

PEMBUATAN MATRIKS KARBOKSIMETIL KITOSAN UNTUK AMOBILISASI ENZIM LIPASE

Anita Herawati Permana*, Eva Yuliana

Program Studi Penjaminan Mutu Industri Pangan, Politeknik AKA Bogor
Jl. Pangeran Sogiri No.283, Tanah Baru, Bogor Utara, Kota Bogor, Jawa Barat 16154

Email: anitahera@kemenperin.go.id

(Received : 1 Juni 2020; Accepted: 30 Juni 2020; Published: 1 Juli 2020)

Abstrak

Kebutuhan akan biokatalis dengan stabilitas tinggi telah mendorong penelitian mengenai metode untuk meningkatkan kinerja biokatalis. Amobilisasi enzim secara kovalen telah dilaporkan dapat menstabilkan enzim selama proses katalisis. Kitosan banyak digunakan sebagai matriks untuk imobilisasi kovalen. Dalam penelitian ini, kitosan dimodifikasi menjadi karboksimetil kitosan untuk meningkatkan mobilitas enzim. Spektra FTIR dari matriks yang dimodifikasi menunjukkan adanya serapan asam karboksilat pada 1724 cm^{-1} , yang menunjukkan bahwa kitosan telah berhasil dimodifikasi menjadi karboksimetil kitosan. Ikatan enzim ke matriks terbentuk melalui gugus asam karboksilat, ditunjukkan oleh pergeseran serapan dari 1724 cm^{-1} (asam karboksilat) menjadi 1651 cm^{-1} (amida). Imobilisasi lipase dalam pelarut isopropanol menunjukkan kapasitas pengikatan yang tinggi, dengan 98% enzim terikat pada matriks. Akan tetapi, aktivitas enzim imobilisasi yang tersisa sebesar 9,08% dibandingkan dengan enzim bebas.

Kata kunci : kitosan; karboksimetil kitosan; amobilisasi; lipase

Abstract

The requirement of a high stability biocatalyst has encouraged the research on methods to increase the biocatalyst performance. Enzyme immobilization through covalent binding has been reported to stabilize the enzyme during the catalytic processes. Chitosan is widely used as matrices for covalent immobilization. In this research, chitosan was modified into carboxymethyl chitosan to increase enzyme mobility. FTIR spectra of the modified matrices showed a carboxylic acid peak at 1724 cm^{-1} , thus suggested that chitosan was successfully modified into carboxymethyl chitosan. Enzyme linkage to the matrices was formed through the carboxylic acid group, indicated by a peak shift from 1724 cm^{-1} (carboxylic acid) to 1651 cm^{-1} (amide). Lipase immobilization in isopropanol solvent showed high binding capacity since 98% of enzyme was linked to matrices. However, the remained activity of immobilized enzyme was only 9,08% compared to the free enzyme.

Keywords : chitosan; carboxymethyl chitosan; immobilization; lipase

PENDAHULUAN

Amobilisasi merupakan suatu teknik pengikatan atau penjebakan enzim pada suatu matriks sehingga pergerakan enzim menjadi terbatas (Jeganathan *et al.*, 2008). Amobilisasi dilakukan untuk meningkatkan performa enzim sebagai biokatalis. Enzim amobil mampu mengkatalisis reaksi menghasilkan produk, dengan proses pemisahan produk akhir yang lebih mudah karena komponen katalisnya tetap terikat pada matriks. Dengan kondisinya yang terikat matriks, enzim amobil dapat digunakan secara berulang untuk mengkatalisis reaksi. Enzim amobil juga memiliki rentang ketahanan pelarut yang lebih tinggi dibandingkan dengan enzim bebasnya.

Penelitian mengenai amobilisasi enzim masih terus dieksplorasi untuk memperoleh hasil yang lebih baik. Berdasarkan jenis interaksi enzim-matriks, teknik amobilisasi enzim dapat dikelompokkan ke

dalam metode interaksi kimia dan interaksi fisik. Metode interaksi kimia meliputi adsorpsi, interaksi ionik, dan ikatan kovalen. Adapun metode interaksi fisik meliputi penjebakan dan enkapsulasi. Jenis interaksi yang memberikan hasil pengikatan yang lebih kuat terjadi pada proses amobilisasi secara kovalen, karena enzim terikat secara permanen terhadap matriks (Tan *et al.*, 2010).

