of short chain alcohols.

This work presents a new method of biodiesel production by simultaneous enzymatic esterification of FFA and transesterification of TAG, two products that are present in high-acidity waste feedstocks (HAWFs) from palm oil (*Elaeis guineensis*) refinement and the chicken processing industry, called chicken residual oil (CRO). The HAWFs used in this work have different ratios of FFA and TAG. The results suggest that the FFA present in HAWFs can act as a surfactant to avoid the coating effect that causes lipase inhibition. Additionally, an empirical equation is proposed, based on the rate constants for the esterification and transesterification reactions, that predicts the yields of the enzymatic FAEE production from HAWFs with high efficiency. Our results may help develop enzymatic processes for biodiesel production that have the potential to be both economically and technically viable for industrial applications.

## 2. Methods

### 2.1. Enzymatic reactions

FAEE Biodiesel synthesis was performed in a Tec-Bio-1,5 reactor (Tecnal, Piracicaba, SP) attached to a reflux condenser. Temperature and agitation were controlled automatically by the reactor software interface. HAWFs, including palm oil fatty acid (POFA) obtained from distilling oil palm from (*E. guineensis*) oil or chicken residual oil (CRO) obtained from broiler chicken processing in the food industry, were equilibrated with ethanol at a ratio of 1:5 at 60 °C. The molar excess of ethanol was calculated using the average fatty acid composition and density of the used feedstocks. The fatty acid (FA) compositions of the HAWFs were obtained from Dubois et al. (2007) and from Feddern et al. (2010). Immobilized lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) was then added at the weight-to-volume concentrations described in Figures caption. The system was reacted at 60 °C at a constant stirring speed of 400 rpm. A filter was installed in the bottom sampler of the reactor flask to separate the catalyst from the collected aliquots during sampling. Aliquots were collected using a 1 mL syringe through the bottom sampler of the reactor without stopping the agitation.

The thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC) or titrimetric analysis were performed using 200 µL of the samples, as described below.

### 2.2. Titrimetric analysis of free fatty acid

For titrimetric analysis, reaction aliquots were diluted in 15 mL of ethanol and 6 drops of 0.1% phenolphthalein. Titration of free fatty acid was then performed against a standardized 0.05 N KOH solution until the phenolphthalein changed color. Blank titrations of 15 mL of ethanol were performed to measure the basal acidity of the alcohol. All titrations were conducted in triplicate. All reagents used were of analytical grade of purity.

### 2.3. Measurement of fatty acid methyl esters and triacylglycerols

To measure the FAEE and TAG contents, 800 µL of hexane was added to each sample and mixed vigorously, and then, 150 µL of this mix was diluted in 850 µL of methanol and analyzed by chromatography in a Hitachi Elite Lachrom HPLC equipped with a 20 µL sample loop. HPLC analyses were performed using a C18 Lichrosphere column (Merck) equilibrated at 40 °C. UV absorption was measured at 210 nm. Chromatographic runs were performed by isocratic elution using a mixture of methanol:hexane (85:15) for FFA, FAEE and TAG analysis (Royon et al., 2007). Yields of FAEE production were determined by the fraction of FAEE in the samples measured by the absorbance at 210 nm using FAEE standards from Supelco. All solvents and standards used were of chromatographic grade.

Immobilized lipase from *C. antarctica* (Novozym 435) was kindly given by Novozymes Latin America. POFA was donated by Petrobras (Biodiesel Production Unity, UBC Candeias, BA). CRO was provided by Biotank Gestão de Resíduos LTDA, Lauro de Freitas, BA. All other reagents were of analytical grade.

## 3. Results and discussion

This work demonstrates an enzymatic process for the production of FAEE-based biodiesel from HAWF. Two HAWFs were used in this work: FFA from palm oil (POFA) and chicken residual oil (CRO). A 50–50 blend of the two feedstocks was also used to evaluate the effect of the feedstock acidity on the kinetics of the enzymatic production of FAEE. Both feedstocks were used in raw form, with no pre-treatment. The acidities and TAG content of HAWF were determined as described in the Section 2. Table 1 summarizes the main properties of POFA, CRO and the blend of these two HAWFs, hereafter referred to as Blend. Acidity is expressed as acidity index ( $I_a$ ) what reflects the concentration of FFA in fraction of equivalent mols of oleic acid. TAG content is expressed as TAG index ( $I_{TAG}$ ) what reflects the fraction of FA in TAG form.

Although the oil to alcohol molar ratio is one of the parameters that usually affect the production yields of biodiesel, there is no agreement on the influence of this parameter on the rate constant of the lipase activity in different reaction media, mainly if high-acidity feedstocks are used (Fjerbaek et al., 2009). Thus, each

**Table 1**  
Acidity index ( $I_a$ ), fraction of TAG ( $I_{TAG}$ ) and density ( $D$ ) of feedstocks.

Feedstock	$I_a^a$	$I_{TAG}$ (mol/mol) <sup>b</sup>	$D$ (g/ml)
POFA	0.805 ± 0.002	0.120 ± 0.008	0.8991 <sup>c</sup>
CRO	0.089 ± 0.002	0.824 ± 0.016	0.9112 <sup>d</sup>
Blend	0.455 ± 0.004	0.479 ± 0.028	0.9009 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> In equivalent mol of oleic acid.

<sup>b</sup> Considering the average fatty acid composition (see Material and Methods).

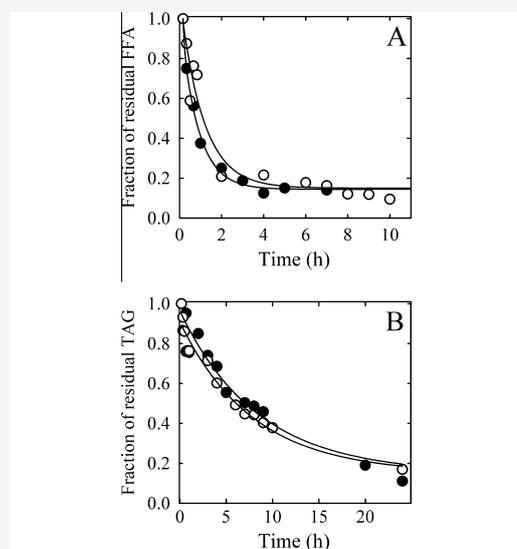
<sup>c</sup> At 40 °C.

<sup>d</sup> At 25 °C.

reaction system must be analyzed in detail in order to determine its particular dependence on the oil to alcohol ratio. It has been described that the influence of oil to alcohol ratio on Novozym 435 was minimized when high-acidity substrates are used (Du et al., 2007). In this work, an oil to ethanol ratio of 1:5 was used since we have found that the rate constant of FAEE production from HAWF has a small dependence on the oil to alcohol ratio up to 1:10 (data not shown).

Three approaches were used to assess the production of FAEE: (i) measurements of the decay of the acidity to track the conversion of FFA and ethanol into FAEE by esterification; (ii) measurements of the decay of TAG content to assess the conversion of TAG and ethanol into FAEE by transesterification; and (iii) measurements of appearance of FAEE levels in the reaction products from both the esterification and transesterification reactions. These combined analytical strategies allowed us to independently determine the rate constants for the simultaneous esterification and transesterification reactions during FAEE production.

Fig. 1 shows the kinetics of FAEE production using 1.5% (w/v) Novozym 435 as the catalyst and POFA (open circles) or CRO (closed circles) as feedstock. FAEE production was assessed by measuring the amount of esterification of FFA (Panel A) and transesterification of TAG over time (Panel B). This data shows that the esterification and transesterification reaction kinetics are not affected by the concentration of FFA or TAG present in the initial feedstock. Table 2 summarizes the rate constants for the esterification of FFA and for the transesterification of TAG in POFA, CRO and the Blend.  $k_E$  and  $k_T$  are the rate constants of esterification and transesterification reactions, respectively, measured as first order



**Fig. 1.** Enzymatic production of FAEE by simultaneous esterification and transesterification: Production kinetics of FAEE using 1.5% (w/v) Novozym 435 as the catalyst were determined in a unique reaction, as shown in the Section 2. Panel A shows FAEE production reaction followed by esterification of FFA, while Panel B shows FAEE production followed by transesterification of TAG. Esterification of FFA was followed by the measurement of the residual FFA content and transesterification of TAG was followed by measurement of the fraction of residual TAG, as described in Section 2. FAEE enzymatic production was performed using both POFA (open circles) and CRO (closed circles). Data-fitting lines were calculated using a single exponential decay model. The results represent a single representative experiment.

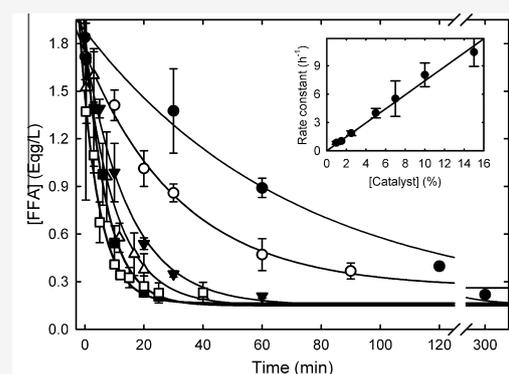
**Table 2**  
Rate constants for esterification and transesterification of HAWF.

Feedstock	$k_E$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_T$ ( $\text{h}^{-1}$ )
POFA	$0.92 \pm 0.23$	$0.13 \pm 0.03$
CRO	$1.20 \pm 0.28$	$0.12 \pm 0.03$
Blend	$1.01 \pm 0.59$	$0.11 \pm 0.02$

reactions. The reaction kinetics for both esterification and transesterification occur in a single exponential fashion ( $R^2 > 0.98$ ) as previously demonstrated for transesterification in *t*-butanol system (Ferrão-Gonzales et al., 2011). Nevertheless, the rate constants for both esterification ( $k_E$ ) and transesterification ( $k_T$ ) could be determined by fitting the data to single exponential equations. Rate constants for esterification and transesterification are not significantly influenced by the acidity of the feedstock, as demonstrated by the similar kinetics values for the POFA, CRO and Blend feedstocks. These results indicate that common kinetic behaviors might exist during the enzymatic production of FAEE when acidity and TAG content are taken into account.

To investigate the reaction rate constant's dependence on catalyst concentration, a range of catalyst concentrations was used to produce FAEE and measured the reaction kinetics, as shown in Fig. 2. The rate constant of the production reaction increased in a linear fashion with the concentration of the catalyst. This behavior was also observed for the transesterification reaction (data not shown), which allowed us to include the catalyst concentration as another parameter in our empirical FAEE rate constant prediction equation. As shown in Fig. 1 and Table 2, rate constants for both esterification ( $k_E$ ) and transesterification ( $k_T$ ) are not dependent on the acidity of the HAWF. This is noted by the similar rate constants measured for the three HAWFs used. The magnitude of the exponential growth for the reaction yields is proportional to the acidity index ( $I_a$ ) for esterification and to the TAG content ( $I_{TAG}$ ) for transesterification. These two parameters measure the molar fraction of fatty acids and thus reflect the amount of FA converted to FAEE by these two pathways.

Based on a series of independent measurements of esterification and transesterification reaction rate constants, the following empirical equation was derived to determine the kinetic behavior of overall FAEE production as a function of the time:



**Fig. 2.** Catalyst concentration influences FAEE production kinetics: Kinetics of FAEE production by esterification using POFA were determined by titrimetric analysis as shown in the Section 2, in the presence of 1% (closed circles), 3% (open circles), 5% (closed triangles), 7% (open triangles), 10% (closed squares) and 15% (open squares) Novozym 435 (w/v). Inset shows the reaction rate constants as a function of the catalyst concentration. Error bars represent MSD from three experiments.

$$f(t) = 1 - I_a \cdot e^{-k_E t} + I_{TAG} \cdot e^{-k_T t} \quad (1)$$

where  $I_a$  and  $I_{TAG}$  are the fraction of FFA and TAG, respectively (see Table 1),  $C$  is the concentration of Novozym 435 (in % w/v) in relation to the reaction mixture,  $k_E$  and  $k_T$  are the absolute rate constants for esterification and transesterification, and  $t$  is the time in hours.

Using this equation, it is possible to predict the reaction kinetics of FAEE production from any HAWF given only its acidity index and TAG content. Eq. (1) was used to predict the kinetics of FAEE production as a function of the acidity of the feedstock and the concentration of the catalyst. Fig. 3 shows predictions of the enzymatic FAEE production by simultaneous esterification of FFA and transesterification of TAG. Panel A shows the predicted kinetics as a function of the concentration of the catalyst in a feedstock with a high acidity index (0.8), and Panel B shows predicted kinetics as a function of the acidity index of the feedstock, holding the catalyst concentration constant at 1.5%. The symbols are experimental points measured for the FAEE production by HPLC (see Section 2). Our prediction using  $I_a = 0.09$  fit well to the experimental data corresponding to CRO feedstock ( $I_a = 0.089 \pm 0.002$ ), while our predictions using  $I_a = 0.45$  and  $I_a = 0.80$  fit the experimental data corresponding to the Blend ( $I_a = 0.455 \pm 0.004$ ) and POFA ( $I_a = 0.805 \pm 0.002$ ), respectively. As shown in Fig. 3, there is excellent agreement between the experimental and predicted kinetics for FAEE production for each feedstock and catalyst concentration used. In previous work, Ferrão-Gonzales et al. (2011) demonstrated that the enzymatic production of FAEE using neat rapeseed oil showed a mono-exponential rate constant, suggesting a first (or pseudo-first) order reaction. Here, it was observed that FAEE yields

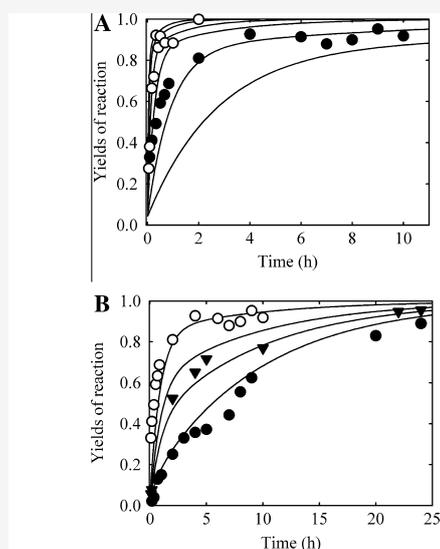
varied over time in a second order exponential manner, where the first rate constant is similar to that observed for the esterification reaction, while the second rate constant reflected observed values for the transesterification reaction (see Table 2). Similar results were observed if  $I_{TAG}$  was substituted by  $1 - I_a$  in Eq. (1) (data not shown).

The enzymatic production of FAEE from HAWFs using Novozym 435 performed faster than most processes presented in literature, even those that include stepwise addition of an alcohol or co-solvent (Fjerbaek et al., 2009; Marchetti and Errazu, 2008). As seen in Fig. 3, even faster reaction speeds could be achieved by using higher concentrations of catalyst. Reaction times as short as 20 min were seen at catalyst concentrations above 10%. These results can be used to predict the behavior of enzymatic FAEE production for different reactor designs as a function of the available feedstock.

Although lipase-catalyzed production of biodiesel presents many advantages compared to chemical catalysis, the process has not yet been fully implemented on an industrial scale due to the high cost of enzyme production, slow reaction rates and enzyme deactivation (Bajaj et al., 2010). Biodiesel production by the enzymatic transesterification of vegetable oils lacks efficiency due to the interference of short-chain alcohols with lipase activity in the presence of TAG. To avoid this toxic affect, stepwise addition of alcohols (Hama et al., 2007; Matassoli et al., 2009; Wang et al., 2010) and the use of co-solvents (Ferrão-Gonzales et al., 2011; Fu and Vasudevan, 2010; Lara and Park, 2004; Li et al., 2006; Royon et al., 2007) have been proposed. These strategies, though effective for a laboratory-scale reaction, add downstream steps to production that reduce their viability for industrial application. Enzymatic production of biodiesel has been also proposed in supercritical fluid (Ciftci and Temelli, 2011). Although the production in supercritical fluid is a promise technology, it still requires expensive and time-consuming process. Our results suggest that the toxic effect exerted by low-chain alcohols on the lipase can be drastically reduced if FFA and ethanol are used as reactants.

The enzymatic production of biodiesel by transesterification of TAG oils requires further strategies to avoid the inhibition of lipase, such as the addition of co-solvents (Ferrão-Gonzales et al., 2011; Fu and Vasudevan, 2010; Lara and Park, 2004; Li et al., 2006; Royon et al., 2007) or stepwise addition of the alcohol (Hama et al., 2007; Matassoli et al., 2009; Wang et al., 2010). Both solutions, though feasible, add downstream processes to the production, making it expensive and time-consuming. Short-chain alcohols and glycerol inhibit enzymes by forming a hydrophilic coat on the enzyme's surface that exclude TAG from the active site (Fu and Vasudevan, 2010; Hama et al., 2007; Tan et al., 2010). The use of co-solvents is believed to reduce the interfacial tension that arises in solution due to solubility issues between methanol (or ethanol) and TAG. By interacting with the enzyme active site, TAG can consequently be transesterified (Li et al., 2006; Tan et al., 2010). Such low solubility is not observed for ethanol in FFAs or FFA-rich feedstocks, such as most HAWF oils. In the presence of Novozym 435, FFAs are quickly esterified with ethanol to form FAEE, suggesting that these conditions at least partially inhibit ethanol's toxic effect by lowering the superficial tension between FFA and ethanol. These results demonstrate that Novozym 435 is able to not only esterify FFA but also transesterify TAG present in HAWFs at a kinetic rate constant comparable to those observed for co-solvent systems (Ferrão-Gonzales et al., 2011; Fu and Vasudevan, 2010; Lara and Park, 2004; Li et al., 2006; Royon et al., 2007). This outcome suggests that FFA and ethanol can act together as solvents, preventing the toxic enzyme-coating effect and allowing TAG to access the lipase active site.

By using ethanol to produce biodiesel from HAWFs minimizes, or even abolishes, the inhibitory effect observed when edible oils and fats are used as the feedstock. As a consequence, our method can take place in less than two hours if anhydrous ethanol and 7%



**Fig. 3.** Predicting the kinetics of FAEE production: FAEE production kinetics were predicted using Eq. (1). Predictions were made as a function of the concentration of the catalyst (Panel A) and the acidity of the feedstock ( $I_a$ ) (Panel B) and were then compared to the corresponding experimental data. Panel A: Lines represent the predicted kinetics of enzymatic FAEE production using the following catalyst concentrations (C): from 0.5%, 1.5%, 5%, 10%, 20% and 30% (w/v) (from bottom to top). Experiments were performed with 1.5% (closed circles) and 10% (open circles) Novozym 435 (w/v). Panel B: Lines represent the predicted kinetics of enzymatic FAEE production using the acidity index ( $I_a$ ) values of different HAWFs (from bottom to top): 0.09, 0.45, 0.65 and 0.80. Experiments were performed with CRO (closed circles), the Blend (closed triangles) or POFA (open circles).

catalyst are used, whereas other biodiesel processes in the literature can take hours to complete (Fjerbaek et al., 2009). The reaction kinetics increase linearly with catalyst concentration up to 15% w/v, which corresponds to a reaction time of approximately 30–40 min (Fig. 2). This process may be considered for use in continuous flow reactions in a bed reactor where enzyme concentrations can be even greater.

In a previous work, the dependence of the kinetics of enzymatic FAEE production on the temperature was demonstrated using Novozym 435 (Ferrão-Gonzales et al., 2011). The rate constant for enzymatic transesterification increases with temperature up to 60 °C. In this work, production experiments were performed at 60 °C because Novozym 435 has shown to be stable at 50–60 °C for our reaction times (Chen et al., 2011; Du et al., 2008; Royon et al., 2007; Talukder et al., 2008). Additionally, the use of Novozym 435 in a continuous packed-bed reactor for 50 days at 60 °C without any loss of enzymatic activity has been reported (Séverac et al., 2011). Because Eq. (1) was based on experiments performed at 60 °C, values for  $k_f$  and  $k_T$  must be adjusted for processes that are carried out at other temperatures to accurately predict the kinetics of FAEE. The optimal temperature of reaction for performing enzymatic catalysis is a trade-off between the speed/yields of the reaction and the catalyst life time. As immobilization of the enzyme allows its reutilization, processes in which the enzyme remains stable and, consequently can be reusable for several times with minimal deactivation, are desirable in order to improve the viability of the biodiesel production. For economic reasons, the best processes are those that give the highest yields in the shortest time and at the lowest temperature. However, inactivation of the enzyme over time must be considered as well.

Most of the biodiesel produced worldwide is made using methanol. However, methanol is mostly obtained from fossil sources. Ethanol, however, can be obtained from renewable sources, such as corn or sugarcane, which makes FAEE-based biodiesel a fully renewable biofuel. Ethanol-based biodiesel production could be an economically viable alternative in ethanol-producing countries, such as USA and Brazil.

As long as enzyme production and immobilization become faster and cheaper, the enzymatic production of biofuels could be industrially viable because of its short reaction times and its use of ethanol and HAWF as feedstocks. Developing reactors for this purpose is a crucial step toward economically competitive biodiesel. This work could aid in the development of such reactors by simulating production conditions for a range of HAWFs and experimentally determining conditions for the available feedstocks.

#### 4. Conclusion

This work demonstrates an enzymatic process for the production of FAEE from HAWF through simultaneous esterification and transesterification. The enzymatic production of FAEE performed faster than most processes presented in literature, even those that include stepwise addition of alcohol or co-solvents. An empirical equation was derived to determine the kinetic behavior of FAEE production. The kinetics of FAEE production from any HAWF can be predicted given only its acidity index and TAG content. These results can be used to predict the behavior of enzymatic FAEE production as a function of the available feedstock.

#### Acknowledgements

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

The authors thank Novozymes Latin America for Novozym 435 samples, PETROBRAS (Unidade de Biodiesel de Candeias – UBC),

Candeias, BA for POFA samples, and Biotank Gestão de Resíduos LTDA, Lauro de Freitas, BA, Brazil for CRO samples.

The authors also thank Dr. Leonardo Maestri Teixeira for the critical reading of this manuscript.

#### References

- Bajaj, A., Purva, L., Prabhat, N., Rajesh, M., 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification, an overview. *J. Mol. Catal.* 62, 9–14.
- Berchmans, H.J., Hirata, S., 2008. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresour. Technol.* 99, 1716–1721.
- Cavalcanti-Oliveira, E.A., da Silva, P.R., Ramos, A.P., Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G., 2011. Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzym. Res.* 2011, 618692.
- Chen, H.C., Hen, Y.J., Wu, T.T., Liu, Y.C., Lee, C.C., Chang, C., Chung, Y.L., Chwen, J.S., 2011. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor, optimization and enzyme reuse study. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 950725.
- Ciftci, O.N., Temelli, F., 2011. Continuous production of fatty acid methyl esters from corn oil in a supercritical carbon dioxide bioreactor. *J. Supercritical Fluids* 58, 79–87.
- Demirbas, A., 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Manag.* 50, 14–34.
- Du, W., Wang, L., Liu, D., 2007. Improved methanol tolerance during Novozym435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. *Green Chem.* 9, 173–176.
- Du, W., Li, W., Sun, T., Chen, X., Liu, D., 2008. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *App. Microbiol.* 79, 331–337.
- Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 710–732.
- Fedderm, V., Kupski, L., Cipolatti, E.P., Giacobbo, G., Mendes, G.L., Badiale-Furlong, E., Souza-Soares, L.A., 2010. Physico-chemical composition, fractionated glycerides and fatty acid profile of chicken skin fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 1277–1284.
- Ferrão-Gonzales, A.D., Veras, I.C., Silva, F.A.L., Alvarez, H.M., Moreau, V.H., 2011. Thermodynamic analysis of the kinetics reactions of the production of FAME and FAEE using Novozyme 435 as catalyst. *Fuel Process. Technol.* 92, 1007–1011.
- Fjerbaek, L., Christensen, K.V., Norddahl, B., 2009. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1298–1315.
- Fu, B., Vasudevan, P.T., 2010. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil. *Energy and Fuels* 24, 4646–4651.
- Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 405–416.
- Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H., 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Biochem. Eng. J.* 34, 273–278.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J. Mol. Catal. B. Enz.* 16, 53–58.
- Kulkarni, M.G., Dalai, A.K., 2006. Waste cooking oil an economical source for biodiesel, a review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 2901–2913.
- Kusdiana, D., Saka, S., 2004. Two-step preparation for catalyst-free biodiesel fuel production. *App. Biochem. Biotechnol.* 115, 781–791.
- Lam, M.K., Lee, K.T., Mohamed, A.R., 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel, a review. *Biotechnol. Adv.* 28, 500–518.
- Lara, P.V., Park, E.Y., 2004. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enz. Microb. Technol.* 34, 270–277.
- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L., Li, Z., 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J. Mol. Catal. B. Enz.* 43, 58–62.
- Lou, W.Y., Zong, M.H., Duan, Z.Q., 2008. Efficient production of biodiesel from high free fatty acid-containing waste oils using various carbohydrate-derived solid acid catalysts. *Bioresour. Technol.* 99, 8752–8758.
- Ma, F., Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production, a review. *Bioresour. Technol.* 70, 1–15.
- Marchetti, M., Errazu, F., 2008. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esteri cation reaction of oleic acid. *Fuel* 87, 3477–3480.
- Matassoli, A., Correa, I.N.S., Portilho, M.F., Veloso, C.O., Langone, M.A.P., 2009. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. *App. Biochem. Biotechnol.* 155, 347–355.
- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S., 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. *Bioresour. Technol.* 98, 648–653.
- Séverac, E., Galy, O., Turon, F., Monsan, P., Marty, A., 2011. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. *Bioresour. Technol.* 102, 4954–4961.

## Author's personal copy

9658

I.C. Véras et al./Bioresource Technology 102 (2011) 9653–9658

- Talukder, M.M.R., Wu, J., Lau, S.K., Cui, L.C., Shimin, G., Lim, A., 2008. Comparison of Novozym 435 and Amberlyst 15 as heterogeneous catalyst for production of biodiesel from palm fatty acid distillate. *Energy and Fuels* 23, 1–4.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F., 2010. Biodiesel production with immobilized lipase, a review. *Biotechnol. Adv.* 28, 628–634.
- Wang, Y., Shen, X.Y., Li, Z., Li, X., Wang, F., Jiang, J.C., 2010. Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system. *J. Mol. Catal. B. Enz.* 67, 45–51.
- Watanabe, Y., Pinsirodom, P., Nagao, T., Kobayashi, T., Nishida, Y., Takagi, Y., Shimada, Y., 2005. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 825–831.
- Zafiroopoulos, N.A., Ngo, H.L., Foglia, T.A., Samulski, E.T., Lin, W., 2007. Catalytic synthesis of biodiesel from high free fatty acid-containing feedstocks. *Chem. Commun.* 35, 3670–3672.
- Zhang, J., Jiang, L., 2008. Acid-catalyzed esterification of *Zanthoxylum bungeanum* seed oil with high free fatty acids for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 99, 8995–8998.
- Zhang, Y., Dube, M.A., McLean, D.D., Kates, M., 2003. Biodiesel production from waste cooking oil, 2 economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresour. Technol.* 90, 229–240.

