



Nghiên cứu cố định enzyme lipase trên hạt silica gel khí bọc chitosan, sử dụng làm chất xúc tác thủy phân dầu thực vật

Immobilization of lipase enzyme on chitosan covered silica aerogel as a catalyst for hydrolysis of vegetable oil

Nguyễn Thị Linh<sup>\*1</sup>, Hà Thị Lan Anh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Mở- Địa chất, <sup>2</sup>Trường cao đẳng Công nghiệp Thực phẩm  
Email: [linhnt1103@gmail.com](mailto:linhnt1103@gmail.com)

#### ARTICLE INFO

Received: 20/8/2019

Accepted: 03/9/2019

#### Keywords:

Silica aerogel, chitosan, lipase enzyme, immobilization, hydrolysis, vegetable oil

#### ABSTRACT

In this work, aerogel silica particles were synthesized under supercritical CO<sub>2</sub> condition with high specific surface area of 560 m<sup>2</sup>/g, pore diameter of 40nm, low density of 0.912 g/cm<sup>3</sup>. The aerogel is covered by chitosan and used as an efficient support for immobilization of lipase enzyme. Loading efficiency for enzyme obtained 87%, catalytic hydrolysis of immobilized lipase for vegetable oil were the same that of free enzyme.

## 1. Giới thiệu chung

Enzyme là chất xúc tác sinh học có hoạt tính cao nên có thể thực hiện các phản ứng có enzyme trong điều kiện mềm hơn rất nhiều so với phản ứng cùng loại sử dụng chất xúc tác hóa học thông thường. Tuy nhiên, việc sử dụng enzyme cho các quá trình chuyển hóa học chưa được phổ biến do chi phí cao, khả năng thu hồi khó. Việc nghiên cứu cố định enzyme lên bề mặt chất mang rắn nhằm thu hồi, tái sử dụng xúc tác enzyme một cách hiệu quả.

Đã có rất nhiều nghiên cứu cố định các enzyme khác nhau lên các chất mang rắn như ống cacbon, silicagel, hạt nano sắt từ, MOFs [1-4], các polyme như polyvinyl sulfone, chitosan [5, 6]. Silica gel là chất mang thường được tổng hợp từ hóa chất tinh khiết như TEOS hoặc các nguồn chứa silic như thủy tinh lỏng [7,8], trong đó nguyên liệu tro trấu được sử dụng chế tạo silica gel khí có tính bền vững và kinh tế hơn cả. Mỗi enzyme có khả năng xúc tác cho 1 hoặc một nhóm phản ứng nhất định. Vì vậy, việc nghiên

cứu tìm kiếm, lựa chọn enzyme cho từng phản ứng cụ thể luôn là vấn đề được quan tâm nghiên cứu.

Phản ứng thủy phân dầu thực vật là phản ứng quen thuộc được thực hiện với các chất xúc tác truyền thống như KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>... đòi hỏi điều kiện nhiệt độ cao và thời gian phản ứng kéo dài hoặc trong điều kiện hơi nước siêu tới hạn ở áp suất cao đến 40 bar [9,10]. Chính vì vậy, việc nghiên cứu xúc tác enzyme cho phản ứng thủy phân dầu thực vật giúp thực hiện phản ứng ở nhiệt độ thấp, áp suất thường và rút ngắn thời gian phản ứng mà vẫn mang lại hiệu suất cao.

Trong nghiên cứu này, enzyme lipase có nguồn gốc thực vật được lựa chọn cố định lên hạt silica gel khí được chế tạo từ tro trấu nhằm đạt được hạt chất mang có khối lượng riêng thấp bằng phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn. Xúc tác sau chế tạo có khả năng làm việc trên bề mặt phân chia pha dầu/nước nhằm tăng cường khả năng tiếp xúc và tối đa hoạt tính xúc tác, cải thiện hiệu quả phản ứng.

## 2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Vỏ trấu được thu mua tại Hưng Yên, chitosan (chiết tách từ vỏ tôm tại phòng thí nghiệm), dầu lạc (Việt Nam). Các hóa chất cấp độ tin khiết gồm  $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$  (Merck), HCl, KOH, etanol (Xilong), enzyme lipase (Novo Nordisk).

