



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

RAFAELA RODRIGUES DE BRITO

**ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE
LIPASES CATALISADORAS DE REAÇÕES DE
TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL.**

São José do Rio Preto/SP
Agosto, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

RAFAELA RODRIGUES DE BRITO

ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES CATALISADORAS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial e Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes

São José do Rio Preto/SP
Agosto, 2012

Brito, Rafaela Rodrigues de.

Isolamento de fungos produtores de lipases catalisadoras de reações de transesterificação para produção de biodiesel / Rafaela Rodrigues de Brito. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

64 f.: 11 il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Lipases. 2. *Acremonium* sp. 3. Biodiesel. I. Gomes, Eleni. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU -

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

Campus de São José do Rio Preto - UNESP

RAFAELA RODRIGUES DE BRITO

ISOLAMENTO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES CATALISADORAS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Aplicada, área de Microbiologia Industrial e Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^º. Dr. José Geraldo Nery
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Professor Assistente Doutor
UFSJ – Sete Lagoas/MG

São José do Rio Preto/SP
Agosto, 2012

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Eleni Gomes por depositar confiança em meu trabalho e pelos ensinamentos relacionados à pesquisa.

À Drª Ana Lúcia Ferrarezi por dar início aos estudos com lipases e biodiesel no laboratório, pelas dicas, ensinamentos, apoio e dedicação. Ao grupo Biodiesel, Ana, Janaína, Thiago, Bárbara Bonini, Bárbara Garcia, Marquinhos, Pedro Henrique e Jéssica e Júnior, pelas experiências divididas, pela dedicação e exímio esforço em buscar bons resultados.

Aos amigos do laboratório que me divertem na hora do café, me apóiam e me consolam nos momentos difíceis: Ana Lúcia, Diego, Priscila, Janaina, Pedro Lucas, Bruna L., Isabel, Fernanda, Gisele, Carol B., Carol M., George, Fernando, Josiane, Márcia, Ariane Zancheta, Ariane Movio, Rosemeire, Guilherme, Andréia, Isabela, Bruna P., Tássia, Angélica e Celso.

À minha família querida pelo apoio (mesmo à distância), carinho, incentivo, compreensão e confiança: Pai, Mãe, Dani e Nick, amo vocês demais.

Ao meu namorado e parceiro Renato pelo carinho, amizade, companheirismo, paciência e incentivo.

À minha amiga profissional e pessoal Vanessa pelo apoio e incentivo.

Ao CNPQ e à FAPESP, pelo incentivo à pesquisa.

“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”

Raul Seixas

Sumário

Resumo.....	i
Abstract	ii
1.Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Lipases	2
2.1.1. Aspectos gerais.....	2
2.2. Reações catalisadas por lipases microbianas e suas aplicações.	5
2.2.1. Reações de hidrólise.	5
2.2.2. Reações de síntese.	7
2.2.2.1. Produção enzimática do biodiesel.....	9
2.3. Uso de lipases associadas às células para produção enzimática do biodiesel.	12
2.4. Fermentação em estado sólido (FES) na produção de lipases microbianas.	14
3. Objetivos.	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1. Meio de Cultura	18
4.1.1 Meio líquido para isolamento das linhagens fúngicas.	18
4.1.2. Meio sólido para o isolamento das culturas.	18
4.2. Coletas das amostras para isolamento dos fungos.....	18
4.4. Identificação das cepas.	19
4.4.1. Extração do DNA.	19
4.4.2. Sequenciamento das amostras.	20
4.5. Estocagem da coleção fúngica de trabalho.	21
4.6. Fermentação em estado sólido (FES).	21
4.7. Imobilização de hifas para a síntese do biodiesel.....	23
4.8. Determinação da atividade enzimática.	23
4.8.1. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico.	23
4.8.2. Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria.	24
4.9. Ensaio para a determinação da transesterificação.	24
4.10. Quantificação dos ésteres etílicos.....	25
4.11. Zimogramas de atividade.....	26
4.11.1. Zimograma baseado na atividade de hidrólise.....	26

4.11.2. Zimograma baseado na atividade de esterificação.....	26
4.12. Modelo experimental para a determinação das melhores condições na reação de transesterificação.....	27
5. Resultados e discussão.	29
5.1. Seleção dos fungos filamentosos.....	29
5.2. Seleção do substrato para atividade de lipase utilizando hifas imobilizadas e extrato bruto liofilizado.....	33
5.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção das enzimas.....	36
5.3. Zimograma baseado na atividade de hidrólise e de esterificação da lipase do fungo <i>Acremonium</i> sp.	37
5.4. Resultados obtidos com o planejamento experimental de superfície de resposta do tipo Box- Behnken na síntese do biodiesel.....	39
6. Conclusões.....	44
7. Referências Bibliográficas.....	45

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática de uma α/β hidrolase. setas azuis= folhas- β (1-8), cilindros vermelhos= α -hélices (A-F). círculos laranjas= posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica (BORNSCHEUER, 2002). 3
- Figura 2.** Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1, 3 específica. (Adaptado de Paques e Macedo, 2006). 4
- Figura 3.** Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (HARALDSSON, 1991 e DE CASTRO et al., 2004). 5
- Figura 4.** Mecanismo de reação para a produção do biodiesel. Óleos vegetais reagem com metanol na presença de uma base ou da lipase para produzir metil ésteres e glicerol (FUKUDA, KONDO e TAMALAMPUDI, 2009). 9
- Figura 5.** Comparação do processo de produção e imobilização de lipase extracelular e intracelular (Adaptado de Fukuda et al., 2001). 13
- Figura 6.** Embalagens de polipropileno utilizados na fermentação sólida. 22
- Figura 7.** Cepas selecionadas e identificadas como pertencentes aos gêneros *Acremonium* e *Fusarium*. 31
- Figura 8.** (A) Desenho esquemático de conídios e conidióforos (ZUCCARO et al., 2004) (B) Fotomicrografias da cepa *Acremonium* sp. 31
- Figura 9.** Efeito do tempo de cultivo na atividade de hidrólise das lipases do fungo *Acremonium* sp. ROG 2.1.9, utilizando bagaço de cana e farelo de soja (9:1) como substratos. Os dados são médias de 2 ensaios. 33
- Figura 10.** Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (A) e de esterificação (B), utilizando as amostras de solução enzimática bruta -enzima extracelular-obtida a partir do cultivo do fungo em meio com peptona e 1% de óleo (L1), e uréia com 4% de óleo (L2) e lipases associadas às hifas obtidas com uréia e 4% de óleo (L3), e peptona com 1% de óleo (L4). M=marcador molecular. 39
- Figura 11.** Curva de contorno que apresenta o rendimento de ésteres etílicos em função da razão molar óleo:etanol versus a temperatura, a proporção de micélio imobilizado e o volume de hexano. 43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variáveis independentes e os níveis aplicados no planejamento experimental.	28
Tabela 2. Atividades lipolítica e de transesterificação das cepas isoladas	30
Tabela 3. Cepas selecionadas com atividade de transesterificação.	32
Tabela 4. Efeito de diferentes composições de substratos sólidos dos meios de cultura sobre as produções de lipases hidrolíticas e transesterificantes pelo fungo <i>Acremonium</i> sp. ROG 2.1.9.....	35
Tabela 5. Influência da fonte de nitrogênio e da concentração de óleo de canola, adicionados ao meio de cultura do fungo <i>Acremonium</i> sp, sobre a produção de lipases com atividade de síntese e hidrólise.	37
Tabela 6. Valores de <i>P</i> do modelo quadrático completo determinados para as variáveis.	40
Tabela 7. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação.	41

Resumo

A produção do biodiesel por meio da transesterificação enzimática, catalisada por lipases, tem a vantagem de gerar biodiesel de melhor qualidade devido à especificidade da catálise, e ainda permite a recuperação de um glicerol mais puro que pode ter diferentes aplicações. Entretanto, o uso da catálise enzimática no processo industrial de produção do biodiesel no Brasil ainda é inviável em função do alto custo das enzimas, requerendo desenvolvimento de tecnologias que reduzam o preço de produção e de aplicação desses biocatalisadores. Com base nestes aspectos, este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos filamentosos capazes de produzir lipases com atividade de transesterificação e aplicar estas enzimas na síntese do biodiesel, avaliando ainda as influências das condições de cultivo do microrganismo na produção das lipases. Dentre as 20 linhagens de fungos isoladas, duas apresentaram capacidade de produzir lipases com atividade de transesterificação quando cultivadas por fermentação em estado sólido (FES) em meio de bagaço de cana e farelo de soja (9:1). Nas condições empregadas, a linhagem *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 apresentou atividade de transesterificação com rendimento de $1,5 \text{ g de ésteres} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de óleo de soja e atividade hidrolítica de $3,8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ quando avaliadas pelo método titulométrico e $0,8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ pelo método colorimétrico. Para determinar as condições favoráveis de fermentação, vários substratos foram testados para a cultura desse fungo e produção das lipases com atividade transesterificação, e aquele que proporcionou a maior atividade, utilizando o micélio imobilizado, foi a torta de algodão (sem adição de óleo), seguida pela mistura de bagaço de cana e farelo de soja (9:1) com rendimentos de $4,7$ e $4,1 \text{ g de ésteres} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de óleo, respectivamente. Usando o micélio imobilizado na mistura de bagaço de cana e farelo de soja (9:1), também foram avaliadas nove soluções com diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de óleo indutor. A solução enzimática obtida pelo cultivo do fungo em meio com $0,08 \text{ mL de óleo de canola} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato e $0,01 \text{ g de ureia} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato apresentou maior atividade de transesterificação. O planejamento experimental do tipo Box–Behnken aplicado com o intuito de maximizar a síntese de ésteres etílicos, levou a um aumento de 77% no rendimento, partindo das melhores condições de cultivo, com $88 \text{ g de ésteres} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de óleo. Os zimogramas baseados nas atividades de hidrólise e de esterificação mostraram a presença de lipases com atividades hidrolítica e de transesterificação.

Abstract

The production of biodiesel by enzymatic transesterification, catalyzed by lipase, has the advantage of produce better quality biodiesel, due to its high specificity and still allows recovery of a purer glycerol which can have several destinations. However, the use of enzymatic catalysis in an industrial production of biodiesel in Brazil is not feasible yet to the high cost of these enzymes, requiring development of technologies that reduce the cost of production and application. Based on these aspects, this study aimed to isolate and select filamentous fungi capable of producing lipase with transesterification activity and apply these enzymes in the synthesis of biodiesel, still evaluating the influences of culture conditions of the microorganism in the production of lipases. Among the 20 strains of fungi isolated, two had the ability to produce lipases with transesterification activity when grown by solid state fermentation (SSF) in the middle of sugarcane bagasse and soybean meal (9:1). Under these conditions employed the strain *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 showed transesterification activity with a yield of $1.5 \text{ g of } 100\text{g}^{-1}$ · esters of soybean oil and hydrolytic activity of $3.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ when measured by titrimetric method and $0.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ by colorimetric method, respectively. To determine favorable conditions of fermentation, various substrates were tested for the culture of this fungus and production of lipases with transesterification activity, and one that yielded the highest transesterification activity, using immobilized mycelia, was cottonseed meal (without added oil), followed by mixture of sugarcane bagasse and soybean meal (9:1) with yields of 4.7 and 4.1 g of esters · 100g^{-1} oil, respectively. Using the mixture of mycelium immobilized on sugarcane bagasse and soybean meal (9:1), were also evaluated nine solutions with different nitrogen sources and concentrations of inductor oil. The enzymatic solution obtained by cultivating the fungus in medium with 0.08 mL of canola oil · g^{-1} substrate and 0.01 g of urea · g^{-1} substrate had higher transesterification activity. The Box-Behnken design of experiment was applied in order to maximize the synthesis of ethyl esters and led to a increase of 77% in the yield, from the best growing conditions, with 88 g of esters · 100g^{-1} oil. Esterification and hydrolysis activity based zymography showed the presence of lipases and hydrolytic transesterificante.

1.Introdução

Com foco em fontes de energias renováveis e ambientalmente seguras, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção de biocombustíveis como etanol celulósico e biodiesel de boa qualidade e com custo competitivo no mercado tem sido alvo de inúmeros projetos de pesquisas. A aplicação de lipases na síntese do biodiesel, em substituição aos catalisadores químicos, é uma proposta muito interessante do ponto de vista ambiental e da qualidade do produto gerado, embora ainda seja proibitiva sob o ponto de vista econômico. Lipases são enzimas com capacidade de catalisar reações de hidrólise em meio aquoso, e de síntese, como a esterificação e a transesterificação, em meio orgânico com baixo teor de água. A transesterificação é a reação entre um triglicerídeo e um álcool gerando um alquil éster (biodiesel). Embora essas reações possam ser catalisadas por compostos químicos, a catálise enzimática tem as vantagens de não gerar subprodutos poluentes, permitir a recuperação do catalisador e ocorrer em condições brandas de temperatura e pressão, evitando desgastes de equipamentos.

Os fungos são os principais produtores de enzimas industriais em função da capacidade de secreção das mesmas, que podem ser extraídas facilmente do meio de cultura. Entretanto, a produção de enzimas em escala industrial exige mais estudos acerca dos microrganismos produtores dessas enzimas e o desenvolvimento de novas técnicas de produção de modo a aumentar a eficiência e reduzir custos operacionais. Assim, a fermentação em estado sólido (FES), além de fornecer suporte e nutrientes para o crescimento das hifas, possibilita o uso de resíduos agrícolas e agro-industriais como substrato, os quais são de baixo custo e amplamente disponíveis no Brasil.

Além do aprimoramento do organismo produtor e da forma de produção, a aplicação da enzima também pode ser um gargalo do processo. O uso de enzimas em sua forma solúvel impede sua recuperação e reuso, além de constituir um aditivo no produto. No caso da produção do biodiesel, cujo substrato a ser transformado é um óleo, a adição de enzimas em solução aquosa é um fator limitante. Nesse contexto, a imobilização das enzimas é uma prática que possibilita a otimização da aplicação e reuso. As lipases quando imobilizadas, apresentam maior rendimento, são mais estáveis e podem ser recuperadas facilmente do meio de reação, contribuindo com a redução nos custos do biodiesel.

Com base no exposto, o presente trabalho abordou a seleção de linhagens fúngicas produtoras de lipases com elevada atividade de transesterificação, o estudo das condições de cultivo do microrganismo para a produção dessas enzimas e a aplicação destas na reação de transesterificação, para a produção do biodiesel.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Lipases.

2.1.1. Aspectos gerais

As lipases (triacilglicerol lipase EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos, em meio aquoso, e as reações de síntese, em meio com mínima quantidade de água, como a transesterificação (acidólise e acoólise), interesterificação, aminólise e a esterificação (SHARMA; CHISTI E BANERJEE, 2001; HOUDE, KADEMI e LEBLANC, 2004; RIGO et al. 2010).

Todas as lipases são constituídas por folhas β e α -hélice e um sítio ativo formado por uma tríade catalítica composta por Ser-His-Asp/Glu (Figura 1) (HOU e SHIMADA, 2009; ERICSSON et al., 2008; BORNSCHEUER, 2002; SECUNDO et al., 2006). Muitas delas apresentam uma estrutura hidrofóbica α helicoidal que encobre o sítio ativo, denominada tampa ou “lid”, que é responsável pelo mecanismo de ativação interfacial, ou seja, quando em contato com o substrato em uma interface lipídio/água, tem sua conformação alterada, movendo-se e expondo o sítio catalítico (JAGER e REETZ, 1998; PLEISS et al., 2000; BORNSCHEUER, 2002).