### 6.3 Patente 1: “PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE”

1/14

#### “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE”

##### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se a um novo processo de produção de biodiesel catalisado por lipase, mais particularmente a partir de matérias-primas graxas de alta acidez, preferencialmente oriunda dos resíduos de óleos e gorduras (OGRs). A síntese de biodiesel ocorre através de reações concomitantes de esterificação de ácidos graxos livres (AGL) e transesterificação de triacilgliceróis (TAG) presentes nas referidas matérias-primas, utilizando álcoois de cadeia curta. Nesta invenção há um rendimento maior de ésteres em curto tempo reacional, pois não há inibição da lipase pelo álcool de cadeia curta.

##### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

No processamento industrial químico convencional a síntese de biodiesel é usualmente obtida por uma reação de transesterificação alcalina (Ma & Hanna 1999; Al-Zuhair 2005; H.-C. Chen et al. 2011). Os catalisadores alcalinos proporcionam transesterificações rápidas e com alta conversão de triacilgliceróis aos seus correspondentes ésteres (Ma & Hanna 1999).

Contudo, a catálise básica apresenta alguns inconvenientes como: dificuldades em recuperar o glicerol; gasto intensivo de energia; incompleta transesterificação na presença de pequena quantidade de ácidos graxos livres e/ou; água durante a reação leva à ocorrência de hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos graxos livres; formação de sabão causa aumento da viscosidade e interfere na separação

do glicerol; requer tratamento de águas residuais alcalinas (Yuji Shimada et al. 1999; Ma & Hanna 1999; Yomi Watanabe et al. 2000; H Fukuda et al. 2001). A variável mais importante que afeta o preço do biodiesel é a matéria-prima, responsável por 70-95% do custo total do éster (Zhang et al. 2003; Kulkarni & Dalai 2006; Lam et al. 2010). A maioria dos esquemas para produção de biodiesel utilizam como principal matéria-prima, óleos vegetais refinados, que contribui com 80% das despesas globais de produção industrial. A redução dos custos de produção pode ser alcançadas utilizando-se de matérias-primas de baixo custo como: óleo de cozinha, resíduos de gorduras de alta acidez e óleos vegetais não comestíveis (Lou et al. 2008; Yomi Watanabe et al. 2005; Zafiroopoulos et al. 2007). Devido aos inconvenientes supracitados, alternativas têm sido buscadas para evitar os problemas relacionados à catálise alcalina. Neste sentido, a catálise enzimática é uma opção interessante para a fabricação de biodiesel em escala industrial porque pode reduzir os custos da produção (Fjerbaek et al. 2009).

As enzimas aplicadas na produção de biodiesel são as lipases. O uso industrial das lipases para este fim ainda não é viável economicamente, pois o custo da enzima é elevado e os efeitos causados pelo excesso de metanol (necessário para que a reação ocorra) e glicerol (produzido durante a reação) na enzima são negativos (Y Shimada et al. 1999; L. Li et al. 2006; Royon et al. 2007). Vários estudos têm sido conduzidos com dois objetivos: produzir lipases mais específicas para esse fim e otimizar as condições reacionais para as reações conduzidas com as enzimas disponíveis comercialmente.

Foi observado que a lipase imobilizada é inativada na presença de razão molar entre álcool e óleo acima de 1.5 com alcoóis de cadeia curta, pois estes apresentam pouca miscibilidade com o óleo contendo altas quantidades de triacilglicerol (H.-ching Chen et al. 2011; Yuji Shimada et al. 1999). A superfície polar das enzimas, assim

como as resinas acrílicas usada para imobilização das mesmas adsorvem compostos polares como metanol e etanol, bloqueando a entrada de triglicerídeos no sítio ativo causando a interrupção da reação (H.-ching Chen et al. 2011). Algumas estratégias são adotadas para solucionar este problema como: adição de metanol em etapas (Y 5 Watanabe et al. 2000) para evitar que a razão molar entre o metanol e o óleo fique acima de 1:1; e uso de solventes orgânicos, *tert*-butanol) para permitir uma melhor dissolução do metanol no meio contendo triacilglicerol (Yuji Shimada et al. 1999; Iso et al. 2001).

Para que os catalisadores enzimáticos sejam ambiental, econômica e 10 energeticamente superiores aos catalisadores tradicionais, a utilização de um método enzimático reacional livre de solventes orgânicos (*t*-butanol, *n*-hexano, éter de petróleo) deve ser meta para a futura produção industrial de biodiesel (Yuji Shimada et al. 1999; Yuji Shimada et al. 2002; Iso et al. 2001; H.-ching Chen et al. 2011; Fjerbaek et al. 2009).

15 O risco de explosão, o aumento do reator para acomodar solventes e reagentes e a necessidade de remoção do solvente por destilação ou extração, necessitando de maior gasto energético, torna o uso de solventes orgânicos inviáveis para a aplicação industrial (Yuji Shimada et al. 1999; Yuji Shimada et al. 2002; Iso et al. 2001; H.-ching Chen et al. 2011; Fjerbaek et al. 2009). Em contrapartida, a produção de biodiesel em um sistema 20 livre de solvente é caracterizada, até o momento, por um menor rendimento de ésteres, necessitando ser otimizada para tornar-se viável (Fjerbaek et al. 2009).

### TÉCNICA RELACIONADA

O artigo apresentado por ROYON *et al.*, [“*Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as solvent*”, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007], mostra a produção de biodiesel usando lipase imobilizada de *Candida antarctica* como catalisador e *t*-butanol como solvente, tendo as vantagens de eliminar o efeito negativo do metanol insolúvel pela adição de *t*-butanol no meio reacional e rendimento de 97% na produção de ésteres. No entanto apresenta como desvantagens possuir um elevado tempo de reação de 24 horas e a necessidade do uso de solvente orgânico, como o *t*-butanol, na reação para obter o rendimento desejado de ésteres, sendo necessário se acrescentar passos adicionais para a separação do solvente do produto, onerando assim os custos da reação.

O artigo apresentado por WATANABE *et al.*, [“*Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized Candida antarctica Lipase*”. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, 2000], mostra a produção de biodiesel usando lipase de *Candida Antarctica*, tendo as vantagens de um rendimento de 95%, no entanto apresenta a desvantagem de adicionar o metanol em etapas (paulatinamente) no curso da reação havendo, então, a necessidade de procedimentos para adição deste álcool por diversas vezes no decorrer da reação. Adicionalmente, o tempo total de reação passa a ser muito elevado, em torno de 36 horas havendo necessidade de uma quantia alta de catalisador em torno de 4% de lipase.

O artigo apresentado por ISO *et al.*, [“*Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase*”. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001], mostra a produção de biodiesel usando lipase de *Pseudomonas fluorescens*, tendo a vantagem de um rendimento de 90% de

5/14

ésteres, no entanto apresenta as desvantagens de o tempo reacional ser em torno de 25 horas, necessidade de adição de solvente orgânico como o 1,4-dioxano. A adição deste solvente também traz a necessidade de passos adicionais para a sua separação do produto final, onerando assim o processo.

5 O artigo apresentado por SHIMADA *et al.*, [“Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p.789-793, 1999”], mostra a produção de biodiesel usando lipase de *Candida Antarctica*, tendo a vantagem de apresentar um rendimento de 98,4%, porém apresenta as desvantagens da conversão total ser após 72 horas e  
10 necessitar da adição paulatina de metanol.

Todos os processos apresentados no Estado da Técnica utilizam um dos dois seguintes artifícios: adicionar paulatinamente o álcool de cadeia curta utilizado como matéria-prima ou adição de um solvente para melhorar a mistura homogênea das matérias-primas. Nos dois casos, há necessidade de passos adicionais durante ou ao  
15 final do processo. No caso do uso de solvente, é preciso proceder à separação deste solvente do produto final durante a purificação; um processo adicional de destilação normalmente é utilizado para este fim. No caso da adição paulatina do referido álcool, é preciso proceder à adição de matéria-prima durante a reação em intervalos de tempo determinados. O **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO**  
20 **POR LIPASE** apresentado na presente invenção traz como vantagem em relação ao Estado da Técnica, o uso de matérias-primas compostas por ácidos graxos livres em triacilgliceróis em proporções que permitam a interação favorável entre a referida matéria-prima com o álcool de cadeia curta utilizado e o sítio ativo da enzima. O

6/14

referido processo tem como vantagem não apresentar a necessidade do uso de solventes, tampouco da necessidade de adicional o álcool de cadeia curta de maneira paulatina.

O uso do processo contido nesta invenção permite a produção de biodiesel com todas as vantagens já conhecidas no Estado da Técnica para a catálise por lipase e, ainda  
5 com a vantagem adicional de possibilitar a utilização de matérias-primas graxas de quaisquer valores de acidez desde de que combinadas para se obter uma mistura com acidez que permita a reação sem adição paulatina de álcool ou uso de solvente para evitar a inibição da enzima pelo álcool de cadeia curta ou pelo glicerol. Em consequência da abolição da inibição da lipase, os tempos de reação se tornam mais  
10 curtos e o processo mais viável técnica e economicamente.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Magnificamente, os inventores trazem um novo método para produção de biodiesel  
15 livre de solventes orgânicos a partir de matérias-primas graxas de alta acidez. A presente invenção possui as seguintes características:

- a) A síntese de biodiesel ocorrer através de reações concomitantes de esterificação de ácidos graxos livres e transesterificação de triacilgliceróis presentes nas  
matérias-primas graxas de alta acidez. Preferencialmente óleos ou gorduras  
20 residuais (OGRs).
- b) A síntese de biodiesel ser livre de adição de solventes orgânicos.
- c) Não adicionar paulatinamente (várias etapas) o álcool de cadeia curta durante a reação.

7/14

- d) Favorecer maior rendimento de ésteres pela não inativação da enzima por alcoóis de cadeia curta.
- e) O ácido graxo livre funcionar como solvente adequado para evitar a inibição da lipase pelo álcool de cadeia curta.

5

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

No processo de acordo com a presente invenção, a matéria-prima é composta por ácidos graxos livres com a presença ou não de triacilgliceróis, preferencialmente  
10 óleos e gorduras residuais (OGRs).

O referido álcool de cadeia curta é preferencialmente etanol, sendo mais preferencialmente ainda etanol anidro.

A referida lipase é preferencialmente uma lipase produzida por microorganismo, sendo preferencialmente NOVOZYM 435. Sendo, preferencialmente, utilizada em  
15 reator de batelada, batelada contínua ou de fluxo. A concentração da referida lipase pode variar entre 0,5% e a 30% (p/v) em relação ao volume total do meio de reação. Em reatores de fluxo contínuo, a referida lipase pode ser empacotada em leito fixo podendo sua concentração chegar até 60% (p/v) em relação ao volume total do meio de reação.

20 A temperatura do processo é preferencialmente entre 50°C e 70°C sendo o frasco de reação mantido em contato com a pressão atmosférica através de um condensador de refluxo no caso de reação por batelada ou batelada contínua.

8/14

Em reação utilizando-se reator de fluxo, o meio de reação é bombeado através de um leito fixo contendo lipases imobilizadas em uma base que permite a permeação do referido meio de reação.

5 Em reação utilizando-se reator de fluxo, o meio de reação contendo a referida matéria-prima graxa de alta acidez e o referido álcool de cadeia curta introduzido por um ducto de entrada referido reator e o produto final (biodiesel) os co-produtos e componentes não reagentes são coletado por um ducto de saída do referido reator.

Em uma reação típica efetuada nas condições ideais a conversão de ácidos graxos em biodiesel se mostrou acima de 94%.

10 As vantagens do processo da presente invenção compreendem a utilização de matérias-primas baratas como resíduos de óleos e gorduras (OGRs), reação concomitante de transesterificação e esterificação, adição única do álcool, evita o uso de co-solventes ou coadjuvantes no meio da reação, diminuindo os custos operacionais. Esse novo sistema reduz a influência negativa dos álcoois de cadeia curta,  
15 principalmente do etanol, na lipase, devido aos referidos álcoois serem solúveis nos ácidos graxos livres, dispensando a utilização de solventes e abolindo o referido efeito selante que os álcoois de cadeia curta apresentam na presença de matérias-primas de triacilglicerol. O tempo da reação curto (em torno de 40 minutos a 5 horas) é uma  
20 vantagem sobre os outros processos demonstrados no Estado da Técnica nos quais a reação costuma durar dezenas de horas.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos:

9/14

## Exemplo 1:

Em um reator Tecbio-1,5 da Tecnal foram adicionados óleo residual de frango (óleo com aproximadamente 8% de acidez obtido do processamento de cortes de frango da indústria de alimentos) e etanol anidro na razão molar aproximada de 5:1 (362,7 g de 5 óleo residual de frango e 337,3 g de etanol) com condensador de refluxo. O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C e agitação de 400 rpm. NOVOZYM 435 foi adicionada na proporção de 1,5% (10,5 g) em relação ao volume total do meio de reação. A reação seguiu por cinco horas. O glicerol e o etanol residual foram retirados do meio de reação por lavagem do biodiesel três vezes com água destilada em 10 quantidade igual a 10% do volume do meio de reação.

## Exemplo 2:

Em um reator Tecbio-1,5 da Tecnal foram adicionados ácido graxo bruto (matéria-prima com acidez em torno de 80% oriundo do refino por destilação de óleo 15 de palma) e etanol anidro na razão molar aproximada de 5:1 (362,7 g de ácido graxo bruto e 337,3 g de etanol) com condensador de refluxo. O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C e agitação de 400 rpm. NOVOZYM 435 foi adicionada na proporção de 1,5% (10,5 g) em relação ao volume total do meio de reação. A reação seguiu por cinco horas. O glicerol e o etanol residual foram retirados do meio de reação 20 por lavagem do biodiesel três vezes com água destilada em quantidade igual a 10% do volume do meio de reação.

## Exemplo 3:

Em um reator Tecbio-1,5 da Tecnal foram adicionados uma mistura de ácido graxo bruto (matéria-prima com acidez em torno de 80% oriundo do refino por destilação de óleo de palma) e óleo residual de frango (óleo com aproximadamente 8% de acidez obtido do processamento de cortes de frango da indústria de alimentos), de modo que a mistura, ou blenda, obteve uma acidez de aproximadamente 40%; e etanol anidro na razão molar aproximada de 1:1:10 (181,3 g de óleo residual de frango, 181,3 g de ácido graxo bruto e 337,3 g de etanol) com condensador de refluxo. O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C e agitação de 400 rpm. NOVOZYM 435 foi adicionada na proporção de 1,5% (10,5 g) em relação ao volume total do meio de reação. A reação seguiu por cinco horas. O glicerol e o etanol residual foram retirados do meio de reação por lavagem do biodiesel três vezes com água destilada em quantidade igual a 10% do volume do meio de reação.

## 15 Exemplo 4:

Em um reator de fluxo formado por um tubo preenchido com um leito de lipase imobilizada NOVOZYM 435 foi bombeado a fluxo constante uma mistura contendo ácido graxo bruto (matéria-prima com acidez em torno de 80% oriundo do refino por destilação de óleo de palma), óleo residual de frango (óleo com aproximadamente 8% de acidez obtido do processamento de cortes de frango da indústria de alimentos) e etanol anidro na razão molar aproximada de 1:1:10 (181,3 g de óleo residual de frango, 181,3 g de ácido graxo bruto e 337,3 g de etanol). O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C por imersão em uma jaqueta termostaticada. O produto final foi coletado na saída do tubo e armazenado. O glicerol e o etanol residual foram retirados

do meio de reação por lavagem do biodiesel três vezes com água destilada em quantidade igual a 10% do volume do meio de reação.

## 5 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Afim de melhor demonstrar o alcance da invenção, são apresentadas a seguir diversas figuras ilustrativas do processo envolvido na presente invenção:

Figura 1: Produção de biodiesel, a partir da óleo residual de frango, acompanhado por titulação da acidez da matéria-prima e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A titulação obedeceu parâmetros técnicos da RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999 (ANVISA) e as análises cromatográficas utilizaram metodologia específica para análise de triacilglicerol total (TAG) e biodiesel sob forma de etilésteres de ácidos graxos (EEAG) (Royon et al. 2007). Como mostrado na Figura, círculos negros mostram o desaparecimento de TAG devido à transesterificação enquanto os triângulos mostram a redução da acidez devido à esterificação dos ácidos graxos livres. Ambos os processos seguem curvas de tendência de decaimento exponencial simples, sendo a esterificação mais rápida e a transesterificação mais lenta. Os círculos abertos mostram o aparecimento do biodiesel na forma de EEAG. Este processo segue uma curva de tendência de crescimento exponencial duplo, sendo o componente mais rápido de constante semelhante ao da esterificação e o componente mais lento de constante semelhante ao da transesterificação.

Figura 2: Produção de biodiesel, a partir de ácido graxo de dendê, acompanhado por titulação da acidez da matéria-prima e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A titulação obedeceu parâmetros técnicos da RDC nº 482, de 23 de setembro

12/14

de 1999 (ANVISA) e as análises cromatográficas utilizaram metodologia específica para análise de triacilglicerol total (TAG) e biodiesel sob forma de etilésteres de ácidos graxos (EEAG) (Royon et al. 2007). Como mostrado na Figura, círculos negros mostram o desaparecimento de TAG devido à transesterificação enquanto os triângulos

5 mostram a redução da acidez devido à esterificação dos ácidos graxos livres. Ambos os processos seguem curvas de tendência de decaimento exponencial simples, sendo a esterificação mais rápida e a transesterificação mais lenta. Os círculos abertos mostram o aparecimento do biodiesel na forma de EEAG. Este processo segue uma curva de

10 tendência de crescimento exponencial duplo, sendo o componente mais rápido de constante semelhante ao da esterificação e o componente mais lento de constante semelhante ao da transesterificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Zuhair, S., 2005. Production of Biodiesel by Lipase Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A Kinetics Study. *Biotechnology progress*, 21, pp.1442-1448.
- 5 Chen, H.-C. et al., 2011. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, pp.5-10.
- Chen, H.-ching et al., 2011. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. , 2011, pp.5-10.
- 10 Fjerbaek, L. et al., 2009. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(5), pp.1298-1315.
- Fukuda, H, Kondo, A. & Noda, H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(5), p.405-416.
- 15 Iso, M. et al., 2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), p.53-58.
- Kulkarni, M.G. & Dalai, A.K., 2006. Waste cooking oil an economical source for biodiesel: A review. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(9), p.2901-2913.
- 20 Lam, M.K., Lee, K.T. & Mohamed, A.R., 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, 28(4), p.500-518.
- Li, L. et al., 2006. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), p.58-62.
- 25 Lou, W.Y., Zong, M.H. & Duan, Z.Q., 2008. Efficient production of biodiesel from high free fatty acid-containing waste oils using various carbohydrate-derived solid acid catalysts. *Bioresource technology*, 99(18), p.8752-8758.
- 30 Ma, F. & Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review1. *Bioresource technology*, 70(1), p.1-15.
- Royon, D., Daz, M. & Ellenrieder, G., 2007. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource technology*, 98, pp.648-653.

- Shimada, Y et al., 1999. Conversion of vegetable oil biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, pp.789-793.
- Shimada, Yuji et al., 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), p.789–793.
- Shimada, Yuji et al., 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis*, 17, pp.133-142.
- Watanabe, Y et al., 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, pp.355-360.
- Watanabe, Yomi et al., 2005. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(11), p.825–831.
- Watanabe, Yomi et al., 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal Of The American Oil Chemists Society*, 77(4), pp.355-360.
- Zafiroopoulos, N.A. et al., 2007. Catalytic synthesis of biodiesel from high free fatty acid-containing feedstocks. *Chemical Communications*, (35), p.3670–3672.
- Zhang, Y. et al., 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technology*, 90(3), p.229–240.
- ANVISA, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999**. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos de gorduras vegetais.

## REIVINDICAÇÕES

## 1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE

caracterizado por:

- 5           a. a referida lipase catalisar reações de esterificação e de transesterificação;
- b. as referidas reações de esterificação e de transesterificação ocorrerem simultaneamente;
- c. as referidas reações de esterificação e de transesterificação envolverem uma matéria-prima graxa de alta acidez e um álcool de cadeia curta;

10

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por a referida matéria-prima graxa de alta acidez conter moléculas de ácidos graxos livres e/ou de triacilgliceróis;

15

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por a referida matéria-prima graxa de alta acidez possuir um valor de índice de acidez entre 8% e 98%.

20

4. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por a referida matéria-prima graxa de alta acidez ser obtida através de uma mistura de matérias-primas graxas.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 4 caracterizado por a referida mistura de matérias-primas graxas ser feita com matérias-primas graxas com índices de acidez distintos para obter o referido valor de índice de acidez na referida mistura de matérias-primas graxas.

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por as referidas reações de esterificação e de transesterificação ocorrerem em um mesmo meio reacional.
7. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por as referidas reações de esterificação e de transesterificação ocorrerem sem adição de um co-solvente ou de um adjuvante.
8. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por o referido álcool de cadeia curta ser o etanol ou o metanol.
- 10 9. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL CATALISADO POR LIPASE de acordo com reivindicação 1, caracterizado por o referido álcool de cadeia curta ser acrescentado em uma única dose.

1/2

## FIGURAS

Figura 1:

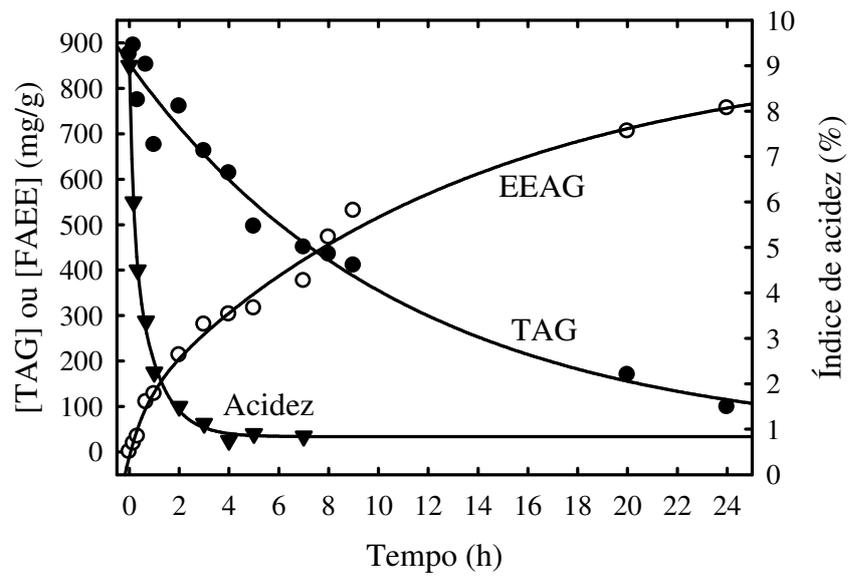
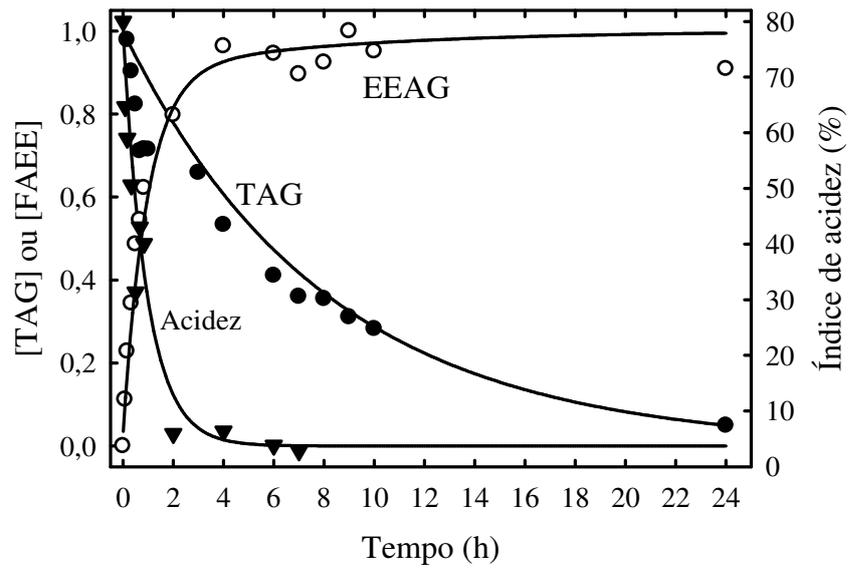


Figura 2:



## RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo de produção de biodiesel catalisado por lipase a partir de matérias-primas graxas de alta acidez através de reações simultâneas de esterificação de ácidos graxos livres e transesterificação de triacilgliceróis presentes nas referidas matérias-primas. A presente invenção refere-se à síntese de biodiesel a partir de matérias-primas de alta acidez utilizando-se alcoóis de cadeia curta, como etanol ou metanol. Nos processos demonstrados de produção de biodiesel por catálise por lipase, observa-se a inibição da lipase pelo álcool de cadeia curta. Normalmente, este efeito é evitado utilizando-se co-solventes, como *tert*-butanol ou adicionando-se o álcool de cadeia curta paulatinamente em várias etapas durante a reação. O referido processo traz como avanço a combinação de matérias-primas e condições reacionais que permitem com que a reação de produção de biodiesel ocorra sem inibição da lipase. O processo concebido na presente invenção permite que a lipase catalise simultaneamente as reações de esterificação e transesterificação para que tanto os ácidos graxos livres quanto os constituintes de glicerídios possam ser convertidos em biodiesel. A presente invenção traz um processo no qual o próprio ácido graxo livre funciona como solvente adequado para agir como co-solvente e evitar a inibição da lipase pelo álcool de cadeia curta.

#### 6.4 Variantes de lipases

Lipases variantes foram projetadas basendo-se no modelo tridimensional do polipeptídeo precursor (PalB) gerando a patente 2, exibida em seguida, que foi depositada junto ao INPI. Foram usadas 57 seqüências de lipases precursoras SEQ ID NO: 1-57 (Patente 2 – Figura 1). Em cada seqüência foram identificados e selecionados os resíduos de aminoácidos correspondentes à região do “lid” (tampa), ou seja, resíduos de posição 137 a 157 da SEQ ID NO: 9, na Figura 1 da patente 2, pertencente à lipase B de *Pseudozyma antarctica*. Após as tampas de cada seqüência precursora terem sido identificadas (Patente 2, Figura 2, SEQ ID NO: 59-116), foram feitas substituições de parte ou da totalidade destas seqüências por um segmento correspondente a uma cadeia peptídica contendo de 1 a 10 resíduos do aminoácido glicina. Estas alterações tem como objetivo aumentar a atividade de hidrólise, esterificação e transesterificação em meio orgânico (Patente 2). A glicina foi o aminoácido de escolha porque possui alta mobilidade e pequena cadeia lateral.