### 2.2. Quy trình chế tạo silica gel khí

50g vỏ trấu rửa sạch với dung dịch sodium dodecyl sulfate (SDS) trong điều kiện có khuấy với thời gian 10 phút, để loại bỏ các bụi bẩn và tạp chất, rửa lại bằng nước cất cho đến khi sạch hết chất hoạt động bề mặt. Vỏ trấu sau khi rửa được phơi khô rồi đưa vào tủ sấy ở điều kiện  $105^\circ\text{C}$  trong 6 giờ thu được vỏ trấu chưa xử lý (kí hiệu URH). URH được xử lý với axit HCl 0,5M trong 30 phút. Sau đó rửa sạch bằng nước cất cho đến hết axit ( $\text{pH}=7$ ), làm khô ở  $105^\circ\text{C}$  trong 3 giờ thu được vỏ trấu đã xử lý (kí hiệu ARH). ARH được nung ở  $600^\circ\text{C}$  trong 3h với tốc độ gia nhiệt  $5^\circ\text{C}/\text{phút}$  thu được tro trấu (kí hiệu RHA).

Silica được chiết từ tro trấu (RHA) bằng phương pháp kiềm trong KOH. Hỗn hợp được để qua đêm, lọc, rửa 2 lần với nước cất tỷ lệ 1:8 (hỗn hợp : nước) sau đó điều chỉnh pH đạt 5-7 để tạo sol silica.

Sol silica được thêm từ từ HCl 3M đồng thời khuấy nhẹ cho đến khi đạt  $\text{pH}=10$ , sau 30 phút, gel đặc hình thành (có màu trắng xanh) và được làm già ở  $20^\circ\text{C}$  trong 24h (gel chuyển sang màu trắng đục), thu được hydrogel silica.

Thêm etanol vào hydrogel silica với tỉ lệ silica:etanol là 1:4, khuấy nhẹ trong 5h sau đó để yên thấy hỗn hợp tách 2 pha: gel silica phía trên, nước phần phía dưới. Sau khi tách pha hoàn toàn, loại bỏ pha nước, thu được alcogel silica. Gel ướt được đưa vào autoclave SEPAREX (Pháp) làm khô trong điều kiện  $\text{CO}_2$  siêu tới hạn ở  $100^\circ\text{C}$ , 40 bar. Kết thúc quá trình làm khô thu được hạt silica gel khí, kí hiệu aeSiO<sub>2</sub>.

### 2.3. Quy trình chế tạo hạt chitosan/SiO<sub>2</sub> gel khí (CTS/aeSiO<sub>2</sub>)

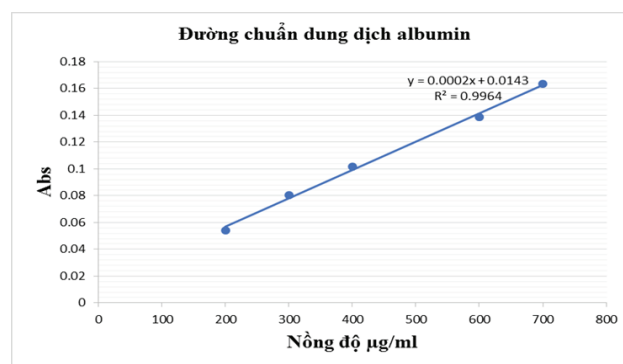
Hòa tan 3g CTS trong 250ml dung dịch axit axetic 1%, thêm 2g SiO<sub>2</sub> vào dung dịch CTS, khuấy nhẹ 30 phút cho hỗn hợp phân tán đều, nhỏ từ từ 5ml dung dịch natri tripolyphosphat (STPP) trong điều kiện khuấy 600v/p ở nhiệt độ phòng trong 1h. Sau quá trình tẩm, hạt CTS/SiO<sub>2</sub> được lọc qua giấy lọc và làm lạnh khô trong điều kiện chân không thu được hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>.