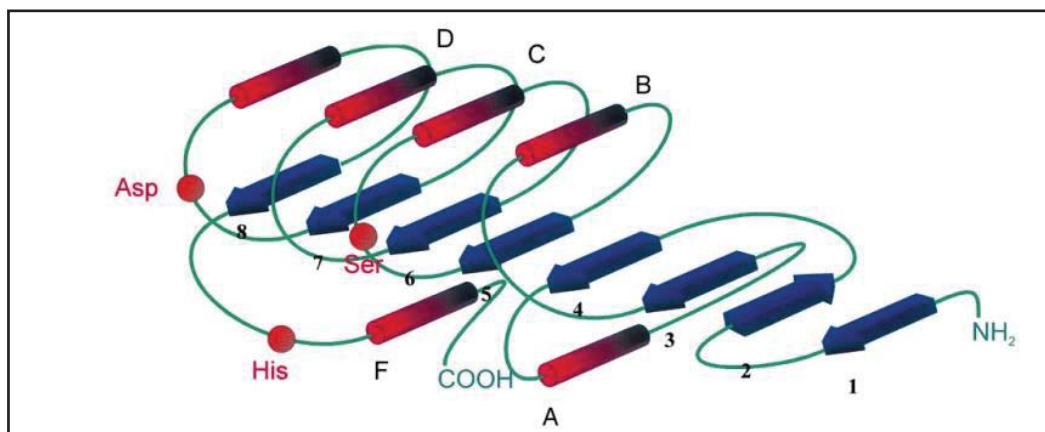


Figura 1. Representação esquemática de uma α/β hidrolase. setas azuis= folhas- β (1-8), cilindros vermelhos= α -hélices (A-F). círculos laranjas= posições relativas dos aminoácidos da tríade catalítica (BORNSCHEUER, 2002).

Segundo Verger (1997) a presença do “lid” não é necessariamente requerida para a ativação interfacial, pois as lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, *B. glumae* and *Candida antarctica* B e uma lipase pancreática possuem a estrutura hidrofóbica e não expressam tal mecanismo.

Animais, plantas e microrganismos são produtores de lipases, entretanto, as de origem microbiana podem ser mais promissoras como biocatalisadores industriais porque frequentemente apresentam boa estabilidade, são ativas em uma ampla variedade de solventes orgânicos, não precisam de co-fatores (BORNSCHEUER et al., 2002) e requerem procedimentos mais simples de extração por serem, na maioria dos casos, secretadas no meio (CARVALHO et al., 2003; SHRIMHAN et al., 2011). Além disso, os microrganismos são facilmente manipulados geneticamente podendo-se obter linhagens hiperprodutoras, não sofrem influência de flutuações sazonais e podem crescer em meios de baixo custo (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

Em relação à especificidade pelos substratos, as lipases podem ser específicas para o tamanho da cadeia de carbono dos ácidos graxos (AG), e para o número e posições das insaturações. Também podem ter especificidades quanto à posição da ligação éster na cadeia de triacilglicerol (TAG), sendo que algumas atuam especificamente nas posições 1, 3 do TAG, como aquelas produzidas por *Aspergillus oryzae* (TOIDA et al., 1998), *Penicillium roqueforti* (LENCKI et al., 1998) e *Rhizopus oryzae* (LEE et al, 2006) (Figura 2), enquanto outras, hidrolisam preferencialmente ligações éster na posição 2 do TAG. Outras lipases reconhecem aleatoriamente todas as ligações éster do TAGs, como as secretadas por *Penicillium* sp. DS-39

(DHARMENDRA et al., 2011) e *Candida rugosa* (LEE et al, 2006) (HOU e SHIMADA, 2009; BORNSCHEUER, 2002; PAQUES e MACEDO, 2006).

As lipases que catalisam as reações de síntese (trans ou esterificação) ainda podem apresentar especificidade pelos alcoois com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, que variam desde o metanol (C1) até o dodecanol (C12), embora outros fatores, como a temperatura, o tipo de solvente e outros componentes do meio reacional e a estrutura e dinâmica molecular das lipases, possam interferir nessas seletividades (GANDHI, SAWANT e JOSHI, 1995; VAYSSE et al., 2002; BEZBRADICA et al., 2006).

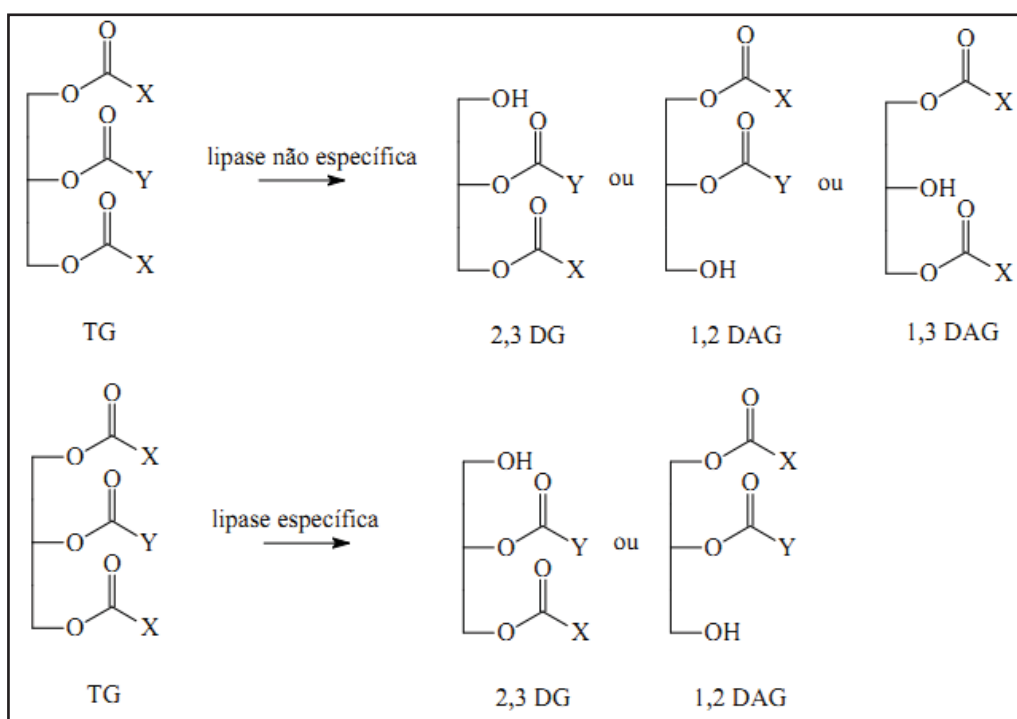


Figura 2. Reações catalisadas por lipases do tipo não-específica e 1, 3 específica.
(Adaptado de Paques e Macedo, 2006).

Vários trabalhos relatam a eficiência das lipases microbianas com capacidade de síntese de ésteres e hidrólise, como aquelas obtidas a partir de *Penicillium citrinum* (MIRANDA et al., 1999) , *Aspergillus niger* (MUHADIK et al., 2002) *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et. al, 2009), *Penicillium sp.* (RIGO et. al, 2009), *Rhizopus chinensis* (SUN e XU, 2008), *Rhizopus delemar* (AÇIREL, ERŞAN e AÇIREL, 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (MAHANTA, GUPTA, KHARE, 2008), *Aureobasidium pullulans* HN2.3(LIU et al., 2008) e *Pichia lynferdii* (KIM et al., 2010). Entretanto, a busca por novas linhagens produtoras de lipases que apresentam características ideais

para a aplicação industrial é muito importante, seja para o uso direto da linhagem ou dos genes das mesmas em cepas transgênicas.

2.2. Reações catalisadas por lipases microbianas e suas aplicações.

2.2.1. Reações de hidrólise.

As lipases apresentam ampla versatilidade e propriedades catalíticas, que permitem suas aplicações em diversas áreas industriais, como a farmacêutica, de alimentos, oleoquímicos, cosméticos, detergentes, tratamento de efluentes e no setor de biocombustíveis (CASTRO et al., 2004; SHARMA; CHISTI E BANERJEE, 2001; FORESTI et al., 2008; TREVISAN, 2004).

Elas pertencem a um grupo de enzimas hidrolíticas que agem na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas, presentes em acilgliceróis, que ocorre por clivagem sequencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (Figura 3) (HARALDSSON, 1991; SAXENA et al., 2003).

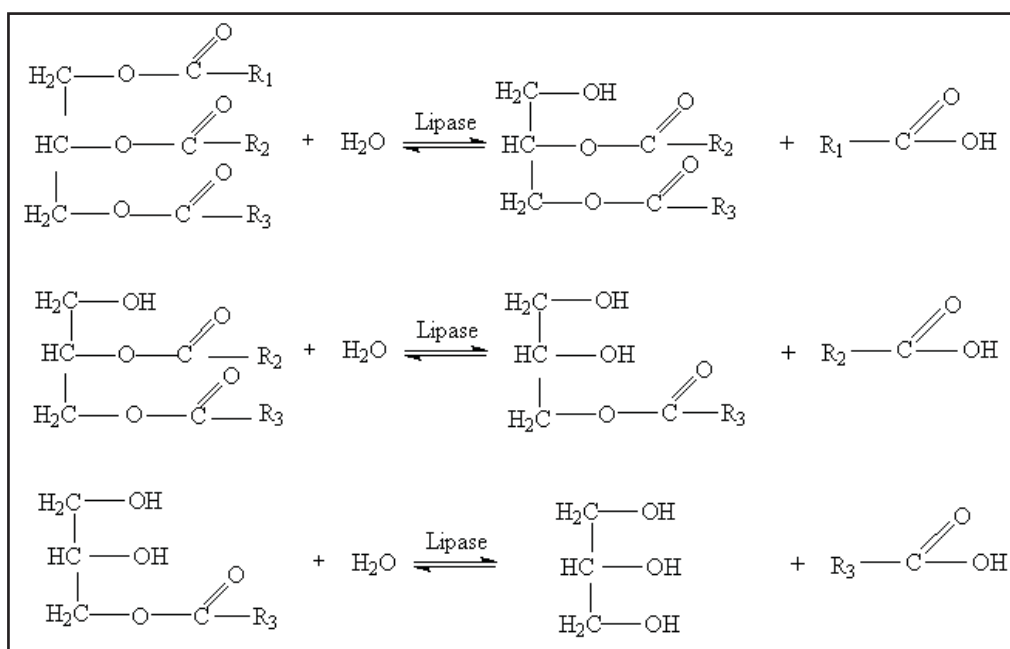


Figura 3. Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (HARALDSSON, 1991 e DE CASTRO et al., 2004).

Nesse sentido, as lipases atuam na formulação de detergentes e cosméticos, na modificação de gorduras do leite, na produção de ácidos graxos poli-insaturados a partir da hidrólise de óleos, no processamento de couro e peles para remover gorduras residuais e na recuperação de efluentes contaminados com óleos e gorduras (HOU e SHIMADA, 2009; BALCÃO e MALCATA, 1998; CAMMAROTA e FREIRE, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MOHAMED et al., 2011).

O uso dessas enzimas em detergentes para roupas é a aplicação mais comum (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001) e para fazer parte da composição destes, as lipases devem ser estáveis nas condições de lavagem, entre pH 10 e 11, e temperaturas entre 30 e 60°C; também devem apresentar pouca ou nenhuma especificidade pelo substrato, sendo capazes de atuar sobre diversos óleos, e por fim, devem resistir aos componentes da formulação e à degradação causada por enzimas proteolíticas também presentes (MARTINS, 2001).

Algumas enzimas comerciais já são utilizadas na fabricação de detergentes, tais como a lipolase (Novozyme, Dinamarca), originada do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae*, lumafast (Genencor, USA) e lipomax (Gist-Brocades, Holanda) lipases produzidas por *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas alcaligenes*, respectivamente (JAEGER, REETZ, 1998). Contudo, pesquisadores ainda buscam lipases microbianas para aplicação na indústria de detergentes, assim como Liu et al. (2009) que avaliaram, em relação aos efeitos de pH, temperatura e a vários componentes de um detergente, a atividade e estabilidade de uma lipase alcalina produzida pelo fungo *Fusarium solani* N4-2, e observaram ótima capacidade de resistência pela lipase, com atividade máxima a 30°C e a pH 9. Cherif et al. (2011) também estudaram os efeitos dos mesmos fatores para a lipase de *Staphylococcus* sp. e obtiveram a maior atividade a pH12 e 60°C, estabilidade na presença de surfactantes e agentes oxidantes e compatibilidade com vários detergentes líquidos e sólidos.

Os compostos lipídicos causam danos ao meio ambiente, pois formam filmes de óleo nas superfícies aquáticas e impedem a difusão de oxigênio do ar para esse meio, promovendo a mortandade de peixes e outros seres aquáticos. Assim, para amenizar tais problemas, o uso de lipases com alta atividade hidrolítica diminui os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, possibilitando melhores condições de operação no tratamento de efluentes e na desobstrução de filmes de óleos em tubulações (MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI, 2002; MENDES et al., 2005).

Diversos microrganismos são empregados nesta atividade, diretamente ou por meio de suas enzimas hidrolíticas, tais como *Pseudomonas aeruginosa* (DHARMISTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998), *Yarrowia lipolytica* (DE FELICE, PONTECORVO e CARFAGNA, 1997), *Penicillium restrictum* (JUNG, CAMMAROTA e FREIRE, 2002), *Geotrichum candidum* (ASSES et al., 2009), *Aspergillus awamori*, (BASHEER et al., 2011) e *Candida rugosa* (MITA et al., 2010). Sendo assim, as lipases microbianas podem ser utilizadas para este fim isoladamente ou em complexos enzimáticos contendo outras hidrolases, tais como proteases, amilases e celulases; além disso, consórcios microbianos também podem ser empregados na remoção de óleos e gorduras de águas residuárias (MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI, 2002; CAIL, BARFORD e LICHACZ, 1986).

Trabalhos recentes nesta área buscam, além de novas fontes de lipases, maximizar sua produção em condições adequadas, como fizeram Roveda, Hemkemeier e Colla (2010), que isolaram fungos em efluentes de laticínios e avaliaram a produção de lipases pelas diferentes cepas por fermentação submersa, com o uso do próprio efluente, visando à seleção de enzimas com grande capacidade de degradar lipídeos, sendo que os gêneros bons produtores foram *Aspergillus* e *Penicillium*.

2.2.2. Reações de síntese.

Por serem regioseletivas, enantioseletivas e específicas por substratos, as lipases microbianas são muito eficientes na biossíntese de ésteres em meio orgânico mediante reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e interesterificação (SNELLMAN et al., 2002; GUPTA et al., 2003; RAJENDRAN, PALANISAMY e THANGAVELU, 2009). Na indústria de alimentos, estas lipases catalisadoras de síntese, são empregadas, principalmente, nas modificações estruturais de lipídios para produzir óleos e gorduras de valor nutricional (WILLIS, LENCKI e MARANGONI, 1998; JENNINGS e AKOH, 2001) e na formação de ésteres responsáveis por aromas e sabores (LIU, HOLLAND e CROW, 2004; TAN et al., 2011).

Os ésteres alifáticos de cadeia curta são compostos voláteis capazes de produzir aromas frutados agradáveis e estão entre os componentes mais importantes e versáteis dos sabores e fragrâncias naturais amplamente utilizados em alimentos, bebidas e cosméticos (MAHAPATRA et al., 2009; LARIOS et al., 2004). Tais compostos, por sua vez, podem ser extraídos de plantas ou sintetizados quimicamente (PRAPULLA, 1992;

SERRA, FUGANTI e BRENNNA, 2005). Contudo, a síntese enzimática pode ser uma alternativa interessante, pois as lipases geralmente são seletivas e atuam em condições moderadas de pressão e temperatura, quando comparadas com a catálise química (HARI KRISHNA et al., 2001).

Salah et al. (2007) estudaram a síntese de acetato de butila (aroma de abacaxi), mediada pela lipase de *Rhizopus oryzae*, e avaliaram diversas condições na reação de esterificação, alcançando um rendimento de 80% ao utilizar a lipase imobilizada e o heptano como solvente. Além disso, Liu, Holland e Crow (2004) reportaram que algumas lipases microbianas, como as de *Candida cylindracea* (YU, RIZVI e ZOLLWEG, 1992), *Candida deformans* (BOUTUR, DUBREUCQ e GALZY, 1995) e *Aeromonas hydrophila* (ROBERTSON, HILTON E BUCKLEV, 1992) podem catalisar a síntese de ésteres que dão sabor a produtos lácteos, por esterificação e/ou alcoólise em sistemas com baixa atividade de água.