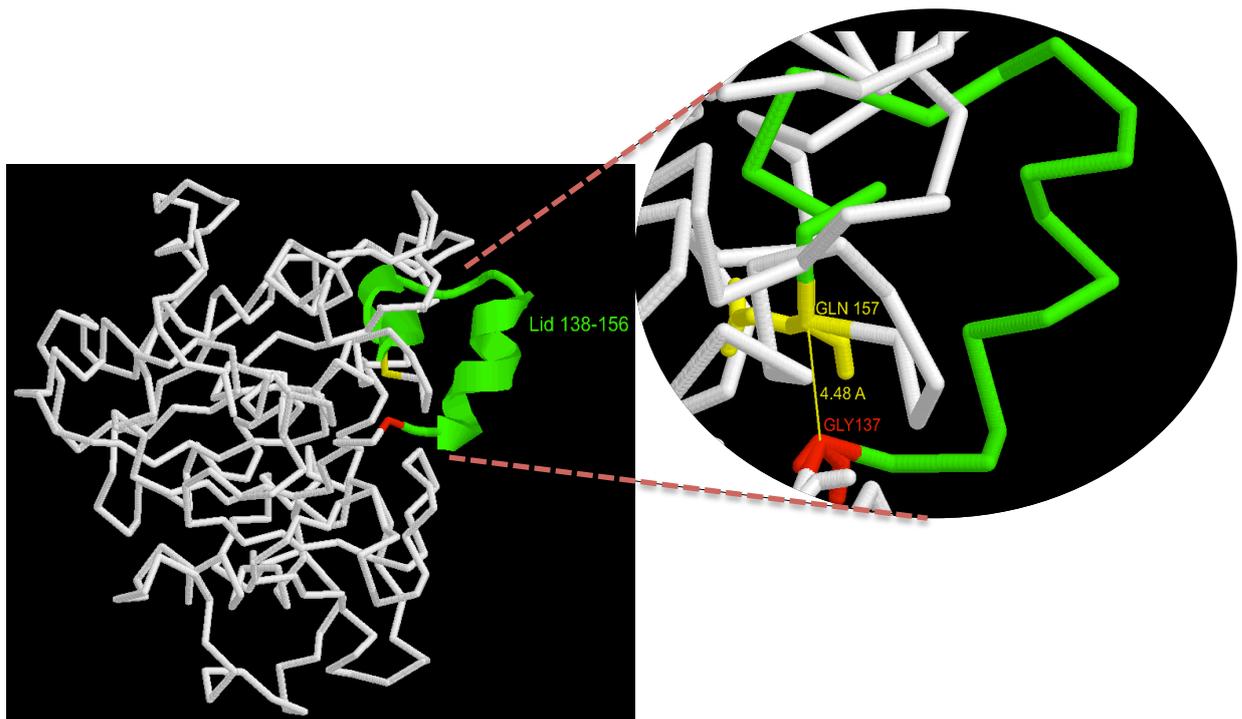


Figura 12 - Representação da estrutura tridimensional da principal cadeia de lipase B de *P. antarctica*. A região da tampa (lid) está destacada. No detalhe é mostrado a distância entre o átomo do carbono carbonílico do resíduo de glicina na posição 137 e o nitrogênio amídico do resíduo de glutamina na posição 157 (PDB código 1TCA).

A Figura 12 mostra o modelo tridimensional da PalB que está publicado no servidor do Protein Data Bank (PDB) sob o código 1TCA (UPPENBERG *et al.*, 1994). A remoção dos resíduos correspondentes à tampa cria a necessidade de complementação da cadeia

polipeptídica entre os resíduos de glicina na posição 137 e de glutamina na posição 157 correspondentes na lipase de *P. antarctica* (Figura 12). Na PalB esta distância é de 4,48 ângstrons ( $4.48 \times 10^{-10}$  metros), o que corresponde ao comprimento de dois resíduos de glicina (Figura 12). Por isso a mutação escolhida para expressão foi a que possui substituição por três glicinas, contando com a glicina presente na posição 137.

A substituição dos resíduos de aminoácidos baseou-se na manutenção da integridade estrutural do polipeptídeo produzido pela alteração prevista. A Figura 13 mostra a sequência FASTA da lipase B selvagem de *P. antarctica* e logo em seguida, o mutante *PantΔlidG3*. A região da tampa (137-157) onde no mutante foi substituída por três resíduos de glicina, está destacada em vermelho.

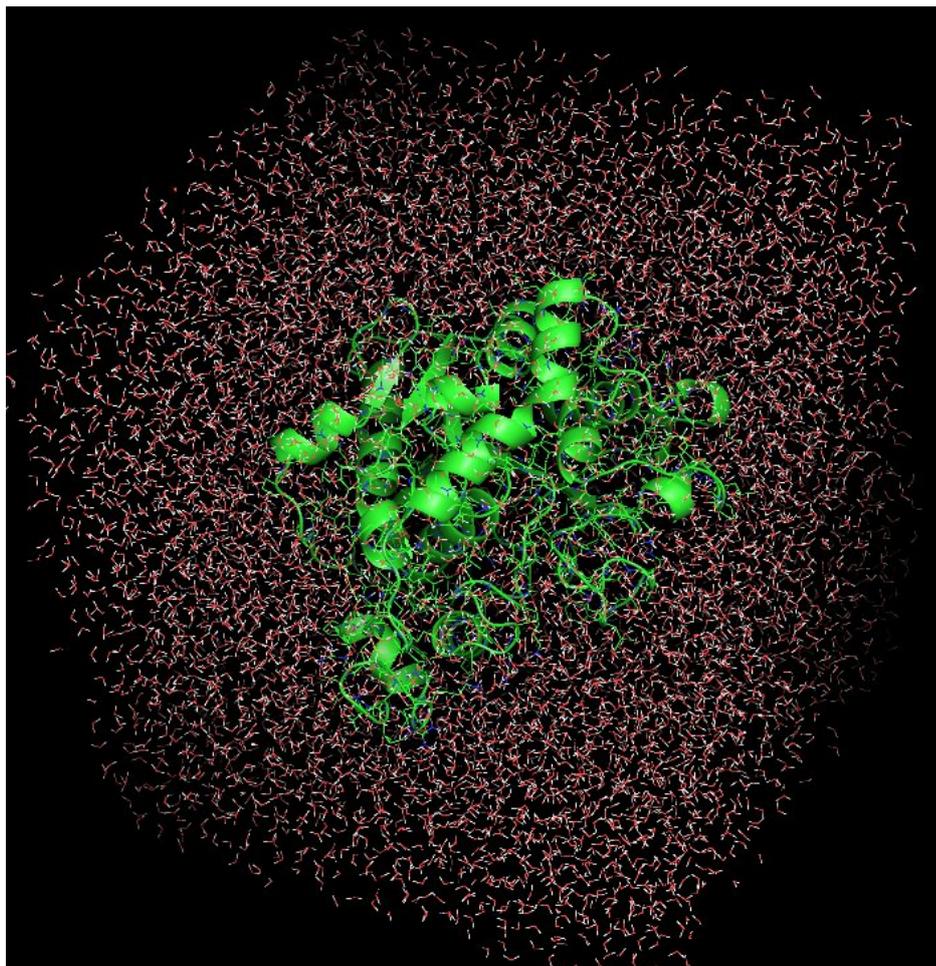
```
> Lipase B de P. antarctica (selvagem)
LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTTPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNT
EYMNVAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQTTG
SALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGSA
LRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAALLAPAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP
>Lipase PantΔlidG3
LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPSVSKPILLVPGTGTTPQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPPFMLNDTQVNT
EYMNVAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFAPDYKGGGQTTGSALTTALRNAGGLTQIV
PTTNLYSATDEIVQPQVNSPLDSSYLFNGKNVQAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGSA LRSTTGQARSADYGITD
CNPLPANDLTPEQKVAAAALLAPAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP
```

Figura 13 - Sequência FASTA da lipase B de *P. Antartica*, tipo selvagem (topo) e o mutante *PantΔlidG3*. A região da tampa da lipase selvagem e sua substituição por três resíduos de glicinas no mutante estão destacados em vermelho.

## 6.5 Simulações de Dinâmica Molecular

A função biológica de uma proteína deve-se ao arranjo tridimensional dos átomos na estrutura terciária. Esse arranjo ocorre através de um processo conhecido como folding, no qual a proteína dobra-se sobre si mesma e torna-se ativa. No sentido de investigar a atividade da lipase sob os efeitos de substituições de 0 a 10 resíduos de glicinas na região da tampa (137-157), modelos mutantes de PalB foram construídos a partir do tipo selvagem (código PDB 1TCA) e submetidos à simulações de DM.

Os modelos mutados foram utilizados para cálculos de DM, sendo introduzidos em caixas d'água medindo aproximadamente  $365.000 \text{ nm}^2$ , contendo cerca de 10.600 moléculas de água em condições periódicas de contorno. A Figura 14 mostra uma ilustração da lipase B inserida na caixa d'água no arquivo PDB pronto para a simulação de DM.



**Figura 14:** Lipase B de *Pseudozyma antarctica* inserida em uma caixa d'água de 365.000 nm<sup>2</sup> contendo 10.600 moléculas de água aproximadamente.

A energia potencial de cada mutante foi calculada como função das coordenadas dos núcleos dos átomos (Figura 15). Através da minimização da energia potencial foi possível prever estruturas e sequências de aminoácidos mais estáveis, ou seja, mais próximos da estrutura nativa da lipase selvagem. No presente estudo, a DM foi usada para simular a interação entre as moléculas da lipase B de *P. antarctica* em relação a sua estrutura, função e movimento.

As análises de energia total foram monitoradas em função do tempo durante a DM por 20000 ps. Após este tempo, a Energia Potencial média não variou em função do tempo. Os gráficos para a variação da energia total ao longo das simulações de DM mostraram que para todos os sistemas estudados a energia total tende a estabilidade após 2000 ps de simulação, com uma variação de energia cerca de  $-0.04 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , indicando que a energia média permanece constante, sugerindo estabilização estrutural (Figura 15).

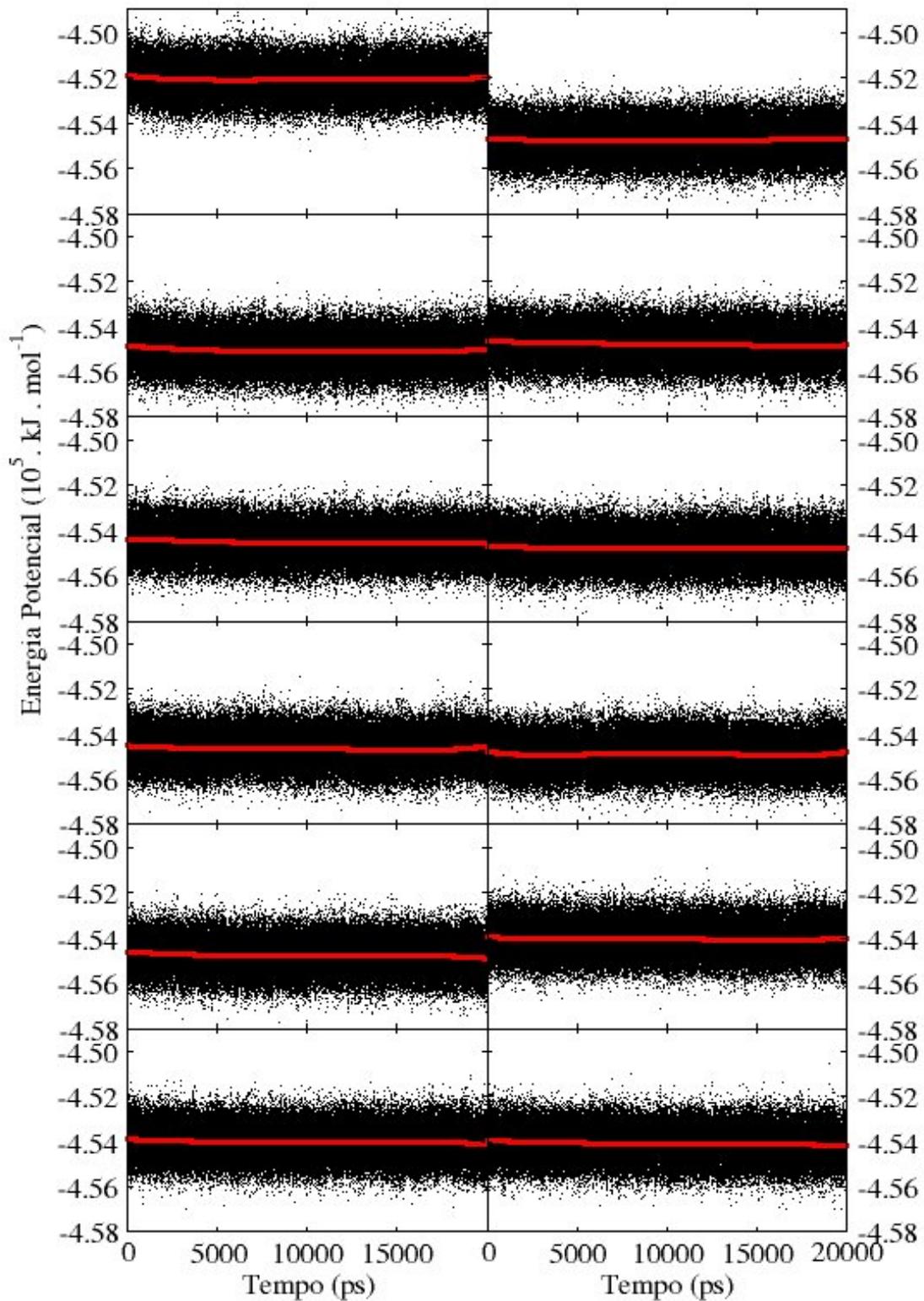


Figura 15 - Perfil dos 20000 ps para a Energia Potencial calculada por DM. A partir da esquerda do topo para a direita da parte inferior, os mutantes: *PantΔlidG0*, *PantΔlidG1*, *PantΔlidG2*, *PantΔlidG3*, *PantΔlidG4*, *PantΔlidG5*, *PantΔlidG6*, *PantΔlidG7*, *PantΔlidG8*, *PantΔlidG9*, *PantΔlidG10* e *PantΔlidG11*. As linhas vermelhas traçam as curvas polinomiais de ajuste aos dados.

A análise do perfil de Energia Potencial como função do tempo em simulações pode dar uma ideia de como a estrutura tridimensional tem flutuado ao longo do tempo, bem como, permitir o monitoramento de flutuações locais, por exemplo, os resíduos com alta mobilidade ao longo das simulações de DM. Os cálculos temporais foram realizados através das médias e desvios padrões dos últimos 10 ns de cada dinâmica, caracterizando o momento onde as dinâmicas atingiram seus estados estacionários de Energia Potencial (Figura 15). Considerando que os complexos poderiam flutuar na caixa d'água, cada estrutura foi ajustada pelo método do menor desvio quadrático médio para o cálculo de desvio padrão.

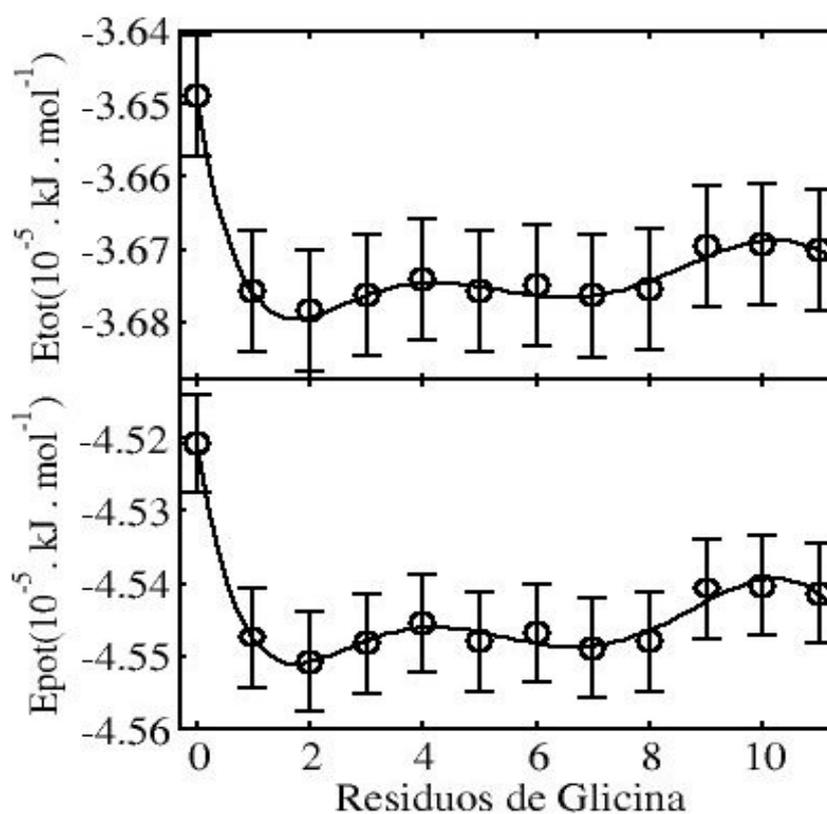


Figura 16 - Estado da energia total e potencial (10 a 20 ns) da simulação de DM de lipases mutantes *PantΔlidGn*. O número (n) de resíduos de glicinas presentes nas substituições na tampa (lid) está no eixo X. As barras de erros representam uma média +/- MSD.

A Figura 16 mostra a variação da energia total e potencial em relação ao número de substituições da tampa por resíduos de glicina. Nota-se que uma substituição da tampa por 2 glicinas apontou como o menor estado de energia potencial, sugerindo um mutante promissor. Todavia, a variação no valor de energia potencial entre as substituições de 1 a 8 resíduos de glicina não tem diferença significativa. Isso garante que esses mutantes são bons candidatos para serem usados nos testes de expressão e atividade.

## 6.6 Patente 2: “VARIANTES DE LIPASES, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE VARIANTES DE LIPASES”

1/12

### “VARIANTES DE LIPASES, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE VARIANTES DE LIPASES”

#### 5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece variantes de lipases através de mutações por substituição de resíduos em uma região identificada na respectiva lipase precursora permitindo melhor interação do sítio ativo com os substratos em reações de hidrólise, esterificação, transesterificação entre outras.

10

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3) e que atuam sobre ligações éster (E.C.3.1), presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER & EGGERT, 2002). É muito vantajoso a aplicação industrial das lipases em meios orgânicos sem a presença de fase aquosa (SALIS *et al*, 2003). Porém a maioria das lipases apresentam baixa ativação interfacial em meio orgânico. Isto sugere que a tampa (lid) anfipática, que dá acesso a tríade catalítica, permanece fechada em meios não aquosos, contribuindo para uma menor atividade enzimática (VERGER, 1997).

20 Estudos mostraram que lipases “típicas”, ou seja, que apresentam ativação interfacial, não estão bem adaptadas para catálise em meios orgânicos (SALIS *et al*, 2003). Pois são rígidas neste meio e há uma grande exigência de mobilidade interna e mudanças estruturais da proteína para a abertura da tampa levando a uma redução na atividade específica destas enzimas.

25 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é uma enzima com atividade de transesterificação e sua forma imobilizada tem sido conhecida como o biocatalisador mais comum para a produção de biodiesel (XU *et al*, 2008). CALB não apresenta uma tampa típica, mas tem uma hélice pequena com grande mobilidade que pode agir como

2/12

uma tampa. CALB pode expressar plena atividade tanto em soluções aquosas quanto em meios orgânicos e apresenta maior atividade em meios orgânicos que as lipases “típicas”. Neste sentido, variantes com atividade aumentada em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituição de aminoácidos na região da tampa (lid) das lipases para que essa tampa seja removida ou tenha seu tamanho diminuído, tal como o da CALB.

#### TÉCNICA RELACIONADA

A patente de número **EP2236611** e título *Lipolytic enzyme variant* mostra o processo de alteração de propriedades de uma enzima lipolítica fúngica por substituição dos resíduos de aminoácidos em lipase de *T. Lanuginosus*, porém a propriedade alterada pode ser, por exemplo, um aumento de termoestabilidade, uma alteração da dependência do ph, ou uma especificidade do substrato alterada, além de servir para a preparação de uma massa ou de um produto de padaria preparado a partir da massa, a qual compreende adicionar a enzima lipolítica.

A patente de número **WO2010065455** e título *Enzymes with Lipase Activity* mostra uma composição detergente compreendendo um polipeptídio selecionado a partir do grupo consistindo de S<sub>1</sub>11, S<sub>1</sub>11A, S<sub>1</sub>11B, C<sub>1</sub>11, e seus variantes, porém a propriedade alterada pode ser para a remoção de nódoas oleosas de tecido.

A patente de número **US20090029440** e título *Lipase Variants* fornece variantes de *Thermomyces lanuginosus* com reduzida tendência de gerar odor, obtida por introdução de mutações em uma ou mais regiões indefinidas na lipase precursora, porém as suas propriedades são aumentadas para uso em detergentes e diminuir a formação de odor de ácidos graxos de cadeia curta.

A patente de número **EP094367** e título *Lipase variants* fornece lipases variante de *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 com melhoria de eficiência de lavagem, incluindo um bom desempenho na lavagem com detergente tendo alto teor de tensoativos aniônicos em baixas temperaturas de lavagem e tempo curto de lavagem

3/12

todavia estas enzimas tem finalidade para uso em detergentes para remover manchas de lipídios ou gordura de roupa e outros têxteis.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

- 5 Surpreendentemente os inventores descobriram que lipases variantes com atividade aumentada de hidrólise, esterificação e transesterificação em meio orgânico podem ser projetadas com base em um modelo tridimensional através de substituições dos aminoácidos na região caracterizada como “lid” ou tampa das lipases precursoras. Como tampa na maioria das lipases funciona como uma interface entre o meio aquoso
- 10 onde a lipase se encontra e o meio orgânico onde o lipídio substrato se encontra, é necessário um sistema de emulsão onde haja uma interface lipídio água para que a lipase possa exercer sua ação catalítica. A maioria das lipases agem na natureza em sistema com micelas de detergentes nas quais o interior é preenchido com o lipídio substrato e o meio externo é formado por água, onde a lipase está dissolvida.
- 15 Muitos processos reacionais industriais não são viáveis nesta condição. Em alguns casos, a lipase deve exercer sua ação em um meio homogêneo composto pelos lipídios substratos e por um receptor de acila que pode ser água em pequenas quantidades ou um álcool (WATANABE *et al.*, 2000; SHIMADA *et al.*, 1999). Em alguns casos, co-solventes são adicionados para garantir uma mistura homogenia entre
- 20 os lipídios substratos e o álcool (WO2005075615; CN101353587; FERRÃO-GONZALES *et al.*, 2011; ROYON *et al.*, 2007; ISO *et al.*, 2001). Nesses casos especiais, as lipases precursoras não exercem a função catalítica adequadamente devido ao fato das mesmas terem sido, durante o processo evolutivo das espécies que as originaram, para funcionarem em sistema emulsificado. Por isso, as lipases disponíveis comercialmente
- 25 não são adequadas para estes processos industriais. Desta forma, a remoção da tampa presente nas lipases deverá exercer ação positiva sobre sua função em meio orgânico homogêneo ou contínuo. Para manter a integridade dos outros domínios protéicos das lipases variantes, diversas modificações podem ser apresentadas para garantir uma ligação adequada entre os aminoácidos localizados imediatamente anteriores a região da

4/12

tampa com os imediatamente posteriores na estrutura primária da proteína. O aminoácido glicina pode ser um bom candidato para compor esta referida ligação devido a sua alta mobilidade e pequena cadeia lateral, quando comparada aos outros aminoácidos.

5 Assim, a invenção fornece um método de alteração da cadeia polipeptídica de lipases que compreende:

a) Identificar e selecionar em cada sequência polipeptídica de lipase precursora SEQ ID NO: 1-57 mostradas na Figura 1 os resíduos de aminoácidos correspondentes à região de tampa em cada polipeptídeo precursor, correspondente à posição dos resíduos 162 a  
10 180 da SEQ ID NO: 1, na Figura 1, correspondente à lipase B de *Candida antarctica*.

b) Produzir sequências de polipeptídeos com atividades lipásicas contendo, a partir das respectivas seqüências precursoras, a substituição de parte ou da totalidade de uma das respectivas sequências SEQ ID NO: 59-116, determinada na Figura 2 por uma segmento correspondente a uma cadeia peptídica contendo de 1(um) a 10 (dez) resíduos do  
15 aminoácido glicina.

d) Produzir polipeptídeos com atividade lipásica em meio orgânico homogêneo ou contínuo possuindo a seqüência alterada de aminoácido.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 A Figura 1 mostra as sequências polipeptídicas das lipases a serem utilizadas como precursoras para as variantes de lipases propostas na invenção e as respectivas espécies de microorganismos de origem das mesmas:

SEQ ID NO: 1 *Aeromicrobium marinum*

SEQ ID NO: 2 *Arthrobacter arilaitensis*

25 SEQ ID NO: 3 *Aspergillus clavatus*

SEQ ID NO: 4 *Aspergillus fumigatus*

5/12

- SEQ ID NO: 5 *Aspergillus niger*
- SEQ ID NO: 6 *Aspergillus oryzae*
- SEQ ID NO: 7 *Aspergillus terreus*
- SEQ ID NO: 8 *Botryotinia fuckeliana*
- 5 SEQ ID NO: 9 *Candida Antarctica*
- SEQ ID NO: 10 *Catenulispora acidiphila*
- SEQ ID NO: 11 *Conexibacter woesei*
- SEQ ID NO: 12 *Corynebacterium efficiens*
- SEQ ID NO: 13 *Corynebacterium genitalium*
- 10 SEQ ID NO: 14 *Corynebacterium glucuronolyticum*
- SEQ ID NO: 15 *Corynebacterium jeikeium*
- SEQ ID NO: 16 *Debaryomyces hansenii*
- SEQ ID NO: 17 *Frankia sp.*
- SEQ ID NO: 18 *Gibberella zeae*
- 15 SEQ ID NO: 19 *Janibacter sp.*
- SEQ ID NO: 20 *Meyerozyma guilliermondii*
- SEQ ID NO: 21 *Pichia guilliermondii*
- SEQ ID NO: 22 *Micromonospora aurantiaca*
- SEQ ID NO: 23 *Micromonospora sp.*
- 20 SEQ ID NO: 24 *Nakamurella multipartita*

6/12

- SEQ ID NO: 25 *Neosartorya fischeri*
- SEQ ID NO: 26 *Neurospora crassa*
- SEQ ID NO: 27 *Nocardia farcinica*
- SEQ ID NO: 28 *Penicillium chrysogenum*
- 5 SEQ ID NO: 29 *Phaeosphaeria nodorum*
- SEQ ID NO: 30 *Propionibacterium acnes*
- SEQ ID NO: 31 *Pyrenophora triticirepentis*
- SEQ ID NO: 32 *Renibacterium salmoninarum*
- SEQ ID NO: 33 *Rhodococcus jostii*
- 10 SEQ ID NO: 34 *Rhodococcus opacus*
- SEQ ID NO: 35 *Salinispora arenicola*
- SEQ ID NO: 36 *Salinispora tropica*
- SEQ ID NO: 37 *Sclerotinia sclerotiorum*
- SEQ ID NO: 38 *Sordaria macrospora*
- 15 SEQ ID NO: 39 *Streptomyces albus*
- SEQ ID NO: 40 *Streptomyces avermitilis*
- SEQ ID NO: 41 *Streptomyces bingchengensis*
- SEQ ID NO: 42 *Streptomyces cinnamonensis*
- SEQ ID NO: 43 *Streptomyces cinnamoneus*
- 20 SEQ ID NO: 44 *Streptomyces coelicolor*

7/12

SEQ ID NO: 45 *Streptomyces flavogriseus*

SEQ ID NO: 46 *Streptomyces fradiae*

SEQ ID NO: 47 *Streptomyces griseoflavus*

SEQ ID NO: 48 *Streptomyces hygroscopicus*

5 SEQ ID NO: 49 *Streptomyces lividans*

SEQ ID NO: 50 *Streptomyces pristinaespiralis*

SEQ ID NO: 51 *Streptomyces roseosporus*

SEQ ID NO: 52 *Streptomyces sviveus*

SEQ ID NO: 53 *Streptomyces violaceusniger*

10 SEQ ID NO: 54 *Streptomyces viridochromogenes*

SEQ ID NO: 55 *Talaromyces stipitatus*

SEQ ID NO: 56 *Thermomonospora curvata*

SEQ ID NO: 57 *Ustilago maydis*

15 A Figura 2 mostra as seqüências polipeptídicas SEQ ID NO: 58-114 correspondentes às regiões substituídas nos variantes de lipases propostos na invenção, assim como os números referentes às posições iniciais da mutação nas respectivas seqüências precursoras SEQ ID NO: 1-57 mostradas na Figura 1.