Amobilisasi enzim secara kovalen telah dilaporkan berhasil pada beberapa matriks seperti *poly (gamma-glutamic acid)*, *insoluble yeast betaglucan*, *Nylon-6*, dan silika. Akan tetapi, enzim amobil yang diperoleh menunjukkan pengurangan aktifitas enzim yang cukup signifikan (Peng, 2014). Pemilihan matriks merupakan salah satu faktor penting dalam perancangan sistem amobilisasi. Salah satu kandidat matriks yang potensial digunakan

adalah jenis polimer alami dari golongan polisakarida, yaitu kitosan. Kitosan merupakan produk hasil deasetilasi kitin, dengan keberadaan gugus hidroksi dan gugus amina yang dapat dimanfaatkan sebagai sisi pengikatan. Kitosan tidak bersifat racun dan dapat didegradasi secara biologis (Dutta *et al.*, 2004). Dalam tulisan ini, matriks kitosan yang digunakan terlebih dahulu dimodifikasi dengan dengan penambahan gugus karboksimetil. Penambahan gugus tersebut berfungsi sebagai spacer yang memberi jarak antara permukaan matriks dengan enzim. Dengan demikian, enzim amobil yang terikat ke matriks memiliki daya jangkauan dan ruang gerak yang lebih luas.

BAHAN DAN METODE

Kitosan yang digunakan sebagai prekursor merupakan kitosan massa molekular tinggi (*Acros Organics*), yang dimodifikasi dengan penambahan NaOH dan asam monokloroasetat. Pelarut organik yang digunakan dalam proses modifikasi matriks dan amobilisasi enzim meliputi isopropanol, etanol, dan kloroform. Larutan HCl pekat digunakan dalam proses pengasaman, dengan indikator pH Acilit (*Merck*) digunakan untuk pemantauan nilai pH. Enzim yang digunakan untuk amobilisasi merupakan enzim lipase rekombinan dari isolat *Geobacillus thermoleovorans* PPD2, yang diperoleh dari Grup Riset Termofilik dan Termostabil Enzim, Kelompok Keahlian Biokimia ITB. Penentuan kadar protein bebas dan terikat menggunakan *Bradford reagen kit* (*Thermo Scientific*), dengan *Bovine Serum Albumine* (*Thermo Scientific*) sebagai standar. Pengujian aktivitas hidrolisis lipase menggunakan p-nitrofenol (*Sigma*) sebagai standar dan p-nitrofenil dekanat (*Sigma*) sebagai substrat.

Sintesis matriks karboksimetil kitosan

Karboksimetil kitosan (KMK) disintesis menggunakan metode Chen dan Park (2003) dengan modifikasi. Sebanyak 5 gram kitosan dicampurkan dengan 6,75 gram NaOH dalam 50 mL isopropanol:air 4:1. Campuran direfluks dalam penangas air (50 °C, 100 rpm) hingga partikel kitosan mengembang. Sebanyak 7,5 gram asam monokloroasetat dilarutkan dalam 10 mL isopropanol, dan ditambahkan tetes demi tetes ke dalam campuran kitosan-NaOH. Campuran kitosan-asam monokloroasetat direaksikan dalam penangas air selama empat jam (50 °C, 100 rpm). Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 mL etanol 70%. Campuran akhir disaring menggunakan penyaring Buchner dan dibilas dengan etanol 70%.

Sebanyak 1 gram padatan dari pengerjaan sebelumnya disuspensikan dalam 100 mL etanol 70%. Suspensi diasamkan dengan penambahan HCl pekat, kemudian diinkubasi selama 30 menit di suhu ruang dengan kecepatan pengadukan 150 rpm. Pengecekan keasaman dilakukan secara berkala menggunakan indikator *Acilit*, dengan pH suspensi

dipastikan berada di kisaran pH 3. Suspensi kemudian disaring menggunakan penyaring Buchner. Karakterisasi KMK dilakukan dengan analisis FTIR.