### 2.4. Quy trình cố định enzyme lipase lên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>

Hòa tan 0,2g enzyme lipase trong 10ml dung dịch đệm phosphat sau đó cho 10 mg hạt CTS/SiO<sub>2</sub> vào dung dịch enzyme lipase. Hỗn hợp được khuấy và ủ trong 12h ở  $4^\circ\text{C}$ . Sau thời gian ủ, lọc để thu hạt enzyme cố định trên CTS/aeSiO<sub>2</sub>, rửa 2-3 lần với dung dịch đệm phosphat để loại enzyme tự do, kí hiệu E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>.

### 2.5. Xác định hàm lượng enzyme cố định trên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>

Để xác định hàm lượng enzym lipase mang trên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> sử dụng phương pháp Bradford dựa trên sự chuyển màu của thuốc thử Coomassie Brilliant Blue có bước sóng hấp thụ cực đại ở 595nm. Quang phổ hấp thụ được đo trên thiết bị JASCO V750. Hàm lượng enzyme được xác định dựa trên đường chuẩn được xây dựng.



Hình 1. Đường chuẩn dung dịch albumin

Hiệu suất cố định enzyme = (Lượng enzyme cố định trên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>/Lượng enzyme ban đầu) $\times 100\%$

### 2.6. Phương pháp đặc trưng cấu trúc hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>

*Phương pháp phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)*

Phương pháp FTIR được sử dụng để xác định các nhóm chức đặc trưng trong hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> hấp thụ trong vùng số sóng từ  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , thực hiện trên thiết bị FTIR JASCO V4600.

*Phương pháp BET-BJH*

Phương pháp Brunauer Emmett Teller (BET) và Barrett-Joyner-Halenda (BJH) được sử dụng nhằm xác định diện tích bề mặt riêng, đường kính mao quản và phân bố kích thước mao quản của hạt silica gel khí. Phương pháp được thực hiện trên thiết bị Micromeritics Tristar 3000 V6.07A.

*Phương pháp SEM*

Thiết bị IMS- NKL 2.0kV độ phóng đại 200 000 lần được sử dụng để xác định hình thái hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>.

*Phương pháp nhiệt vi sai (TGA)*

Tính ổn định nhiệt của hạt aeSiO<sub>2</sub> được xác định bằng phương pháp nhiệt vi sai (Thermal Gravimetric Analysis- TGA) sử dụng hệ DTG-60H vận hành trong

dòng không khí dưới điều kiện lưu lượng dòng 50mL/phút, tốc độ gia nhiệt 10°C/phút.

Phương pháp xác định khối lượng riêng của hạt aeSiO<sub>2</sub>

Khối lượng riêng của silica gel khí là khối lượng của một đơn vị thể tích vật liệu hoàn toàn đặc, được xác định theo công thức:

$$\gamma_b = \frac{m}{V_b} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

Trong đó,  $\gamma_b$  là khối lượng riêng

M là khối lượng mẫu

V<sub>b</sub> là thể tích khối của mẫu

Thí nghiệm xác định khối lượng riêng của silica gel khí được thực hiện theo tiêu chuẩn ASTM C188.

### 2.7. Phản ứng thủy phân dầu lạc

Cho 30 g dầu lạc khuấy trong 30 ml nước cất, điều chỉnh pH=5,5. Thực hiện phản ứng có xúc tác enzyme cố định và enzyme tự do để đối chứng ở điều kiện nhiệt 30°C, khuấy 200 vòng/phút, trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được tinh chế bằng n-hexan, sau đó loại bỏ dung môi thu được axit béo (kí hiệu FA). Hiệu suất tách axit béo từ dầu thực vật được tính như sau:

$$\frac{[92 \times (TAN_s - TAN_{bd}) \times m'] - [18 \times (TAN_s - TAN_{bd}) \times m']}{(56 \times 3)} + \frac{m' - (m \times TAN_{bd} \times TAN_s)}{56} \times \frac{m \times TAN_{bd} \times TAN_s}{56}$$

Trong đó: TAN<sub>bd</sub>, TAN<sub>s</sub> lần lượt là trị số axit ban đầu của dầu thực vật và trị số axit của axit béo thu được. m, m' là khối lượng dầu thực vật ban đầu và khối lượng axit béo thu được.