A indústria farmacêutica também tem empregado lipases na separação de enantiômeros de misturas racêmicas para obter fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura destes (FABER, 2000; CARVALHO et al., 2005). Vários fármacos são comercializados em suas formas racêmicas e, muitas vezes, apenas um dos isômeros é biologicamente ativo ou mais ativo que o outro, tornando tais fármacos muito inferiores aos seus enantiômeros puros. Portanto, com o intuito de obter isômeros puros e aumentar a eficiência dos produtos farmacêuticos, muitos autores estão investindo nas lipases microbianas de alta especificidade, assim como Cardenas et al. (2001), que selecionaram lipases microbianas capazes de catalisar reações de esterificação, incluindo a separação da mistura racêmica (R, S) – ibuprofeno por esterificação estereoseletiva, e Kawakami et al. (2012) que aplicaram a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em sílica na separação dos isômeros (R, S)-1-phenylethanol por meio da reação de transesterificação.

Os ésteres alquílicos de ácidos graxos, conhecidos como biodiesel, também são produtos de reações de síntese catalisadas por lipases e comumente, a reação responsável pela sua produção é a transesterificação, que consiste num processo de intercâmbio de grupos acil entre um éster e um ácido (acidólise), entre um éster e outro éster (interesterificação) ou entre um éster e um álcool (alcoólise) (Figura 4) (AKOH et al., 2002). A transesterificação (alcoólise) química que utiliza bases como catalisadores

(NaOH, KOH, metóxido de sódio) é a mais empregada atualmente na produção do biodiesel. Entretanto, apesar do alto poder de conversão em curto período de tempo e a baixo custo, este método apresenta o inconveniente da formação de sabões que consome o catalisador, diminui o rendimento e dificulta o isolamento e purificação dos ésteres alquílicos de ácidos graxos (AKOH et al., 2007).

Diante de tais problemas, a obtenção de biodiesel via catálise enzimática, empregando lipases microbianas, é uma opção que oferece boas perspectivas sob o ponto de vista econômico e ambiental.

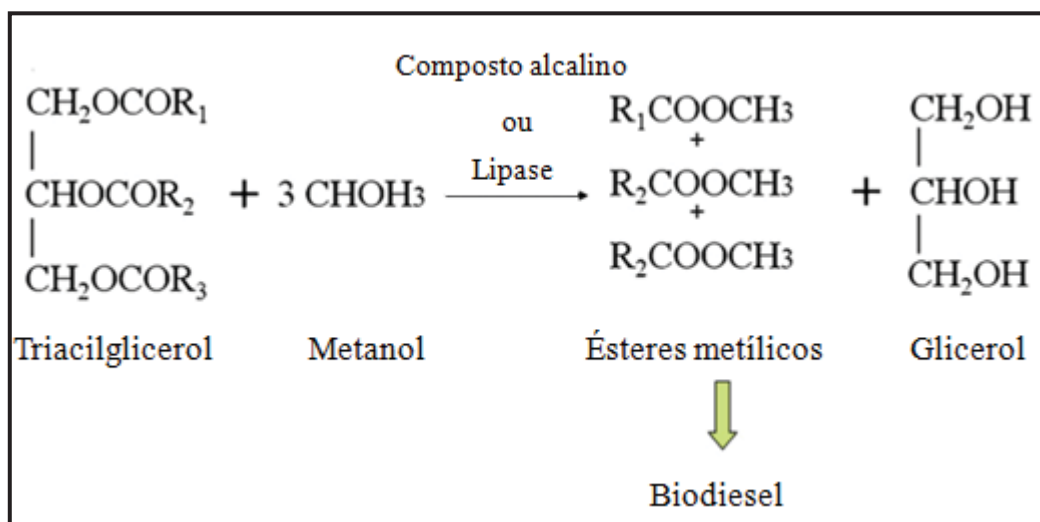


Figura 4. Mecanismo de reação para a produção do biodiesel. Óleos vegetais reagem com metanol na presença de uma base ou da lipase para produzir metil ésteres e glicerol (FUKUDA, KONDO e TAMALAMPUDI, 2009).

2.2.2.1. Produção enzimática do biodiesel.

A produção do biodiesel por transesterificação catalisada por lipases exibe várias vantagens, como a alta seletividade dessas enzimas, a menor demanda de energia durante a reação, a formação de resíduos tóxicos é reduzida, e, além disso, o glicerol produzido na reação é facilmente recuperado e o processo de purificação dos ésteres alquílicos é mais simples (AKOH et al., 2007; BAJAJ et al., 2010).

Apesar de todas essas considerações, o biodiesel enzimático enfrenta problemas com os preços elevados das enzimas comerciais utilizadas para a sua produção. Por isso, muitos pesquisadores estão estudando maneiras de reduzir estes custos, seja com a busca de novas enzimas e de métodos que levem a maiores rendimentos na produção

das mesmas, assim como a reutilização dos biocatalisadores. Diversas lipases microbianas estão sendo empregadas na síntese do biodiesel, como aquelas obtidas de *Mucor miehei* (AL-ZUHAIR et al., 2006), *Candida antarctica* (WATANABE et al., 2007), *Rhizopus chinensis* (QIN et al., 2008), *Burkholderia cepacia* (JEGANNATHAN et al., 2010), *Thermomyces lanuginosus* (DIZGE e KESKINLER, 2008; YÜCEL, 2011) e *Penicillium expansum* (ZHANG et al., 2011).

Nie et al. (2006) empregaram a lipase de *Candida* sp. imobilizada em membrana de algodão na produção de biodiesel metílico utilizando óleo residual e obtiveram rendimentos de até 92%. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi expressa em *Aspergillus* sp e utilizada na transesterificação entre etanol e óleo de palma para produzir ésteres etílicos de ácidos graxos (biodiesel), e apresentou, em suas condições ótimas de atividade, um rendimento máximo de 89,9% (RAITA, CHAMPREDA e LAOSIRIPOJANA, 2010). Rosset et al. (2011) investigaram a produção de biodiesel a partir do etanol e óleo de soja utilizando a lipase comercial imobilizada tipo B de *Candida antarctica*. Os autores obtiveram até 82,9% de rendimento em ésteres, em 24 horas a 32°C.

O uso combinado de duas lipases na produção do biodiesel também tem sido relatado em alguns trabalhos, como por exemplo, o de Guan et al. (2010), que expressaram duas lipases com diferentes especificidades, de *Rhizomucor miehei* e *Penicillium cyclopium*, em *Pichia pastoris* e observaram que com o uso de ambas as enzimas na reação, o rendimento passou de 68,5% para mais de 95%. Tongboriboon, Cheirsilp e H-Kittikun (2010) também aplicaram, em diferentes proporções, duas lipases comerciais, uma proveniente de *Pseudomonas fluorescens* (AK) e outra de *Candida rugosa* (AY), na síntese do biodiesel a partir do óleo de palma e alcançaram o maior rendimento quando ambas foram utilizadas em quantidades iguais. As lipases de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML) foram avaliadas da mesma forma na etanólise e hidrólise do óleo de soja, com um rendimento na transesterificação de 90%, nas melhores condições da reação (RODRIGUES e AYUB; 2011).

Existem vários fatores que influenciam a transesterificação enzimática, tais como o substrato utilizado (triacilglicerídeo e álcool), a razão molar entre os substratos, o conteúdo de água no meio reacional, o uso de solvente, a temperatura, se a enzima é livre ou imobilizada e a concentração da lipase (FREIRE, SOUSA e OLIVEIRA; 2011).

Considerando os álcoois como um dos substratos da lipase na transesterificação, aqueles de cadeias curtas, como o metanol, etanol, propanol e butanol, assim como os álcoois secundários, isopropanol e 2-butanol, podem ser empregados na produção do biodiesel por rota enzimática, no entanto, alguns pré-requisitos básicos devem ser levados em consideração na escolha do álcool para uso em escala industrial: ele deve ter baixo custo, ser disponível em grande quantidade e ser seguro no manuseio e de baixa toxicidade (FJERBAEK et al., 2009; FREIRE, SOUSA e OLIVEIRA; 2011)

O metanol é o álcool mais utilizado na produção do biodiesel devido as suas propriedades físico-químicas que facilitam a separação de fases, reatividade e baixo custo, porém, é uma substância tóxica com risco grande de explosão. Já o etanol, o segundo álcool mais empregado na transesterificação, tem baixa toxicidade se comparado ao metanol e, no Brasil, apresenta maior disponibilidade e menor custo (LEUNG, WU e LEUNG, 2010; STAMENKOVIC, VELICKOVIC e VELJKOVIC, 2011;).

Os tipos de triglicerídeos também influenciam as reações de transesterificação enzimática, visto que a lipase pode apresentar especificidade pelo comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo. Tem sido empregados diferentes tipos de óleos vegetais para esse fim, desde os comestíveis, como o óleo de palma (ou óleo de dendê) (RAITA, CHAMPREDA e LAOSIRIPOJANA; 2010), óleo de soja (LI, DU e LIU, 2007), óleo de canola (DIZGE, KESKINLER e TANRISEVEN, 2009), óleo de girassol (OGNJANOVIC, BEZBRADICA e KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009) aos não comestíveis, como o de pinhão manso (SHAH e GUPTA, 2007), óleos residuais de frituras (MACEIRAS et al., 2009), o sebo bovino (DA RÓS et al., 2011) e mais recentemente, óleos produzidos por microalgas (TRAN et al., 2012).

A razão molar óleo/álcool, assim como a presença ou ausência de um co-solvente são fatores importantes que determinam as taxas de conversão aos ésteres, visto que o excesso de álcool pode inibir a atividade da enzima. Uma das soluções para este problema é a adição de solventes orgânicos, que também melhoram a solubilidade dos triglicerídeos e alcoóis. (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; GOG et al., 2012).

Maceiras e colaboradores (2009) ao trabalharem com a lipase comercial Novozym 435, observaram um aumento de 40% no rendimento de metil ésteres quando a razão molar metanol/óleo residual, do meio reacional, passou de 1:1 para 25:1. Foi observado ainda, que uma razão molar acima de 25:1 diminuiu o rendimento,

provavelmente devido à inativação da enzima pelo álcool. Utilizando a lipase da cepa *Pseudomonas cepacia* G63, óleo da planta “pau de sebo” e metanol, Li e Yan (2010) reportaram como condições ótimas de reação para a síntese do biodiesel uma razão molar 4:1 (metanol/óleo), sendo que acima desta concentração houve um decréscimo no rendimento.

Com relação à presença de solventes orgânicos, Liu et al. (2010) avaliaram seis álcoois primários (metanol, etanol, propanol, isopropanol, isobutanol e álcool isoamílico), na ausência de solvente e em meio contendo tert-butanol, no rendimento da transesterificação enzimática catalisada por três lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme TLIM and Lipozyme RMIM). Esses autores observaram que para a metanólise, na presença do solvente tert-butanol, independentemente do tipo de lipase, a conversão foi maior do que em meio sem o solvente. Segundo Halim e Kamaruddin (2008), isso ocorre porque o terc-butanol elimina os efeitos negativos do metanol e do glicerol sobre as lipases, uma vez que o glicerol cria uma camada hidrofílica ao redor da enzima, limitando a difusão do substrato hidrofóbico ao sítio ativo (DOSSAT, COMBES e MARTYS; 1999).

2.3. Uso de lipases associadas às células para produção enzimática do biodiesel.

A forma imobilizada da lipase é a mais adequada para a produção contínua do biodiesel, visto que facilita sua recuperação do meio reacional, no entanto, o principal obstáculo para a sua utilização é o custo elevado dos processos de extração e purificação e da matriz de imobilização dessas enzimas (BAN et al., 2001; ZENG et al., 2006; SUN et al., 2010). Para contornar tais problemas, as lipases associadas à parede ou membrana das células, que são sintetizadas e imobilizadas espontaneamente durante o cultivo dos microrganismos em suportes sintéticos ou naturais, podem ser utilizadas como biocatalisadores na síntese do biodiesel (Figura 5) (ODA et al., 2005; FUKUDA et al., 2008; JIM e BIERMA, 2010).

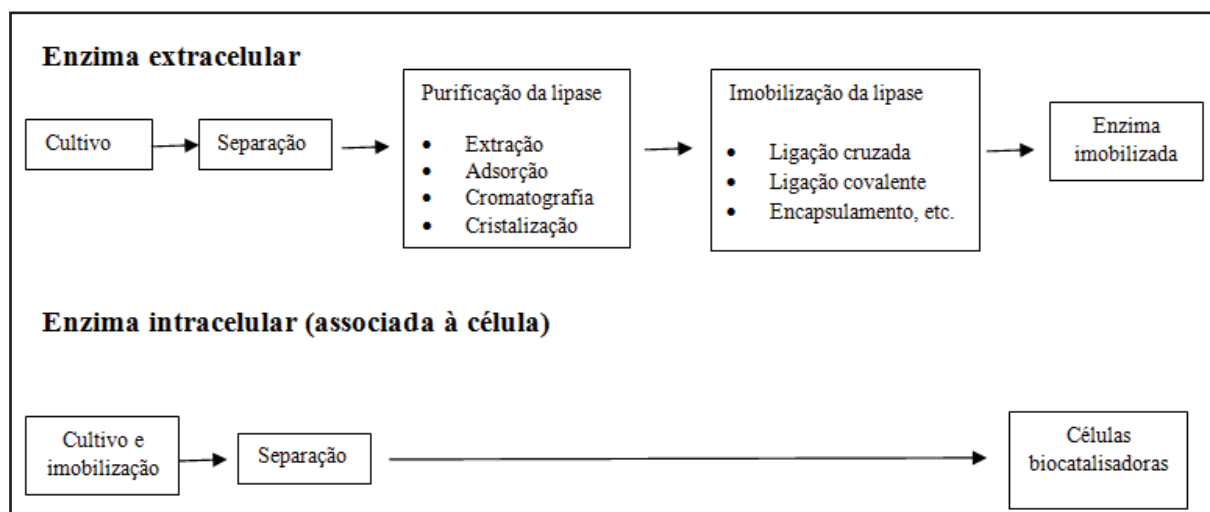


Figura 5. Comparação do processo de produção e imobilização de lipase extracelular e intracelular (Adaptado de Fukuda et al., 2001).

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais empregados na biocatálise celular (enzimas associadas às células) para a produção do biodiesel (FUKUDA et al. 2008) e vários suportes podem ser utilizados na imobilização das hifas, como espuma de poliuretano, náilon, poliéster, aço inoxidável, celulose e bucha vegetal (NAKASHIMA et al., 1990; BAN et al., 2002, ZENG et al., 2006; FERRAREZI, 2010).

Oda et al. (2005) imobilizaram micélio de *Rhizopus oryzae*, durante seu cultivo, em espuma de poliuretano, o qual foi utilizado para produção de biodiesel via metanólise do óleo de soja. Sun et al. (2010) cultivaram *Rhizopus oryzae* em meio contendo óleos de soja, de palma e de oliva, utilizando também espuma de poliuretano como suporte e observaram que o desempenho catalítico das hifas imobilizadas nessa matriz variou pouco em relação aos diferentes óleos utilizados. Qin et al. (2008), ao comparar lipases associadas às células de *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 obtiveram rendimentos maiores que 86% na transesterificação de óleo de soja em sistema livre de solvente.