Amobilisasi enzim lipase pada matriks

KMK hasil sintesis digunakan sebagai matriks amobilisasi untuk enzim lipase. Padatan enzim sebanyak 1 mg terlebih dahulu dilarutkan dalam 1 mL bufer K-fosfat 50 mM pH 8, untuk memperluas area kontak enzim dengan matriks. Dalam tabung terpisah, sebanyak 10 mg KMK disuspensikan dalam 2 mL pelarut (isopropanol atau kloroform). Ke dalam suspensi KMK kemudian ditambahkan larutan enzim. Campuran matriks-enzim diaduk pada 20 °C selama 12 jam. Setelah reaksi berakhir, larutan disentrifugasi pada $3800 \times g$ selama 30 menit. Enzim terikat matriks terdapat di bagian pelet, yang selanjutnya dibilas dengan 3×5 mL bufer K-fosfat 50 mM pH 8 dan disimpan pada suhu 4 °C. Supernatan dipisahkan dan disimpan pada suhu 4 °C untuk pengujian lebih lanjut.

Penentuan kapasitas pengikatan matriks

Kadar protein terikat matriks ditentukan melalui pengujian tidak langsung pada supernatan. Supernatan diuji kadar proteinnya menggunakan metode *Bradford*, yang dapat mendeteksi protein dalam kisaran μgram . Sebanyak 500 μL sampel direaksikan dengan 500 μL reagen *Bradford kit* pada suhu ruang. Reaksi dibiarkan berlangsung selama sepuluh menit. Produk hasil reaksi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi sampel kemudian dibandingkan dengan kurva standar Bovine Serum Albumin (*Bradford, 1976*). Kadar protein terikat matriks ditentukan dari selisih enzim mula-mula dengan enzim yang terukur di supernatan.

Penentuan aktivitas enzim amobil

Aktivitas hidrolisis enzim lipase ditentukan menggunakan metode yang dilakukan oleh Lee *et al.* (1999) dengan beberapa modifikasi. Campuran substrat dibuat dengan mencampurkan larutan substrat p-nitrofenil dekanat 10 mM (dalam asetonitril), etanol, dan bufer glisin-NaOH 50 mM pH 9 dengan perbandingan 1:4:95 (Lee *et al.*, 1999). Campuran substrat dibuat segar sebelum dilakukan uji aktivitas. Sebanyak 90 μL campuran substrat ditempatkan dalam tabung mikro dan diinkubasi selama 30 detik. Kedalam tabung mikro ditambahkan 1 mg enzim amobil kemudian campuran akhir diinkubasi selama 90 detik. Reaksi dihentikan dengan inkubasi campuran enzim-substrat dalam es. Uji aktivitas dilakukan pada 50 °C dan pH 9. Produk hasil reaksi diukur pada panjang gelombang 405 nm. Sebagai kontrol digunakan pengukuran terhadap campuran substrat tanpa penambahan enzim. Selisih dari absorbansi sampel dengan kontrol kemudian dibandingkan dengan kurva standar p-nitrofenol untuk menentukan aktivitas enzim.

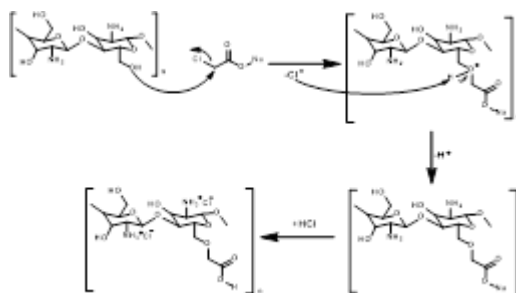
HASIL DAN PEMBAHASAN
Matriks Karboksimetil Kitosan

Sintesis karboksimetil kitosan (KMK), dilakukan melalui pembentukan produk Na-karboksimetil kitosan (Na-KMK) yang selanjutnya diasamkan untuk membentuk produk KMK (Gambar 1). Analisis FTIR terhadap prekursor kitosan yang digunakan menunjukkan adanya serapan khas di bilangan gelombang 3353 cm^{-1} (vibrasi ulur O-H), 2871 cm^{-1} (vibrasi ulur C-H), 1589 cm^{-1} (vibrasi tekuk -NH dari -NH₂), dan 1024 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O).