## 3. Kết quả và thảo luận

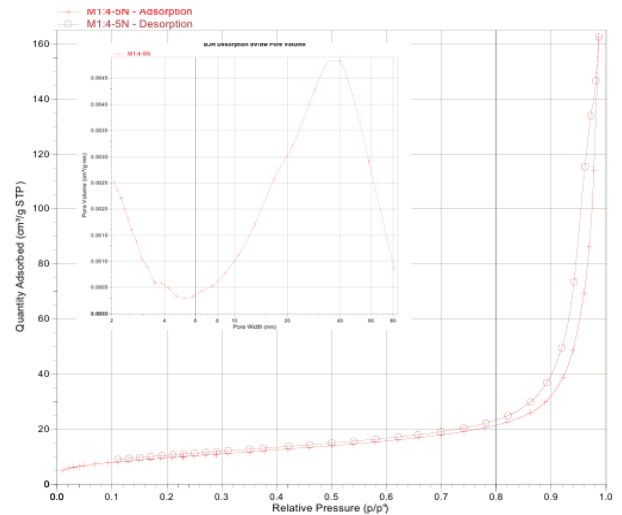
### 3.1. Một số đặc trưng của hạt aeSiO<sub>2</sub>

#### Kết quả đo đẳng nhiệt hấp phụ- giải hấp phụ N<sub>2</sub>

Kết quả trên đường đẳng nhiệt hấp phụ- giải hấp phụ N<sub>2</sub> của hạt aeSiO<sub>2</sub> có dạng IV, đặc trưng cho cấu trúc mao quản trung bình. Diện tích bề mặt riêng tính theo BET đạt 560m<sup>2</sup>/g. Phân bố kích thước hạt tập trung trong khoảng 40nm.

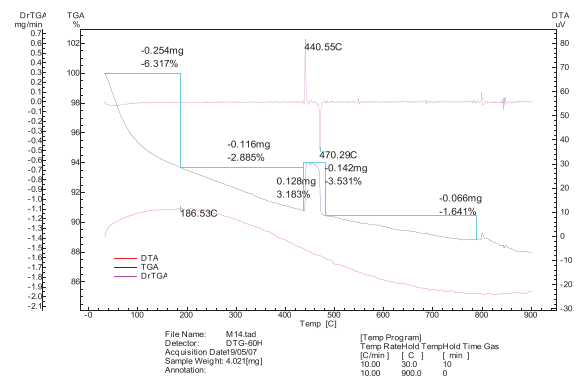
Kết quả trên đã cho thấy hạt aeSiO<sub>2</sub> chế tạo bằng phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn cho độ xốp, nhẹ phù hợp với Kết quả xác định khối lượng riêng của hạt theo tiêu chuẩn ASTM C188 đạt 0,912 g/cm<sup>3</sup>. Điều này thuận lợi cho việc sử dụng hạt aeSiO<sub>2</sub> làm chất mang cố định enzyme lipase sử dụng làm xúc tác thủy phân dầu thực vật. Chất xúc tác nhẹ có thể hoạt động trên bề mặt phân chia pha dầu/nước, thuận lợi cho enzyme lipase

xúc tiến phản ứng thủy phân xảy ra tốt hơn.



Hình 2. Đường đẳng nhiệt hấp phụ- giải hấp phụ N<sub>2</sub> của hạt aeSiO<sub>2</sub> và phân bố kích thước hạt (hình chèn)

#### Phân tích nhiệt vi sai (TGA/TG)



Hình 3. Giảm dần TGA-TG của hạt aeSiO<sub>2</sub>

Trên giản đồ TGA (hình 3) cho thấy một số thay đổi khối lượng theo nhiệt độ trong điều kiện xác định như sau: Trên đường TG xuất hiện các hiệu ứng thu nhiệt nhẹ trong khoảng 100°C tương ứng với sự mất khối lượng 6% là do xảy ra sự mất nước hấp phụ trên bề mặt và trong mao quản của hạt silica gel khí. Trong khoảng nhiệt độ từ 200°C đến 440°C cho thấy có sự mất khối lượng rất nhỏ (2,8%) Hiệu ứng này là quá trình giải phóng nước hấp phụ trong mao quản của hạt gel khí. Hiệu ứng thu nhiệt khá mạnh ở 440°C trước khi tỏa nhiệt tại nhiệt độ 470°C gây nên sự phá vỡ cấu trúc thứ cấp ứng với sự mất khối lượng khoảng 3,5%.