20 A Figura 3 mostra uma representação tridimensional da cadeia principal da lipase B de *Candida antarctica*, código PDB 1TCA. A região correspondente à tampa da lipase de *Candida antarctica* está destacada.

A Figura 4 mostra a representação da cadeia principal da estrutura

8/12

tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* com detalhe na região da tampa, mostrando a distância entre o átomo de carbono carbonílico de resíduo de glicina na posição 137 e o nitrogênio amídico do resíduo de glutamina na posição 157. A tampa é mostrada em destaque.

5

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### **Polipeptídeo precursor**

A invenção utiliza um polipeptídeo precursor com a atividade da enzima hidrolítica. As sequências de aminoácidos das lipases usadas como sequências precursoras são listadas na Figura 1 SEQ ID NO 1-57. As sequências precursoras foram selecionadas pela sua similaridade com a sequência primária da lipase B de *Candida antarctica*.

10

##### **Modelo tridimensional e seleção de resíduos de aminoácidos:**

A invenção é baseada em um modelo tridimensional do polipeptídeo precursor de *Candida antarctica* onde os resíduos de aminoácidos correspondentes à região da tampa foram identificados. A Figura 3 e a Figura 4 mostram o modelo tridimensional da lipase B de *Candida antarctica* que está publicado no servidor do *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1TCA (UPPENBERG e cols., 1994). A remoção dos resíduos correspondentes à tampa cria a necessidade de complementação da cadeia polipeptídica entre os resíduos de glicina na posição 137 e de glutamina na posição 157 correspondentes na lipase de *Candida antarctica*. Na lipase B de *Candida antarctica*, esta distância corresponde a 4,48 ângstrons ( $4,48 \times 10^{-10}$  metros). Esta distância corresponde ao comprimento de dois resíduos de glicina. Por isso, a mutação por remoção da tampa na lipase B de *Candida antarctica* deve ser acompanhada da inserção de preferencialmente dois resíduos de glicina para a manutenção do posicionamento adequando dos resíduos de aminoácidos do polipeptídeo.

20

25

9/12

**Sequência de aminoácidos alterada**

A substituição dos resíduos de aminoácidos propostas nesta invenção se baseia na manutenção da integridade estrutural do polipeptídeo produzido pela alteração prevista. Com a remoção dos resíduos de aminoácidos da região da tampa das lipases, o último resíduo imediatamente anterior à região retirada deve ser conectado ao primeiro resíduo imediatamente após a região retirada. Para isso, esta invenção propõe a substituição dos resíduos que compõem a tampa das respectivas lipases, caracterizadas pelas sequências peptídicas mostradas na Figura 2 (SEQ ID NO 58-114) por um segmento de resíduos do aminoácido glicina. O número de resíduos de glicina necessária para compor o referido segmento pode variar dependendo da enzima lipase utilizada como precursora. Baseado em observações computacionais, um número de resíduos de glicina compreendido entre 1 e 10 é suficiente para manter a estabilidade e integridade das lipases modificadas.

As mutações propostas nesta invenção podem ser realizadas por técnicas de básicas de biologia molecular contidas no Estado da Técnica (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

**Nomenclatura para alterações de aminoácidos**

As lipases variantes obtidas pelas alterações dos polipeptídios propostos nesta invenção são nomeadas segundo o organismo de origem da sequência precursora e a modificação proposta seguindo a seguinte regra:

- a) Primeira letra do termo genérico do organismo de origem da sequência precursora, seguida de;

10/12

- b) Duas primeiras letras do termo genérico do organismo de origem da sequência precursora, seguida da;
- c) Letra grega delta ( $\Delta$ ) e da palavra inglesa “lid”, referindo-se à mutação por deleção da tampa “lid” da lipase, seguidas da;
- 5 d) Letra G, em referência ao resíduos do aminoácido glicina e de um número subscripto de 1 a 10, referente ao número de resíduos de glicina introduzidos em substituição à tampa.

Para melhor explicação da nomenclatura, seguem os exemplos:

10 Can $\Delta$ lidG<sub>3</sub> – Lipase de *Candida antarctica* cujo a tampa foi substituída por 3 resíduos de glicina.

Can $\Delta$ lidG<sub>7</sub> – Lipase de *Candida antarctica* cujo a tampa foi substituída por 7 resíduos de glicina.

Ani $\Delta$ lidG<sub>1</sub> - Lipase de *Aspergillus niger* cujo a tampa foi substituída por 1 resíduos de glicina.

15

11/12

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERRÃO-GONZALES, A. D.; VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; ALVAREZ, H. M.; MOREAU, V. H. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1007-1011, 2011
- 5 ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, jun. 2001.
- JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipase for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.390-397, 2002.
- 10 KIM, D.; DORDICK, J. S., **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, p. 200-206 (2001).
- ROYON, D.; DAZ, D.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic Production of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using *t*-butanol as a Solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.
- 15 SALIS, A.; SVENSSON I., MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1646, p. 145-151.
- 20 SAMBROOK, J. e RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p.789-793, mar. 1999.

12/12

- TANAKA, K.; YOSHIDA, K.; SASAKI, C.; OSANO, Y. T. Practical Asymmetric Synthesis of the Herbicide (S)-Indanofan via Lipase-Catalyzed Resolution of a Diol and Stereoselective Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Chiral Epoxide. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3131-3133.
- 5 UPPENBERG, J., HANSEN, M.T., PATKAR, S., JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**. v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n.1, p. 32-38, 1997.
- 10 WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, 2000.
- 15 XU, Y.; LEWIS, D.; CHOU, P. Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 1035-1044.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. VARIANTES DE LIPASES caracterizados por:
  - a. serem constituídos por um polipeptídio com uma sequência de resíduos de aminoácidos obtida a partir de uma mutação em uma das sequências precursoras SEQ ID NO 1-57;
  - b. a referida mutação consistir de uma substituição das sequências SEQ ID NO 58-114 presentes nas referidas sequências precursoras SEQ ID NO 1-57 respectivas, por um segmento polipeptídico distinto;
  - c. o referido segmento polipeptídico ser constituído por resíduos do aminoácido glicina.
  
2. VARIANTES DE LIPASES, de acordo com a reivindicação 1, caracterizados por possuírem sequência polipeptídica com, pelo menos 80% de identidade com o referido polipeptídio.
  
3. SEQUÊNCIA DE DNA caracterizada por codificar os referidos variantes de lipases, de acordo com as reivindicações 1 e 2.
  
4. VETOR DE EXPRESSÃO caracterizado por abrigar a referida sequência de DNA, de acordo com a reivindicação 3.
  
5. CÉLULAS HOSPEDEIRAS TRANSFORMADAS caracterizadas por conterem a sequência de DNA, de acordo com a reivindicação 3.
  
6. MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE VARIANTES DE LIPASES caracterizado por compreender o cultivo das referidas células hospedeiras transformadas com o referido vetor de expressão contendo a referida sequência de DNA, de

2/2

acordo com as reivindicações 3 a 5 sob condições necessárias para a recuperação dos referidos variantes de lipases do caldo resultante.

1/15

FIGURA 1: SEQUÊNCIAS DOS POLIPEPTÍDIOS UTILIZADOS COMO  
PRECURSORES PARA AS MODIFICAÇÕES NAS LIPASES. SEQ ID NO 1-57.

SEQ ID NO 1:

MPVSRARQRWSWPAARLLVVP LLLIGAAATPVGAAVPVEPPGALSVDADLDRALTCSGDLADADRTPV  
LLTPAFSTDKQSYGMWYLQSLPRAGYPTCSLSLPDRGYGDLQVAAEYVVAATRRMHEAAGRPIITLMGHQH  
GALNGLWALRFWPDVAPVVEDFIALATPFRGTATSALACRTLRSPPAAWQIATGSAYLAALDGLPTGP  
SYTSIATVFDPLIVPQPRASRLEGASNVLVQDVCPLRPVEHFALIGDHSVAYSLVLDALQHEGPADRRRIS  
RLTCFRAGMPGLDASGLPRLVVAAGGAVTGALTQVPATSVGQEPALADYAR

SEQ ID NO 2:

MQRRILSVL GALCLAAATLTAPAIMPSAGSTAQAETVSSLNISP SGANDWDCAPDAEHPYPVVLVHGTF  
TMDVNWISLSPKLKRNQYCVFALNYGLENGISGAAHV PDSAAELRDFIDRVRQATGANKVDIVGHSQGGM  
MPRWYMGHMGGAKHVNELVAIAPSSHGTQGILVPSATGVKIAGNYAGWICACADQVAGSEFMTELNSIG  
DTVAGPDYTVISTKYDEVMPYKQFLQGN SARVTNVLLQDKCPLDVSGHAGVAVDPVHRVNLALSTD  
GPADPGYRPSCYL

SEQ ID NO 3:

MKWSSFLEAALLCGAILSPVTSGAALPSDTASTASDQGLVSTLSAVANDPAINDTQITTTVSSIVSGIDE  
TQRKQTTKGDESVERAFKQLQSVFSDGTPDFLRLAREIVRIGLVPADILSLLNGYLKQELNSINNRNPVL  
NNQIIYPAKAPGDVPYSAEKALRAAIYIPSSFGYGKNGKPVILVPGTATPAGTTYHFSFAKLSATNV  
DVVWLNIPQASLNDIQINA EYVAYAINYISAL TGSNVAVISWSQGGPDTQWALKYWPTRDRVDDFIAIS  
PDFHGTVASSLACPWLKSLLCSPALWQQAWDSEFISTLRADGGDSAYVPTTTIYSSFDEIVQPMMSGQAS  
AILGDARAVGVSNNQVQTVCGSKPAGGIYTHEGVLYNPLAWALAVDAL THDGPDP SRLNLDVCGRLLP  
PQLGLDDFLGTEGLLLVGLAEALAYMPKTLREPPIAGYAA

SEQ ID NO 4:

MRWSSLLKAAVLYRAILSPLVSGAVIPRGAVPVASDLSLVSILSSAANDSSIESEARSIASLIASEIVSK  
IGKTEFSRSTKDAKSVQEA FDKIQSIFADGTPDFLKM TREILTVGLIPADILSFLNGYLNLDLNSIHNRN  
PSPKQAIYPVKAPGDARYSVAENALRAAIHIPASFGYGKNGKPVILVPGTATPAGTTYFNFGLGSA  
ADADVWLNIPQASLNDVQINSEYVAYAINYISAISESNVAVLSWSQGGLDQWALKYWPSTRKVVDDFI  
AISPDFHGTVMRSLVCPWLAALACTPSLWQQGWNT E FIRT LRGGGDSAYVPTTTIYSTFDEIVQPMMSG  
QASAILSDSRVAVGVSNNHLQ TICGGKPAGGVYTHEGVLYNPLAWALAVDALSHDGPDP SRLDLDVVCGR  
VLPPQLGLDDLLGTEGLLLIALAEVLAYKPKTFGEP AIASYAH

SEQ ID NO 5:

MSERVQDKSGKQINEGDYVYTKYRGG SHEGEVDKVVTD DAGAHEEEVANPPKMTQAWGTVTVLWFPHSEL  
VAEHKRCLCFPIALGWPADWVTGHTKTATG SWSPGQDRNSMTKEYEARFAGYIHQHFLSSGSTFTLGPL

2/15

LDSPSCTLNLHNMRLSALTRRLLYGVFLSPVCLCISIPQQPSHVPISDHDLVSVLSNAVKDPMVDRRVSS  
 VASDIMLGLATNENLQHPGNEQLQAALKKIEAIFTKSSSTMLDLAKDIVASGLVPPKILAFNLGYLDAK  
 INSAHNLNPDLSKSGSIYPSKATEDAPYSIPEAALREAIHMPNLFSGESNSGRKPILVPGTAAPAGTSFY  
 YNFGKLGNAIPEIDVSWVNIPQASLGDVQVTAEYIAYSINYISSLYRSKVNVISWSQGGGLNTQWALKYWP  
 STRDSVEDFIAISPDRGTIETRLVCPWLAGIMCTPALWQQGWDKAFVRTLRGFGGESAYVHTTTIYSSF  
 DEIVQPMYGDQASAILQDARGVGVSNHLQSICAEHPAGGMYTHRGVLYNPLAWALTIDALTHDGPGRPS  
 RVNVTVCQQSIPPQLGLDLDLGTGELLLVSLSETLRYRPKTFAEPDILGYAASAPGVGGEIWDLKDEQF

SEQ ID NO 6:

MRFFTALSLFISGAAIASALPSSSETVEANCVKPYLCCGELKTPLDSTLDPILLDLGIDAASIVGSVGLL  
 CLIPSKALTCLNGYAIIDLNSIHRHNPSPENLSIYPYKAKSDAPYSIAENTLRAAIHIPRSFSHKRDKKI  
 PVLLVPGTAVPAAITFYFNGKLRRALPESELVWIDLQASLDDIQLSAEYVAYALNYVSALTSSKIAVI  
 SWSQGALDIQWALKYWPSTRSVVNDFAISPDPFHGTIVKWLVCPLLDLACTPSIWQQGWDANFIQALRS  
 QGGDSAYVTTTTIYSSFDKIVRPMSEGENASARLLDYRGGVGVSNHLQTCANNAAGGLYTHEGVLYNPLA  
 WALTVDALLHDGPSNITRIDTQKICEQVLPYLELTDMLGTEALLVALAKILTYSPKVSSEPDIKAYAY

SEQ ID NO 7:

MVWPSYNRDSHGDAHQSFDVKRDLHWHVKVSGCPRRLHSTTTMYPVAMAVFTGVLLGQSITTAALSMD  
 RRSLPETLLMVTNGVKALGFLGASALQEVDLLVSHLLDLSTGKSPVTSVDGTIKELSDLLDSHNGTFDH  
 IAYALDLVARGLLPSNVLDLLEGVTDDEINSSNNINTKSPSSPIYPQKAPEDAPYSVDEATLRSALYIPS  
 SFEYGANGKTPVLLVPGTAVPAGLTYHFNFVKKLLATSADPVLNIPRNSLDDVQINAEYVAYAINYLS  
 GMSNNSTIGVISWSQGGDLTQWALKYWSSTRAVVQDFMPVSPDFHGTLMGGPCPGFPSRLCTPSLIQQA  
 NTSLLRTRLRSNGGDSAYVPTTLYSSLDEVVQPQIGTEASAFLRDARAVGVTNNQVQLRPPWLRAS

SEQ ID NO 8:

MYPYAFLAVITAPLVLAAPAPVPAPFPKQLTGDPVTGLLSGVGNVLDIGSLSSAIPAVLSDIGQVSTA  
 ANLVVAAIANGTILGTDVPVIAKKLFSAAQPTAKPSSVSQAISWAAGAWGVSDPSASPTPPANIVTNALG  
 LVLNGFTSNDLQAVASGASPFANSVNNVNPVPPNKRIFYNNVNRNARFSVDETTLRAAIYIPPGFTWGKK  
 QPVIMSPGTGAFGYGTFASNIGKLLATTNYADPVYLNIPFALLDDAQTNAEYVAYALQYFYAMTSRKTAI  
 VTWSQGSINAQWAFKYWPSIPKTVTDHIAISPDYHGTVLSYILCPGFESGNDVACTPSILQQQYQSNFVN  
 RLRNNGDSAYVPTTIVYSLTDEIVQPQIGTAASGFLNDARGVGASNTFLQGACGLPAGTLYTHAGVLF  
 NPVAYALVTDALQNDGPGSFDRVSDQCGNLVAPGISLADVIETEALIPLAALNVLAYEKKITNEPALMSY  
 ATY

SEQ ID NO 9:

LPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGASPVSKPILLVPGTGTTGQSFDSNWIPLSTQLGYTPCWISPPP  
 FMLNDTQVNTIYMVNAITALYAGSGNNKLPVLTWSQGGGLVAQWGLTFFPSIRSKVDRLMAFADYKGTVL  
 AGPLDALAVSAPSVWQQTGSALTTALRNAGGLTQIVPTTNLYSATDEIVQPQVNSPLDSSYLFNGKNV

3/15

QAQAVCGPLFVIDHAGSLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVA AAAALLAP  
AAAAIVAGPKQNCEPDLMPYARPFVAVGKRTCSGIVTP

SEQ ID NO 10:

MRKRRILHALSALLLVAPLVALAAPAQAATSSGINDFSCKPSAAHPRPVVLVHGTFGNASDNWLVGAPYI  
AARGYCVFELDYGQEPGIPLFHGLAPVAQSAQQLSDYVNQVLGATGASQVDIVGHSQGGMMPRYLKFGLG  
DAAKVHTLVGLAPSNHGTNLDDIETLAADYFPAALGLIGTACPSCSDQIVGSPLMQQLNAGGDTVPGVQY  
TVISTLFDEVVTPWQSQRLSGANVHNILLQNLCPDLEHVLIGTTDKIALHEAVNALDPSHATPTTCLS  
AFS

SEQ ID NO 11:

MGISSPAARLRGSIGAVCAAVVLLFAALVAPAARADLPVVYNFPTALAIIGTFAPNDPPGANDYGCRP  
SAAHPRPVVLVHGTVENKNVNRALSPLLKNNGYCVFALNYGAWLPGPYLGLGPIPSARQLSTFVDGVL  
AATGAREVDVVGHSQGGMMPRWYIKFLGGAQVHTLVGLTPSNHGTTLLGLSTLARFIPGASAVLRAGGP  
ALEDQRQGSTFNRTLDAAGDTIAGVNYTVIASIYDEVVTPYTNGLSGLATNITLQSGCIINFTEHLGVAY  
DRRALRLTLNALDPATARTPPCVPTIPGVGG

SEQ ID NO 12:

MCAPSWSAWPAWGETVKLEGMPSPVQTAQQTPLKLPDLRRELTAAKAVWRNLPTGDQAPPATELPDE  
VVQEIIITNYAEDPRRSATLIDDTTASLPLLARARHRGLFEDDWRARTTPERPWPVILIHGTGTTKGDWQE  
LGADLRRDGVAVFAPDFGTRATGPVHQSAEQVGAYIEAVLGATGAEQAILVGHSQGGVVARYWIRILGGY  
PKVRHLVSLACPHHGTMMGGVVSPLLKTNRGEAVAQSVVQSWFGGAGLELITGHETIEKINEGGDLDPGV  
TYTNIATHFDTVIQPETCFLTAEDPGAERIRNLWVENLSDAVVLHPNMPFDHRVRALVRADLARLVE  
EL

SEQ ID NO 13:

MLFNDFDAQHATPVLYVHGINSRTIAFRNRARLISSHGHWVWGYDYGRMLIPGLAGTGRIEDMVDELG  
ENVVHVLSETGASKVNVVAHSQGGLLTKLFIAAGGAERVERVAMGANFHGTDLRGYAARINPITGRNPK  
FWMASPSAVQQLAGSEWSHELATVPDTNPRVMTSLYSRRDHVTPVETSILTPIDGADVNVLEIPGA  
PLHPLMPRDRETAELTWGLEREPGETAPS

SEQ ID NO 14:

MMKTIGAVATAFALTIGATAGTATAAEPFDNLSANLSSAFSGSSETLPLEPSLPVPPGGTGEAIDYTQP  
LPGNAAKDAQYGFPTGVALGPENDFYAALMKTLYVTGQYPKGMNDFSCSEKNPVILLPGTTTNIYNDFS  
KMAPALMDAGYCVYGFNHNPGTIPATQFAGDIKDSARALGLVDRVLKETGAEKVTLVGHSQGGGIMPIY  
YINNYGGDKKVDHLIGLAPSNNGTTVGGMFKASEFTNGVVDFVAGVASRQQLIGSDLVNEVYHNGPVTRP  
GVKYTMIASATDQTVTPYNSFIDEPGVTKITVQDHPGFVSDHNNMTYYEQVIDLTLHALKA

4/15

SEQ ID NO 15:

MKADSRNLGRGRSFLAGAAALSVSLSTLFLSLTPSALAADAASGVIPDAAVPAGLEGNHVAKAPVNNPT  
 CVPSPHPNPVFLHGTSDNSTRWQKAANALSNQGFCTWAFNYGKPTDGKPNLLGHYAMTDIDDSAKEIA  
 STIDYILSVTGAEKVDLVGHSQGGHLKKYIAENGGGDKVDRVVGVAPTYHGTTLAGMDKMLRPIIERNP  
 KLAESVAGKAGVQQLVGSELIDRLNKLPTDKRVQYTNLYSSADTTATPNKTSMLSEVDGADVANVEVGA  
 ACKLPIAPAAAMPQNNPTIGLILWGLSREAGDHTPATEHCTNPGRGSASSSAASS

SEQ ID NO 16:

MKVSLVKIAFTALMVSGISAHPTKELERRDLISNIDDIVNSTIDNGEAHKDNAKSAITDIFDKINDGIKQ  
 DIDNLKEVGKSIADLIKSVVPTEDLSTPEGVQAYLGQLFENGEDLFKNSIDMVGHGLKPGSIAGNFEGFS  
 DEINTSDNFNVKEPEGSVYPQAESEDPFSLSEEQLRSIQIPEEFQYGNKSKSPVILVPGTSGKGGMTY  
 ASNYAKLLKETDFADVWLVNPGYLLDDAQNNAEYVAYAINYISGISNNKNVSIISWSQGGLDQWALKY  
 WASTRSKVSDFIPISPDFKGRMVPVLCPSFKLSCPPSVLQQEYNSTFIETLRADGGDSAYVPTTSIYS  
 GFDEIVQPQSGKGASGLINDNRNVGVTNNEVQTCIDRPAKYYTHEGVLYNPVGYALAVDALTHEGPGQ  
 LSRIDLDETCGRIVPDGLTYDILLATEALPEALVILSYDDKTRDEPEIRSYAQ

SEQ ID NO 17:

MLSAGLVAGVGLVGGAPASAAAQPGPLPVLYNFPAAALISLANPNADPPGANDFSCRPSATHPLPVVLLV  
 HGTLANKTNEWQAVAPLLKNDGYCVFAPNLGGDTPTSFLQATRIEIEIAAQLGVFVDQVLATTGAAKVDI  
 VGHSLGGMLPRYYINNLGGDTKVNSLIGLSPSNHGTTLLGLAKLGEAIGVTGPIESFCASCIQQIAGSPF  
 LTALNANGGLRPGVRYTVIQTRYDEIVTPYTSAFLSGPNVRNITLQDACILDGVDHTAIANDRVALRHVQ  
 NALDPAHPRPAICVPVLPITIGG

SEQ ID NO 18:

MRFPVHIISLVCVFSGLGLAAPSYSDESRLIGLLKGVDTLETVVGGLLGTLRKAIDSGDRDKTLDIL  
 HVLEPAKHKHNVEEFAALEKISKSKPKTIIDYSAQLIVNGLISGNTLDFAYAKGLVSAQNGSNNKRN  
 PPKEVYPKVANCDASYTTSEAKLRAAIHIPPTFTYGEKPPVILFPGTGSTGFTTYRGNFIPLLDVWEAD  
 PVWVNPVLLLEDAQVNAEYAAALNYIASLTKRNVSVIAWSQGNIDVQWALKYWPSTRKVTTDHVAISA  
 DYKGTILANIGGATGLINTPAVVQQEAGSTFINTLRSDGDSGYIPTTSLYSSLFDEVVQPQEGAGASAY  
 LLDARDVGVTAEVQKCTGKLGGSFYTHESMLANPLTFALAKDALTHEGPGTISRDLADVCNRSLAPG  
 LGLKDLLITENAVVIAALSVLVLPKQIDEPAIKQYALEATGTC

SEQ ID NO 19:

MELSMPLRLTRVMPALVAAAAVALLPQSASAATVAADPVGPEQISFLPAKLYSSLAPTALPPGTNDWTC  
 QPSAAHPRPVVLVHGTWANRYDSFAMIAPHLKRAYCYVALNYGDENVSVLGGQLPGLYATQTIKPAAGGEI  
 SSFVDQVLDSTGADQVDMFGWSQGGIAARSYLKFGGTNAANPAANKVKNLITFGATNHGTTLSGLGALA  
 GQLAPATIPPVLGPAADQLIDSPFLTELNAGGDTQPGVTTYIIGSRYDEVSTPYQRTFLTAGPGATVNN  
 ITLQNGCEIDLSHLSGLYSYRLVGLVKKALDPTGNVYVPCLPNAPVL

5/15

SEQ ID NO 20:

MKPVNLAIGFCLATNYVHGYPVLDKRNLLLDGFANLFNSSGDLNASISEGIFQDVKDLGGIILSLDLMI  
 ESVVDTSEIHGISGAFNYLKEIFESQTKWSIYSGI IKLVFEENGLETVIIINYSQRLNNLNNTNARSPKSA  
 VYPSANSKDAPYSLEQLKLSAIEIPSGYEYGGDKKPVLLVPGTGSYGGNGFYNYIKLLNQTDFADVA  
 WLNIPNYLLEDSQLNAEYVAYGVNYLSGISEGKKSVISWSQGGLITQWALKYWPSLRENMGFEIPVAAD  
 FHGTKLAPAICPSFPKLSCAPSVLQQEYNSNYVRTLRENDGDSAYVPTTSLFSGFDEIVQPQSKNASAAL  
 KDARNVGVGNVYQFNLCPNNTAGRYTHEGSLYNPVGYALAADALKHGGVGDPSRIDLEHLCTLPFPEEL  
 DYADVLTTVEELLYCGFNIIFGKGKVKKEPRIRDYAK

SEQ ID NO 21:

MKPVNLAIGFCLATNYVHGYPVLDKRNLLLDGFANLFNSSGDLNASISEGIFQDVKDLGGIISLDMI  
 ESVVDTSEIHGISGAFNYLKEIFESQTKWSIYSGI IKS VFEENGLETVIIINYSQRLNNLNNTNARSPKSA  
 VYPSANSKDAPYSLEQLKLSAIEIPSGYEYGGDKKPVLLVPGTGSYGGNGFYNYIKLLNQTDFADVA  
 WLNIPNYLLEDSQLNAEYVAYGVNYLSGISEGKKSVISWSQGGLITQWALKYWPSLRENMGFEIPVAAD  
 FHGTKLAPAICPSFPKLSCAPSVLQQEYNSNYVRTLRENDGDSAYVPTTSLFSGFDEIVQPQSKNASAAL  
 KDARNVGVGNVYQFNLCPNNTAGRYTHEGSLYNPVGYALAADALKHGGVGDPSRIDLEHLCTLPFPEEL  
 DYADVLTTVEELLYCGFNIIFGKGKVKKEPRIRDYAK