Gambar 1. [a] Kitosan, [b] Na-karboksimetil kitosan, [c] karboksimetil kitosan

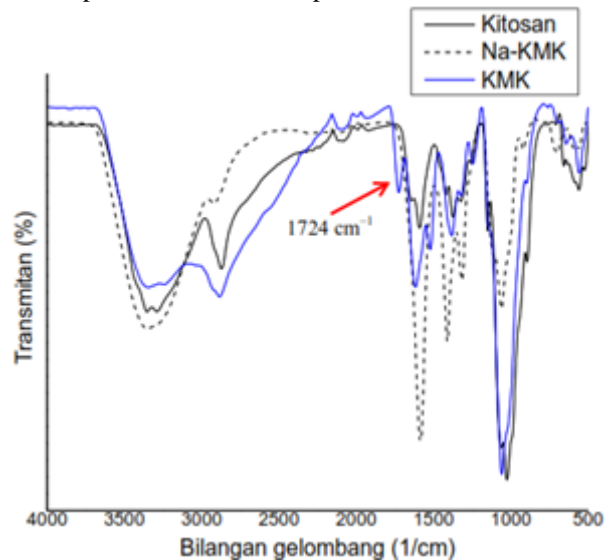
Penambahan gugus karboksimetil pada polimer kitosan terjadi melalui serangkaian reaksi. Tahap awal dari reaksi ini adalah terjadinya alkalisasi kitosan melalui penambahan NaOH hingga polimer mengembang. Selanjutnya, proses protonasi pada asam monokloroasetat menghasilkan CH₂ClCOONa (Na-kloroasetat). Na-kloroasetat yang terbentuk kemudian berikatan dengan kitosan. Reaksi tersebut diawali dengan penyerangan gugus nukleofilik dari kitosan pada C- α dari Na-kloroasetat (CH₂ClCOONa). Reaksi terjadi secara serentak, diikuti dengan lepasnya gugus dari Na-kloroasetat, menghasilkan produk Na-karboksimetil kitosan (Gambar 2). Terbentuknya produk Na-karboksimetil kitosan didukung dengan data FTIR, yang menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3354 cm^{-1} (vibrasi ulur O-H), 1584 cm^{-1} (vibrasi ulur C=O dari -COONa), 1410 cm^{-1} (vibrasi tekuk C-H), 1315 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O-C asimetris), dan 1060 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O). Hasil serupa juga dilaporkan oleh Chen dan Park (2003).



Gambar 2. Mekanisme reaksi pembentukan karboksimetil kitosan

Selanjutnya, produk KMK diperoleh melalui penambahan asam pada Na-KMK. Padatan KMK yang dihasilkan menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 3344 cm^{-1} (vibrasi ulur dari O-H), 2883 cm^{-1} (vibrasi ulur C-H), 1724 cm^{-1} (vibrasi ulur C=O dari -COOH), 1617 dan 1520 cm^{-1} (vibrasi tekuk N-

H dari -NH₃⁺), 1382 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O-C asimetris), dan 1058 cm^{-1} (vibrasi ulur C-O). Hasil serupa juga dilaporkan oleh Chen dan Park (2003). Adanya serapan C=O dari -COOH pada panjang gelombang 1724 cm^{-1} , yang tidak ditemui pada kitosan maupun Na-KMK (Gambar 3), menunjukkan bahwa produk KMK telah diperoleh.



Gambar 3. Hasil analisis FTIR untuk kitosan, Na-karboksimetil kitosan (Na-KMK), dan karboksimetil kitosan (KMK)

Lipase Teramobil Matriks Karboksimetil Kitosan

Amobilisasi enzim lipase dilakukan dalam dua pelarut organik, yaitu isopropanol dan kloroform. Enzim lipase yang diamobilisasi dalam pelarut isopropanol menunjukkan hasil pengikatan yang lebih baik (98%), dibandingkan dengan pelarut kloroform (47 %) (Tabel 1). Penggunaan pelarut isopropanol pada proses amobilisasi memberikan hasil yang lebih baik karena sifatnya yang protik sesuai dengan matriks KMK, dibandingkan dengan pelarut kloroform yang bersifat aprotik.