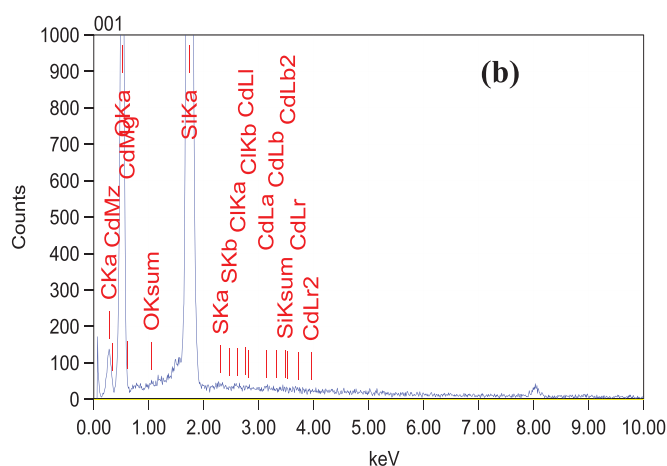
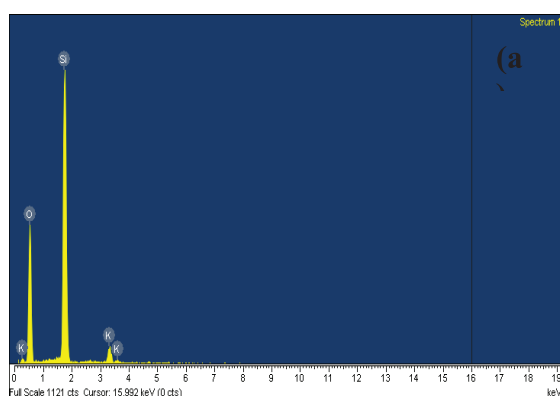
Như vậy, qua kết quả đánh giá bằng phương pháp TGA cho thấy hạt nano silica gel khí chế tạo trong điều kiện CO<sub>2</sub> siêu tới hạn có độ bền nhiệt trên 800°C. Khả năng bền nhiệt của hạt silica gel khí tổng hợp trong

điều kiện CO<sub>2</sub> siêu tới hạn có được nhờ cấu trúc đồng trục Si-O-Si một cách trật tự. đều của tường thành hạt và sự sắp xếp các đơn vị cấu

**Bảng 2.** Một số thông số hạt aeSiO<sub>2</sub>

Thông số	Diện tích bề mặt riêng (theo BET), m <sup>2</sup> /g	Kích thước mao quản (nm)	Độ bền nhiệt (°C)	Khối lượng riêng (g/cm <sup>3</sup> )
Giá trị	560	40	>800	0,912

**3.2. Kết quả chế tạo hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>**



Element	Weight%	Atomic%
O K	54.36	68.20
Si K	41.59	29.72
K K	4.05	2.08
Totals	100.00	

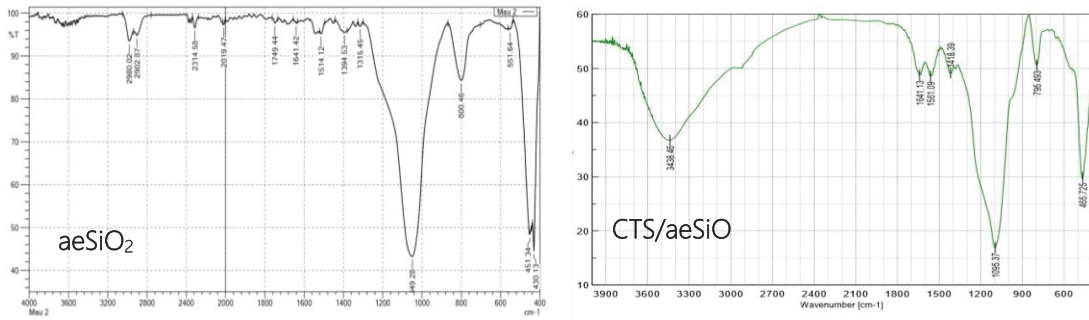
Element	(keV)	Mass%	Error%	Atom%
C K	0.277	11.97	0.39	18.15
O K	0.525	50.75	0.31	57.78
Si K	1.739	36.96	0.15	23.97
S K	2.307	0.06	0.17	0.04
Cl K	2.621	0.05	0.18	0.03
Cd L	3.132	0.21	0.52	0.03
Total		100.00		100.00