Outro método de imobilização de lipases associadas às células de fungos filamentosos é aquele que utiliza como suporte os resíduos agroindustriais em processo de fermentação em estado sólido. O microrganismo desenvolve-se sobre o substrato sólido e é induzido a produzir lipases por indutores acrescentados ao meio e à biomassa, e aderido a esse material pode ser empregado diretamente na reação de transesterificação ou esterificação (FERNANDES et al., 2007; OHE, 2011). Fernandes

et al. (2007) utilizaram o substrato sólido fermentado com a bactéria *Burkholderia cepacia* em reações de esterificação e transesterificação, obtendo 94% e 95% de rendimento de ésteres, respectivamente. O arroz, a farinha de milho, a farinha de trigo, a cevada, a aveia, o farelo de trigo, o farelo de arroz, a casca de trigo e a soja em pó foram testados como substratos e suporte no cultivo e imobilização de lipases de *Rhizopus chinensis* por Sun e Xu et al. (2008); o farelo e a farinha de trigo foram os melhores substratos, com atividade esterificante de $1500 \text{ U} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de substrato.

2.4. Fermentação em estado sólido (FES) na produção de lipases microbianas.

Diversos parâmetros devem ser considerados quando se visa à produção de enzimas, sendo os principais, as fontes de carbono e de macro e micronutrientes, como o nitrogênio; os parâmetros físico-químicos e o tipo de processo fermentativo, seja fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSS).

A fermentação em estado sólido (FES) é um método de cultivo de microrganismos que pode utilizar resíduos agroindustriais como substrato e também como suporte para as células (PANDEY, 2003). Além de agregar valor ao resíduo, reduz o impacto ambiental causado pelo descarte do mesmo e reduz o custo de produção da enzima. Diferentes tipos de resíduos têm sido aproveitados para a produção de lipase, como aqueles gerados na extração de óleos (torta de soja, torta de babaçu), resíduos fibrosos ou na forma de farelos (bagaço de cana, farelo de soja, farelo de trigo) (SALIHU et al., 2012). Embora contenham nutrientes e/ou indutores das enzimas, como no caso de resíduos da extração de óleo, estes podem estar em concentrações sub-ótimas necessitando de suplementação (PANDEY et al., 1999; SALIHU et al., 2012).

Damaso et al. (2008) utilizaram farelo de trigo e sabugo de milho na produção de lipase por *Aspergillus niger* 11T53A14, por meio de fermentação sólida utilizando como substrato sub-produtos do refino do óleo de milho suplementados com óleo de oliva em diferentes concentrações. A melhor atividade de lipase hidrolítica ($62,7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) foi obtida com o farelo de trigo e borra, um sub-produto do óleo de milho. Shukla, Bhagat e Shrivastava (2011) usaram diferentes resíduos da extração de óleo (torta de pinhão manso, torta de linhaça, torta de mostarda e torta de amendoim) como substrato para FES visando à produção de lipase extracelular pelo fungo *Rhizopus oryzae* KG-10 e alcançaram a maior atividade hidrolítica ($170 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) com a torta do óleo de mostarda.

Óleos e gorduras são essenciais para a produção de lipases, no entanto, outras fontes de carbono e fontes de nitrogênio podem ser adicionadas ao substrato sólido para complementar os nutrientes. Gutarra et al. (2005) cultivaram *Penicillium simplicissimum* em torta de babaçu e conseguiram atividades de lipases de $20 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ com suplementação desse substrato com óleo de oliva ou com melaço de cana de açúcar. Falony et al. (2006) avaliaram a síntese de lipases por *Aspergillus niger* em FES utilizando farelo de trigo suplementado com óleo de oliva, glicose, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_2CONH_2 . Azeredo et al. (2007) investigaram o efeito de diferentes fontes de carbono (óleo de babaçu, óleo de oliva, ácido oleico, tributirina, amido ou glicose) na produção de lipases por *Penicillium restrictum*, utilizando torta de babaçu como material sólido na FES. A melhor atividade foi obtida com a adição do óleo de oliva à torta de babaçu ($17,4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$). Balaji e Ebenezer (2008) suplementaram com diferentes fontes de carbono, de nitrogênio e co-indutores a torta do óleo de pongamia e a torta de coco para a produção de lipases pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, obtendo os melhores resultados com a xilose como fonte de carbono complementar, com a peptona e o óleo de girassol como fonte de nitrogênio e co-indutor, respectivamente, quando a torta de pongamia foi utilizada como suporte na FES.

Outra maneira de suprir as necessidades nutricionais dos microrganismos por meio da FES para a produção de lipases é a mistura de diferentes substratos em diferentes proporções com ou sem adição de suplementos. Um dos trabalhos pioneiros na mistura de substratos foi o de Cordova et al. (1998), que testou o bagaço de cana-de-açúcar como único substrato ou misturado com torta de óleo de oliva na produção de lipase pelos fungos *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* em FES, alcançando atividades de $79,6 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ para *Rhizopus rhizopodiformis* e $20,24 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ para *Rhizomucor pusillus*.

Mala et al. (2007) ao adicionar torta do óleo de gergelim ao farelo de trigo, numa proporção de 3:1(m/m), conseguiram, em 72 horas de FES a 30°C , um aumento de 36% na atividade da lipase de *Aspergillus niger* MTCC2594, que foi de $384,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. Diante de resultados positivos com a mistura de resíduos agroindustriais na FES alguns trabalhos mais recentes já estão utilizando até três substratos diferentes, um processo denominado fermentação tri-substratos (FTS) (EDWINOLIVER et al., 2010).

Com base nos trabalhos foram obtidos bons resultados testando diferentes condições nutricionais para a produção de lipases microbianas. Contudo, a grande

maioria é relativa às lipases com atividade hidrolítica, sendo poucos os trabalhos encontrados que avaliam estes fatores nutricionais na produção de lipases que catalisam a síntese de ésteres a partir de triglicerídeos (lipases com atividades de transesterificação e esterificação). Um desses trabalhos foi o de Sun e Xu (2008), que avaliou a produção da lipase com capacidade de sintetizar ésteres pelo fungo *Rhizopus chinensis*, variando diversos parâmetros na FES, como o tipo de substratos sólido, a umidade inicial, o pH inicial do meio, a suplementação adicional de nitrogênio e a adição de óleo como indutor. A atividade sintetizante máxima foi obtida com a mistura de farelo de trigo e farinha de trigo (2:3) com umidade de 70%, pH inicial de 6,5, peptona como fonte adicional de nitrogênio a 2% e óleo de oliva a 2% como indutor.

Pelo exposto, o uso de lipases específicas nas reações de transesterificação para a produção de biodiesel pode ser uma alternativa tecnológica interessante desde que haja viabilidade de custo de produção e aplicação da enzima. Assim, o presente estudo buscou a seleção de cepas capazes de produzir lipases com atividade de transesterificação em meio de baixo custo e sua aplicação em forma livre e associada às hifas.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo geral.

Este trabalho teve como objetivo geral, o isolamento e a seleção de fungos filamentosos produtores de lipases capazes de catalisar reações de transesterificação para a produção de biodiesel por catálise enzimática.

3.2. Objetivos específicos.

- Selecionar cepas fúngicas produtoras de lipases com atividade de transesterificação.
- Selecionar substratos à base de resíduos agroindustriais que possibilitem a produção de enzimas pela linhagem selecionada por fermentação em estado sólido.
- Avaliar o efeito da adição de nutrientes minerais e diferentes tipos de óleos ao substrato sobre a produção das enzimas.
- Aplicar as enzimas livres e imobilizadas na transesterificação de óleos e identificar os ésteres formados.

4. Materiais e Métodos

4.1. Meio de Cultura

4.1.1 Meio líquido para isolamento das linhagens fúngicas.

Para o isolamento das linhagens fúngicas utilizou-se três meios nutrientes modificados (CASTRO - OCHOA et al., 2005) compostos por (% m/v): 0,1 peptona; 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 KH_2PO_4 ; 0,05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 óleo de canola; 0,1 de emulsificante (Tween 80); 0,5 de solução de elementos traços (2,2% de $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,1% de H_3BO_3 ; 0,5% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16% de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,16% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11% de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 5% de EDTA), pH 6,0.

Uma solução de antibiótico contendo ampicilina e clorafenicol foi adicionada ao meio (concentração de $0,1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) para prevenir crescimento bacteriano.

Foi também utilizado para o cultivo dos fungos, meio de aveia composto por aveia em flocos suspensos em água destilada numa concentração de $0,02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.1.2. Meio sólido para o isolamento das culturas.

Para a obtenção das culturas puras utilizou-se o meio nutriente descrito no item 4.1.1 acrescentado de 3% de Agar.

4.2. Coletas das amostras para isolamento dos fungos.

As coletas foram realizadas em caixas de gordura de duas residências, uma localizada em São José do Rio Preto/SP e outra em Ilha Solteira/SP, em sementes oleaginosas (*Pachira aquatica*) e na estação de tratamento de resíduos de curtume Sebo Sol, situada na cidade de São José do Rio Preto/SP. As coordenadas dos locais de coleta estão apresentadas na seção resultados e discussão.

As amostras foram transferidas para frascos contendo 20 mL do meio nutriente descritos (4.1.1) previamente esterilizados em autoclave a 121°C e 20 min. Cada amostra coletada foi dividida em três partes e inoculada em meios contendo fontes de carbono diferentes ($0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$): óleo de canola, glicose, glicose e óleo de canola (item 4.1.1).

No laboratório, os frascos foram incubados a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, e as amostras transferidas, por meio de estrias, para placas de Petri contendo meio sólido (4.1.2). Após o surgimento das colônias, as mesmas foram separadas com base no aspecto do micélio, cor de esporos e em outras características do reverso das colônias, sendo re-inoculadas até obtenção das culturas puras.

Os fungos isolados foram codificados segundo respectivo meio no qual foram isolados. Assim, os fungos com código G foram isolados em meio contendo glicose, O contendo óleo e OG contendo óleo e glicose.

4.4. Identificação das cepas.

4.4.1. Extração do DNA.

A fim de se obter quantidades suficientes de micélio para a extração de DNA, os isolados foram repicados para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL meio de aveia e mantidos por sete dias a 30°C . Para a separação do micélio do meio de cultura, foram utilizadas peneiras de cozinha com trama em torno de 1 mm. Ainda na peneira, o micélio foi lavado com água destilada, escorrido e colocado para secar em placas de Petri, em temperatura ambiente por cerca de 12 horas. Posteriormente, o micélio seco foi macerado em nitrogênio líquido até a formação de um pó, que foi transferido para tubos eppendorf de 2,0 mL.

Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Kuramae-Izioka (1997), com modificações, que permitiu a obtenção de DNA em maior quantidade e qualidade. Assim, foram acrescentados 800 μL de tampão de extração [Tris-HCl 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0, EDTA 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.0 e SDS 0,5% (em massa)] a um tubo eppendorf de 2,0 mL contendo 0,1 g de micélio macerado. Após agitados, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 min. e agitados, suavemente, a cada 10 min. Posteriormente, foram acrescentados 400 μL de acetato de potássio a 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, misturando-se a solução por inversão, a qual foi mantida em banho de gelo por 30 min., invertendo-se os tubos a cada 10 min. Após as amostras terem sido centrifugadas a $15294 \times g$ por 10 min., a 15°C , o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf, sendo acrescentados 700 μL de mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi homogeneizada por inversão durante dois minutos e centrifugada a $15294 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf, e novamente, tratado com mistura

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sob as mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf, e acrescentou-se 15 µL de RNase (10 mg·mL⁻¹) e mantidos em banho-maria a 37°C por 60 min. Posteriormente, foram acrescentados 1000 µL de etanol absoluto gelado e a solução, após ser misturada gentilmente, foi levada ao freezer -20°C *overnight*.

Após a precipitação do DNA em etanol, os tubos foram centrifugados a 15294 x g por 20 min. A fase líquida foi descartada e o pellet foi lavado com 1000 µL de etanol 70% (v·v⁻¹). Após a centrifugação, sob as mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco à temperatura ambiente (±25°C). Posteriormente, o pellet foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mmol·L⁻¹ pH 8,0; EDTA 1 mmol·L⁻¹ pH 8,0) por 24 horas a 4°C. A avaliação da quantidade do DNA e da sua qualidade foi realizada pela medida das absorbâncias a 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop-100 (Uniscience). As amostras com relação da absorbância 260/280 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m·v⁻¹), contendo brometo de etídio (0,5 µg·mL⁻¹) e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas) para completar a verificação da qualidade do DNA. O gel foi observado sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC 1000 (BioRad).

As amostras de DNA com qualidade adequada foram submetidas a PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) empregando-se os *primers* ITS4 (5'CCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') que amplificam as zonas variáveis e intergênicas (ITS1 e ITS2) do gene 5.8S do DNAr (DNA ribossômico) (WHITE *et al.*, 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com volume final de 50 µL contendo 1U de *DNA Taq polimerase* (Fermentas), 0,1 µmol·L⁻¹ de cada *primer*, 0,1mmol·L⁻¹ de cada DNTP, 1x tampão de reação, 2mmol·L⁻¹ MgCl₂ e 10-50ng de DNA genômico como “*template*”. As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador *GeneAmp 2400 PCR System*, sob ciclagem 94°C/3min; 35 ciclos (94°C/1min; 52°C/1min; 72°C/2min); 4°C. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

4.4.2. Sequenciamento das amostras.

Os amplificados obtidos pela técnica de PCR foram sequenciados para a região ITS-5,8S. Purificou-se os amplicons usando kit *GenElute PCR* (Invitrogen). Após a purificação, os produtos de PCR passaram por sequenciamento com *primer “forward”*

ITS5 e/ou o *primer* reverso ITS4 usando kit *ABI BigDye terminator cycle sequencing* em um sequenciador ABI PRISM 377. As seqüências ITS1-5,8S-ITS2 obtidas foram alinhadas com programa *Biedit (Biological Sequence Alignment Editor)* e comparadas com as seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e também com *CBS Yeast Database* (<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSSequences.aspx>). Sequências com 98% de similaridade nucleotídica ou superior com a região ITS-5,8S DNAr foram consideradas como sendo da mesma espécie, sempre contando com a confirmação morfológica.

4.5. Estocagem da coleção fúngica de trabalho.

As culturas purificadas foram cultivadas em meio Ágar Batata Dextrose, que foi preparado segundo as instruções do fabricante (Himedia Laboratórios PVT, LTD) em tubos de cultura. Após o crescimento, foram adicionados água destilada e óleo mineral estéreis para a conservação e armazenamento das culturas, a 4°C. As cepas também foram armazenadas em criotubos contendo solução de glicerol 20% a -80°C.

4.6. Fermentação em estado sólido (FES).

O cultivo para a obtenção do inóculo a ser usado para a fermentação em estado sólido foi feito em erlenmeyer de 250 mL, contendo meio nutriente sólido inclinado modificado citado no item 4.1.2, porém contendo 2,0% (em volume) de óleo de canola. Após a miceliação e esporulação, os esporos ou micélio foram suspensos em 100 mL de uma solução nutriente composta por 2,0g de peptona, 0,2g de K₂HPO₄, 0,05g de MgSO₄.7H₂O e 2,0 mL de óleo de canola a qual foi utilizada para inocular o substrato da FES.

Os cultivos por FES foram realizados em embalagens de polipropileno (26,5 cm x 15 cm), contendo 10,0g de mistura de bagaço de cana-de-açúcar (fornecido pela Usina de açúcar e álcool Cruz Alta localizada no município de Olímpia/SP) e farelo de soja numa proporção de 9:1 (BS 9:1). Essa embalagem foi vedada com tubo PVC e rolha de algodão (Figura 6). O material foi inoculado com a suspensão de esporos/micélio na proporção de 2,0 mL por grama de substrato. O substrato apresentou umidade de 70%, a

qual foi determinada por meio de peso seco a 100°C. A incubação foi feita em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96 horas.



Figura 6. Embalagens de polipropileno utilizados na fermentação sólida.

A partir desse processo básico, foram testadas as modificações nas condições de fermentação como descrito abaixo:

- a) Tipos de substratos e suas misturas em diferentes proporções: bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja, nas proporções 9:1, 1:1 e 1:9 (BS); torta de algodão sem a adição de óleo (A), torta de algodão com óleo de canola (AO) e torta de algodão e farelo de soja nas proporções 9:1, 1:1 e 1:9. (AS).
- b) Tipos de soluções nutrientes utilizadas com diferentes fontes de nitrogênio e concentrações de óleo: Peptona (0,04g/g substrato), Ureia (0,01g/g substrato) e NH_4NO_3 (0,014g/g substrato) com 0,02 mL, 0,04 mL e 0,08 mL de óleo de canola para cada grama de substrato.