	Enzim tersisa di supernatant	Enzim terikat
Isopropanol	1 mg 0,02 mg	0,98 mg
Kloroform	1 mg 0,53 mg	0,47 mg

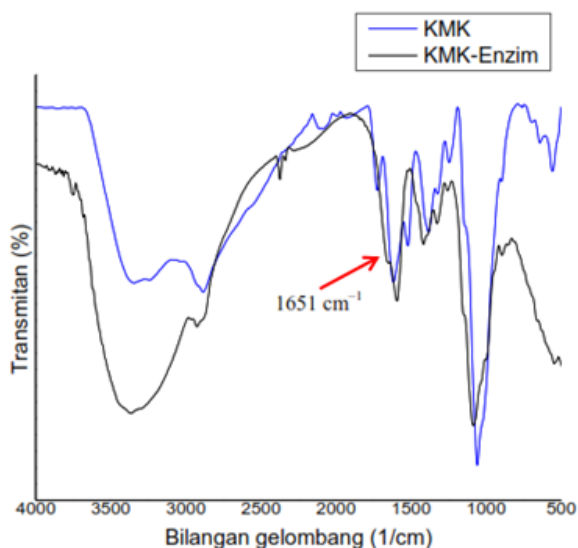
Enzim lipase yang diamobilisasi dalam pelarut isopropanol menunjukkan hasil pengikatan yang lebih baik (98%), dibandingkan dengan pelarut kloroform (47 %) (Tabel 1). Penggunaan pelarut isopropanol pada proses amobilisasi memberikan hasil yang lebih baik karena sifatnya yang protik sesuai dengan matriks KMK, dibandingkan dengan pelarut kloroform yang bersifat aprotik.

Analisis FTIR menunjukkan bahwa serapan khas gugus -COOH pada matriks KMK tidak ditemui pada kompleks enzim terikat matriks (KMK-enzim), digantikan oleh serapan C=O dari amida pada bilangan gelombang 1651 cm^{-1} (Gambar 4).

Tabel 1. Hasil Pengikatan Enzim pada Matriks KMK

Pelarut	Enzim mula-mula	Enzim tersisa di supernatant	Enzim terikat
Isopropanol	1 mg	0,02 mg	0,98 mg
Kloroform	1 mg	0,53 mg	0,47 mg

Kompleks KMK-enzim menunjukkan adanya serapan vibrasi ulur N-H dari $-NH_2$ pada 3363 cm^{-1} , vibrasi ulur C-H pada 2936 cm^{-1} , vibrasi ulur C=O dari $-CONH_2$ pada 1651 cm^{-1} , vibrasi tekuk N-H dari $-NH_2$ pada 1589 cm^{-1} , vibrasi ulur C-O-C asimetris pada 1324 cm^{-1} , dan vibrasi ulur C-O pada 1075 cm^{-1} . Hasil yang diperoleh mengindikasikan adanya pembentukan ikatan kovalen antara gugus karboksimetil dari matriks dengan gugus amina pada protein, menghasilkan ikatan amida yang memberi serapan khas di panjang gelombang 1651 cm^{-1} .



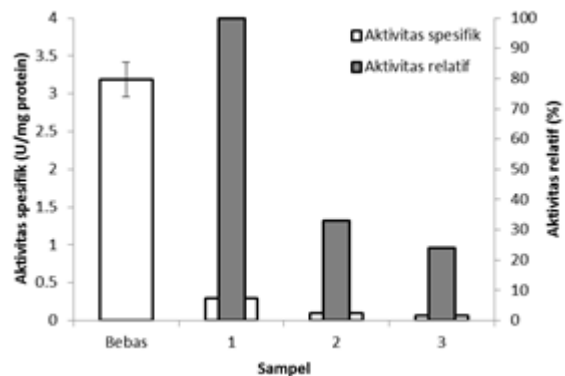
Gambar 4. Hasil analisis FTIR untuk karboksimetil kitosan (KMK) dan KMK terikat enzim

Aktivitas Enzim Lipase Teramobil KMK

Penentuan aktivitas hidrolisis lipase dilakukan pada enzim bebas dan enzim amobil. Aktivitas ditentukan melalui pengukuran produk p-nitrofenol (pNP) yang dihasilkan oleh enzim. Aktivitas hidrolisis lipase dinyatakan dalam satuan unit aktivitas ($\mu\text{mol pNP}$ yang dilepaskan per menit). Keboleholangan enzim amobil dinyatakan dalam persentase aktivitas yang tersisa relatif terhadap aktivitas pada penggunaan pertama (aktivitas relatif). Nilai $t_{1/2}$ ditentukan saat aktivitas relatif berkurang sebanyak 50% dari aktivitas awal.