**Hình 4.** Phổ EDX của hạt aeSiO<sub>2</sub> (a) và CTS/aeSiO<sub>2</sub> (b)

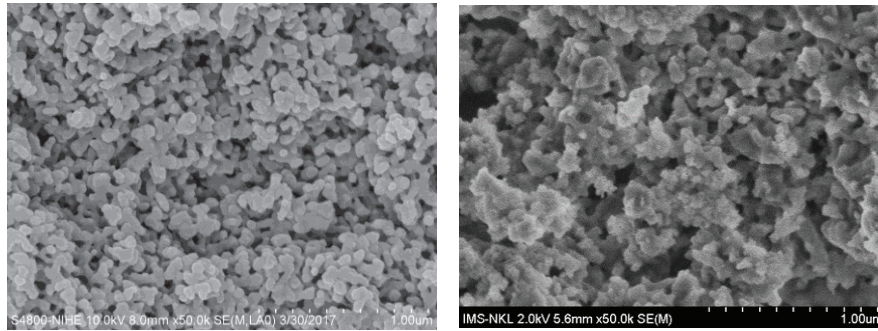
Nhằm xác định sự có mặt của chitosan bọc trên bề mặt hạt aeSiO<sub>2</sub>, phương pháp phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) và phổ FTIR được sử dụng.

Bằng phương pháp phổ tán sắc năng lượng tia X (hình 4a) cho thấy hạt aeSiO<sub>2</sub> được chế tạo từ tro trấu có thành phần chính chứa Silic trong liên kết Si-O-Si và Si-OH. Kết quả trên hình 4b lại cho thấy sự xuất hiện thêm nguyên tố cacbon trong chitosan trên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>. Điều này đã xác nhận chitosan đã được mang trên hạt aeSiO<sub>2</sub>.

Phổ FTIR của hạt silica gel khí aeSiO<sub>2</sub> và CTS/aeSiO<sub>2</sub> đều xuất hiện dao động biến dạng ở số sóng 2980 cm<sup>-1</sup> của liên kết Si-CH<sub>3</sub>, dao động đối xứng và bất đối xứng của liên kết Si-O-Si tương ứng ở 1095 cm<sup>-1</sup> và 795 cm<sup>-1</sup> – 800 cm<sup>-1</sup>. Tuy nhiên, trên phổ FTIR của hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> thấy xuất hiện rõ nét dao động ở 3438 cm<sup>-1</sup> của nhóm amin bậc 2 trong chitosan và nhóm amit ở 1641 cm<sup>-1</sup> do hình thành liên kết giữa chitosan và Si-OH trên bề mặt hạt aeSiO<sub>2</sub>. Kết quả này một lần nữa xác nhận sự có mặt của chitosan trên hạt aeSiO<sub>2</sub>.



Hình 5. Phổ FTIR của aeSiO<sub>2</sub> và CTS/aeSiO<sub>2</sub>



Hình 6. Ảnh SEM của hạt aeSiO<sub>2</sub> (trái) và CTS/aeSiO<sub>2</sub> (phải)