SEQ ID NO 22:

MLLRTILAATTAATVLLVAAAQAATAEPAAPSNTAAAATAAQRAAAAADPVIVVGGLSGISIAYEPIA  
 ARLRADGYRVSIFQLPNLGLGDIRESARALSSYVDRVRATTGAARVDLVGHSEGLVSRVYVKYLGGAAAT  
 VDQYVSLGSPQYGTVANLVAVLGLGSCAGVIACQMTIGSSFLADLNAGDDTPGPVRWATVRTWQDELV  
 RPDVNAVLAGATNIIVQAWCPLRVVGHGLVLDGTTYTAVRQVLAGAPVQPNCFVAV

SEQ ID NO 23:

MLLRTILAATTAATVLLVAAAQAATAEPATPSNTAAVATAAQRAAAAADPVIVVGGLSGISIAYEPIA  
 ARLRADGYRVSIFQLPNLGLGDIRESARALSSYVDRVRATTGAARVDLVGHSEGLVSRVYVKYLGGAAAT  
 VDQYVSLGSPQYGTVANLVAVLGLGSCAGVIACQMTIGSSFLADLNAGDDTPGPVRWATVRTWQDELV  
 RPDVNAVLAGATNIIVQAWCPLRVVGHGLVLDGTTYTAVRQVLAGAPVQPNCFVAV

SEQ ID NO 24:

MRRTVRAGRPASVLVGLLLAVGACSAAGAPDPATTAVPTTAVPTTAAPTSSSVPTLAPTASPSRIRSP  
 LPDVHVPGVNDPSCRSAERPVLVLPSTVQSNFTALAAALQAGGRCVYGLNYSLAGVAPVRDSASAAA  
 GFVQDVRAATGADQVDVVGFSQGGLVLRALRLDGLAPAVASAVLIAPSFHGSTADLLTGVPAAACPACA  
 DQTAGSALLTEL DAGGDLGQVRYATISSRDDTVVTPVDGQSPVGPADRVRSLVIQDRCPRATVSHLDLP  
 ADPGVVGWVGAALDSGRPEPTAYRCP

6/15

SEQ ID NO 25:

MRWSSLLKAAVLYRAIFSPVLSGAVLPRGALPAASDSSLVLSILSSAANDSSIKSEAQSTASSIVSKIDET  
 ENSRSTKDAESVQEAFDKIQSIFADGTPDFLKMARIKILTVGLIPADILSFLNGYLNLDLNSIHNRNPSPK  
 GQAIYPIKAPGDARYSVAENALRAAIHIPASFGYGKNGKPVILVPGTATPAGTTYFNFGLGSAADAD  
 VVWLNIPQASLNDVQINSEYVAYAINYISALSSENVAVLSWSQGGLDQWALKYWPSTRKVVDDFIAISP  
 DFHGTVVRSLVCPWLAALACTPSLWQQGWNTFIRTLRGDGGDSAYVPTTTIYSTFDEIVQPMMSGQASA  
 ILSDSRAVGVSNHLQTCGGKPAAGVYTHEGVLYNPLAWALAVDALTHDGPDPRLDLDDVCGRALPP  
 QLGLDDLLGTEGLLLIALAEVLAYRPKTFGEPAIASYAG

SEQ ID NO 26:

MIFTSSPAVLLSTITLFAQLALGLPTTSEPVHESVRAIGELSHRDELHDAGVVWNVKVRQSPVAPTD  
 RDSFNNQNPDPVGVYPRSSDADPAFTIPEAKLRSIYLPSTGNSSTNRQVVLVFPVGTGAYGHESFADNL  
 LKVIITNAGAADAVWVNPAMLDVQSNAEYIAYAISYVKALIGDDRDLNVIGWSQGNLATQWVLTYPWS  
 TAPKVRQLISVSPDFHGTMLAYGLCAGNFGKVAKAGAPCPPSVLQQLYSSNLINTLRAAGGGDAQVPTTS  
 FWSRLTDEVVQPQAGLTASARMGDARNKGVNTNEVQTVCGLSVGGGQYGHSTLMAHPLVAAMTLDALKNG  
 GPASLSRIRSQMFRACSNVAVPGLQLTDRAKTEGLLATAGARMGAFPTKLLREPALRQYAA

SEQ ID NO 27:

MVTVSVLAVTVSGSPAHPADAGTSVSEQALAAIAEGRTLAPTAGGTGSACTSGSGAGSGNGSGNCGYGG  
 SGSSSGSAGGYASDTVGHGPEMSSWLAAFGYGLGNPDVAPPGANDWNCKPTAEHPRPVLLHGTWMNAYN  
 GFAYMSQPIKDAGFCTFTLNYGRSNLLEGGGLGSLVPGVMGTGYIQSAKQVATFVDRVLAATGADEVDI  
 IAHSQGGALANWYTKYEGGADKVNKLITYGATHHGTTLVIGALGRAINNFIDVLGFEIFVGHAGIQQ  
 TVGSDFINKLNENGDTIAGVDYTVGTRYDEITNPYELTFLQAVPGATVQNTLQDQCEQDMSDHLTMMY  
 SPRGLSIALRALDPEGHPDLVCTGNPWLGGGSL

SEQ ID NO 28:

MRCHKVLRVFFVVISLGSVPVSYTSKGAQDGPVIFNKLNTSTSRAPFSTDIYQELSQLQAKISDIATG  
 KIKPVSTIEKGLSVLSSIPHDNNRTSLQNAIDIVSLGLVPSSITDILNGITNHEINSIANNNTKNPTPRI  
 HPTRSFEDAPYDIPEERLRSIYIPPAFSYGNNKIPVLLVPGTADPAGSTYYFSYAKLFTANPHDTPVW  
 VNIPENSLGDIQSNAEYVAYAINYISALSQRPIGVLTWSQGSIDVQWALKYWPSTRAAVSDFMAVSGDFH  
 GTLLATLCVFAKPFCSPAVQQAYDTRFIRALRGGGDSAFVPTTSVYSGDDFIVQPQSGDWASAALGDV  
 HGVGVSINVQVACAGGAAGGSYSHSAMLVNPLAYALFVDALVHDGPGKLERIDLDAICGESLAPGLDVD  
 DFLGIEDVSNVIGVLNVLLYGYNRNEEPLRDYVHY

SEQ ID NO 29:

MRCVPSLALLSLIPAAIAAPAPAAEPAPVQAPAPTAPSLDDALALEERQLGGLLGGILGGVNGVVTGL  
 LGSVESAAAAKNPAAVGSALVKIVAPNRPTNIADCMTRASKVWASPTGRDIIYPAIASQVAVGLGPLLDG  
 TLLTALTGGLAVGENSINNNPNPPKSVWNIKGDAPYSLSALRKAIFIPPTFKYGAGKKRPIIMVPGT

7/15

GAFGGVNFANNLRKLLVNQPFADPVWLNIPGAMLGDAQLNSEYVAYAINYISAISKSNMMAVISWSQG  
GLDTQWAFKYWPSTRKVVKDFLPISPDFRGTVLANALCLTADSKLMLNPLCPPSVIQEATSDYVNTLRT  
ANGDSAYVPTTTFYSGFFDEIVEPQQGNFASAFMNDGRNVGVSNEVQKVCAGGLAGTFYGHAGVLFNPL  
TYALIVDALTHDGPNTSRINLASVCSTYAAPGLDLDVVIATSGLIPIAGVMLLTYDPKRLAEPGLKSYA  
R

SEQ ID NO 30:

MKINARFAVMAASVAVLMAAAPIAQAVTSPGDIHPLVQAAHSPDGIPGNGVGEFHTSSMARSYSEKHLG  
VAPRGVNDFSCVKPGDRPVILIPGTGGNAFATWSFYGPHLAHEGYCVYFTTNNVPVGILDEGWFTGDV  
RASAQALGAFVDRVRKATGSEKVDVFGHSQGGGILPNAYIKMYGGASKVDKLIGLVAANHGTAVGLDKL  
VDGLPEAVKDFLSTWSYDHNMEAYGQQLKGSALMQQVYRDGDTVPGIAYTVISTRDITVTPYTQAFKLG  
AKNMTVQDACPLDYGHRPLPYDPVAYQMVNLALDPNHPREISCTWRPRVLPVSTTDAA

SEQ ID NO 31:

MRLHGVSLAVWGIQSFAVPTPAPDGLLPGLLPGVVSFVQNLGGINRAVAEGDPTKVLNILKQLQPLT  
RPTNIEDAMGRAAYIWKPSPRQDLYSAAAEQIVDGLVLDLTKAALTGGLPVGENNINTNNPSPTIY  
PKKNATDAPYTLSESLRKAIIYPPSFVYAGSKRPVIFVPGTGAYGGTNFASNLKLLTGKSYADPVWL  
NIPGAMLGDAQTNAEYIAYAINYISAISKQNKENIAIISWSQGGLDTQWFKHWPSTRPLVKDFLAVSPD  
FKGTVLANLLCLSPDSNLGLLPCAPSVIQEATSDYVRSLSRNGGDSAYVPTTTFYSSFFDEVVQPQEGT  
AASAFINDARNVGVSNNEVQAVCKGQAGGSFYGHSGVLLNPLTYALIVDALQHEGPGSLERIDVKSVCDS  
YAAPGLDLDVLDLATTGLIPVALVLIILAYPQKSLTETPVRAFAG

SEQ ID NO 32:

MEVSMTKIKVFARAVVVSFVAGLLLLTGLPASFAAATPEPGPVLTPTAQLFSAKCSADLAPPNKTPLV  
LVPGFGEVNDAYSGGYEKYFRDQGRPLCLLTIIPGRFGDMQVTVEYVVS AIRSMNEKSEKISAIGHSE  
GGMLLTWAVKFWPDLATRLDDVINIASPINGTSFTGIIPTCKPNEWYSSCPPVGFQVSRGSDWTTALAAR  
RLPGDFHTRRSPPTMMSSFFLRLARPTWLPATSSCRISVQAEHLHCILAY

SEQ ID NO 33:

MWKARHGSRFALLAAVVCICALGVAPAQAAEVP TLPGPAQSDAGSAISYAKHHPHSAPPGTNDFSCRPGP  
AHPHPVILVHGSDGSAYSNWAGLSPKLKAAGYCVYALNYGRKPGTEHFGMQTMDGAAELEVFVDDVLAS  
TGADVDLVGHSQGATVARYYINRLGGASKVNRWVGLASPSYGGTFFGIATALQTLPGGNELIVGIGSEA  
LAEVQVQSPFLTALNAGGDTVPGVEYTTIGTRYDEVIQPYTNVALHDPGATNILVQDLCPLDQTGHFNLP  
YDPFSQQLVNLTPAHAIIVPPCTFVPLGTGIAGVVIASNF

SEQ ID NO 34:

MRFRGAGAVVAGVLLMSGAVSTARADDASPPAVPATAGLPQTGRSAAALYAHEHPGSAPAGSNDFSC  
TPSPDRPDPVLAHGTDASAYADWAALSPMLAADGYCVFALNYGGAPGAESFGTEDIVASAEFGFRFVDR

8/15

VRDATGAGKVDVVGYSQGANVTRYVVKLGGAPFVDHWVGLASPSYGGVYGLVPVVQALPGGPDFARTV  
 TSVAVSQMQGSPFMTDLNAGGDTVPGVAYTTIGSRYDEMIQPYTNMALRGAGAENLIQDRCPEDGTGH  
 FRAPYDPFALDLVRAALDPAATPLARCGFVPIGADIPQVIVDSNR

SEQ ID NO 35:

MLLRKTAVLALALGATLAVPGVAASAAPADA AVEGASAPHSTVGDARDTAAGTAAATDNPV IIVGGLSG  
 IAVAYGPLAARLKHDFRPFVYELPGLGFGDIPTSARAFADYVDQVRATTGAAQVDLVGHSEGLVARYY  
 LKRLGGTGSVGRYVSLGSPQYGTIVANILAFGLGSCAGVVACQMTIGSDFITDLNAGDDTPGSVSYTA  
 VRTRQDQLVRPVDNAMLADGATNVLIQSSCPWRLVGHGLVLDGTTYTVIRQALRDESIRPRCLAL

SEQ ID NO 36:

MLLRKTAVLAFALGVTLAVPGVAASAASASAAPAGAAAEPASTSHVPPSSVHNATAGPAVAADNPV IIV  
 GGLSGFAFAYGPLAARLDADGFRSFVYELPGLGFGDIPTSARAFADYVDQVRATTGANRVDLVGHSEGL  
 VARYYLKQLGGTGAVGRYVSLGSPQYGTIVANIVAFGLGSCAGVVACQMTIGSDFLADLNAGDDTPGS  
 VSYTTIRTWQDQLVRPVGNAALADGARNVLIQSWCPLRLVGHGLALDGTTTYTVIRQALRDESIRPNCLA  
 V

SEQ ID NO 37:

MRPHMGIFLAVVTAPITLAAPALVPGSPKPNSTDSSSCTSSGGNRVSHIGSLTSLIPAVLSDVTNVL  
 TAADEVANAIANGTVFGTDVPLVKKLFSAVQPTATPTSISQAQELAAGVWGTNPSASPTAPANIIANV  
 LELVLDGFTSSDLQALSSGVNPAANSVNNVNDVSSNKTFYNTVKGDAPFSVNEETLRAAIYIPPSFTWG  
 KKQPVIMLPGTGGYGYVYASNIGKLLSATDYADPVYLSIPNAFTSDAQINA EYVAYALQYFYAMTSRKP  
 AIVTWSQGS LDAHWAFKYWPSVRNIVTDHIAISPDYHGTVLAYILCPGFALGNGIACTPSVLQQTYESNF  
 VKRLRSTDGDSAYVSTTSIYSLTDEIVQPQAGTAASGFIKDVRGVGSNTFLQGACAGLPAGGLYTHAGV  
 LYNPVAYALLTDALKNDGPGLFERRGGRLFVVVLDWFLYIPNLF

SEQ ID NO 38:

MILTSKTAVLFSTVTLFAQVAFGLPTTSGPERHNRARAVRQLSYTNKTSTFRNAPDSESDLQSR LDSIWD  
 STAGSSTTGTFWDKVVLAHQNILPGQGIDINYIDDPNSITDVLVGPTDPRDSFSLNPNPDVPGVHYPRF  
 SDVDPLYTISEAGLRAAIYLPFGFTASSNRQVFLSLPNPAPPTTVWLNVPGAMLNDVQSNAEYIAYAIS  
 YVKALIGDGRELVIGWSQGNLATQWVFTYWPSTSPKVRQLISVSPDFHGTALANGLCLNAGLNTNGIEE  
 GLPCAPSVLQQEYNSNLISTLRAAGGDAYVPTTSFWSL FDEIVQPQIGLTASARIGNARRKGV TNVEV  
 QTVCGLSPGGGFYGHASLLSHPLVAALTDALKNGGPASLGRIASDIRDICKNVLAPGLDGADGAQTAGA  
 IVLAGVRLIAYPSKLKEEPALRAYAA

SEQ ID NO 39:

MLPWKRWLRPLAALAL TAAAVLTPAATASAAPTAQATASSGWN DYSCKPSAAHPRPVVLVHGT FANSVDN  
 WLVLAPYLVNRGYCVFSLDYGQLPGVPLIHGLGPIDKSAEQLRDFVDKVLAAATGAPEADLVGHSQGGMMP

9/15

RHYLKFLGGADKVNALVGIAPDNHGTTLLGLTKLLPHFPGAEEKFLNDKTPALADQIAGSPFLTRLNEGDD  
 TVPGVQYTVIATRYDQVVTQPYRSQYLDGPNVRNVLVQDLCVNISEHVAIGTIDRIAFHEVANALDPANA  
 TPTNCGSVIN

SEQ ID NO 40:

MLPWKVRLRPLTALLLTVAAVALVPAATAHADSAAPSSGWNDSYCKPSAAHPRPVVLVHGTGNSVDNWLGL  
 APYLEHRGYCVFSLDYGQLSGVFFHGLGPIDKSAEQLVFVDKVL TATGATKADLVGHSQGGMPRYL  
 KFLGGAGKVNALVGIAPNNHGTTLSGLTNLLPYFPGAEDLLSTATPGLADQVVSFAFMAKLNAGGDTVAG  
 VHYTVIATQYDEVVTPYRTAFLSGSDVHNVLQDLCPLDLSEHVAIGLIDRIAFHEVTNALDPAHATRTT  
 CASVFS

SEQ ID NO 41:

MSHWRRIRSLRRLPALALAVAAVAAMAPVAASAAPDESAAGQSATSNGWNDYCKPSAQHPRPVVLVH  
 GTLNSVDNWLGFAPYLVDRGYCVFSLDYGQLPGVPIFYGLGPIADSAKQLSAYVDRVRTATGAAKVDIV  
 GHSQGGMPRYLKLFGAAKVNALVGLAPTNHGTTLSGLTKLLDYFPGAADVLAKHTPGLTDQVVSFAF  
 LTRLNEGDDTVPGVRYTVISTKYDEVATPYRAQFLTGSDVKNVVVQDLCPSDLSEHVTIAMTDRVAFHEA  
 VNALDPEHATPTTC

SEQ ID NO 42:

MRLSSWLGGVAAVLAATVLPASAASAADVSSPPEIPAAELAKALHCGTELGDLRDAGDKPTVLFVPGT  
 GLKGEENYAWNMAELKKKGYQSCWVDSRGLRDMQESVEYVYATRAIQEATGRKVDLVGHSQGGLLT  
 AWALRFWPDLPKVDMMVTLGSPFQGTRLASPCRPIAEVAGCPASVLQFARSDNSKALGADGTPMPAGP  
 SYTTIYSYADESVVADGEAPSLPGAHRIGVQDIPCGRPWPTHIAMVVDQVSYDLVADAIEHPGADTSRI  
 DRAHCAKPVMLNSQEAVDALPGLLNFPIELLIHSQPWDEEPLRPYAR

SEQ ID NO 43:

MRLRRTVRFLIAAAATAALGLTGLSAPAAASVLDVPPGGANDWSCKPDSAHQPVVLVNGTFKLAENWS  
 KLSPKLKEAGYCVFAFNHGFETDPIPESAAELRDFVEAVRGATGAAKVDIVGHSQGGMLPRYYVKFLGG  
 ADKVDLGVIVPSNHGTKNPLAIPAGWTFPCSCVDQQAQAGSELLQKLNAGDETPAGPDYTVITTRYDEVVI  
 PYASALLTGDKEHLTNVVLQDKCPLDLYMHDQATKDPVVAQWVLDALARKGPADPGFQPRCLGGA

SEQ ID NO 44:

MLPWSRVLRPLAALLAAVALVPATAATAAPTADARPGSGWNDYCKPSAAHPRPVVLVHGTGNSVDN  
 WLGLAPYLKNRGYCVFSLDYGQLPGVPLFHGLGPVEKSAEQLAHVDKVLAATGATETDLVGHSGGMMMP  
 RYYLKFLGGAAEVNALVGIAPSNHGTTLSGLTRLLPYFPGAEDLLNEHTPALADQVVSFVTLRNLNAGGD  
 TVPGVRYTVLATKYDEVVTPYRGQFLDGPVGRNVLLQDLCPLDLSEHLAIGLFDRIAFHEVTNALDPAHA  
 TPTTCASVFG

10/15

SEQ ID NO 45:

MLPWTRPPRTPRARRTLAALLLTLAALVAPTATATAAPTQAAAPSRGWN DYSCKPSATHPRPVLVHGT  
 GNSIDNWLVLAPYLVSRGYCVFSLDYGQLPGVPLFNGLGPIDRSAGQLDVFVDKVLGATGAPKADLVGHS  
 QGGMMPHYLLKFLGGAEKVNALVGIAPDNHGTTLLGLTKLLPYFPGVEDLLTTNTPGLADQIAGSAFITK  
 LNAGGDTVPGVRYTVIATKYDEVVTPYRTQYLSGTNVRNVLLQDLCVLDLSEHVAIGTIDRIAFHEVANA  
 LDPARATPTTCASAVS

SEQ ID NO 46:

MLPPRPPAARRTLRAL TALLLLAAALLFAPAATAHAATPPAATDRTAATAATAGASGAGWNDYACKPSA  
 AHRPVVLVHGTFGNSVDNWLGLAPYLVRRGYCVFSLDYGQLPGVPPFFHGPGLVAESAGQLDAYVDRVLG  
 ATGAREVDIVGHSQGGMMPRHYLLKFLGGAEKVNALVGIAPDNHGTTLLHGLTRLLPHFPGAADLISAKTPA  
 LADQIAGSPFLQRLNEGDTVPGVRYTVIATRYDQVVTPYRSSFLDGPVNRNVLLQDLCPLDLSEHLAIG  
 LVDRIAFHEVANALDPARATPTTCASVLG

SEQ ID NO 47:

MLPWKRLIRPLAALLAAGVTL PAAAGAQAAGAPSSGWN DYSCRPSAAHPRPVLVHGTFGNSVDNWLGL  
 APYLKARGYCVYSLDYGQLPGVPLFHGLGPTEKSAEQLDADFVDKVLAAATGAAETDIVGHSQGGMMPRYLL  
 RFLGGADEVNALVGIAPSNHGTTLLNGLTRLLPHFPGAEDLLSEATPALADQIAGSAFLTKLNAGGDTVPG  
 VRYTVIATRYDEVVTPYHSGYLTGPNVRNVLLQDLCPLDLSEHLAIGLFDRAVAFHEVANALDPAHARPTT  
 CASAFS

SEQ ID NO 48:

MLPWRNIRTL L PAL TLAVAAATAAPAAAQSSQT TDSGWN DYSCKPSAQHPRPVLVHGTGNSVDNWLGL  
 APYLVDRGYCVFSLDYGQLPGVPPFFHGLGPVDRSAGQLSSYVDRVLAATGAAEVMVGHSQGGMMPRYLL  
 KFLGGAAKVNALVGLAPSNHGTTLLSGLTKLLDLFPGLDDAVAKAAPGLMDQVAGSDLLNRLNAGGDTVPG  
 VRYTVIATRYDEVVTPYRSQFLTGPDKVNVLLQDLCASDLSEHLTIGMTDGLAFHEAANALDPAHATPTT  
 CASDD

SEQ ID NO 49:

MPWSRVL RPLAALL LAAAVALPATAATAAPTADARPGSGWNDYTCCKPSAAHPRPVLVHGTFGNSVDNW  
 LGLAPYLVKRGYCVFSLDYGQLPGVPLFHGLGPVEKSAEQLAHVVDKVLAAATGATETDLVGHSGGGMMPR  
 YYLKFLGGADEVNALVGIAPSNHGTTLLSGLTRLLPYFPGAEDLLNEHTPALADQVVGSDVLRNLAGGDT  
 VPGVRYTVLATKYDEVVTPYRGQFLDGPVNRNVLLQDLCPLDLSEHLAIGLFDRIAFHEVTNALDPAHAT  
 PTTCASVFG

SEQ ID NO 50:

MLPWKRALRPLSALMLAVAVALTPAATATADTTTAAAPSSGWN DYDCKPSAAHPRPVLVHGTGNSVDNW  
 LVLAPYLVKRGYCVFSLDYGQLPGVPPFFHGLGPVDKSAEQLDAYVDKVLAAATGAPEADIVGHSGGGMMPR

11/15

YYLKFLGGAAKVNALVGIAPSNHGTDLNGFTALLPYFPGAADLLGRHTPALADQVTGSAFLTRLNADGDT  
VAGVRYTVIATRYDEVVTPWRSQYLSGPNVRNVLQDLCPLDLSEHVAIGVFDLIAYHEVANALDPAHAT  
PTTCASVFG

SEQ ID NO 51:

MPWIRARVPRTSLLAALLLALTVLVAPTATASAAPAAEAATSRGWN DYSCKPSAAHPRPVVLVHGTFG  
NSIDNWLVLAPYLVNRGYCVFSLDYGQLPGVPPFFHGLGPIEKSAEQLDVFVDKVL DATGAPKADIVGHSQ  
GGMPPNYL KFLGGADKVNALVGIAPDNHGTLLGLTKLLPFFPGVEKFISDKTPGLADQVAGSPFITKL  
TAGGDTVPGVRYTVIATKYDQVWTPYRTQYLDGPNVRNVLQDLCPLDLSEHVAIGTIDRVAFHEVANAL  
DPARATPTTCASVIG

SEQ ID NO 52:

MLPWKRLRLPLAALLL TATVAVVPAATAAQANAPTRGWN DYSCKPSAAHPRPVVLVHGTFANSVDNWL A  
LAPYLESRDYCVFSFDYGELSGVPLFHGLGPIDKSAEQLKTFVDKVL TATGAAETDLVGHSGGMLPRYY  
LRLFLGGAAKVNALVGIAPDNHGTLLSGLTNLLPYFPGVGDFTTNTPALADQVVGSAFLTKLNEGDTV P  
GVKYTVLATKYDEVVTPYRSQFLSGSGVHNVLQDLCPLDLSEHVAIGLFDRIAFHEVANALDPAHATAT  
TCASALS

SEQ ID NO 53:

MLPRRRIRFRKTTTKPRTLLPALALAVAATAATPTAALATDTASQGVSSGWN DYSCKPSAQHPRPVVL  
VHGT LGNSVDNWLGFAPYLVKRGYCVFSLDYGQLPAVPPFFHGLGAVDQSAKQLSTHVDRVLAATGAAKVD  
MVGHSQGGMPPRYL KFLGGAPKVNALVGVAPTNHGTLLSGLTKLLDYFPGAGDLIAK GAPGLMDQVVG S  
DFLRRLN EGGDTVPGVRYTVIATKYDEVATPYQAQFLSGPNVKNVVIQDLCATDISEHLAIGLTDGLAFH  
EAVNALDPDHATPTTCASDD

SEQ ID NO 54:

MLPWKVRLRPLSALLL TAAAL TVPATTAQAAGAPSSGWN DYSCKPSAAHPRPVVLVHGT LGNSVDNWLGL  
APYLKVRGYCVFSLDYGQLEGVPPFFHGLGPAEKSAGQLKDFVDQVLAATGAAETDVVGHSGGMPRYL  
KFLGGAAKVNALVGIAPSNHGTDLNGFTKLLPYFPGAADLLSKNTPALADQVTGSAFLTKLNTGGDTVPG  
VRYTVIATQYDEVVTPWRSQYLSGPDVRNVLQDLCVDLSEHVAVGLLDRIAFHEVANALDPGRATPTT  
CASAFD

SEQ ID NO 55:

MLALLLPTISFALAAIWL GASVREKRLVYHKNNVFTFGDPVYLVDERQLDEAVSCPSSRPQAKGTVLL  
VHGTGMAPQINWEYTLVPPLIHEGFRPCYVAVPHRLFDDAQISA EYISHAIKKLADKNDTQISIISWSAG  
ALITQWTLTFYPETRSKVKRHIALGPDYRGSWSMVPLFYFNMFT EAVVQQIPWSNFLNTLNRFGGDIARV  
PTTNIGSSTDLIVQPGFYGEGWPMFKDSWRLNGPQARNIDLFKLC AAKSLMHRALPHVSHDSLLEWEPAS  
HQIIFDALNNEETYVGSADSVTFDHCRRGGQANHLPPGSETRHSEIMPELV DYASKMPVKGWPEVPLRDYA

12/15

LLE

SEQ ID NO 56:

MRRRRMRAWALAASAVTAAAMLLAAPGTAHADTSPPGANDWTCKPTQRPRPVVLVHGTFFENMAFNWQW  
LSPVLKRHGVCVFALNYGGKTPESPIQGTEDIPTSAGQLAAFVDAVLKATGAAEVDIIGHSQGGMMPRY  
VRFLGGADKVHHLIGLAPSNYGTTFWGLVVEGLMRLTELAVRLAPAVGQQIEGSQFLRKLNDGGDTVPG  
VYTVIASRYDEVVTPYNSFLKDGRARNLTIQDLCPLNPVEHLAIIWDKPTQLVILNTLAGLDPRTPE  
CAFPRP

SEQ ID NO 57:

MKTTSVISALVTLASIIIRAAPLASSDPAFSTPKATLDAGLECQTGSPSSQTKPILLVPGTGANGTQTFDS  
SWIPLSAKLGFSPCWISPPPFMLNDSQVNVYIYVNAVQTLYAGSGSKKVPVLTWSQGGLATQWALTFPFS  
IRNQVDRLMAFAPDYKGTIEAGLLSTFGLASQSVWQQAGSAFVTALKNAGGLTSFVPTTNLYSFFDEIV  
QPQVNSDADSSYLGNKNIQAQTVCGGFFVIDHAGSLTSQFSYVVGKSALTSSSGVANSADYSSKDCKA  
SPADDLSAKQKADASALLFVAAGNLLAGPKQNCPEDLKPYARQFAVGKKTCSGTIN

13/15

**FIGURA 2: SEQUÊNCIAS DE POLIPEPTÍDEOS DAS REGIÕES DA TAMPA (“LID”) IDENTIFICADAS NAS RESPECTIVAS LIPASES A SEREM MUTADAS**  
**SEQ ID NO: 58-114**

SEQ ID NO	Sequência precursora	Posição na sequência precursora	Sequência
58	SEQ ID NO 1:	171	GTATSALACRTLRSPPAA
59	SEQ ID NO 2:	167	GTQGILVPSATGVKIAGNYAGWICDACAD
60	SEQ ID NO 3:	285	GTVASSLACPWLKSLCSPALW
61	SEQ ID NO 4:	288	GTVMRSLVCPWLAALACTPSLW
62	SEQ ID NO 5:	438	GTIETRLVCPWLAGIMCTPALW
63	SEQ ID NO 6:	245	GTIVKWLVCPLNDLACTPSIW
64	SEQ ID NO 7:	326	GTLGGPCPGFPPSRLCTPSLI
65	SEQ ID NO 8:	316	GTVLSYLCPGPEGNDVACTPSIL
66	SEQ ID NO 9:	137	GTVLAGPLDALAVSAPSVW
67	SEQ ID NO 10:	157	GTNLDDIETLAADYFPAALGLIGTACPCSD
68	SEQ ID NO 11:	185	GTLLGLSTLARFIPGASAVLRAGGPALED
69	SEQ ID NO 12:	225	GTTMGGVSPPLKTNRGEAVQSVVQSWFGGAGLEL
70	SEQ ID NO 13:	121	GTDLRGYAARINPIITGRNPKFWMERMASSAV
71	SEQ ID NO 14:	233	GTTVGGMFKASEFTNGVDFVDFAGVASR
72	SEQ ID NO 15:	192	GTTLAGMDKMLRPIIERNPKLAESVAGKAGV
73	SEQ ID NO 16:	300	GTRMVPVLCPSFPKLSPPSVL
74	SEQ ID NO 17:	179	GTLLGLLAKLGEAIGVTGPJESFCASCI
75	SEQ ID NO 18:	284	GTILANIGGATGLINTPAVV
76	SEQ ID NO 19:	200	GTTLSGLGALAGQLAPATIPPVLGPAAAD
77	SEQ ID NO 20:	283	GTKLAPAI CPSFPKLSCAPSVL
78	SEQ ID NO 21:	283	GTKLAPAI CPSFPKLSCAPSVL
79	SEQ ID NO 22:	153	GTYYANLVAVLGLGSCAGVIAC
80	SEQ ID NO 23:	153	GTYYANLVAVLGLGSCAGVIAC
81	SEQ ID NO 24:	192	GSTADLLTGVPAAACPCAD
82	SEQ ID NO 25:	284	GTVVRSVCPWLAALACTPSLW
83	SEQ ID NO 26:	227	GTMLAYGLCAGNFKVAVKAGAPCPPSVL
84	SEQ ID NO 27:	245	GTTLVGIGALGRAINNFIDVLGFVEIFVGHAGI
85	SEQ ID NO 28:	281	GTLLATLCVFAKPFCSPAVQ
86	SEQ ID NO 29:	310	GTVLANALCLTADSKMLNPLCPPSVI
87	SEQ ID NO 30:	201	GTTAVGLDKLVLDGLPEAVKDFLSTWSYDHNMEAYG
88	SEQ ID NO 31:	283	GTVLANLCLSPDNLGLLPCAPSVI
89	SEQ ID NO 32:	171	GTSFTGIITCKPNEWYSSCPPVGF
90	SEQ ID NO 33:	183	GGTFFGIATALQTLPGGNELIVGIGSEALAE
91	SEQ ID NO 34:	187	GGVMYGLVPVQALPGGPDFARTVTSVAVS
92	SEQ ID NO 35:	162	GTYYANILAFGLGSCAGVVAC
93	SEQ ID NO 36:	167	GTYYANIVAFGLGSCAGVVAC
94	SEQ ID NO 37:	318	GTVLAYILCPGFALNGIACTPSVL
95	SEQ ID NO 38:	260	GTALANGLCLNAGNLNNGIEEGLPCAPSVL
96	SEQ ID NO 39:	165	GTLLGLTKLLPHFPGAEEKFLNDKTPALAD
97	SEQ ID NO 40:	161	GTTLSGLTNLLPYFPGAEDLLSTATPGLAD
98	SEQ ID NO 41:	174	GTTLSGLTKLLDYFPGAADVLAKHTPGLTD
99	SEQ ID NO 42:	166	GTRLASPCRP IAEVAGCPASVL
100	SEQ ID NO 43:	156	GTKNPLAIPAGWTFPCSCVD
101	SEQ ID NO 44:	165	GTTLSGLTRLLPYFPGAEDLLNEHTPALAD
102	SEQ ID NO 45:	171	GTLLGLTKLLPYFPGVEDLLTTNTPGLAD
103	SEQ ID NO 46:	184	GTTLHGLTRLLPHFPGAADLISAKTPALAD
104	SEQ ID NO 47:	161	GTTLNGLTRLLPHFPGAEDLLSEATPALAD
105	SEQ ID NO 48:	161	GTTLSGLTKLLDLPFGDLDVAKAAPGLMD
106	SEQ ID NO 49:	164	GTTLSGLTRLLPYFPGAEDLLNEHTPALAD
107	SEQ ID NO 50:	164	GTDLNGFTALLPYFPGAADLLGRHTPALAD
108	SEQ ID NO 51:	170	GTLLGLTKLLPYFPGVEKFI SDKTPGLAD
109	SEQ ID NO 52:	162	GTTLSGLTNLLPYFPGVDFLTTNTPALAD
110	SEQ ID NO 53:	176	GTTLSGLTKLLDYFPGAADL IAKGAPGLMD
111	SEQ ID NO 54:	161	GTDLNGFTKLLPYFPGAADLLSKNTPALAD
112	SEQ ID NO 55:	170	GSWSMVPLFYFNMFT EAVV
113	SEQ ID NO 56:	162	GTTFWGLVVEGGLMRLTELAVRLAPAVG
114	SEQ ID NO 57:	157	GTIEAGLLSTFGLASQSVW

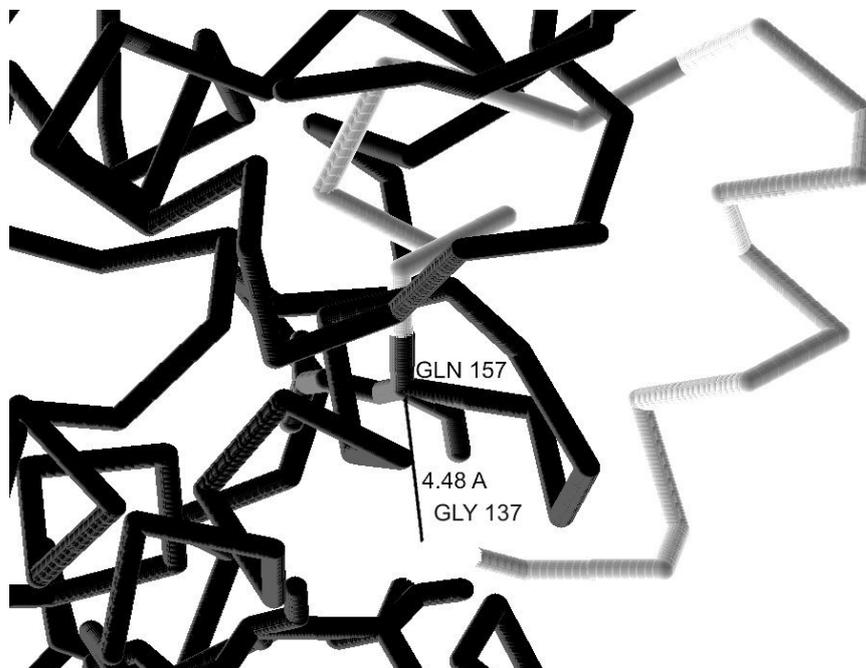
14/15

FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA CADEIA PRINCIPAL DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE B DE *Candida antarctica*.



15/15

FIGURA 4: DETALHE DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE B DE *Candida antarctica*.



1/1

**RESUMO**

A presente invenção fornece variantes de lipases, sequência de DNA, vetor de expressão, células hospedeiras transformadas e método para produção de variantes de lipases. Variantes de lipases, preferencialmente, com maior atividade em meio orgânico, contínuo e homogêneo pela introdução de mutações que substituem a região conhecida como tampa ("lid"), identificadas nas lipases precursoras, responsável pelo fenômeno de ativação interfacial das lipases naturais quando exercem sua ação catalítica em meio emulsificado, por um segmento de ligação composto de um ou mais resíduos do aminoácido glicina

### 6.7 Preparo de células eletrocompetentes e transformação de *E. coli* por eletroporação

Clones de lipase selvagem e modificada foram desenhados, submetidos a simulações de DM e encomendados à empresa Genescript. Células eletrocompetentes foram preparadas e transformadas por eletroporação para a inserção dos plasmídeos possuindo a PalB mutante e a PalB selvagem. O mutante escolhido para os testes de expressão foi o *Pant*ΔlidG3. Houve crescimento de células transformadas em meio seletivo as quais foram utilizadas para o método de expressão.

### 6.8 Expressão heteróloga de PalB selvagem e mutante

Expressão de proteínas em sistema *E. coli* cepa Rosetta-gami 2(DE3) Competent cells foi investigado em diferentes temperaturas (37 e 25°C) e tempos de cultivo. Incubação prolongada foi realizada a 25°C para compensar parcialmente uma taxa mais lenta de crescimento específico, portanto, variando de 3 horas (37°C) a 20 h (25°C) (Dados não mostrados).

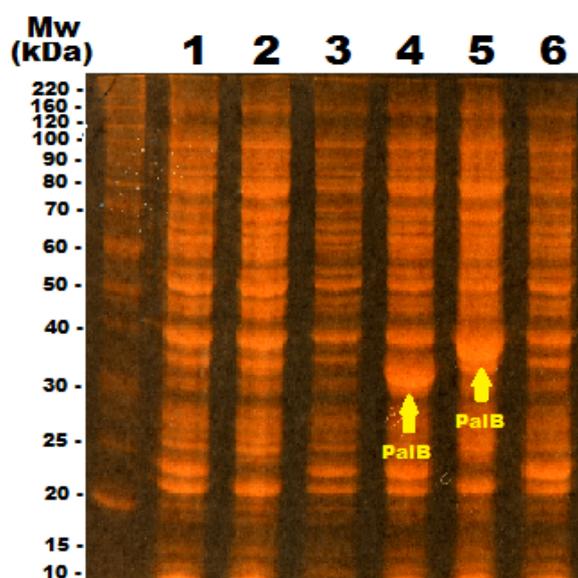


Figura 17 - SDS-PAGE de expressão heteróloga de lipase B de *P. antarctica* em *E. coli* Rosetta-gami 2 (DE3). Linhas 1-3: amostras não induzidas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente; linhas 4-6: amostras induzidas com 1 mM IPTG por 3 horas de lipase mutante, lipase selvagem, plasmídeo sem inserto respectivamente. SDS-PAGE foi corado com Comasie Brilliant Blue.

O extrato bruto da proteína produzida foi visualizado em gel SDS-PAGE (Figura 17). Os géis foram carregados com o mesmo volume de amostra. Utilizando-se o plasmídeo sem inserto como negativo (Figura 17: 6), verificou-se a expressão de PalB após 3 horas de

indução com IPTG 1 mM a 37°C. A lipase mutante apresenta redução no número de aminoácidos em sua cadeia, desta forma, mostrou uma banda mais leve que a lipase selvagem (Figura 17: 4). Todavia a lipase selvagem e mutante ficaram aproximadamente dentro da faixa de peso molecular de PalB de 33 kDa.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Projetos que promovem o desenvolvimento de tecnologias limpas devem ser valorizados na tentativa de reduzir os danos que já foram causados ao meio ambiente. A utilização do biodiesel como combustível renovável é fortemente influenciada por ele ser uma fonte de energia menos impactante do que os combustíveis fósseis. Isso deve-se, não só pela fonte renovável de produção, mas também pela formação de co–produtos e efluentes menos danosos ao meio ambiente.

A lipase está sendo apreciada como principal catalisador na geração de energia, uma prova disso é o aumento do depósito de patentes sobre produção enzimática de biodiesel. Estratégias tecnológicas para a otimização do processo da produção de biodiesel por via enzimática foram os principais focos deste estudo. De acordo com os resultados de DM obtidos, variantes de lipases com substituições na tampa de 2 a 8 glicinas possuem valores baixos de energia potencial o que justifica futuros ensaios de expressão e atividade.

Os testes de expressão foram bem sucedidos tanto com a lipase selvagem quanto para a lipase mutante. Os próximos passos de purificação e ensaios de atividade já estão sendo desenvolvidos com o objetivo de mensurar as alterações na atividade catalítica e a influência da mutação feita na tampa.

Este trabalho demonstra um processo enzimático para a produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras residuais através da esterificação e transesterificação simultâneas. A produção de etil ésteres de ácidos graxos (EEAG) realizada é mais rápida do que a maioria dos processos apresentados na literatura, mesmo aqueles que incluem a adição gradual de álcool ou de co-solventes.

A equação empírica  $f(t) = 1 - I_a \cdot e^{-C_k Et} + I_{TAG} \cdot e^{-C_k Tt}$  foi deduzida para determinar o comportamento cinético em toda produção de biodiesel em função do tempo. Usando esta equação será possível prever a cinética reacional de produção de biodiesel para qualquer OGR usando apenas o índice de acidez e teor de TAG. Estes resultados podem ser utilizados para prever o comportamento da produção enzimática de EEAG em função da disponibilidade da matéria-prima.

O presente trabalho constitui mais um passo na elucidação do mecanismo de catálise enzimática a fim de desenvolver lipases mais específicas para produção de biodiesel. Os mecanismos da produção enzimática de biodiesel não foram exaustivamente estudados e requerem mais estudos.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion. Science*. v. 33, p. 233–271, 2007.
- AL-ZUHAIR, S. Production of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A kinetics study. *Biotechnol. Prog*, v. 21, p. 1442-1448, 2005.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J. Molecular characterization of gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases. *Biotechnology Letters*, v.21, p. 313-319, 1999.
- ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. Green Chemistry: An Overview. *Green Chemistry*, Chapter 1, p. 1-17, 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-1996-0626.ch001>> Acesso em: 30 abr. 2012.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 301-312, 2010.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **O biodiesel obrigatório, 2010**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=17680&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1267481272429>>. Acesso em: 18 fev. 2012.
- ANVISA. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 482 de 23 de setembro de 1999**. Secretaria de Vigilância Sanitária, Brasília, 1999. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm)>. Acesso em: 15 fev. 2012.
- APROBIO (Associação dos Produtores de Biodiesel do Brasil). **Informações Técnicas – Ganhos ambientais**. Disponível em: <<http://www.aprobio.com.br/informacoes.html>>. Acesso em: 30 abr. 2012.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. Production of biodiesel using high free fatty acid feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 3275-3285, 2012.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, n. 6, p.392-416, 1996.
- BLANK, K.; MORFILL, J.; GUMPP, H.; GAUB, H. E. Functional expression. of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 125, p. 474-483, 2006.
- BRASIL – **Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/biocombustiveis>>. Acesso em: 30 abr. 2012.
- BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de

outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 14 jan. 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)>. Acesso em: 18 fev. 2012.

BRASIL. Resolução do CNPE nº 6, de 16 setembro 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, 26 out. 2009. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder\\_resolucoes/resolucoes\\_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$g=\\$x=\\$nc=4231](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_resolucoes/resolucoes_cnpe/2009/rcnpe%206%20-%202009.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$g=$x=$nc=4231)>. Acesso em: 18 fev. 2012.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, **Química Nova**. v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHEN, J.; WU, W. Regeneration of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 466-469, jan. 2003.

COPPE – UFRJ: **Brasil e China debatem captura de carbono e biocombustível**.

Disponível em: <<http://www.planeta.coppe.ufrj.br/artigo.php?artigo=1239>> Acesso em: 1 dez. 2011.

CVENGROS, J.; CVENGROSOVÁ, Z. Quality Control of Rapeseed Oil Methyl Esters by Determination of Acyl Conversion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 12, p.1349-1352, dez. 1994.

DALL'AGNOL, AMÉLIO, 2007. **Porque fazemos biodiesel de soja**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/convidado/porque-fazemos-biodiesel-de-soja.htm>>. Acesso em: 31 mai. 2012.

DEMIRBAS, A. Biodiesel : a realistic fuel alternative for diesel engines. **Springer - Verlag London Limited**: p. 208, 2008.

DUBOIS, V.; BRETON, S.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **European Journal of Lipid Science Technology**, 109, p. 710-732, 2007.

EREC (European Renewable Energy Council). Renewable Energy Scenario by 2040, EREC Statistics, **Brussels**, 2006.

European Patent Office – EPO: banco de dados de patentes. Disponível em: <[http://ep.espacenet.com/?locale=en\\_EP](http://ep.espacenet.com/?locale=en_EP)> Acesso em: 25 abr. 2012.

EWEA (European Wind Energy Association). Report: Large scale integration of wind energy in the European power supply: analysis, issues and recommendations, **Brussels**, 2005.

FERRÃO-GONZALES, A. D.; VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; ALVAREZ, H. M.; MOREAU, V. H. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1007-1011, 2011.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 10, p. 1638-1643, 1984.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p.405-416, set. 2001.

GOLDEMBERG, J.; JOHANSSON, T.B. **World Energy Assessment: Overview, 2004 Update**. United Nations Development Programme, New York, p. 26, 2004. Disponível em: <<http://www.energyandenvironment.undp.org/undp/indexAction.cfm?module=Library&action=GetFile&DocumentAttachmentID=1010>> Acesso em: 18 ago. 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763–781, 2004.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

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

HOEKAMAN, S. K., ROBBINS, C. Review of the effects of biodiesel on NOx emissions. **Fuel Processing Technology**, v. 96, p. 237-249, 2012.

IEA - **Emissions From Fuel Combustion Highlights**, International Energy Agency, Edition: 2010. Disponível em: <<http://www.iea.org/co2highlights/co2highlights.pdf>> Acesso em: 23 nov. 2011.

INPI – **China lidera patentes de biodiesel**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/noticias/china-lidera-patentes-de-biodiesel>> Acesso em: 1 dez. 2011.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, jun. 2001.

- IUBMB **Enzyme Nomenclature: Lipase**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/3.html>>. Acesso em: 10 abr. 2011.
- JAEGER, K-E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipase for Biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.390-397, 2002.
- JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- Jornal da Ciência: **Brasil e China debatem captura de carbono e biocombustível**. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=73091>> Acesso em: 1 dez. 2011.
- JUNG, S.; PARK, S. Improving the expression. Yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 717-722, 2008.
- KELEŞ, S.. Fossil Energy Sources, Climate Change, and Alternative Solutions. **Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects**, 2011, Vol. 33 Issue 12, p1184-1195, 12p
- KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446-451, 2002.
- KNOTHE G.; GERPEN J. V.; KRAHL J. The Biodiesel Handbook. **AOCS Press, Champaign, Illinois**, p. 303, 2005.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzimatic transesterification of Jatropha oil. **Biotechnology for Biofuels**, 2009, 2:1. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/1>>. Acesso em: 17 jul. 2011.
- LARSEN, M. W. **Expression of a lipase in prokaryote and eukaryote host systems allowing engineering**. 2009. 62 f., Doctoral Thesis. Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, AlbaNova University Center, Stockholm, Sweden, 2009.
- LARSEN, M. W.; BORNSCHEUER, U. T.; HULT, K. Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. **Protein Expression and Purification**, v. 62, p. 90-97, 2008.
- LEE, D. H.; KIM, J. M.; SHIN, H. Y.; KANG, S. W.; KIM, S. W. Biodiesel Production Using a Mixture of Immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* Lipases. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 522-525, 2006.
- LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed Transesterification of Rapeseed Oils for Biodiesel Production with a Novel Organic Solvent as the Reaction Medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p.58-62, 2006.

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2743-2748, 2004.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular, Cap 12. MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. Editora Livraria da Física, São Paulo, p. 413-414, 2007.

MME - Ministério de Minas e Energia. **Adição de 5% de biodiesel ao diesel é antecipada em três anos**. Disponível em:

<[http://www.mme.gov.br/spg/noticias/destaque\\_foto/destaque\\_0010.html](http://www.mme.gov.br/spg/noticias/destaque_foto/destaque_0010.html)>. Acesso em: 18 fev. 2011. Atualizado: em 23 out. 2009.

MME – **Balanco Energético Nacional, 2011** (ano base 2010). Disponível em:

<[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2\\_-\\_BEN\\_-\\_Ano\\_Base/1\\_-\\_BEN\\_Portugues\\_-\\_Inglxs\\_-\\_Completo.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2_-_BEN_-_Ano_Base/1_-_BEN_Portugues_-_Inglxs_-_Completo.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2012.

NAMBA, A. M. ; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n° 4, 2008. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/eq/v33n4/v33n4a02.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2012.

NATIONAL BIODIESEL BOARD. **Specification for Biodiesel (B100)** – ASTM D6751-08, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.biodiesel.org/pdf\\_files/fuelfactsheets/BDSpec.pdf](http://www.biodiesel.org/pdf_files/fuelfactsheets/BDSpec.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2011.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996.

NOVAGEN MANUAL. pET System 11th Edition. USA, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J.L.; VERSCHUEREN, K.H.G.; GOLDMAN, A. The a/b hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, p. 197-211, 1992.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 187-204, 2000.

PANWAR, N. L.; KAUSHIK, S. C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1513-1524, 2011.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PETERSEN, S. B. Em **Engineering of with lipases**; MALCATA, F. X., ed.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, 1996, p. 125. Disponível em

<<http://books.google.com.br/books?id=vHstQQfqhvwC&lpg=PA51&ots=82HfKWp6GI&dq>>

=Engineering%20of%20with%20lipases&pg=PA54#v=onepage&q=&f=false>. Acesso em: 14 ago. 2011.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 83-90, 2006.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 461-468, 1995.

RAMOS, LUIS PEREIRA, 2006. **A Qualidade da Matéria-Prima para a Produção de Biodiesel - Parte 1 e 2**. Disponível em:

<<http://www.biodieselbr.com/colunistas/ramos/qualidade-materia-prima-producao-biodiesel-2.htm>> <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/ramos/qualidade-materia-prima-producao-biodiesel-1.htm>>. Acesso em: 31 mai. 2012

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n° 3, p.43-49, 2001.

Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/modelag.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 12.

ROTTICCI-MULDER, J. C.; GUSTAVSSON, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K.; MARTINELLE, M. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase B Fused to a Cellulose-Binding Domain. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 386-392, 2001.

ROYON, D.; DAZ, D.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic Production of Biodiesel from Cotton Seed Oil Using *t*-butanol as a Solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.

RYAN, P.E.D. Biodiesel – A Primer. **National Center for Appropriate Technology (NCAT) Energy Specialist**. 2004. Disponível em: <<http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/biodiesel.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2011.

SAF/MDA – **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel**. Disponível em: <[http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel\\_Book\\_final\\_Low\\_Completo.pdf](http://www.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/biodiesel/arquivos-2011/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2012

SALIS, A.; SVENSSON, I.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1646, p. 145-151, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v.1, p. 49-57, 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/13/33>>. Acesso em: 24 jun. 12.

SANTOS, H. F. O Conceito da Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n°4, 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/04/modelag.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2012.

SAXENA, R.K; GHOSH, P.K; GUPTA, R; DAVIDSON, W.S; BRADDOO, S; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, p.101 - 115,1999.

SCHARMER, K. Alternative Fuels from Renewable Resources. **National Biodiesel Board**. Disponível em: <[http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19990101\\_gen-189.pdf](http://www.biodiesel.org/resources/reportsdatabase/reports/gen/19990101_gen-189.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2011.

SEO, H.; KIM, S.; HAN, K.; OARK, J.; KIM, Y.; SIM, S. J.; LEE, J. Functional fusion mutante of *Candida antarctica* lipase B (CalB) expressed in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 519-525, 2009.

SHAH, S.; GUPTA, M.N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v.42, p.409-414, 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p.789-793, mar. 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SILVA, T. H. A. Modelagem Molecular com o Auxílio do Computador. **Practical Studies for Medicinal Chemistry**. Chapter III.3 - Molecular Modeling, 2006. Disponível em <[http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-III-3.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-III-3.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2012.