Para a extração das enzimas, foram adicionados 100 mL de água destilada ao material fermentado, o qual foi homogeneizado e mantido sob agitação em shaker, a 50 rpm, por 30 min., filtrado e centrifugado a 10.000 xg durante 15 min., a 5°C. O

sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Cerca de 4 mL da solução enzimática foi separada para a determinação de atividade de hidrólise e 80 mL foi liofilizado (Thermo Scientific RVT 4104) para as reações de transesterificação.

4.7. Imobilização de hifas para a síntese do biodiesel.

Foi considerado como micélio imobilizado, o material fermentado contendo hifas e substrato oriundos da FES (item 4.6). Após 72 horas de fermentação a 30°C os sólidos fermentados foram retirados sob assepsia (em câmara de fluxo laminar), liofilizados e usados na reação enzimática.

4.8. Determinação da atividade enzimática.

4.8.1. Quantificação da atividade de lipase por hidrólise de substrato cromogênico.

Este método de hidrólise foi proposto por Winkler e Stuckmann (1979) e modificado por Krieger (1995) utilizando-se o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato. Foram preparadas duas soluções, sendo 1 mL da solução A (*p*-NPP em isopropanol na concentração de 3 mg·mL⁻¹) misturada a 9 mL da solução B (2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol·L⁻¹, pH 7,0) lentamente sob contínua agitação. A mistura de reação constou de 0,9 mL da mistura de soluções (A e B) e 0,1 mL da solução enzimática bruta e a incubação ocorreu a 35°C por 1 min. O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS Cary 100 Varian, a 410 nm. Como branco, utilizou-se 0,9 mL da mistura de soluções preparada (A + B) + 0,1 mL de água destilada.

Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol *p*-NP (*p*-nitrofenol) por minuto, nas condições de ensaio. O coeficiente de absortividade molar do *p*-NP utilizado foi de 8x10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹ (LIMA et al., 2004). Para o cálculo da atividade de hidrólise lipolítica seguiu-se a seguinte Equação 1:

$$\text{Atividade hidrolítica (U·mL}^{-1}\text{)} = \left\{ \left(\frac{\text{Abs} \times V_t}{\epsilon \times V_{enz} \times t} \right) \times 10^3 \right\} \times D$$

Equação 1

Onde:

U = Unidade de atividade enzimática que é expressa em U·mL⁻¹;

Abs = Absorbância da amostra a 410 nm;

V_t = Volume total da reação (mL);

ϵ = Coeficiente de absorvidade molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);
 V_{enz} = Volume da amostra enzimática (mL);
 T = Tempo de incubação (min.);
 10^3 = Fator de correção da unidade de ϵ ;
 D = Diluição da amostra, se houver.

4.8.2. Quantificação da atividade de lipase hidrolítica por titulometria.

Para quantificar a atividade hidrolítica por titulometria foi utilizada a metodologia de Soares et al. (1999) que foi adaptada para este trabalho. Em Erlenmeyer de 50 mL, foram pesados 0,09 g de goma arábica que foi dissolvida em 3 mL de água destilada, 4 mL de tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7 e 1 mL de óleo de canola. A essa mistura reacional foi adicionado 1 mL da solução enzimática bruta e incubado a 35°C , sob agitação de 150 rpm, por 30 min. A reação foi interrompida com 10 mL de solução 1:1 ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) de acetona:álcool etílico anidro e titulada com solução NaOH $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ padronizada, até pH 8.

O cálculo para determinar a atividade foi com a seguinte Equação 2:

$$\text{Atividade hidrolítica (U} \cdot \text{mL}^{-1}\text{)} = \frac{(V_{\text{NaOH amostra}} - V_{\text{NaOH controle}}) \times M \times 1000}{V_{\text{amostra}} \times t}$$

Equação 2

Onde:

$V_{\text{NaOH amostra}}$ = Volume de base titulada na amostra (mL);
 $V_{\text{NaOH controle}}$ = Volume de base titulada no controle (mL);
 M = Molaridade de NaOH usada ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
 V_{amostra} = Volume da amostra (mL);
 t = Tempo de incubação (min).

A atividade foi expressa em $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e definida como quantidade de enzima necessária para liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

4.9. Ensaio para a determinação da transesterificação.

Para a seleção dos microrganismos produtores de lipases com atividade de transesterificação, foi feito um ensaio padrão de transesterificação no qual foram

utilizados óleo de soja e álcool etílico anidro, na razão molar 1:6 de óleo:álcool e solução enzimática bruta liofilizada na proporção de 100 µg por mg de mistura reacional (peso total da mistura foi de 5 g). A reação ocorreu a 37°C, sob agitação de 150 rpm. O solvente utilizado na reação foi o n-hexano na proporção de 1,2 mL por grama de mistura reacional. Após 96 horas de incubação, o produto da reação foi filtrado a vácuo para retirada dos sólidos insolúveis e submetido à remoção do n-hexano em evaporador rotativo. As amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa (CG-FID).

Para as determinações das atividades enzimáticas provenientes dos ensaios de seleção dos substratos e de fontes de nitrogênio foram utilizados 200 µg de solução enzimática bruta liofilizada ou de micélio imobilizado, por mg de mistura reacional

4.10. Quantificação dos ésteres etílicos.

A quantificação dos ésteres etílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (GC-FID). 1 µL de cada amostra foi injetado em um Cromatógrafo HP 5890 serie II, usando o software Chromeleon. A coluna utilizada foi a SPB-35 (SUPELCO). A temperatura da corrida foi de 160 a 180°C, mantendo uma taxa de aquecimento 4°C por min., e de 180 a 235°C a 6°C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, utilizando-se o gás nitrogênio como carreador (TORRES, et al. 2007; SHAH et al., 2004). A curva de calibração foi construída utilizando os ésteres linoleato de etila, linolenato de etila, oleato de etila e palmitato de etila (Sigma-Aldrich), com pureza acima de 98%.

Para o cálculo do rendimento da síntese do biodiesel foi utilizada a seguinte Equação 3:

$$R = \left(\frac{M_{e \text{ amostra}}}{M_0} \right) \times 100$$

Equação 3

Onde:

R = rendimento em g de ésteres · 100g⁻¹ de óleo;

M_{e amostra} = massa do éster etílico da amostra e

M₀ - massa do óleo utilizado na reação.

Para o cálculo da M_{e amostra} foi aplicada a Equação 4:

$$M_{e \text{ amostra}} = \left[\sum A_i \times M_{Mi} \right] \times D$$

Equação 4

Onde:

A_i = Concentrações de ésteres etílicos da amostra ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);

D = Diluição da amostra;

MMi = Massa molar de cada etil éster.

4.11. Zimogramas de atividade

Para esses ensaios, avaliou-se a possibilidade da existência de lipases associadas às hifas, as quais foram extraídas seguindo o método descrito por Hama et al. (2006) com algumas modificações. 50 mg de substrato com as hifas imobilizadas foram congelados em freezer -80°C , overnight e posteriormente, triturados com um bastão de vidro, suspensos em 200 μL de tampão Tris-HCl a $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,5 e centrifugadas a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à agitação em 200 μL de uma solução de triton x-100 1% a 30°C por 20 horas para liberar as enzimas associadas à biomassa (parede e/ou membrana).

4.11.1. Zimograma baseado na atividade de hidrólise.

Foi realizado um zimograma SDS-PAGE, utilizando um gel de poliacrilamida a 13% e um gel de empilhamento a 5%, utilizando tampão de corrida tris-glicina pH8,8 (sem SDS). As amostras foram misturadas numa razão 1:1($v \cdot v^{-1}$) com um tampão de amostra composto por tampão Tris/HCl a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8,0, glicerol a 20%, azul de bromofenol e água ultrapura. Aliquota de 20 μL dessa mistura foi aplicada no gel. Após a corrida, o gel foi lavado com tampão Tris/HCl pH 8,0 contendo 2,5% de triton x-100, por 30 min.

Para a detecção de lipases hidrolíticas o gel foi previamente equilibrado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 7,0 por 30 min e posteriormente incubado na solução contendo α - e β naftil acetato e corante fast blue, até o surgimento das bandas.

4.11.2. Zimograma baseado na atividade de esterificação.

Esta metodologia foi modificada a partir do trabalho de Known et al. (2011). Foi utilizado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 13% e gel de empilhamento a 5%, as amostras foram aplicadas nas mesmas condições citadas no item 4.11.1. Posteriormente

à corrida, o gel foi lavado com duas soluções tampão Tris/HCl a $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH8,0, uma contendo 2,5% e outra contendo 1% de triton x-100. O gel também foi submetido a uma lavagem com 2-propanol a 20% por 20 min. e equilibrado no tampão Tris/HCl a $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ por 10 min. Para a detecção das lipases com atividade de esterificação o gel foi incubado por 24 horas a 30°C em uma solução contendo ácido oleico ($1,5\% \text{ v}\cdot\text{v}^{-1}$) e dodecanol ($1,5\% \text{ v}\cdot\text{v}^{-1}$) emulsificados em tampão Tris/HCl a $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH8,0.

A presença da enzima foi verificada pela formação de uma banda com precipitado de coloração branca que corresponde à precipitação do éster formado.

4.12. Modelo experimental para a determinação das melhores condições na reação de transesterificação.

Para determinar as condições de maior produção de biodiesel por meio da transesterificação foi utilizado o modelo experimental Box–Behnken. Foram investigados os efeitos da razão molar óleo:etanol, proporção de micélio imobilizado ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e o volume de n-hexano ($\text{mL}/10\text{g}$ de mistura reacional), sendo que o tempo de reação permaneceu em 96 horas. As reações enzimáticas e o rendimento de etil ésteres de ácidos graxos foram determinados de acordo com o item 4.10.

A Tabela 1 mostra o delineamento experimental e os níveis das variáveis independentes usadas no estudo. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software MINITAB 16.0 e os rendimentos de ésteres etílicos foram correlacionados com as variáveis testadas por meio de um modelo completo quadrático.

Tabela 1. Variáveis independentes e os níveis aplicados no planejamento experimental.

Variáveis	Código	Faixas e Níveis		
		-1	0	1
Razão molar óleo:etanol	O:E	1:3	1:6	1:9
Temperatura (°C)	T	30	37	44
Volume de n-hexano (mL·10g mistura ⁻¹)	VH	4	12	21
Proporção do micélio imobilizado no meio reacional (µg·mg ⁻¹)	MI	100	150	200

5. Resultados e discussão.

5.1. Seleção dos fungos filamentosos.

Foram testadas 20 cepas (Tabela 2), sendo que 14 foram isoladas neste trabalho e as outras 6 linhagens, faziam parte da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP de São José do Rio Preto. Dessas, apenas as linhagens ROG2.1.9 e ID7 apresentaram atividades lipolítica e de transesterificação, as quais foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 e o *Fusarium* sp. ID7 (Figuras 7 e 8) e utilizadas na continuidade ao trabalho.

A identificação em nível de espécie, utilizando a sequência do gene 5,8S-ITS, para as duas linhagens não foi possível, visto que o alinhamento das sequências não permitiu ir além da caracterização em nível de gênero. Essa identificação será retomada tomando por base dados morfológicos, fisiológicos e biológicos.

A reprodução dos ensaios com essas duas cepas mostrou que a linhagem *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 produziu lipase que levou a um rendimento de transesterificação de 1,5 g de ésteres·100 g⁻¹ de óleo de soja, quase três vezes mais que a linhagem de *Fusarium* sp. ID7 (Tabela 3).

Tabela 2. Atividades lipolítica e de transesterificação das cepas isoladas

Cepas	Local de coleta	Material da amostra	Transesterificação	Hidrólise
RG1.1.2	Ilha Solteira 20°25'59.09''S 51°21'03.18''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
ROG2.1.5	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
ROG2.1.6	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
ROG2.1.7	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
ROG2.1.8	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
ROG2.1.9	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	+	0,83 U·mL ⁻¹
ROG4.3.11	São José do Rio Preto 20°47'09.33''S 49°21'33.09''O	Semente de <i>Pachira aquatica</i>	-	n.d
ROG4.3.12	São José do Rio Preto 20°47'09.33''S 49°21'33.09''O	Semente de <i>Pachira aquatica</i>	-	n.d
ROG5.4.14	São José do Rio Preto (Sebo Sol) 20°44'03.05''S 49°20'32.21''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
RO2.1.3	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
RO2.1.5	São José do Rio Preto 20°48'57.57''S 49°20'24.65''O	Resíduo de caixa de gordura doméstica	-	n.d
RO4.3.9	São José do Rio Preto (UNESP) 20°47'09.33''S 49°21'33.09''O	Semente de <i>Pachira aquatica</i>	-	n.d
RO4.3.10	São José do Rio Preto 20°47'09.33''S 49°21'33.09''O	Semente de <i>Pachira aquatica</i>	-	n.d
RO5.4.11	São José do Rio Preto (Sebo Sol) 20°44'03.05''S 49°20'32.21''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d
ID1	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d
ID2	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d
ID6	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d
ID7	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	+	0,58 U·mL ⁻¹
ID8	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d
ID10	São José do Rio Preto 20°49'08.80''S 49°22'45.08''O	Resíduo da estação de tratamento de curtume.	-	n.d

n.d – Não determinado



Acremonium sp.

Fusarium sp.

Figura 7. Cepas selecionadas e identificadas como pertencentes aos gêneros *Acremonium* e *Fusarium*

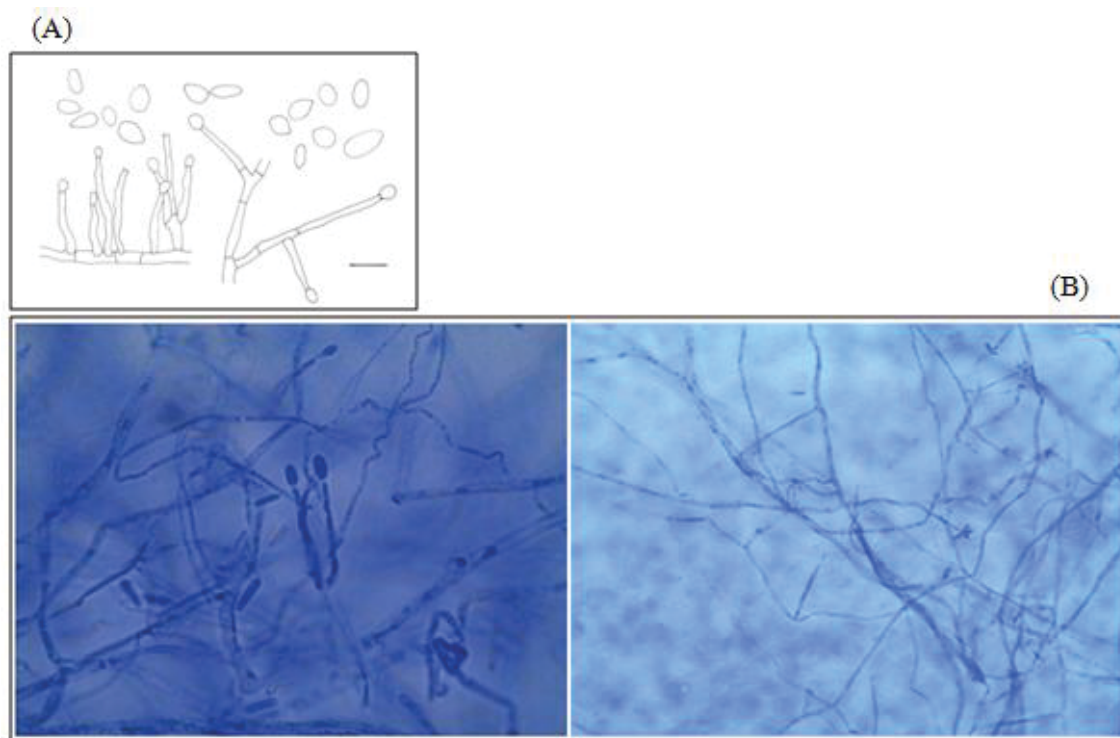


Figura 8. (A) Desenho esquemático de conídios e conidióforos (ZUCCARO et al., 2004) (B) Fotomicrografias da cepa *Acremonium* sp.