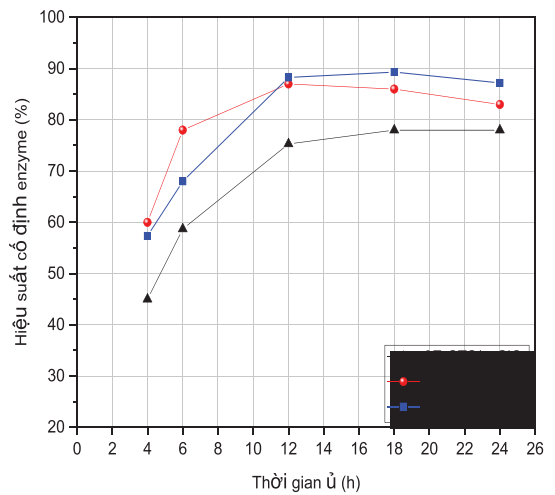
Hình thái hạt aeSiO<sub>2</sub> trên ảnh SEM (hình 6 trái) có cấu trúc hình cầu với kích thước đồng đều khoảng 0,1 μm. Ảnh SEM của hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> ( hình 6 phải) lại cho thấy có lớp phủ chitosan bao bên ngoài bề mặt của hạt aeSiO<sub>2</sub> làm cho hình thái hạt không còn tròn đều rõ nét, kích thước hạt lớn hơn do lớp chitosan bao phủ bên ngoài bề mặt hạt aeSiO<sub>2</sub>, đạt 0,15 μm.

### 3.3. Kết quả cố định enzyme lipase lên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub>

Hàm lượng enzyme cố định trên hạt CTS/SiO<sub>2</sub> được xác định theo phương pháp đã trình bày trong mục 2.4. Khảo sát yếu tố thời gian ủ (4h, 6h, 12h, 18h, 24h) và hàm lượng enzyme ban đầu (3mg, 5mg, 7mg) ảnh hưởng đến hiệu suất cố định enzyme trên 3 mẫu tương ứng 3E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>, 5E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>, 7E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>.

Đồ thị hình 7 biểu diễn ảnh hưởng của thời gian ủ và hàm lượng enzyme ban đầu đến hiệu suất cố định enzyme. Kết quả chỉ ra rằng ở tất cả các hàm lượng, khi tăng thời gian ủ hiệu suất cố định enzyme tăng đến giá trị nhất định. Điều này cho thấy khả năng liên kết của các phân tử enzyme lên bề mặt hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> đạt đến trạng thái bão hòa bao phủ. Tuy nhiên khi tăng hàm lượng enzyme ban đầu tốc độ cố định enzyme tăng nhanh ở thời gian ủ ban đầu (4 giờ đầu) sau đó đạt bão hòa. Ngược lại, khi hàm lượng enzyme thấp, tốc độ cố định enzyme chậm và hiệu suất cố định thấp do mật độ enzyme thấp, thời gian ủ

chưa đủ để enzyme liên kết lên bề mặt hạt chất mang. Như vậy, với thời gian ủ 12h, hàm lượng enzyme ban đầu 5mg, hiệu suất cố định enzyme đạt đến 87%.



Hình 7. Hiệu suất cố định enzyme đối

### 3.4. Đánh giá khả năng xúc tác của 5E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>

Thực hiện phản ứng thủy phân dầu lạc theo quy trình trong mục 2.7. Phản ứng được thực hiện với 0,1 g 5E-CTS/aeSiO<sub>2</sub> và 0,1 g enzyme tự do. Kết quả thực hiện phản ứng cho trong bảng 3.

**Bảng 3.** Một số tính chất đặc trưng của axit béo

Tên mẫu	Khối lượng riêng (g/ml)	Độ nhớt		Màu sắc	Trị số axit (ml/g)	Hiệu suất (%)
		40°C	100°C			
Dầu lạc	921	36.84	8.6	Vàng sẫm	1.57	-
FA-E	902	18	4.5	Vàng nhạt	48.24	89,0
FA-E-CTS/aeSiO <sub>2</sub>	902	18	4.5	Vàng nhạt	48.57	88,6

Từ kết quả trên cho thấy axit béo thu được từ phản ứng thủy phân dầu lạc sử dụng xúc tác enzyme tự do (FA-E) và enzyme cố định (FA-5E-CTS/aeSiO<sub>2</sub>) đều cho hiệu suất cao và có tính chất đặc trưng tương đồng. Đây là kết quả bước đầu đánh giá khả năng xúc tác cho phản ứng thủy phân dầu lạc của enzyme cố định trên hạt aeSiO<sub>2</sub> cho hiệu suất tương đương khi sử dụng enzyme tự do. Tốc độ khuấy khi sử dụng enzyme cố định là 200v/p thấp hơn so với phản ứng sử dụng enzyme tự do (600 v/p).