SOUZA, L. H.; SOMMER, P. S. As Enzimas Industriais na Produção de Alimentos: passado, presente e perspectivas futuras. **Jornal da ANBio**, Rio de Janeiro: Ano 2, n7, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.anbio.org.br/jornais/jornal7/pag6e7.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

TOMBS, M. P. Enzymes in the processing of fat oils. In: TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. (eds), **Enzymes in Food Processing**, 2nd. ed., London: Blackie Academic & Professional, p. 268-291, 1995. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?id=-4ZnMbryTqkC&pg=PA268&lpg=PA268&dq=TOMBS,+M.+P.+Enzymes+in+the+processing+of+fat+oils.&source=bl&ots=yULA\\_47lzi&sig=N3AIgwOk\\_PPb2zrlYUt6ASNuYrc&hl=pt-](http://books.google.com.br/books?id=-4ZnMbryTqkC&pg=PA268&lpg=PA268&dq=TOMBS,+M.+P.+Enzymes+in+the+processing+of+fat+oils.&source=bl&ots=yULA_47lzi&sig=N3AIgwOk_PPb2zrlYUt6ASNuYrc&hl=pt-)>

BR&ei=P4TfSoKeCc6m8AbEjI1g&sa=X&oi=book\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CAkQ6AEwAA#v=onepage&q=TOMBS%2C%20M.%20P.%20Enzymes%20in%20the%20processing%20of%20fat%20oils.&f=false>. Acesso em: 17 ago. 2011.

TURKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalized methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 34–44, 2006.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, Crystal structure determination and refinement of two Crystal forms of lipases B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

UPPENBERG, J.; OHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket form Secondary Alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.

VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; FERRÃO-GONZALES, D. A.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9653-9658, 2011.

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

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

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, 2000.

XU, Y.Y; DU, W.; ZENG, J.; LIU, D.H. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.22, n.1, p. 45-48, 2004.

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

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; McLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process desing and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p.1-16, 2003.

# ANEXO A – Artigo 2: Thermodynamic analysis of the kinetics reactions of the production of FAME and FAEE using Novozyme 435 as catalyst

Author's personal copy

Fuel Processing Technology 92 (2011) 1007–1011



Contents lists available at ScienceDirect

Fuel Processing Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fuproc](http://www.elsevier.com/locate/fuproc)



## Thermodynamic analysis of the kinetics reactions of the production of FAME and FAEE using Novozyme 435 as catalyst

Astria D. Ferrão-Gonzales<sup>a</sup>, Ilvania C. Vêras<sup>a</sup>, Frederico A.L. Silva<sup>a</sup>,  
Heiddy M. Alvarez<sup>a</sup>, Vitor Hugo Moreau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Biotecnologia (NuBiotec), Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências da Biointeração (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 March 2010

Received in revised form 27 December 2010

Accepted 30 December 2010

Available online 17 January 2011

#### Keywords:

Biodiesel

Biocatalysis

Lipase

Activation entropy

Kinetics

### ABSTRACT

Biodiesel is a biofuel expected to become a substitute for petroleum diesel. One of the most promising technologies for production of biodiesel is enzymatic catalysis. However, low catalytic performance of most of the enzymes employed makes such processes expensive and time-consuming. This work describes a kinetic study of the enzymatic production of biodiesel at different temperatures using either methanolysis or ethanolysis, using immobilized lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) as catalyst. Reactions kinetics were followed by GC, and data were used to perform thermodynamic analysis of the transition state using Arrhenius equation. We found that methanolysis is faster than ethanolysis at temperatures above 13 °C. Thermodynamic analysis of the kinetics of reactions showed that methanol is favored as acyl acceptor due to the positive activation entropy change of reaction. These data may be useful in the development of new enzymes and new processes for enzymatic production of biodiesel.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biodiesel has become an important renewable biofuel since it was demonstrated to be an alternative to petroleum-based energy. Biodiesel is considered a carbon-neutral fuel and a pivotal advantage related to the emission of greenhouse gases because the carbon present in its exhaust is removed by the plant source from the atmosphere. Biodiesel can be produced by transesterification of triacylglycerol (TAG)\* usually obtained from vegetable oils or beef tallow, to short-chain alcohols forming fatty acid alkyl esters and glycerol [1,2]. Usually, biodiesel is produced by alkaline chemical catalysis with methanol as acyl acceptor, forming fatty acid methyl ester (FAME). However, longer-chain alcohols, such as ethanol, can be used, in which case fatty acid ethyl esters (FAEE) are formed [2]. Although chemical transesterification yields high levels of conversion of TAG into FAME with short reaction times, recovery of glycerol and removal of catalyst constitute energy consuming drawbacks. Further, the alkaline or acid waste water that is produced requires further treatment. Also, the presence of free fatty acids (FFA) and the water in

the feed stock oil interfere to the chemical reaction. Lately, many heterogeneous catalysts have been tested in transesterification reactions, including immobilized lipases [3]. Lipases (E.C.3.1.1.3) are enzymes with potential for use in biodiesel production since enzymatic reactions can overcome the problems mentioned above. Although lipase-catalyzed biodiesel production possesses certain advantages, the process has not yet been adopted on an industrial scale due to certain constraints like the high cost of enzyme production, exhaustion of enzyme activity, and enzyme inhibition by methanol. This inhibitory effect is attributed to the polar coating effect alcohol has on the surface of the enzyme [4,5], and many strategies have been studied in order to overcome this problem. Among these strategies, one can note the use of co-solvents, such as *t*-butanol [6–8], long-chain alcohols (butanol) as acyl acceptors [9], and the stepwise addition of methanol [10–13]. For this work, we chose *t*-butanol as co-solvent since, this system configuration is the best experimental design for such kinetics studies.

Lipases from different sources have been tested for biodiesel production by transesterification of vegetable oils, most of them using methanol. Methanol is the alcohol mainly utilized for industrial production of biodiesel due to its low cost and abundant availability [3]. However, ethanol-based production would be an economically viable alternative in ethanol-producing countries, such as USA and Brazil. Ethanol can be obtained from vegetable sources, such as corn or sugarcane, which makes the resulting FAEE-based biodiesel a fully renewable biofuel. The high cost associated with the dehydration of ethanol is one of the major problems encountered in the industrial

*Abbreviations:* FAME, fatty acid methylester; FAEE, fatty acid ethylester; TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol; FA, fatty acid; FFA, free fatty acid.

\* Corresponding author. Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Av. Luiz Vianna Filho, 8812, mod.I, sala 504, CEP: 41741-590, Salvador, BA, Brazil. Tel.: +55 71 3281 8193.

E-mail address: [vhmoreau@pq.cnpq.br](mailto:vhmoreau@pq.cnpq.br) (V.H. Moreau).

production of FAEE. Enzymatic production could prove useful in overcoming this problem, since it has been demonstrated that minor water-related activities do not interfere in enzymatic reactions [5,14,15].

The thermodynamics of enzymatic production of biodiesel has not been investigated thoroughly and it is the kinetics studies of these enzymes that provide the essential parameters for the selection of the best systems for production of biodiesel [16]. In this paper, the kinetics of enzymatic production of FAME and FAEE from rapeseed oil, as a function of reaction temperature, was investigated using immobilized *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) as catalyst. Lipases catalyze the conversion of TAG into biodiesel in at least three reversible steps with diacylglycerol (DAG) and monoacylglycerol (MAG) as intermediates. Novozym 435 has been shown to convert TAG into FAME without significant accumulation of MAG and DAG, indicating that the conversion of TAG to DAG is the rate-determining step of the reaction [17]. Assuming that the rate constant of TAG conversion to DAG reflects the rate constant of the whole reaction, we analyzed the rate of consumption of TAG during the enzymatic biodiesel production process using GC to determine the effect of temperature on enzymatic activity. For this purpose, we used either methanol or ethanol as the acyl acceptor. Changes in the rate constant of FAME and FAEE production as a function of temperature enable us to determine the transition energies involved in enzymatic biodiesel production. To analyze this data, we used the Arrhenius plot method, which correlates the dependence of the rate constants of the reaction on temperature and enables estimation of the changes in enthalpy ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropy ( $\Delta S^\ddagger$ ) and Gibbs free energy ( $\Delta G^\ddagger$ ) of the transition state. These data form the basis necessary for studies on the improvement of the enzymatic processes using lipases to make the enzymatic industrial production of biodiesel viable.

## 2. Materials and methods

FAME and FAEE (biodiesel) were synthesized in a 50 ml round-bottom reaction flask, attached to a reflux condenser, containing 10 ml of rapeseed oil, methanol or ethanol in a 6:1 alcohol to oil molar excess, 1% (w/v) immobilized lipase from *Candida antarctica* (5000 U/g), and 20% (v/v) *t*-butanol. Using magnetic stirring to keep the system vigorously stirred the reaction temperatures were controlled between 30 and 60 °C in a silicon oil bath. The alcohol-to-oil ratio was calculated based on the average molecular mass of rapeseed oil based on its fatty acid composition [19]. At the times noted under the figures, 500  $\mu$ l samples were collected and added to 500  $\mu$ l of hexane in order to arrest the reaction. The samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min in a spin centrifuge at 5 °C to separate the immobilized enzyme from hexane-soluble reactants and products.

Gas chromatography (GC) analysis was performed using 50  $\mu$ l aliquots of clear supernatant diluted in 5 ml hexane.

The GC analyses were carried out in a Varian CP-3800 gas chromatograph equipped with a 15 m  $\times$  320  $\mu$ m capillary Select™ biodiesel for glycerides column. The injection was done at 100 °C. Temperature gradient sequences between 50 °C and 380 °C were as follows: 50 °C for 1 min; from 50 °C to 180 °C at 15 °C/min; from 180 °C to 230 °C at 7 °C/min, and from 230 °C to 380 °C at 30 °C/min. Detection was by FID at 380 °C. Retention times, as well as integration of TAG, DAG, and MAG peaks were determined using GC standards from Merck (Darmstadt, Germany).

The yields of FA conversion from TAG to FAME were calculated from GC peak integrations derived using Eq. (1):

$$R = \frac{(A_{\text{FAME}} / \text{mm}_{\text{FAME}})}{(A_{\text{FAME}} / \text{mm}_{\text{FAME}}) + (A_{\text{MAG}} / \text{mm}_{\text{MAG}}) + 2(A_{\text{DAG}} / \text{mm}_{\text{DAG}}) + 3(A_{\text{TAG}} / \text{mm}_{\text{TAG}})} \quad (1)$$

where  $A_{\text{FAME}}$ ,  $A_{\text{MAG}}$ ,  $A_{\text{DAG}}$ , and  $A_{\text{TAG}}$  are the integration peaks of FAME, MAG, DAG and TAG, respectively;  $\text{mm}_{\text{FAME}}$ ,  $\text{mm}_{\text{MAG}}$ ,  $\text{mm}_{\text{DAG}}$ , and  $\text{mm}_{\text{TAG}}$  are the average molecular masses of FAME, MAG, DAG, and TAG, respectively, of rapeseed oil taking into account its fatty acid composition [19].

All reagents used were of analytical grade purity. Hexane, ethanol, methanol, and *t*-butanol utilized were anhydrous. In order to remove residual water present in the rapeseed oil, the sample was heated at 120 °C for 10 min before the production experiments were conducted.

The immobilized lipase (Novozym 435) used was kindly provided by Novozymes Latin America.

## 3. Results and discussion

Kinetics of the enzymatic transesterification reaction of rapeseed oil was measured using either methanol or ethanol as acyl acceptor. Enzymatic activity, carried out with Novozym 435, was evaluated by computing the reduction of area of the TAG peak in the gas chromatogram. As conversion of TAG to DAG is the rate-limiting step in enzymatic production of biodiesel [18], this step was used to determine the rate constant of the overall reaction. Control experiments have been performed in order to evaluate the reproducibility of the reaction system regarding temperature control and agitation velocity. No influence of agitation velocity on the reaction rate constant were observed if the magnetic steering was kept above ~200 rpm (data not shown), suggesting that at such steering speed the reactions' rate were not limited by mass transfer processes. Fig. 1 is a typical chromatogram of FAME obtained after 22 h of enzymatic transesterification of rapeseed oil at 60 °C. The sample was prepared

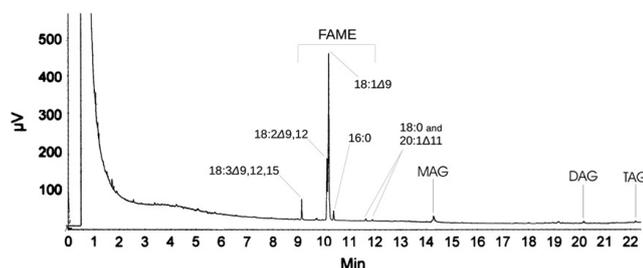


Fig. 1. Gas chromatogram of a typical product of enzymatic production of biodiesel. Samples from methanolysis reaction performed at 60 °C were taken after 22 h of reaction and analyzed as described in Material and methods. Peaks for FAME, MAG, DAG, and TAG are depicted. FAME peaks can be observed for the major FAs present in rapeseed oil. The composition of FAME is in accordance with the FA composition of rapeseed oil [19].

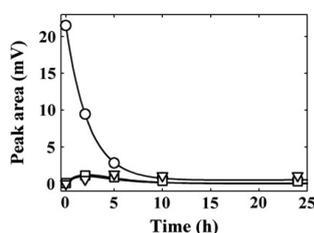


Fig. 2. Kinetics for integrations of TAG, DAG, and MAG peaks. Area of TAG, DAG, and MAG peaks were automatically integrated in each reaction time sample. TAG (circles) consumption follows a single-decay fashion. DAG (squares) and MAG (triangles) cannot be quantitatively measured and, in these experiments, were of concentrations too small to be precisely measured by GC.

as described in Materials and methods. The fatty acid composition of the FAME produced tallies with the fatty acid composition of rapeseed oil: 60.1% oleic acid, 21.5% linoleic acid, 9.9%  $\alpha$ -linolenic acid, 5.1% palmitic acid, 1.7% stearic acid, and 1.4% 11-eicosanoic acid [19]. Yields of biodiesel production were calculated as described in Materials and methods and in a typical FAME production experiment 98% of TAG was seen to have been converted into FAME at 60 °C. Such conversion is similar to the highest conversion yields reported for enzymatic biodiesel production elsewhere [3].

As described by other authors [6–8], no enzymatic FAME or FAEE production was observed in the absence of *t*-butanol. Furthermore, no conversion was observed if immobilized enzyme was not added as well (data not shown).

Fig. 2 shows the integration of the TAG, DAG, and MAG peaks as a function of the reaction time. It was observed that the diminution in the TAG peak was mono-exponential. The transesterification reaction was almost complete at 10 h (94%) and no significant accumulations of DAG and MAG were visible. DAG and MAG are not directly measurable with quantitative precision by GC [20]. However, TAG peak integration quantitatively represents the mass of TAG present in the reaction medium. The rate constant for TAG consumption can,

therefore, be used to measure the rate constant of the whole reaction because it has been shown to be the limiting step for enzymatic transesterification when Novozym 435 is used [18]. In this sense, the diminution of the TAG peak in gas chromatography was used to estimate the kinetics of the transesterification reaction for enzymatic production of biodiesel from rapeseed oil.

Kinetics of the enzymatic production of FAME and FAEE were measured as a function of temperatures in the range between 30 and 60 °C (Fig. 3A and B). Rate constants of transesterification reactions fitted a single-decay equation, suggesting a first-order reaction. Darnoko and Cheryan [21] assert that alkaline (KOH)-catalyzed conversion of TAG into DAG occurs in a second order reaction, while Freedman et al. [22] found that acid-catalyzed transesterification was a pseudo-first-order reaction. Our results suggests that enzymatic conversion occurs in the first (or pseudo-first) order reaction, as is observed in acid catalysis, since all kinetic data curves fitted mono-exponential equations with a high correlation coefficient ( $R > 0.99$ ). Double-order equations were also tried to fit the data, but the regression results did not correlate so well ( $R < 0.7$ ; data not shown). The dependence of the rate constant of enzymatic biodiesel production as a function of temperature was used to calculate the transition energies for this process using the Arrhenius plot (Fig. 3C). The Arrhenius plot correlates the natural logarithm of the rate constant of the reaction [ $\ln(k)$ ] with the inverse of temperature ( $1/T$ ), in Kelvin. Transesterification performed by lipases can be considered as combination of reversible reactions of different reactants/products [16,17]. Considering the reversibility of the enzymatic transesterification and assuming that  $\ln(k)$  changes linearly with  $1/T$ , it is possible to estimate the Gibbs free energy change ( $\Delta G^\ddagger$ ), the enthalpy change ( $\Delta H^\ddagger$ ), and the entropy change ( $\Delta S^\ddagger$ ) of the transition state by use of the Gibbs equations:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (2)$$

and

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln(kh/k_bT) \quad (3)$$

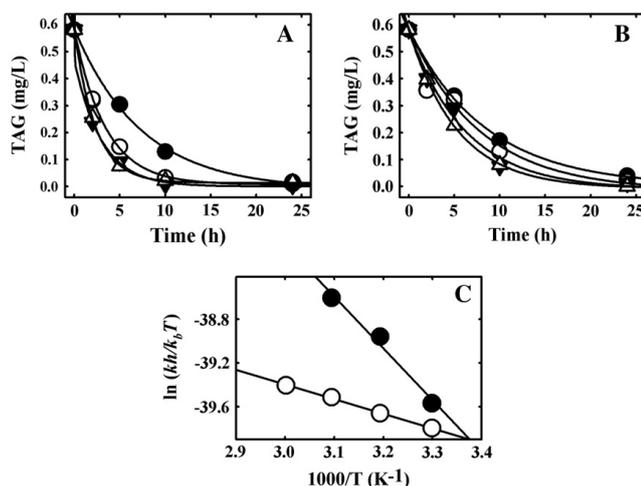


Fig. 3. Kinetics of enzymatic production of biodiesel. Kinetics of the enzymatic production of biodiesel was measured by the consumption of TAG at 30 °C (circles), 40 °C (triangles), 50 °C (diamonds), and 60 °C (squares), using methanol (A) or ethanol (B) as acyl acceptor. Data points were fitted with a single-order equation to calculate the kinetic rate constants of each reaction. Arrhenius analysis was done by plotting  $\ln(k)$  as a function of  $1000/T$  (C), as described in the text. Slopes and intercepts for methanolysis (closed circles) and for ethanolysis (open circles) from the Arrhenius plots were determined by linear regression.

where  $k_b$  is Boltzman's constant and  $h$  is Planck's constant.  $R$  and  $T$  have their usual meanings.

Replacing  $\Delta G^\ddagger$  in Eq. (2):

$$-RT \ln(kh/k_bT) = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (4)$$

and rearranging the equation gives

$$\ln(kh/k_bT) = -(\Delta H^\ddagger/RT) + (\Delta S^\ddagger/R). \quad (5)$$

The Arrhenius plot treats Eq. (5) as a linear regression where  $y = \ln(kh/k_bT)$  and  $x = 1/T$ . In such a case, the slope gives  $-\Delta H^\ddagger/R$ , and the intercept  $\Delta S^\ddagger/R$ .

Fig. 3C shows the Arrhenius plot of enzymatic biodiesel production at temperatures of 30, 40, 50, and 60 °C. From Arrhenius plot, it is possible to confirm that  $\ln(k)$  appears to change linearly with  $1/T$  in the studied temperature range as expected for a single rate-limited thermally activated process [23]. When methanol is used as the acyl acceptor, the enzymatic production of biodiesel displays higher  $\Delta H^\ddagger$  than when ethanol is the acyl acceptor. This is obvious from the higher slope of the methanolysis curve (Fig. 3C, open circles). Such information in isolation would lead to the conclusion that methanolysis transesterification presents higher activation heat than ethanolsis and might take place at a slower pace, especially at low temperatures. In fact, our calculations suggest that, if enzymatic production of biodiesel was carried out at temperatures below 13 °C, the ethanolsis reaction would be kinetically favored over methanolysis. However, in temperatures above 13 °C, methanol is kinetically favored as the acyl acceptor due to differences observed in the entropy change of the activation state ( $\Delta S^\ddagger$ ), given by the intercept of curves in the Arrhenius plot (Fig. 3C). The  $\Delta S^\ddagger$  for methanolysis appeared quite positive at 60 °C, indicating that it is entropically favorable. Fig. 4 displays the energy diagram for reagents and intermediates ( $\ddagger$ ) of enzymatic transesterification at 60 °C. The estimated values for the transition state energies are summarized in Table 1. These results suggest that when methanol is the acyl acceptor, the kinetics of biodiesel production by enzymatic transesterification of rapeseed oil is entropically favored. At high temperatures (above 13 °C), the positive  $T\Delta S^\ddagger$  component of activation Gibbs free energy ( $\Delta G^\ddagger$ ) compensates the difference between the  $\Delta H^\ddagger$  values for methanolysis and ethanolsis. At 60 °C,  $\Delta G^\ddagger$  estimated for methanolysis was 3.4 kJ mol<sup>-1</sup> lower than for ethanolsis (Fig. 4). This difference in

**Table 1**  
Energies changes of the transition state of enzymatic production of biodiesel.

Energy	Acyl acceptor	
	Methanol (kJ mol <sup>-1</sup> )	Ethanol (kJ mol <sup>-1</sup> )
$\Delta H^\ddagger$	139.5	11.1
$T\Delta S^\ddagger$	33.9	-98.0
$\Delta G^\ddagger$	105.6	109

activation free energy is responsible for the faster kinetics of the methanolysis reaction at 60 °C.

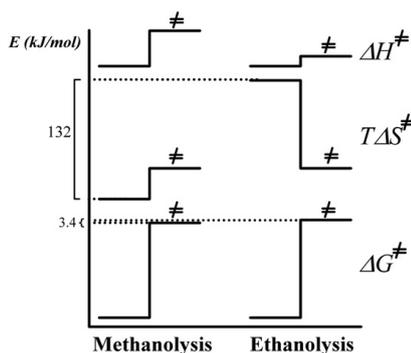
The difference between the standard molar entropies ( $S^0$ ) of methanol and ethanol could account for part of the entropic differences observed.  $S^0$  of methanol is 126.8 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> and of ethanol 160.7 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> [23], which account for a difference of 11.3 kJ mol<sup>-1</sup> at 60 °C between the methanol and ethanol  $T S^0$  components. As shown in Fig. 4, if one assumes that the transition states for methanolysis and ethanolsis reactions have similar  $S^\ddagger$  values, a difference of 132 kJ mol<sup>-1</sup> would be observed between the  $T\Delta S^\ddagger$  values of methanol and ethanol. While we believe that  $S^0$  values of methanol and ethanol could be part of the explanation, other factors might be involved in the entropy compensation of enzymatic methanolysis of biodiesel production. Intuitive conclusions point to a possible lower organization of methanolysis intermediates. Thus, in addition to the explanation based on the  $S^0$  values of methanol and ethanol, our present results might be due also to differences between the bulk solution and/or in the enzyme active site organization when alcohol molecules bind to the enzyme or to the distinct conformational surfaces of lipase molecules when dissolved in methanol rather than when dissolved in ethanol.

Although enzymatic mechanisms of most lipases are well described, they may be significantly distinct for the reaction in biodiesel production for industrial purposes. Most lipases work *in vivo* in the water–micelles interface, while industrial biodiesel production is carried out in oil–alcohol monophasic mixtures, where no micellar systems are present. Inhibition of lipase activity in such media by methanol has been reported when the alcohol/oil molar rate exceeds 1. Strategies used to avoid inhibition include stepwise addition of methanol [10–13] and the use of co-solvents to reduce the superficial tension between oil and methanol [7–9]. Even when co-solvents such as *t*-butanol are used, the oil–alcohol mixture remains homogeneous.

The mechanism of the kinetics of the enzymatic production of biodiesel has not been thoroughly investigated and more studies are required to answer such questions. The mechanism of the enzymatic catalysis for biodiesel production needs to be clearly elucidated to enable the development of more specific lipases for biodiesel production. Such development may involve the selection of new classes of lipases and site-directed mutagenesis strategies in order to find, or design, active sites and protein surfaces with chemical properties more favorable for the transesterification reaction in the industrial production of biodiesel.

#### 4. Conclusions

In this work, kinetic studies on the biodiesel production by enzymatic transesterification of rapeseed oil are presented using immobilized lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) either through methanolysis and ethanolsis. Thermodynamic analysis of the transition states of reaction in several temperature indicate that methanolysis is kinetically favored in relation to ethanolsis due to the positive activation entropy observed in methanolysis reaction. However complete explanations of lipase mechanism on the transesterification reaction demands further studies, the present results might be due to, at least one of the following: (i) partition of methanol molecules from the bulk into the lipase active site generates more molecular disorder in the bulk than by the partition of ethanol



**Fig. 4.** Transition energy changes for the enzymatic production of biodiesel. Changes in the energies of the transition state ( $\ddagger$ ) for enzymatic methanolysis (left) and ethanolsis (right) were estimated from Arrhenius plots.  $\Delta H^\ddagger$ ,  $T\Delta S^\ddagger$ , and  $\Delta G^\ddagger$  were calculated as described in the text. Energy values are shown in Table 1.

molecules; (ii) binding of ethanol to amino acid residues present in the lipase active site must lead to a more ordered cluster of atoms than with methanol binding; and (iii) as acyl acceptor alcohol is one of the solvents present in the reaction media (16% for methanol and 22% for ethanol), the higher polarity of methanol must affect the lipase surface, making the entropy of the complex enzyme-TAG-methanol higher than with enzyme-TAG-ethanol. In any case, the differences observed in  $\Delta S^\ddagger$  values between the methanolysis and ethanolysis reactions may be due to the differences in the bulk solution and/or in the enzyme active site organization when alcohol molecules bind to the enzyme or to the distinct conformational surfaces of lipase molecules when dissolved in methanol rather than when dissolved in ethanol.

#### Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

The authors also thank Novozymes Latin America for the supply of samples.

#### References

- [1] H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, Biodiesel production by transesterification of oils, *J. Biosci. Bioeng.* 5 (2001) 405–416.
- [2] F. Ma, M.A. Hanna, Biodiesel production: a review, *Bioresour. Technol.* 70 (1999) 1–15.
- [3] S.V. Ranganathan, S.L. Narasimham, K. Muthukumar, An overview of enzymatic production of biodiesel, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3975–3981.
- [4] P.V. Lara, E.Y. Park, Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system, *Enzyme Microbiol. Technol.* 34 (2004) 270–277.
- [5] B. Fu, P.T. Vasudevan, Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil, *Energy Fuels* 24 (2010) 4646–4651.
- [6] L. Li, W. Du, D. Liu, L. Wang, Z. Li, Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium, *J. Biomol. Catalys. B: Enzyme* 43 (2006) 58–62.
- [7] D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Lotelli, Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 648–653.
- [8] H.C. Chen, H.Y. Ju, T.T. Wu, Y.C. Liu, C.C. Lee, C. Chang, Y.L. Chung, C.J. Shieh, Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: optimization and enzyme reuse study, *J. Biomed. Biotechnol.* (2011) 1–6, Article ID 950725.
- [9] M. Iso, B. Chem, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 16 (2001) 53–58.
- [10] K.B. Bako, F.C.S. Kova, L. Gubicza, J.K. Hansco, Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 437–439.
- [11] S. Hama, H. Yamaji, T. Fukumizu, T. Numata, S. Tamalampudi, A. Kondo, H. Nodac, H. Fukuda, Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochem. Eng. J.* 34 (2007) 273–278.
- [12] Y. Xu, W. Du, J. Zeng, D. Liu, Conversion of soya bean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent free medium, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004) 45–48.
- [13] A.L. Matassoli, I.N. Correa, M.F. Portilho, C.O. Veloso, M.A. Langone, Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 155 (2009) 347–355.
- [14] W. Du, Y.Y. Xu, J. Zeng, D.H. Liu, Novozym 435-catalysed transesterification of crude soy bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40 (2004) 187–190.
- [15] T. Tan, K. Nie, F. Wang, Production of biodiesel by immobilized *Candida sp* lipase at high water content, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128 (2006) 109–116.
- [16] L. Fjerbaek, K.V. Christensen, B. Norddahl, A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 1298–1315.
- [17] A.L. Paiva, V.M. Balcao, F.X. Malcata, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme Microbiol. Technol.* 27 (2000) 187–204.
- [18] A. Turkan, S. Kalay, Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 34–44.
- [19] V. Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier, Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 710–732.
- [20] C. Plank, J. Lorbeer, Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 461–468.
- [21] D. Darmoko, M. Cheryan, Kinetics of Palm Oil Transesterification in a Batch Reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 1263–1267.
- [22] B. Freedman, R.O. Butterfield, E.H. Pryde, Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63 (1986) 1375–1380.
- [23] P.W. Atkins, J. dePaula, *Physical chemistry for the life science*, first ed. Oxford Univ Press, Oxford UK, 2006.