Tabela 3. Cepas selecionadas com atividade de transesterificação.

Cepas selecionadas	Atividade hidrolítica por titulometria (U·mL ⁻¹)	Atividade hidrolítica por substrato cromogênico (U·mL ⁻¹)	Transesterificação ^a (g de ésteres·100g ⁻¹ de óleo)
<i>Acremonium</i> sp.	3,8	0,8	1,5
<i>Fusarium</i> sp.	0,9	0,6	0,6

^a Foi utilizado 0,5g de solução enzimática bruta liofilizado (100µg·mg⁻¹ de mistura reacional).

Pelos dados da Tabela 3 pode-se observar que a cepa com melhor rendimento na transesterificação também apresentou a melhor atividade de hidrólise, com 3,8 U·mL⁻¹ e 0,8 U·mL⁻¹, para os métodos titulométrico e cromogênico, respectivamente. Embora, Wu, Jääskeläinen e Linko (1996) tenham reportado pouca correlação entre atividade hidrolítica e de transesterificação em preparados comerciais de lipases, estes resultados mostram que, em alguns casos, altas atividades de hidrólise podem estar associadas à atividade de síntese, conforme resultados descritos por Srimhan et al. (2011) com as lipases produzidas pela levedura *Rhodotorula mucilagenosa* P11189.

Após selecionar a melhor linhagem produtora de lipases, foram realizadas fermentações por períodos de 1 a 5 dias para determinar o melhor tempo de produção das lipases com base em sua atividade hidrolítica (item 4.8.1), já que foi observada uma relação entre atividades de síntese e de hidrólise. A Figura 9 mostra que o fungo apresentou o seu máximo de produção de lipases em 72 horas, atingindo 1,5 U·mL⁻¹.

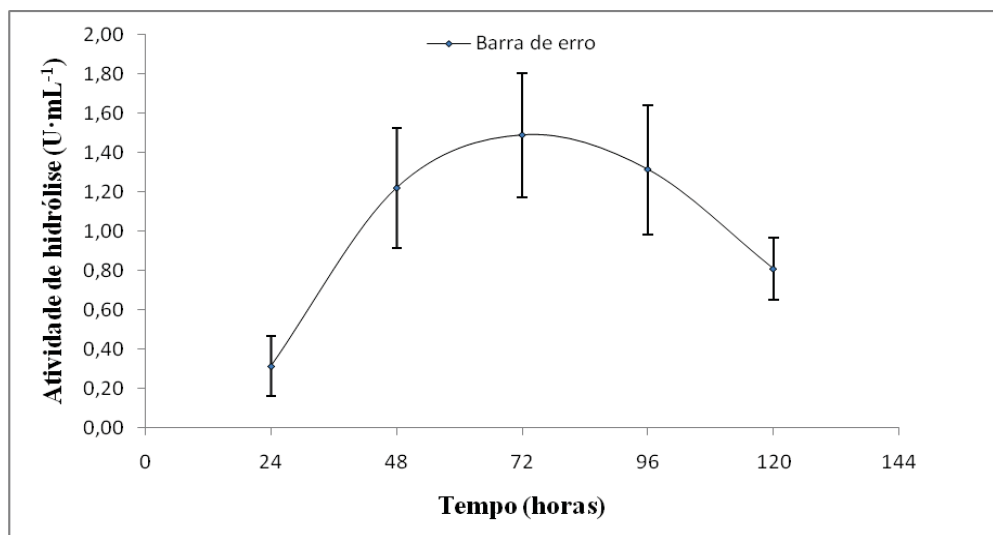


Figura 9. Efeito do tempo de cultivo na atividade de hidrólise das lipases do fungo *Acremonium* sp. ROG 2.1.9, utilizando bagaço de cana e farelo de soja (9:1) como substratos. Os dados são médias de 2 ensaios.

Dentro do gênero *Acremonium* tem sido relatado espécies saprofíticas, endofíticas, além de algumas espécies serem patogênicas, como *Acremonium falciforme* (KOÇ, ERDEM e PATIROGLU, 2002), o *Acremonium recifei* (ZAITZ et al., 1995) e *Acremonium kiliense* (PASTORINO et al., 2005). Muitos trabalhos também apresentam este gênero como bom produtor de β -glucanases, como *Acremonium* sp. IMI383068 (JAYUS, MCDOUGALL e SEVIOUR, 2005) e *Acremonium cellulolyticus* (PARK, NARUSE e KATO, 2011) e produtor de antibiótico (cefalosporina C) como *Acremonium chrysogenum* (SEIDEL et al., 2002; EL-SABBAGH, HARVEY e MCNEIL, 2008). A produção de lipases foi relatada para a espécie *Acremonium strictum* por Okeke e Okolo (1990).

5.2. Seleção do substrato para atividade de lipase utilizando hifas imobilizadas e extrato bruto liofilizado.

Visto que a cepa *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 (Tabela 2) apresentou maior potencial na produção de lipases capazes de catalisar a transesterificação entre óleo de soja e etanol na presença de solvente orgânico, foi escolhida para a continuidade do trabalho.

Oito diferentes misturas de substratos descritas no item 4.7 foram avaliadas quanto à produção de lipases com atividade de transesterificação extracelulares livres ou

associadas à parede celular. O micélio imobilizado e a solução enzimática foram obtidos após 72 horas de fermentação, separados e liofilizados.

O uso de hifas imobilizadas na reação de transesterificação mostrou que a mistura bagaço de cana e farelo de soja (BS) 9:1 e a torta de algodão sem óleo (A) foram os melhores substratos, com rendimentos de $4,1 \pm 0,4$ e $4,7 \pm 0,5$ (g de ésteres·100g⁻¹ de óleo), respectivamente. Entretanto, quando foi utilizada a solução enzimática bruta (enzima livre no sobrenadante do meio de cultivo), apenas a mistura bagaço de cana e farelo de soja 9:1 e 1:1 apresentaram rendimentos, equivalentes a $1,3 \pm 0,3$ e $1,1 \pm 0,2$ g de ésteres·100g⁻¹ de óleo, respectivamente. Os rendimentos muito baixos obtidos com a solução enzimática liofilizada podem ser atribuídos à inativação das enzimas quando estas são submetidas ao processo de liofilização em suas formas livres, ou seja, não imobilizadas (PERSSON et al., 2002).

O uso de misturas de diferentes substratos para a produção de lipases hidrolíticas já foi reportado em vários trabalhos (BENJAMIN e PANDEY, 1998; BABU e RAO, 2007; EDWINOLIVER et al., 2010). O bagaço da cana-de-açúcar e o farelo de soja foram utilizados por alguns pesquisadores como meio de cultura para a produção de lipases microbianas hidrolíticas extracelulares (RODRIGUEZ et al., 2006; DÍAZ et al., 2006; BABU e RAO, 2007) Entretanto, não se encontrou relatos sobre o uso de resíduos agro-industriais como meio de cultura para a produção de lipases com atividade de transesterificação.

Pelos dados da Tabela 4, verifica-se que a cepa *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 parece ter produzido pelo menos duas lipases, uma com atividade de síntese de ésteres e outra com atividade de hidrólise quando o meio de cultura usado continha torta de algodão e o bagaço de cana com farelo de soja. A presença de torta de algodão no meio parece favorecer a produção de lipase transesterificante, enquanto o farelo de soja reduz a produção dessa enzima e induz a lipase hidrolítica.

A produção de dois tipos de lipases também foi observada por Sun e Xu (2008) ao monitorarem as atividades de hidrólise e de síntese das lipases produzidas por *Rhizopus chinensis* em meio composto por arroz. Hama et al.(2006) compararam as atividades de síntese e de hidrólise das lipases de *Rhizopus oryzae* associadas às hifas e imobilizadas em espuma de poliuretano e também observaram a presença de dois tipos de lipases.

Tabela 4. Efeito de diferentes composições de substratos sólidos dos meios de cultura sobre as produções de lipases hidrolíticas e transesterificantes pelo fungo *Acremonium* sp.ROG 2.1.9.

Misturas de substratos ^a	Atividade de transesterificação (g de ésteres·100g ⁻¹ de óleo)			Atividade de hidrólise do extrato bruto com pNPP (U· mL ⁻¹)
	Tipo de etil éster formado	Uso de solução enzimática bruta liofilizado ^b	Uso de substrato sólido (substrato+micelio) liofilizado ^c	
BS = Bagaço de Cana + farelo de Soja (9:1)	Palmitato	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,6 ± 0,32
	Oleato	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,0	
	Linoleato	0,8 ± 0,2	2,5 ± 0,2	
	Linolenato	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	
	Total	1,3 ± 0,3	4,1 ± 0,4	
BS = Bagaço de Cana + farelo de Soja (1:1)	Palmitato	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,07
	Oleato	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	
	Linoleato	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,3	
	Linolenato	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,5	
	Total	1,1 ± 0,2	2,9 ± 0,9	
BS = Bagaço de Cana + farelo de Soja (1:9)	Palmitato	-----	0,1 ± 0,0	1,4 ± 0,50
	Oleato	-----	0,1 ± 0,0	
	Linoleato	-----	0,3 ± 0,0	
	Linolenato	-----	0,0 ± 0,0	
	Total	-----	0,4 ± 0,0	
Torta de algodão sem óleo.	Palmitato	-----	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,12
	Oleato	-----	0,7 ± 0,0	
	Linoleato	-----	3,0 ± 0,3	
	Linolenato	-----	0,4 ± 0,1	
	Total	-----	4,7 ± 0,5	
Torta de algodão com óleo	Palmitato	-----	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,8
	Oleato	-----	0,5 ± 0,2	
	Linoleato	-----	1,5 ± 0,3	
	Linolenato	-----	0,2 ± 0,1	
	Total	-----	2,5 ± 0,6	
AS = Torta de algodão + farelo de soja (9:1)	Palmitato	-----	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,21
	Oleato	-----	0,2 ± 0,1	
	Linoleato	-----	0,9 ± 0,2	
	Linolenato	-----	0,1 ± 0,0	
	Total	-----	1,4 ± 0,3	
AS = Torta de algodão + farelo de soja (1:1)	Palmitato	-----	-----	0,6 ± 0,16
	Oleato	-----	-----	
	Linoleato	-----	-----	
	Linolenato	-----	-----	
	Total	-----	-----	
AS = Torta de algodão + farelo de soja (1:9)	Palmitato	-----	-----	0,7 ± 0,18
	Oleato	-----	-----	
	Linoleato	-----	-----	
	Linolenato	-----	-----	
	Total	-----	-----	

^a Foram utilizados 10g de substrato sólido.

^b Foram utilizados 1g do extrato enzimático seco em um meio reacional de 5g.

^c Foram utilizados 2g do fermentado sólido seco em um meio reacional de 10g.

5.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção das enzimas.

Considerando que a maior atividade de transesterificação foi obtida quando se utilizou hifa imobilizada (micélio fermentado), essa técnica foi aplicada para avaliar os efeitos dos nutrientes minerais adicionados ao meio sobre a produção dessas enzimas, enquanto a atividade de hidrólise foi realizada com a solução enzimática bruta (meio líquido). Desta forma, foram testadas nove soluções nutrientes combinando três fontes de nitrogênio (Peptona, nitrato de amônio e Ureia) e três concentrações de óleo de canola (1%, 2% e 4%) adicionadas ao substrato sólido composto por mistura de bagaço de cana e farelo de soja (9:1).

A Tabela 5 mostra que a quantidade de óleo de canola adicionada ao meio interferiu na produção da enzima, obtendo-se um aumento na produção com o aumento da concentração de 2 a 4% de óleo. Observa-se também, que a fonte de nitrogênio também influenciou nesse resultado, visto que a diferença mais acentuada das concentrações de óleo sobre a produção da lipase com atividade de transesterificação, ocorreu em presença de ureia. Desta forma, a solução nutriente que permitiu a maior atividade de transesterificação (20 g de ésteres·100g⁻¹ de óleo) foi aquela que continha ureia e 4% de óleo, enquanto que a solução contendo peptona e 1% de óleo foi a que possibilitou a maior atividade de hidrólise (1,85 U·mL⁻¹).

Sun e Xu (2008) verificaram que a ureia (2%) prejudicou a produção de lipases com atividade de síntese e que a peptona foi a mais eficiente. Isso pode estar relacionado à concentração de ureia, já que em determinadas quantidades ela pode inibir a produção de lipases (BABU e RAO, 2007).

Freire et al. (1997) e Cihangir e Sarikaya (2004), que ao avaliarem apenas as fontes de nitrogênio, obtiveram bons resultados na atividade hidrolítica das lipases de *Penicillium restrictum* e *Aspergillus* sp, respectivamente, utilizando a peptona. Na atividade de transesterificação, os rendimentos (g de ésteres·100g⁻¹ de óleo) com a peptona foram melhores a 2% (7,6 ± 1,3), 4% de óleo (9,5 ± 0,8), assim como para as soluções com nitrato de amônio (6,4 ± 0,6 e 8,9 ± 0,6).

Wang et al. (2008) também observaram que a quantidade de óleo de oliva teve um efeito significativo na produção de lipases com atividade de síntese; eles avaliaram concentrações de 0 a 40 g/L de óleo de oliva e alcançaram o maior rendimento com 20 g/L, sendo que acima desta concentração o rendimento diminuiu notavelmente.

A diferença entre a atividade de hidrólise e o rendimento de etil ésteres também foi evidente nesta análise, propondo mais uma vez a possibilidade de haver duas lipases sendo sintetizadas pela cepa ROG 2.1.9.

Tabela 5. Influência da fonte de nitrogênio e da concentração de óleo de canola, adicionados ao meio de cultura do fungo *Acremonium* sp., sobre a produção de lipases com atividade de síntese e hidrólise.

Soluções nutrientes	Rendimento de etil ésteres de ácidos graxos (g de ésteres·100g ⁻¹ de óleo)					Atividade de hidrólise do extrato bruto (U·mL ⁻¹) ^a
	Palmitato	Oleato	Linoleato	Linolenato	Total	
Peptona e 1% de óleo	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	3,6 ± 0,8	0,4 ± 0,2	5,8 ± 1,4	1,8 ± 0,58
Peptona e 2% de óleo	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	4,8 ± 0,7	0,5 ± 0,1	7,6 ± 1,3	1,5 ± 0,12
Peptona e 4% de óleo	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,2	5,9 ± 0,5	0,8 ± 0,1	9,5 ± 0,8	1,7 ± 0,15
Ureia e 1% de óleo	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,09
Ureia e 2% de óleo	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,7 ± 0,2	0,3 ± 0,0	4,2 ± 0,4	0,7 ± 0,36
Ureia e 4% de óleo	2,8 ± 0,0	3,3 ± 0,0	12,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	20 ± 0,3	0,7 ± 0,23
NH ₄ NO ₃ e 1% de óleo	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	3,6 ± 0,8	0,4 ± 0,2	5,8 ± 1,4	0,6 ± 0,07
NH ₄ NO ₃ e 2% de óleo	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,1	4,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1	6,4 ± 0,6	0,9 ± 0,50
NH ₄ NO ₃ e 4% de óleo	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	5,6 ± 0,3	0,7 ± 0,1	8,9 ± 0,6	1,4 ± 0,21

A fermentação foi realizada a 30°C por 72h e os componentes básicos de todas as soluções são K₂HPO₄ (0,2%) e MgSO₄·7H₂O (0,05%).