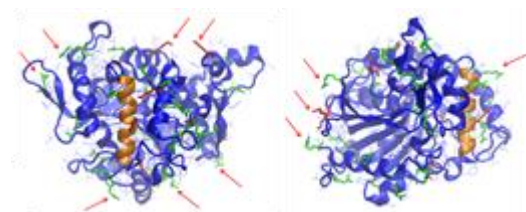
Aktivitas hidrolisis enzim bebas sebesar $3,19 \pm 0,225\text{ U/mg protein}$, sedangkan aktivitas enzim amobil sebesar $0,289\text{ U/mg protein}$. Aktivitas hidrolisis mengalami penurunan menjadi 9,08% relatif terhadap enzim bebasnya. Nilai $t_{1/2}$ dicapai pada penggunaan kedua dengan aktivitas relatif tersisa sebesar 33,1%. Pada penggunaan ketiga, aktivitas hidrolisis enzim amobil masih tersisa sebesar 23,9% (Gambar 5). Padatan enzim amobil yang disimpan pada 4 oC masih mempertahankan 12,7% aktivitas setelah 30 hari penyimpanan (Tabel

2). Amobilisasi lipase pada matriks KMK dalam pelarut isopropanol menghasilkan enzim amobil yang masih mempertahankan 9,08% aktivitas hidrolisis. Adapun penggunaan pelarut kloroform menghasilkan enzim amobil yang inaktif (kehilangan aktivitas). Pemilihan pelarut merupakan salah satu faktor penting dalam proses amobilisasi, dan pelarut isopropanol memberikan hasil yang lebih baik dari segi pengikatan protein maupun aktivitas enzim amobil yang dihasilkan.



Gambar 5. Aktivitas hidrolisis enzim bebas dan amobil pada matriks KMK

Penurunan aktivitas pada enzim amobil yang dihasilkan, menunjukkan adanya interferensi pada kemampuan katalitik enzim. Proses amobilisasi secara kovalen menghasilkan ikatan yang kuat antara matriks dan enzim, namun lokasi pengikatan yang berada di sekitar sisi aktif enzim dapat mengganggu aktivitas enzim. Interaksi matriks KMK dengan enzim diduga berasal dari gugus karboksimetil yang bersifat asam dengan residu-residu asam amino basa dalam enzim, seperti lisin dan arginin. Hasil pemetaan residu-residu lisin dan arginin dalam enzim lipase *Geobacillus thermoleovorans* PPD2 menunjukkan adanya residu di bagian lid, yang dapat berakibat fatal jika terikat ke matriks. Lid pada enzim lipase merupakan bagian yang harus bebas bergerak membuka dan menutup, agar substrat dapat mengakses sisi aktif enzim yang terletak di balik lid (Gambar 6).



Gambar 6. Sebaran residu lisin (merah) dan arginin (hijau) pada lipase *G. thermoleovorans* PPD2: lid ditunjukkan oleh bagian berwarna kuning dan residu-residu basa ditunjukkan oleh tanda panah

Penurunan aktivitas enzim amobil juga dilaporkan terjadi pada lipase *C. rugosa* yang diamobilisasi pada matriks glioksil agarosa (Perna *et al.*, 2017). Aktivitas lipase amobil yang diperoleh mengalami penurunan

menjadi 35,4% relatif terhadap enzim bebasnya. *Lipase C. antarctica* yang diamobilisasi pada matriks kitosan teraktivasi glutaraldehid (Silva *et al.*, 2012) dan lipase *C. rugosa* yang diamobilisasi pada manik kitosan (Yi *et al.*, 2009) juga mengalami penurunan aktivitas, berturut-turut menjadi 39,9% dan 10,4% relatif terhadap enzim bebasnya.