## **ANEXO B – Patente 3: “PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES POR CATÁLISE POR LIPASE EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE”**

1/11

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATÁLISADO POR LIPASE EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES”

### 5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se relaciona com o campo da síntese de biocombustível, mais particularmente com um novo processo para produção rápida de biodiesel a partir de ácidos graxos livres na presença de catálise por lipase em um sistema de reação sem solventes orgânicos adicionais.

10

### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A escassez de combustíveis fósseis e os danos climáticos causados pelo aumento da emissão de dióxido de carbono na atmosfera têm trazido à tona a necessidade urgente de desenvolvimento de formas mais limpas e renováveis de produção de energia. Entre elas, a bioenergia proveniente de etanol e, recentemente, biodiesel, têm se mostrado como alternativas mais viáveis para a substituição aos combustíveis fósseis. O programa brasileiro Pro-álcool, bem estabelecido em suas bases tecnológicas, é um dos modelos mais bem sucedidos do mundo. O biodiesel, no entanto, padece ainda no Brasil de escassez de matéria-prima que sustente as previsões de produção para satisfazer a Lei 11.097/2005 que prevê a adição obrigatória de biodiesel ao diesel de petróleo na proporção de 3% (B3) e de 5% após 2013 (B5). A obrigatoriedade de adição de 5% de biodiesel ao diesel foi antecipada pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) para janeiro de 2010 (ANP, 2010). Hoje, a metanólise com catálise homogênea alcalina é o processo de

produção que domina o mercado. No entanto, é consenso na comunidade científica que a produção por catálise heterogênea traz benefícios em relação à homocatálise e, entre esta, a catálise enzimática se destaca como meio potencialmente mais eficiente e limpo de produção de biodiesel.

5           O biodiesel é obtido a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos por álcoois de cadeia curta (Iso e cols., 2001). Essa reação é normalmente realizada com óleos vegetais, metanol ou etanol, sob aquecimento e em presença de um catalisador (Mittelbach, 1990). Os principais produtos da reação de transesterificação são os ésteres de ácidos graxos e glicerol, que posteriormente devem ser retirados por decantação para  
10   obtenção do biodiesel (Fukuda e cols., 2001; Kose e cols., 2002). Para a reação de transesterificação por catálise química, os processos mais utilizados na produção de biodiesel, inclusive em escala industrial, são a catálise ácida e a básica. Na catálise ácida é preferencialmente utilizado o ácido sulfônico ou sulfúrico, com rendimento acima de 96% levando cerca de 8h para alcançar um valor assintótico. A reação deve se  
15   proceder em temperaturas acima de 100°C e é considerada lenta. Na catálise básica são utilizados alcoóxidos (metóxido de sódio e etóxido de sódio) ou hidróxidos de metais alcalinos (KOH e NaOH), assim com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Nas reações catalisadas por metóxido de sódio o rendimento é elevado e tempo de reação é de aproximadamente 30 minutos (Sheeham e cols., 1998). A utilização de KOH e NaOH com os catalisadores  
20   apresenta o inconveniente de produzir água durante a reação, o que leva à ocorrência de hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos graxos livres. A presença de sais de ácidos graxos dificulta a recuperação do glicerol devido à formação de emulsões. Com o uso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  esse problema é minimizado, embora o rendimento da reação seja inferior ao da catálise básica. Os sais de carbonato formam

bicarbonato durante a reação ao invés de água, o que diminui a hidrólise dos ésteres e, conseqüentemente, a formação de emulsões (Ma e Hanna 1999; Fukuda e cols., 2001).

As lipases (classificação bioquímica EC 3.1.1.3) são as enzimas do tipo carboxilesterase, que catalisam a hidrólise e síntese de acilgliceróis em ácidos graxos de cadeia longa, utilizando trioleilglicerol com o substrato quando em meio aquoso (Sharma e cols., 2001; Jaeger e Eggert, 2002), e também realizam processos de síntese de ésteres em solventes orgânicos (Zaks e Klibanov, 1984; Ueda e cols., 2002), embora alguns solventes possam afetar as propriedades da enzima por promover alterações na sua estrutura tridimensional comprometendo sua atividade. A utilização das lipases na produção de biodiesel é relativamente recente (Theil, 1995), porém tem-se mostrado muito promissora devido a uma série de vantagens sobre os catalisadores químicos, apresentando rendimento superior aos mesmos (mais de 98 % na produção), uso de condições brandas no processo, maior especificidade (sintetiza especificamente ésteres alquílicos), permite a recuperação de forma mais simples do glicerol, a transesterificação de glicerídeos com alto conteúdo de ácidos graxos e a transesterificação total dos ácidos graxos livres (Verger, 1997, Schuchardt e cols., 1998; Haas e cols., 2002). No entanto com a tecnologia atualmente utilizada para biocatálise ainda não se conseguiu condições ótimas que permitam a sua realização em escala industrial principalmente devido ao longo tempo de reação envolvido, sendo este entre 10 e 20 horas

Entre as vantagens da utilização das enzimas como catalisadores para a produção de biodiesel, podemos ressaltar as condições reacionais suaves, as emissões menos tóxicas e as reações catalisadas por enzimas não são afetadas pelos ácidos graxos livres e pela pequena quantidade de água presente no meio de reação. Portanto, a

biocatálise é consistente com a exigência do desenvolvimento da química Verde, a assim têm atraído mais e mais atenção.

Entre as desvantagens apontadas pela síntese de biodiesel por catálise enzimática estão a baixa solubilidade dos álcoois de cadeia curta, como etanol e metanol, na matéria-prima do óleo vegetal (triacilglicerol). Além disso, o excesso de álcool pode produzir um efeito tóxico na enzima, causando a inativação da mesma. Portanto, durante o processo de produção de biodiesel por catálise enzimática, é geralmente adotada uma das seguintes estratégias:

1. Adição paulatina do álcool em diversas etapas reacionais, evitando assim o excesso de álcool tóxico à enzima.
2. Uso de co-solvente com polaridades intermediárias entre o álcool de cadeia curta e o óleo que possam aumentar a solubilidade do referido álcool na matéria prima do óleo vegetal.

Ambas soluções requerem processos complicados e/ou adição de cofatores que aumentam o custo e complicação dos processos descritos. Adicionalmente, mesmo evitando a intoxicação da enzima pelo álcoois, os tempos de reação requeridos para que estes processos ocorram são da ordem de, pelo menos, dez a vinte horas, fazendo com que os mesmos sejam inviáveis para uso em escala de produção.

#### TÉCNICA RELACIONADA

A patente de número **CN 101381614 (A)** e título *Technique for preparing biodiesel by catalyzing oil using recovery of non-immobilized lipase* mostra o processo de síntese de biodiesel com lipase não imobilizada tendo as vantagens de reduzir a perda da lipases não imobilizada usada para a síntese de biodiesel podendo reutilizar a mesma,

5/11

no entanto apresenta a desvantagem de possuir tempo de reação entre 5 e 15 horas sendo muito elevado, tendo ainda a desvantagem adicional de necessitar de centrifugar o produto final para remover as impurezas.

A patente de número **WO 2005075615 (A1)** e título *A new process for producing biodiesel from oils and fats catalyzed by lipase in organic medium reaction system* mostra o processo de produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras catalisada por lipase em sistema de reação em meio orgânico tendo as vantagens de o meio da reação ser constituído por solvente orgânico para que não haja efeitos negativos do álcool sob a lipase prolongando o uso da lipase e encurtando o tempo da reação, no entanto apresenta a desvantagem de o rendimento de biodiesel ser de até 94%, tendo ainda a desvantagem adicional da presença de solventes orgânicos que encarece a produção enzimática de biodiesel e há maiores riscos de explosão, aumento do reator para acomodar solventes e reagentes e a necessidade de remoção do solvente por destilação ou extração, causando de maior gasto energético.

A patente de número **CN 101353587 (A)** e título *Method for improving lipase-catalyzed production biodiesel production rate* mostra o processo de melhorar a taxa de produção de biodiesel catalisado e produzido por lipase, pela adição Ectoína, em sistema de reação que lipase catalisa óleo da semente por alcoólise tendo a vantagem de possuir solvente orgânico hidrofílico Ectoína com o objetivo de impedir os efeitos negativos do álcool na enzima, no entanto apresenta as desvantagens da necessidade da presença do solvente orgânico.

A patente de número **CN 101085927 (A)** e título *Method for catalytically synthesizing biological diesel oil by lipase* mostra o processo de síntese de biodiesel usando lipase tendo a vantagem de produzir biodiesel usando lipase, sem uso de

6/11

solventes orgânicos, no entanto apresenta as desvantagens da adição de metanol ser em etapas e o tempo de cada etapa estar em torno de 6 a 10h.

A patente de número **WO2006050589 (A1)** e título *Biodiesel production from soapstock* mostra o processo para produção de ésteres de ácido graxo diretamente de qualquer matéria-prima de sabão gerada no processo de refino de álcali, tendo as vantagens de usar matéria-prima de sabão gerada no processo de refino de álcali, no entanto apresenta a desvantagem da duração da produção ser em torno de 3 a 5 dias, tendo ainda a desvantagem adicional de necessitar de purificação do produto final e rendimento máximo de biodiesel entre 80 a 90%.

10 A patente de número **WO2008009772 (A1)** e título *Method for producing biodiesel using porcine pancreatic lipase as na enzymatic biocatalyst* mostra o processo para a produção de biodiesel, tendo as vantagens produzir biodiesel com lipase pancreática e utilizar óleo puro ou usado, no entanto apresenta a desvantagem do tempo da produção em torno de 8 a 72 horas, tendo ainda a desvantagem adicional de necessitar de colocar base alcalina para manter o ph da lipase.

15 A patente de número **WO2008092207 (A1)** e título *Biodiesel production* mostra o processo para a produção de ésteres de ácidos graxos para uso como combustíveis e/ou lubrificantes, tendo as vantagens de tratar as matérias-prima contendo triglicerídeos e/ou ácidos graxos livres com a lipase, no entanto apresenta a desvantagem de necessitar da presença de um catalisador ácido.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Portanto, o objetivo da presente invenção é prover um novo processo para a produção de biodiesel através de catálise por lipase em sistema de reação que não

7/11

requeira adição paulatina de reagentes tampouco adições de co-solventes ou coadjuvantes no meio de reação. Neste processo, é utilizado álcool de cadeia curta ROH, como receptor de acila e a matéria-prima de ácidos graxos livres provenientes de fontes vegetais. A solubilidade dos álcoois utilizados, principalmente do etanol, nos ácidos graxos livres impedem que o excesso deste álcool intoxique a lipase logo não causa diminuição da atividade da enzima. Como consequência da combinação adequada de matérias-primas para a produção, o processo pode ser completo em até 40 minutos, sendo mais viável do que os processos até então demonstrados.

A matéria-prima de ácidos graxos livres pode ser ácidos graxos purificados ou matéria-prima bruta proveniente do refino de óleos vegetais, sem necessidade de tratamentos adicionais. Preferencialmente com teor de triacilgliceróis abaixo de 1%.

O álcool de cadeia curta pode ser tanto hidratado quanto anidro, sendo preferencialmente anidro quando o objetivo for o melhoramento da cinética da reação ou preferencialmente hidratado quando o objetivo for diminuir os custos do processo.

O processo da presente invenção é caracterizado pelo fato de que um álcool de cadeia curta pode ser anidro ou hidratado com até 5% v/v de água, na proporção molar de 2:1 a 10:1, uma matéria prima consistindo de ácidos graxos livres de origem vegetal, e de 1% a 15%, em relação ao volume total de reação, de uma lipase imobilizada. A mistura é aquecida a temperatura entre 30 a 70°C e agitada constantemente para reagir por 40 minutos a 5 horas para converter a matéria-prima de ácido graxo livre em biodiesel pela reação de esterificação. O processo da presente invenção traz como vantagem o fato de atingir a completude da reação em menos de uma hora e não requer adição de nenhum adjuvante, cofator ou co-solvente.

### MELHOR MODO DA INVENÇÃO

No processo de acordo com a presente invenção, a matéria-prima de ácidos graxos com conteúdo de triacilgliceróis preferivelmente abaixo de 1% obtido da destilação ou refino de óleos vegetais, preferencialmente óleo de dendê (palma) ou soja.

5 O referido álcool de cadeia curta é preferencialmente etanol, sendo mais preferencialmente ainda etanol anidro quando se tem como ideal o tempo de reação. O referido álcool de cadeia curta é preferencialmente o etanol, mais preferencialmente ainda etanol hidratado (95% v/v) quando se tem como ideal reduzir o custo da matéria prima.

10 A referida lipase é preferencialmente uma lipase produzida por microorganismo, sendo mais preferencialmente NOVOZYM 435. Sendo, preferencialmente utilizada a 5% (p/v) em relação ao volume total do meio de reação.

A temperatura do processo é preferivelmente entre 50°C e 70°C sendo o frasco de reação mantido em contato com a pressão atmosférica através de um condensador de refluxo. Em uma reação típica efetuada nas condições ideais a conversão de ácidos graxos em biodiesel se mostrou acima de 94%.

As vantagens do processo da presente invenção compreendem o aperfeiçoamento da reatividade e o prolongamento da vida útil da lipase com aumento da velocidade de conversão da matéria-prima em biodiesel. A utilização de uma matéria prima de ácidos graxos purificados ou bruto proveniente do refino de óleos vegetais. Não há necessidade de adição de co-solventes ou coadjuvantes no meio da reação, diminuindo os custos operacionais. Esse novo sistema reduz a influência negativa dos álcoois de cadeia curta, principalmente do etanol, na lipase pois o mesmo é bem solúvel nos ácidos graxos livres, dispensando a utilização de co-solventes e abolindo o efeito

9/11

selante que os álcoois de cadeia curta apresentam na presença de matérias-primas de triacilglicerol. O tempo da reação curto é uma vantagem sobre os outros processos já patenteados que dura em torno de 40 minutos a 5 horas.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos:

5

Exemplo 1:

Em um balão de reação de três bocas foram adicionados ácido oléico PA e etanol anidro na razão molar de 5:1 (8,95 g de ácido oléico e 7,35 g de etanol). O balão foi acoplado a um condensador de refluxo refrigerado a água e submerso em um banho 10 termostaticado de óleo de silicone a 60°C. Uma barra magnética de teflon foi introduzida no balão e o sistema foi montado sobre uma placa de aquecimento e agitação magnética. Um termômetro digital foi acoplado ao balão para controle da temperatura. Após o meio de reação atingir a temperatura de 60 °C, a lipase NOVOZYM 435 foi adicionada na razão de 5% (0,965 g) em relação ao volume total 15 de meio de reação. A reação prosseguiu por 5 horas.

Exemplo 2:

Em um balão de reação de três bocas foram adicionados ácido graxo bruto oriundo do refino por destilação de óleo de palma e etanol anidro na razão molar de 5:1 20 (8,73 g de ácido graxo bruto e 7,35 g mL de etanol). O balão foi acoplado a um condensador de refluxo refrigerado a água e submerso em um banho termostaticado de óleo de silicone a 60°C. Uma barra magnética de teflon foi introduzida no balão e o sistema foi montado sobre uma placa de aquecimento e agitação magnética. Um termômetro digital foi acoplado ao balão para controle da temperatura. Após o meio de

reação atingir a temperatura de 60 °C, a lipase NOVOZYM 435 foi adicionada na razão de 5% (0,965 g) em relação ao volume total de meio de reação. A reação prosseguiu por 5 horas.

5 Exemplo 3:

Em um reator Tecbio-1,5 da Tecnal foram adicionados ácido graxo bruto oriundo do refino por destilação de óleo de palma e etanol anidro na razão molar de 5:1 (316,8 g de ácido graxo bruto e 266,5 de etanol) com condensador de refluxo. O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C e agitação de 400 RPM. NOVOZYM 435 foi  
10 adicionada na proporção de 5% (35,18 g) em relação ao volume total do meio de reação. A reação seguiu por duas horas. O etanol residual foi retirado do meio de reação por lavagem do biodiesel duas vezes com 20% do volume de água destilada.

Exemplo 4:

15 Em um reator Tecbio-1,5 da Tecnal foram adicionados ácido graxo bruto oriundo do refino por destilação de óleo de palma e etanol hidratado (95%) na razão molar de 5:1 (316,8 g de ácido graxo bruto e 283,4 g de etanol) com condensador de refluxo. O reator foi equilibrado a temperatura de 60 °C e agitação de 400 RPM. NOVOZYM 435 foi adicionada na proporção de 5% (35,18 g) em relação ao volume  
20 total do meio de reação. A reação seguiu por duas horas. O etanol residual foi retirado do meio de reação por lavagem do biodiesel duas vezes com 20% do volume de água destilada.

Exemplo 5:

A lipase utilizada no Exemplo 4 foi filtrada e reutilizada nas mesmas condições em um segundo lote, tendo resultado em uma produção foi semelhante ao observado no exemplo 4. A lipase foi então filtrada novamente e lavada 3 vezes com etanol anidro, com conseguinte filtração, para retirada da matéria-prima adsorvida. Novamente, a lipase lavada foi utilizada em uma reação com as mesmas condições que o exemplo 4, tendo resultado em uma produção semelhante ao exemplo 4.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS:

Afim de melhor demonstrar o alcance da invenção, são apresentadas a seguir diversas figuras ilustrativas do processo envolvido na presente invenção:

Figura 1: Cromatografia de camada delgada mostrando a produção de biodiesel a partir de ácido oléico por catálise por lipase utilizando etanol (Painel A) ou metanol (Painel B) como acceptor de acila.

Figura 2: Efeito da relação molar etanol: ácido graxo na produção de biodiesel a partir de matéria-prima de ácidos graxos brutos de palma por catálise por lipase.

Figura 3: Efeito da concentração de lipase na velocidade de produção de biodiesel a partir de ácidos graxos brutos de palma por catálise por lipase.

Figura 4: Produção de biodiesel na forma de etilésteres de ácidos graxos (EEAG) a partir de ácidos graxos brutos de palma por catálise por lipase.

### REIVINDICAÇÕES

1.                   PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE  
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE em um sistema livre  
de co-solventes ou adjuvantes, onde o receptor de acila é um álcool de cadeia curta  
5                   ROH que não inativa a enzima, e uma matéria-prima de ácidos graxos livres, sendo  
catalisada por lipase para a produção de biodiesel, por meio de uma reação de  
esterificação, caracterizado por serem adicionados em um reator enzimático e  
misturados de maneira homogênea, o álcool de cadeia curta, a matéria prima de  
ácidos graxos livres com uma razão molar álcool/ácido graxo livre de 2:1 a 10:1 e a  
10                   lipase na concentração entre 1% a 15%, a mistura ser aquecida entre 30°C a 70°C,  
para reagir completamente entre 10 minutos a 5 horas para converter a matéria  
prima de ácidos graxos livres em biodiesel.
2.                   PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE  
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a  
15                   reivindicação 1, caracterizado por o ácido graxo livre ser oriundo do refino de óleos  
vegetais, extraído de óleos e gorduras residuais e/ou extraído de espuma de esgoto.
3.                   PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE  
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a  
reivindicação 2, caracterizado por o referido ácido graxo livre ser oriundo do refino  
20                   de óleos vegetais que compreende óleo de palma (dendê) e soja.
4.                   PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE  
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a  
reivindicação 1, caracterizado por o receptor de acila ser um álcool de cadeia curta

2/3

ROH, onde R é um grupo alquila contendo de 1 a 5 átomos de carbono, com razão molar álcool/ácido graxo livre de 2:1 a 10:1.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o referido álcool de cadeia curta ROH ser selecionado a partir do grupo que consiste de metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol.
6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizado por o álcool de cadeia curta ROH ser anidro ou hidratado com até 20% (v/v) de água.
7. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a lipase ser de origem microbiana.
- 15 8. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a referida lipase produzida por microorganismo compreende Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435, e suas misturas.
9. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE 20 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por não necessitar da adição de co-solventes ou adjuvantes da reação.
10. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE, de acordo com as

3/3

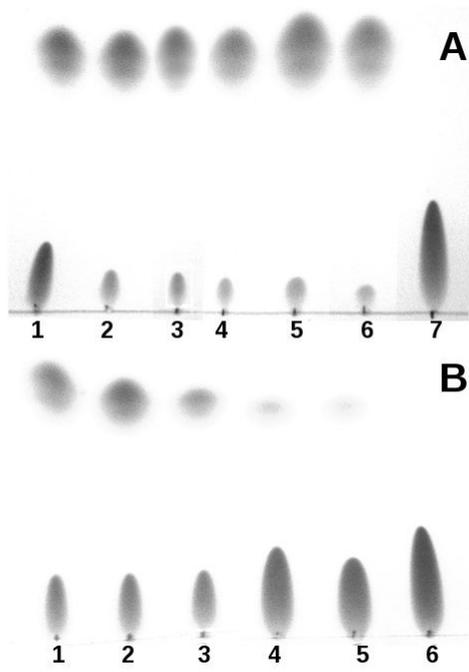
reivindicação 1, caracterizado por não necessitar de adição paulatina ou múltiplos passos de adição do álcool.

11.                   PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DE  
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATALISADO POR LIPASE caracterizado por o  
5                   produto de reação ser lavado com água para remoção do álcool e dos ácidos graxos  
residuais não reagidos.

1/4

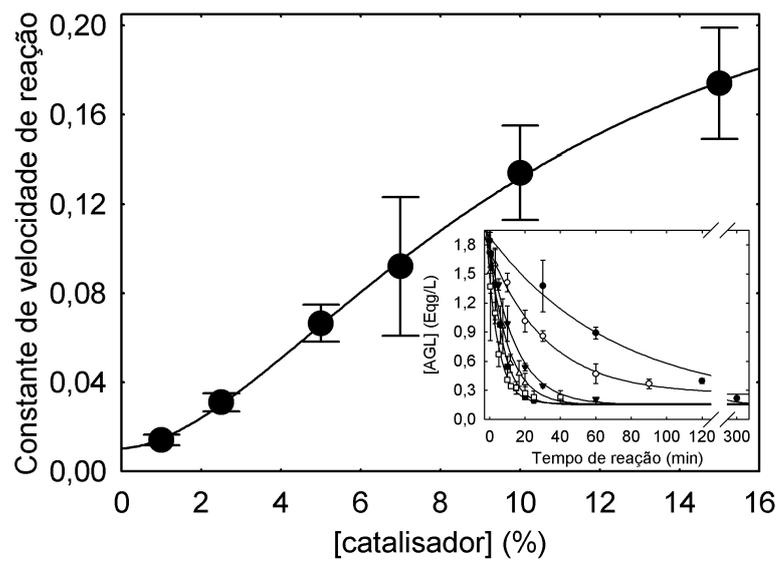
**FIGURAS**

FIGURA 1:



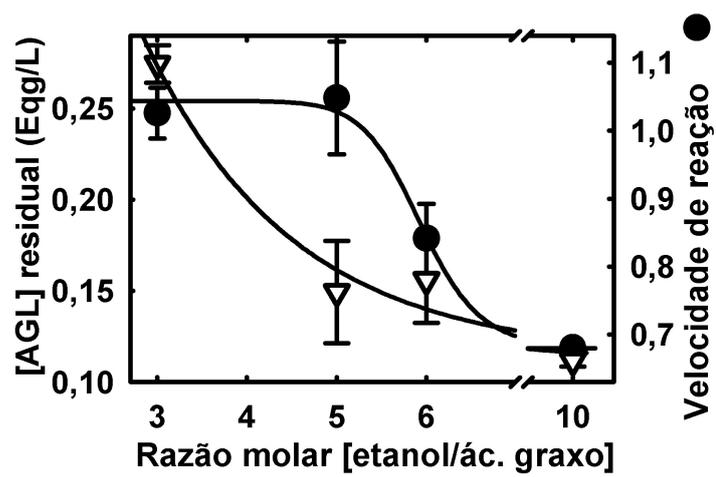
2/4

FIGURA 2:



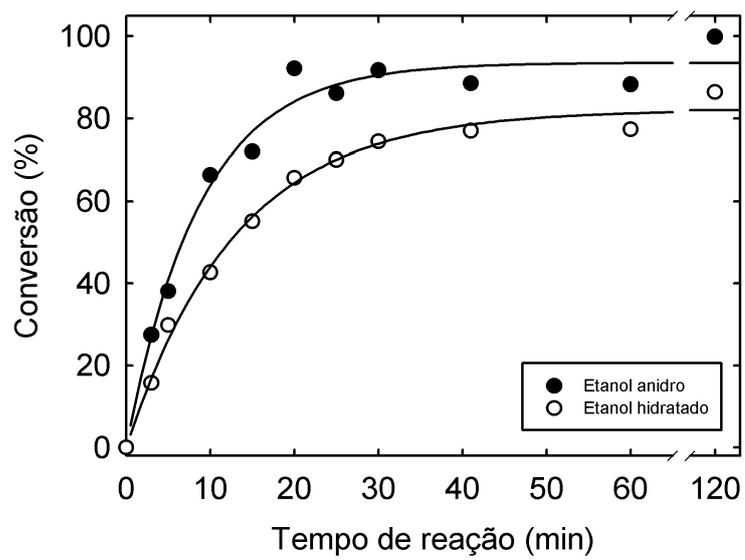
3/4

FIGURA 3:



4/4

FIGURA 4:



1/1

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES CATÁLISADO POR LIPASE EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES”

5

RESUMO

A presente invenção se relaciona com o campo da síntese de biocombustível, mais particularmente com um novo processo para produção rápida de biodiesel a partir da reação de esterificação de ácidos graxos livres e um álcool de cadeia curta na presença de catálise por lipase em um sistema de reação sem solventes orgânicos 10adicionais. A invenção traz como vantagem a abolição da inibição da lipase pelo álcool de cadeia curta normalmente observada em reações de produção de biodiesel por catálise enzimática. Utilizando o processo relacionado na invenção, pode-se produzir biodiesel a partir de ácidos graxos livres oriundos do refino de óleos vegetais por catálise por lipases sem adição de co-solventes em um tempo de reação de até 40 15minutos.