1% de óleo= 0,02 mL·g⁻¹ de substrato; 2% de óleo= 0,04 mL·g⁻¹ e 4%= 0,08 mL·g⁻¹

As fontes de nitrogênio foram calculadas em quantidade de N por g de substrato. Peptona= 0,04 g·g⁻¹; Ureia= 0,01 g·g⁻¹; NH₄NO₃= 0,014 g·g⁻¹.

^a Atividade de hidrólise foi realizada utilizando o pNPP como substrato.

5.3. Zimograma baseado na atividade de hidrólise e de esterificação da lipase do fungo *Acremonium* sp.

Para identificar a presença de lipases ativas, além de diferenciá-las com relação às atividades hidrolíticas e de esterificação, foram realizados ensaios em dois geis de eletroforese não desnaturante. Com o objetivo de verificar a existência de lipases associadas às hifas imobilizadas, foi realizada a extração dessas enzimas conforme descrito no item 4.11.1. As amostras aplicadas no gel foram aquelas que apresentaram diferenças acentuadas na atividade de hidrólise (Foto A) (solução enzimática) e na atividade de transesterificação (micélio imobilizado), ou seja, aquelas obtidas a partir do cultivo do fungo em meio composto por peptona e 1% de óleo de canola e por ureia e 4% de óleo de canola.

Observa-se nos zimogramas da Figura 10 que a hipótese levantada acerca da existência de duas lipases com atividades diferentes foi confirmada. Conforme pode ser observado no zimograma de hidrólise, apenas uma banda de atividade foi revelada nas amostras de enzimas extracelulares (enzima I -L1 e L2) e também nas enzimas associadas à hifa (enzima II-L3), enquanto que no zimograma de esterificação (Foto B), duas bandas foram determinadas para as enzimas do meio de cultura e apenas uma associada ao micélio, sugerindo que uma das enzimas é rapidamente secretada ao meio, não ficando retida na célula. Pode-se observar ainda, que as duas lipases secretadas tem massa molar bastante diferentes, sendo a EI com massa em torno 30KDa e a EII, com aproximadamente 20KDa. Hama et al (2006) determinaram, em hifas de *Rhizopus oryzae*, uma lipase com massa molar de 34 kDa associada à parede celular e outra de 31 kDa associada à membrana citoplasmática e sugeriram que esta última teria sido derivada da primeira por clivagem de uma sequência de 28 amino ácidos a partir do N - terminal.

Tem sido reportado que a adição de óleo e o tipo de ácido graxo utilizado no meio de cultura podem interferir na retenção da enzima na parede/membrana celular. Hama et al. (2004), estudando os efeitos dos ácidos graxos (saturados e insaturados) na membrana celular de *Rhizopus oryzae*, demonstraram que tais compostos podem afetar a permeabilidade da membrana e consequentemente a atividade de metanólise, quando se utiliza a hifa imobilizada. Em estudos posteriores, utilizando o mesmo micro-organismo, Hama et al. (2006) observaram que a adição do óleo de oliva ao meio de cultivo inibiu a secreção de lipase, permitindo maior rendimento na metanólise ao aplicar as células fúngicas na reação, além disso, a atividade de hidrólise do extrato enzimático ($1,02 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi notavelmente menor em relação à hidrólise realizada com o micélio ($25,6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Considerando que as amostras referentes à L2 e L3 foram oriundas de meio com concentração de 4% de óleo, é possível inferir que essa concentração possa ter influenciado a composição da membrana e a secreção das enzimas.

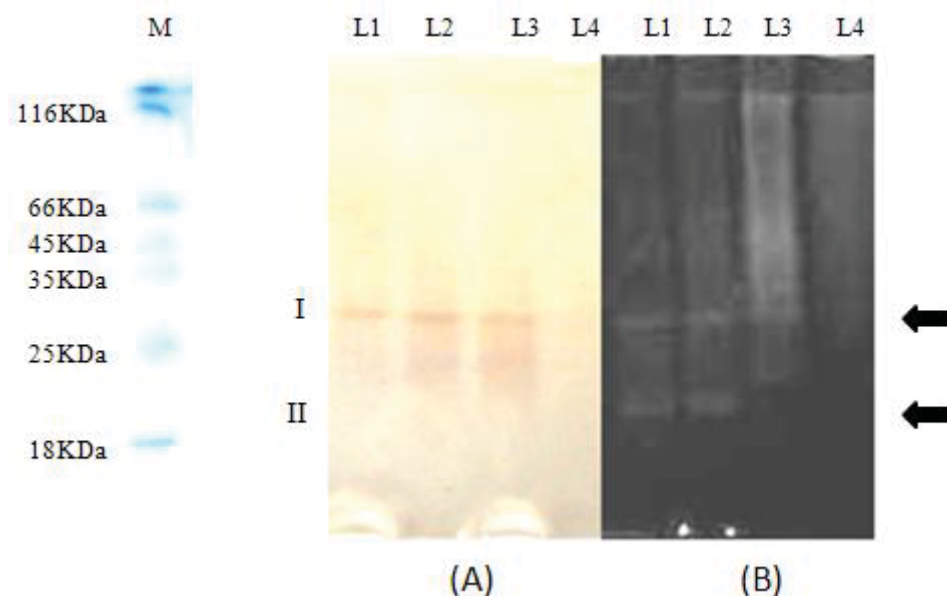


Figura 10. Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (A) e de esterificação (B), utilizando as amostras de solução enzimática bruta -enzima extracelular- obtida a partir do cultivo do fungo em meio com peptona e 1% de óleo (L1), e uréia com 4% de óleo (L2) e lipases associadas às hifas obtidas com uréia e 4% de óleo (L3), e peptona com 1% de óleo (L4). M=marcador molecular.

5.4. Resultados obtidos com o planejamento experimental de superfície de resposta do tipo Box- Behnken na síntese do biodiesel.

O modelo experimental Box-Behnken, composto por 27 ensaios, sendo 3 repetições no ponto central, foi utilizado com o intuito de maximizar a produção de biodiesel variando parâmetros que influenciam a reação de transesterificação, como a temperatura (T), razão molar óleo:etanol (O:E), concentração da enzima (E) e quantidade de solvente (VH). Para estes ensaios foram utilizados como catalisador as hifas do *Acremonium* sp. ROG 2.1.9 imobilizadas em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja (9:1), obtidas nas melhores condições de fermentação determinadas anteriormente e o período das reações foi de 96 horas.

Para a análise dos resultados foi utilizado o software MINITAB 16 e o modelo de análise quadrático completo, obtendo-se assim os coeficientes de regressão, as

variâncias e as curvas de contorno. O modelo quadrático completo é mostrado na Equação 5:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_{ij} + \varepsilon$$

Equação 5

Onde y é o rendimento, x_i e x_{ij} são as variáveis independentes, β_0 é uma constante e β_i , β_{ii} e β_{ij} são coeficientes de regressão.

O valor P do teste de *lack-of-fit* foi de 0,117 ($>0,05$), sugerindo que esse modelo ajustou adequadamente os dados, assim, a significância de cada parâmetro foi avaliada pelos valores de $P < 0,05$ com nível de confiança de 95% (Tabela 6) e considerando os efeitos linear e quadrático somente a razão molar óleo:etanol (O:E) com $P = 0,001$ e 0,048, respectivamente, foi significativa no aumento do rendimento de ésteres etílico.

Tabela 6. Valores de P do modelo quadrático completo determinados para as variáveis.

Termos	Valor de P
T°	0,763
O:E	0,001
[E]	0,258
VH	0,577
T°*T°	0,275
O:E*O:E	0,048
[E]*[E]	0,251
VH*VH	0,415
T°*O:E	0,742
T°*[E]	0,858
T°*VH	1,000
O:E*[E]	0,052
O:E*VH	0,410
[E]*VH	0,766
R ² = 75,71%, R ² (adj)= 47,36%, valor P de <i>Lack-of-fit</i> = 0,117	

Os resultados da Tabela 7 mostram que o maior rendimento na formação dos ésteres foi obtido na condição de reação com razão molar óleo:etanol (O:E) de 1:3 (10g de meio reacional), utilizando a maior proporção de micélio imobilizado (MI), com 12 mL do solvente, a 37°C, sendo possível um rendimento de 88% de biodiesel.

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com os rendimentos das reações de transesterificação.

Ensaio	Fatores avaliados				Rendimento em g éster·100g ⁻¹ óleo
	T (°C)	Óleo:etanol O:E(mol·mol ⁻¹)	MI (µg·mg ⁻¹)	Hexano- VH (mL)	
1	30(-1)	1:3(-1)	150(0)	12(0)	24,2
2	44(1)	1:3(-1)	150(0)	12(0)	15,3
3	30(-1)	1:9(1)	150(0)	12(0)	0,0
4	44(1)	1:9(1)	150(0)	12(0)	0,0
5	37(0)	1:6(0)	100(-1)	4(-1)	1,7
6	37(0)	1:6(0)	200(1)	4(-1)	10,6
7	37(0)	1:6(0)	100(-1)	20(1)	5,2
8	37(0)	1:6(0)	200(1)	20(1)	6,0
9	30(0)	1:6(0)	150(0)	4(-1)	0,0
10	44(1)	1:6(0)	150(0)	4(-1)	0,0
11	30(-1)	1:6(0)	150(0)	20(1)	0,0
12	44(1)	1:6(0)	150(0)	20(1)	0,0
13	37(0)	1:3(-1)	100(-1)	12(0)	33,1
14	37(0)	1:9(1)	100(-1)	12(0)	2,6
15	37(0)	1:3(-1)	200(1)	12(0)	88,0
16	37(0)	1:9(1)	200(1)	12(0)	0,3
17	30(-1)	1:6(0)	100(-1)	12(0)	7,4
18	44(1)	1:6(0)	100(-1)	12(0)	2,3
19	30(-1)	1:6(0)	200(1)	12(0)	1,1
20	44(1)	1:6(0)	200(1)	12(0)	0,9
21	37(0)	1:3(-1)	150(0)	4(-1)	7,1
22	37(0)	1:9(1)	150(0)	4(-1)	0,0
23	37(0)	1:3(-1)	150(0)	20(1)	32,0
24	37(0)	1:9(1)	150(0)	20(1)	2,4
25	37(0)	1:6(0)	150(0)	12(0)	10,0
26	37(0)	1:6(0)	150(0)	12(0)	0,2
27	37(0)	1:6(0)	150(0)	12(0)	7,6

Foi possível ainda observar, que a razão molar óleo:etanol de 6 e 9 inibiram a formação dos ésteres, indicando que quantidades elevadas de álcool pode ter inativado a enzima. Essa tendência pode ser visualizada nas curvas de contorno (Figura 11), que relacionam a razão molar O:E e os demais fatores.

Segundo Maceiras et al. (2009) a razão molar entre álcool e óleo é um dos fatores mais importantes na produção do biodiesel. As proteínas geralmente são

instáveis na presença de álcoois de cadeia curta, como o etanol e metanol e razões molares elevadas entre óleo e álcool podem inativar as lipases, mas isso pode variar de acordo com a resistência de cada biocatalisador à concentração deste substrato (HAAS et al., 2002; SHIMADA et al., 2002; DU et al., 2004; ISSO et al., 2001; SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003).

Corroborando tal fato, Hernández-Martín et al. (2008) observaram que a lipase comercial Lipozyme[®]TL IM foi mais eficiente em quantidades baixas de etanol e a Novozym[®]435 foi mais eficaz quando um excesso deste álcool estava presente. Desta maneira, assim como no presente trabalho, Matassoli et al. (2009) constataram uma diminuição na síntese de ésteres etílicos ao aumentar a razão molar óleo/etanol para 1:6 e 1:9, quando utilizaram a Lipozyme[®]TL IM como catalisador, sendo que o maior rendimento foi obtido com razão molar 1:3 (15,3%).

Diante de todos os resultados apresentados foi observada a ascensão dos rendimentos de ésteres etílicos (biodiesel), destacando a importância de se estudar tanto as condições de cultivo do microrganismo produtor da enzima de interesse, quanto os parâmetros envolvidos na produção do biodiesel.

Ainda destaca-se neste trabalho o uso inédito do fungo *Acremonium* sp., imobilizado em resíduos agroindustriais, na produção de ésteres etílicos, já que não há relatos a respeito da síntese de lipases com atividade de transesterificação por este gênero, criando grandes possibilidades de trabalhos futuros que aprofundem os estudos com estas enzimas.

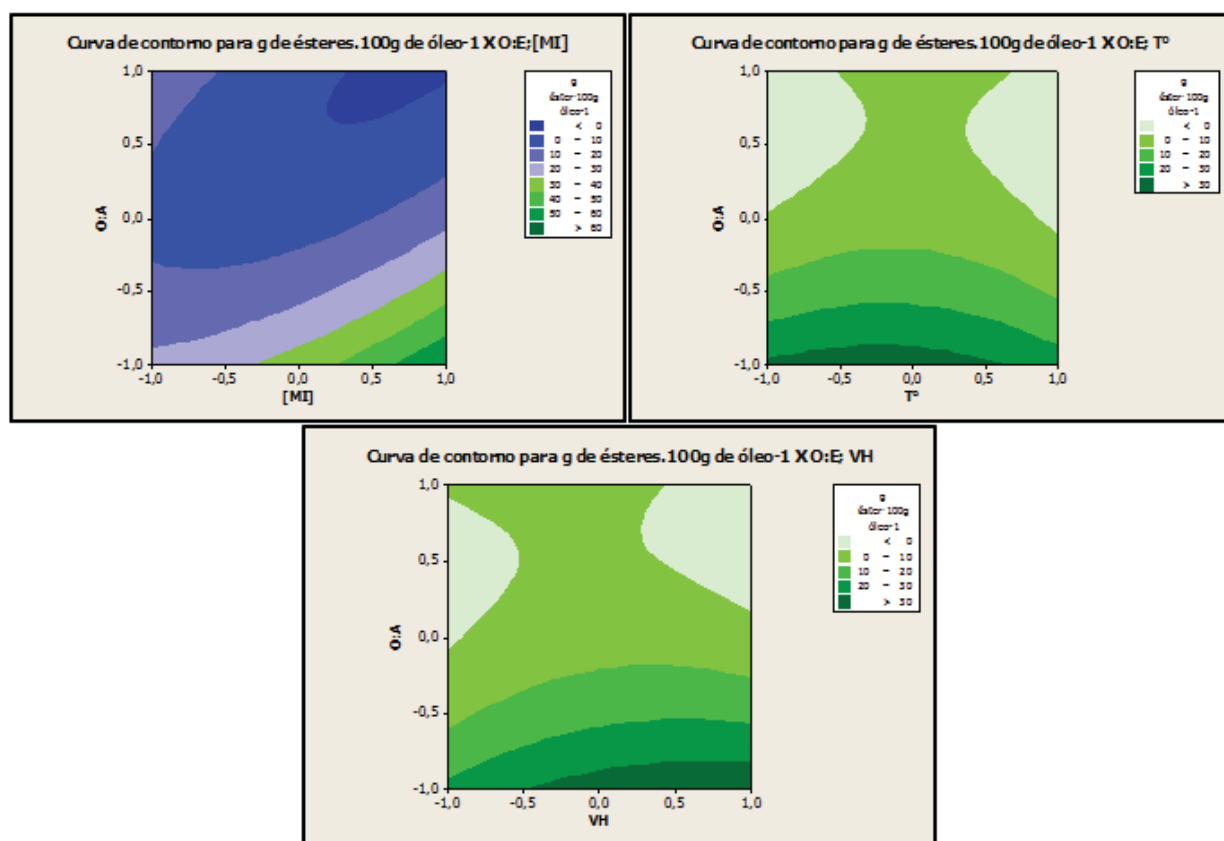


Figura 11. Curva de contorno que apresenta o rendimento de ésteres etílicos em função da razão molar óleo:etanol versus a temperatura, a proporção de micélio imobilizado e o volume de hexano.