### Kết luận

Hạt silica gel khí được chế tạo từ tro trấu bằng phương pháp CO<sub>2</sub> siêu tới hạn có diện tích bề mặt riêng 560 m<sup>2</sup>/g, kích thước hạt đồng đều khoảng 0,1 µm, khối lượng riêng 0,912 g/cm<sup>3</sup> thích hợp làm chất mang.

Hạt silica gel khí bọc chitosan đã giúp cho khả năng cố định enzyme lipase lên bề mặt hạt đạt đến 87%.

Enzyme lipase được cố định trên hạt silica gel khí bọc chitosan có hoạt tính cao đối với phản ứng thủy phân dầu lạc, cho hiệu suất phản ứng đạt 88,6%. Việc cố định enzyme lên hạt chất mang rắn giúp dễ dàng thu hồi xúc tác sau phản ứng. Mặt khác, hạt silica gel khí với khối lượng riêng thấp mang enzyme có khả năng phân tán đều trong môi trường phản ứng, tăng khả năng tiếp xúc của tâm xúc tác trên bề mặt phân chia pha dầu/nước, giúp giảm năng lượng khuấy.

Phản ứng thủy phân dầu lạc sử dụng xúc tác enzyme cố định giúp giảm điều kiện phản ứng (ở 30°C, áp suất thường, thời gian phản ứng 30 phút).

Phương pháp cố định enzyme lipase trên hạt CTS/aeSiO<sub>2</sub> mở ra hướng nghiên cứu sử dụng hiệu quả chất xúc tác sinh học enzyme cho các phản ứng chuyển hóa hóa học.

### Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện của Phòng thí nghiệm Lọc- Hóa dầu, trường Đại học Mở- Địa chất và Trung tâm phân tích trường Cao đẳng Thực phẩm.

### Tài liệu tham khảo

1. Ashok Kumara, GiDae Park, Sanjay K.S.Patela, SanathKondaveetia, SachinOtaria, Jung-KulLeea, *Chem. Eng.* 359 (2019), 1252-1264.
2. Natália B. Machado, João P. Miguez, Iara C. A. Bolina, Adriana B. Salviano, Raphael A. B. Gomes, Olga L. Tavano, Jaíne H. H. Luiz, Paulo W. Tardioli, Érika C. Cren, Adriano A. Mendes,\* *Enzyme and Microbial Technology.*
3. Yingli Hu, Lingmei Dai, Dehua Liu, Wei Du, Yujun Wang, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (2018), 793-801.
4. Kamyar Khoshnevisana, Faezeh Vakhshiteh, Mohammad Barkhi, Hadi Baharifar, Elahe Poor-Akbar, Naeemeh Zari, Haralambos Stamatias, Abdol-Khalegh Bordbar, *Molecular Catalysis* 442 (2017) 66–73.
5. Bruna B. Pinheiro, Nathalia S. Rios, Elena Rodríguez Aguado, Roberto Fernandez-Lafuente, Tiago M. Freire, Pierre B.A. Fecine, José C.S. dos Santos, Luciana R.B. Gonçalves, *International Journal of Biological Macromolecules* (2019),
6. Deqiang Wang, Weifeng Jiang, *International Journal of Biological Macromolecules* 126 (2019) 1125–1132.
7. Manijeh Mohammadian, Tahereh S. Jafarzadeh Kashi, Mohammad Erfan, Fatemeh Pashaei Soorbagh, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 44 (2018) 205–212.
8. Irina Smirnova, Pavel Gurikov, *The Journal of Supercritical Fluids* 134 (2018) 228–233
9. Letícia Karen dos Santos, Rafael Rodrigues Hatanaka, Jose Eduardo de Oliveira, Danilo Luiz Flumignan, *Renewable Energy* 130 (2019) 633–640.
10. Guillaume Maniet, Nicolas Jacquet, Aurore Richel, *C. R. Chimie* 22 (2019) 347– 353