Tabel 2. Aktivitas Enzim Amobil setelah 30 Hari Penyimpanan*

Sampel	Aktivitas mula-mula (A ₀)	Aktivitas setelah penyimpanan (A _t)
Lipase amobil	0,289	0,0368 (12,7% dari A ₀)

*dinyatakan dalam unit/ mg protein

Lipase amobil dilaporkan memiliki ketahanan penyimpanan yang beragam, mulai dari 7 hari (Hung *et al.*, 2003), 30 hari (Chiou dan Wu, 2004; Huang *et al.*, 2007), 60 hari (Tumturk *et al.*, 2007), hingga 120 hari (Brady *et al.*, 1988). Lipase *Candida rugosa* yang diamobilisasi pada manik kitosan (Hung *et al.*, 2003) dan membran kitosan nanofiber (Huang *et al.*, 2007) dilaporkan memiliki ketahanan penyimpanan selama 7 dan 30 hari, dengan penurunan aktivitas berturut-turut menjadi sebesar 67% dan 56,2%. Lipase amobil dengan ketahanan penyimpanan hingga 120 hari dilaporkan oleh Brady *et al.* (1988), pada lipase yang diamobilisasi dengan serbuk Accurel. Lipase amobil kehilangan kurang dari 10% aktivitasnya setelah penyimpanan selama 120 hari (Brady *et al.*, 1988).

KESIMPULAN

Sistem amobilisasi menggunakan matriks karboksimetil kitosan (KMK) berhasil diterapkan untuk mengamobilisasi enzim lipase. Matriks KMK terikat secara kovalen dengan residu-residu asam amino basa yang tersebar di permukaan enzim, dengan beberapa residu diantaranya berada di dekat lid sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim amobil. Amobilisasi lipase pada matriks KMK dalam pelarut isopropanol memberikan hasil yang lebih baik dari segi pengikatan protein maupun aktivitas enzim amobil yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.

Brady, C., Metcalfe, L., Slaboszewski, D., Dan Frank, D. (1988). *Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 65(6), 917-921.

Chen, X. G., Park, H. J. (2003). *Chemical characteristics of O-carboxymethyl*

chitosans related to the preparation conditions. Carbo. Pol, 53, 355-359.

Chiou, S.H., Wu, W.T. (2004). *Immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups*, Biomaterials, 25(2), 197-204.

Dutta, P. K., Dutta, J., Tripathi, V. S. (2004). *Chitin and Chitosan: Chemistry, properties, and applications*, J. of Sci. & Ind. Research, 63, 20-31.

Huang, X.J., Ge, D., Xu, Z.K. (2007). *Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization*. European Polymer Journal, 43(9), 3710-3718.

Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Dan Wu, W.T. (2003). *Binary immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 26(1), 69-78.

Jegannathan, K.R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E.S., Ravindra, P. (2008). *Production of biodiesel using immobilized lipase – a critical review*, Critical Reviews in Biotechnology, 28, 253-264.

Lee, D.W., Koh, Y.S., Kim, K.J., Kim, B.C., Choi, H.J., Kim, D.S., Sujartono, M.T., Dan Pyun, Y.R. (1999). *Isolation and characterization of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1*. FEMS Microbiology Letters, 179, 393-400.

Peng, R. (2014). *Recent progress in lipase immobilization*, BioTechnology: An Indian Journal, 9(1).

Perna, R.F., Tiosso, P.C., Sgobbi, L.M., Vieira, A.M., Vieira, M.F., Tardioli, P.W., Soares, C.M.F., Dan Zanin, G.M. (2017). *Effects of Triton X-100 and PEG on the catalytic properties and thermal stability of lipase from Candida rugosa free and immobilized on glyoxyl-agarose*, Open Biochemistry Journal, 11, 66-76.

Silva, J.A., Macedo, G.P., Rodrigues, D.S., Giordano, R.L.C., Goncalves, L.R.B. (2012). *Immobilization of Candida antarctica lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies*, Biochemical Engineering Journal, 60, 16-24.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Dan Wang, F. (2010). *Biodiesel production with immobilized lipase: A review*. Biotechnology advances, 28, 628-634.

Tumturk, H., Karaca, N., Demirel, G., Dan Şahin, F. (2007). *Preparation and application of poly (N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/κ-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase*, Int jour of biological macromolecules, 40(3), 281-285.

Yi, S.S., Noh, J.M., Lee, Y.S. (2009). *Amino acid modified chitosan beads: improved polymer supports for immobilization of lipase from Candida rugosa*, Jour of Molecular Catalysis B: Enzy of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57(1), 123-129.