6. Conclusões.

Com base nos dados experimentais desse trabalho, foi possível concluir que:

-a frequência de atividade de lipase, tanto hidrolítica, quanto transesterificante foi baixa nos isolados, visto que dos 20 fungos testados, apenas dois foram positivos para as atividades de lipase e apenas um (ROG 2.1.9) ofereceu boa atividade de transesterificação;

-ensaios com diferentes meios de cultura revelaram que o meio composto por (%) 0,2 K₂HPO₄, 0,05 MgSO₄ · 7H₂O, 0,5 Ureia e 4 óleo de canola adicionados à mistura de bagaço de cana de farelo de soja (9:1), proporcionou maiores atividades (20 g de ésteres·100g⁻¹ de óleo)

- o fungo *Acremonium* sp produziu dois tipos de lipases: uma que aparentemente hidrolisa o triglicerídeo e depois esterifica e que é secretada mais lentamente ficando parte associada ao micélio e outra, com menor massa molar que esterifica diretamente, sem a etapa de hidrólise e que é rapidamente secretada ao meio, não aparecendo associada ao micélio

- o estudo das condições de aplicação das enzimas na síntese do biodiesel mostrou que maior rendimento foi obtido na condição de reação com razão molar óleo:etanol (O:E) de 1:3 (10g de meio reacional), utilizando 2g do micélio imobilizado (MI), com 12 mL do solvente hexano, a 37°C, sendo possível um rendimento de 88% (ou 88 g de ésteres·100g⁻¹ de óleo) do óleo de soja em biodiesel.

Em estudos posteriores será realizada ainda a caracterização das enzimas, tanto livres quanto associadas às células; também será avaliada a estabilidade destas a diferentes pHs e temperaturas. Diferentes métodos de imobilização também serão testados a fim de se obter um derivado enzima-suporte eficiente e de baixo custo para a produção do biodiesel.

7. Referências Bibliográficas.

AÇIKEL,Ü.; ERŞAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 31-39. 2010.

AKOH, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8995-9005. 2007.

AKOH, C. C.; SELLAPPAN, S.; FOMUSO, L. B.; YANKAH, V. V. Enzymatic synthesis of structured lipids. In *Lipid Biotechnology*; KUO, T. M., GARDNER, H. W. **Marcel Dekker**, p. 433-478. 2002.

AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K. V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W. H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217. 2006.

ASSES, N.; AYED, L.; BOUALLAGUI, H.; BEN REJEB, I.; GARGOURI, M.; HAMDI, M. Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2182-2188. 2009.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANA JR., G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and Regulation of Lipase Activity from *Penicillium restrictum* in Submerged and Solid-State Fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, p. 361-365. 2007.

BABU, I. S.; RAO, G. H. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid fermentation using mixed substrate. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 469-474. 2007.

- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14. 2010.
- BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 1-8. 2008.
- BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 2, p. 309-341. 1998.
- BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 157-165. 2002.
- BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39-43. 2001.
- BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627-638. 2011.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Mixed-Solid Substrate Fermentation: a novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. **Acta. Biotechnology**, v. 4, p. 315-324. 1998.
- BEZBRADICA, D.; KARALAZIC, I.; OGNJANOVIC, N.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 71, p. 31-41. 2006.
- BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases : classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p. 73-81. 2002.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R. KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437. 2002.

BOUTUR, O.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Factors influencing ester synthesis catalysed in aqueous media by the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. **Journal of Biotechnology**, v. 42, p. 23-33. 1995.

CAIL, R. G.; BARFORD, J. P.; LICHACZ, R. Anaerobic Digestion of Wool Scouring Wastewater in a Digester Operated Semi-Continuously for Biomass Retention. **Agricultural Wastes**, v. 18, p. 27-38. 1986.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210. 2006.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, p. 111-123. 2001.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantioselectiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621. 2005.

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

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRÍGUEZ-GOMES, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654. 2005.

CHERIF, S.; MNIF, S.; HADRICHE, F.; ABDELKAFI, S.; SAYADI, S. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 1-8. 2011.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.* **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 193-197. 2004.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, p. 75-78. 1998.

DA RÓS, P. C. M.; DE CASTRO, H. F.; CARVALHO, A. K. F.; SOARES, C. M. F.; DE MORAES, F. F. ZANIN, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. **Journal Industrial Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p- 529-536. 2011.

DAMASO, M. C.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 676-681. 2008.

DE 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.

DE FELICE, B.; PONTECORVO, G.; CARFAGNA, M. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. **Acta Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 231-239. 1997.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 75-80. 1998.

DHEEMAN, D. S.; BABU, S. A.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium sp.* DS-39. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 256-262. 2011.

DÍAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050. 2006.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274-1278. 2008.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 220-225. 2009.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 194-200. 1999.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 125-129. 2004.

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T. N.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6791-6796. 2010.

EL-SABBAGH, N.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 315-324. 2008.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. E.; MOWBRAY, L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119. 2008.

- FABER, K. Biotransformation in Organic Chemistry. **Springer-Verlag**, 4^a edição. 2000.
- FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 235-240. 2006.
- FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 8-13. 2007.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus* : Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197-212. 2010.
- FERRAREZI, A. L. Produção de lipases por fungos termofílicos imobilizados e a sua utilização para produção de biodiesel por transesterificação. 2010, 162f. **Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)**- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Julio de mesquita Filho/UNESP, Rio Claro, 2010.
- 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.
- FORESTI, M. L.; PEDERNEIRA, M.; FERREIRA, M. L.; BUCALÁ, V. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v. 334, p. 65-72. 2008.
- FREIRE, D. M. G.; SOUSA, J. S.; OLIVEIRA, E. A. C. Biotechnological Methods to Produce Biodiesel. In: **BIOFUELS - Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Elsevier, p. 319-337. 2011.
- FREIRE, D. M. G.; TELES, E. M. F.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA, JR. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 409-421. 1997.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 668-673. 2008.

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. 2001.

GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. **Biotechnol. Prog.**, v. 11, p. 282-287. 1995.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12. 2009.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOŞA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives production from soybean oil. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16. 2012.

GUAN, F.; PENG, P.; WANG, G.; YIN, T.; PENG, Q.; HUANG, J.; GUAN, G.; LI, Y. Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1677-1682. 2010.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 635-644. 2003.

GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E. D. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA, G. L. Lipase production by solid-state Fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 105-116. 2005.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249-5254. 2009.

HAAS, M. J.; PIAZZA, G. J.; FOGLIA, T. A. Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels. In: KUO, T. M.; GARDNER, H. W.; DEKKER, M. (Eds.) **Lipid Biotechnology**. New York, capítulo 29, p. 587-598. 2002.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1436-1439. 2008.

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.

HARALDSSON, G. G. The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. **Mar. Lipids Biotechnol.**, v. 7, p. 337-352. 1991.

HARI KRISHNA, S., DIVAKAR, S., PRAPULLA, S. G., KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 193-201. 2001.

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

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipzyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277-286. 2008.

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Encyclopedia of Microbiology**. e. 3, p. 385-392. 2009.

HOUDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications-On Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, p. 155-170. 2004.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications-An overview. **Applied Biochemistry and Biothechnology**, v. 118, p. 155-170. 2004.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403. 1998.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, p. 273-278. 2001.

JAYUS, B. M. M.; MCDOUGALL, R. J. S. The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 → 3)- and (1 → 6)- β-glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 176-181. 2005.

JEGANNATHAN, K. R.; JUN-YEE, L.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in κ-carrageenan. **Fuel**, v. 89, p. 2272-2277. 2010.

JIN, G.; BIERMA, T. J. Whole-cell biocatalysts for producing biodiesel from waste greases. **ISTC Reports**, f. 1-38. 2010.

JUNG, F.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pre hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1797-1802. 2002.

KAWAKAMI, K.; UENO, M.; TAKEI, T.; ODA, T.; TAKAHASHI, R. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith micro-bioreactor to continuous-flow kinetic resolution for transesterification of (R, S)-1-phenylethanol. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 147-150. 2012.

KIM, H. R.; HOU, C. T.; LEE, K. T.; KIM, B. H.; KIM, I. H. Enzymatic synthesis of structured lipids using a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723. **Food Chemistry**, v. 122, p. 846-849. 2010.

KOÇ, A. N.; ERDEM, F.; PAUROGLU, T. Case report. *Acremonium falciforme* fungemia in a patient with acute leukaemia. **Mycoses**, v. 45, p. 202-203. 2002.

KOWN, M.; KIM, H. S.; HAHM, D. H.; SONG, J. K. Syntesis activity-based zymografy for detection of lipases and esterases. **Biotechnol Lett.**, v. 33, p. 741-746. 2011.

KRIEGER, N. Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba. 1995.

KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista UNIMAR**, v. 19, p. 683-689. 1997.

LARIOS, A.; GARCÍA, H. S.; OLIART, R. M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida Antarctica* lipase. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 373-376. 2004.

LEE, S.; HWANG, S.; LEE, K.; AHN, I. Microscopic analysis of ester hydrolysis reaction catalyzed by *Candida rugosa* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, p. 78-84. 2006.

LENCKI, R. W.; SMINK, N.; SNETTING, H.; ARUL, J. Increasing short-chain fatty acid yield during lipase hydrolysis of a butterfat fraction with periodic aqueous extraction. **JAACS**, v. 75, p. 1195-1200. 1998.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083-1095. 2010.

LI, Q.; YAN, Y. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. **Applied Energy**, v. 87, p. 3148-3154. 2010.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 122-127. 2007.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. v. 18, p. 65-71. 2004.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and estabily of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, n.1, p.65-71, 2004.

LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.; LI, X. A novel low temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4

2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 265-270. 2009.

LIU, S. Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 923-945. 2004.

LIU, Y.; TAN, H.; ZHANG, X.; YAN, Y.; HAMEED, B. H. Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, p. 223-229. 2010.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 445-451. 2008.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MÁRQUEZ, M. C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 88, p. 2130-2134. 2009.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721. 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1729-1735. 2008.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 57-63. 2009.

MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extration of lipase from

Aspergillus niger MTCC 2594. **The Journal of General Applied Microbiology**, v. 53, p. 247-253. 2007.

MARTINS, T. S. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. 2001.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947. 2008.

MATASSOLI, A. L. F.; CORRÊA, I. N. S.; PORTILHO, M. F.; VELOSO, C. O.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 347-355. 2009.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305. 2005.

MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DURÁN, N. Lipase production by Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 145-147. 1999.

MITA, L.; SICA, V.; GUIDA, M.; NICOLUCCI, C.; GRIMALDI, T.; CAPUTO, L.; BIANCO, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; ELDIN, M. S. M.; TUFANO, M. A.; MITA, D. G.; DIANO, N. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 133-141. 2010.

MOHAMED, S. A.; ABDEL-MAGEED, H. M.; TAYEL, S. A.; EL-NABRAWI, M. A.; FAHMY, A. S. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 642-648. 2011.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. Biodegradation of lipid- rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 101-105. 2002.

NAKASHIMA, T.; KYOTANI, S.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Cell aggregation as a trigger for enhancement of intracellular lipase production by a *Rhizopus* species. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 2, p. 85-89. 1990.

NIE, K., XIE, F., WANG, F., TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 142-147. 2006.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777. 2005.

ODA, M.; KAIEDA, M.; HAMA, S.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 45-51. 2005.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5146-5154. 2009.

OHE, T. H. K. Produção de biodiesel etílico com uso de lipases extracelulares de fungos termofílicos. 2011. 92f. **Dissertação (Mestrado em Química)** – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho/UNESP, São José do Rio Preto, 2011.

OKEKE, C. N.; OKOLO, B. N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. **Biotechnology letters**, v. 12, p. 747-750. 1990.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84. 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162. 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A.; Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Químmica Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99. 2006.

PARK, E. Y.; NARUSE, K.; KATO, T. Improvement of cellulose production in cultures of *Acremonium cellulolyticus* using pretreated waste milk pack with cellulose targeting for biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6120-6127. 2011.

PASTORINO, A. C.; MENEZES, U. P.; MARQUES, H. H. S.; VALLADA, M. G.; CAPPELLOZI, V. L.; CARNIDE, E. M. G.; JACOB, C. M. A. *Acremonium kiliense* infection in a child with chronic granulomatous disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 529-534. 2005.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 833-841. 2002.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE, C.; SCHMID, R. D. Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 491-508. 2000.

PRAPULLA, S. G., KARANTH, N. G., ENGEL, K. H., TRESSL, R. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 7, p. 231-234. 1992.

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel Production Catalyzed by Whole Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46. 2008.

RAITA, M., CHAMPREDA, V., LAOSIRIPOJANA, N. Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 829-834. 2010.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207-219. 2009.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LW T - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137. 2010.

ROBERTSON, D. L.; HILTON, S.; BUCKLEY, J. T. Stereochemical and positional specificity of the lipase/acyltransferase produced by *Aeromonas hydrophila*. **Biochemistry**, v. 31, p. 4974-4980. 1992.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 682-688. 2011.

RODRÍGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269. 2006.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M. PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida Antarctica* and ¹ H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p. 136-142. 2011.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131. 2010.

SALAH, R. B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372. 2007.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 58, p. 36-44. 2012.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1-18. 2003.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic activity and selectivity**. v. 39, p. 166-170. 2006.

SEIDEL, G.; TOLLNICK, C.; BEYER, M.; FAHIMI, Y.; SCHÜGERL, K. Process engineering aspects of the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. Part I. Application of complex media. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 229-239. 2002.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavors and fragrances. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 193-198. 2005.

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.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. **Energy & Fuel**, v. 18, p. 154-159. 2004.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662. 2001.

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.

SHUKLA, P.; BHAGAT, J.; SHRIVASTAVA, S. Oil cakes as substrate for improved lipase production in solid state fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 71-73. 2011.

SNELLMAN, E. A.; SULLIVAN, E. R. COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **European Journal Biochemistry**, v. 269, p. 5771-5779. 2002.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 656-660. 2003.

SRIMHAN, P.; KONGNUM, K.; Taweerodjanakarn, S.; HONGPATTARAKERE, T. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 293-298. 2011.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A. V.; VELJKOVIĆ. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141-3155. 2011.

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 514-518. 2010.

SUN, X. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219-224. 2008.

TAN, H. S. G.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. **Food Chemistry**, v. 124, p. 80-84. 2011.

TOIDA, J.; ARIKAWA, Y.; KONDOU, K.; FUKUZAWA, M.; SEKIGUCHI, J. Purification and characterization of triacylglycerol lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 759-763. 1998.

TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 52-59. 2010.

TORRES, C. F., TORÉ, A. M., FORNARI, T., SEÑORÁNS, F. J., REGLERO G. Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 165-171. 2007.

TRAN, D. T.; YEH, K. L.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 119-127. 2012.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. C. Enzimas como agentes biotecnológicos. **Editora Legis Summa**, Cap. 4, p. 35-85, 2004.

VAYSSE, L.; LY, A.; MOULIN, G.; DUBREUCQ, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 648-655. 2002.

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

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30-37. 2008.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 99-105. 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, p. 315-322. 1990.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 639-674. 1998.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glicogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670. 1979.

WU, X. Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y. Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 226-231. 1996.

YU, Z.R.; RIZVI, S. S. H.; ZOLLWEG, J. A. Enzymatic esterification of fatty acid mixtures from milk fat and anhydrous milk fat with canola oil in supercritical carbon dioxide. **Biotechnology Progress**, v. 8, p. 508-513. 1992.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3977-3980. 2011.

ZAITS, C.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; SADAHIRO, A.; RUIZ, L. R. B.; MÜLLER, H.; LACAZ, C. S. Subcutaneous hyalohyphomycosis caused by *Acremonium recifei*: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 267-270. 1995.

ZENG, J.; DU, W.; LIU, X.; LIU, D.; DAI, L. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 15-18. 2006.

ZHANG, K. P.; LAI, J. Q.; HUANG, Z. L.; YANG, Z. *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2767-2772. 2011.

ZUCCARO, A.; SUMMERBELL, R. C.; GAMS, W.; SCHROERS, H-J.; MITCHELL, J. I. A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a

phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 283-297. 2004.

