

PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

Gisele Gelbecke¹, Maria Luiza Fernandes Rodrigues²

¹Acadêmica do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR).

²Doutora em Processos Biotecnológicos. Prof^ª. Orientadora e Adjunto da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil.

Endereço para correspondência: Maria Luiza Fernandes Rodrigues: mlmfernandes@hotmail.com

RESUMO

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. Inicialmente foi isolado o fungo endofítico produtor de lipase e classificado como R2, obtido a partir da folha de mamona (*Ricinus communis L.*) e para a conservação das colônias fúngicas isoladas, utilizou-se meio inclinado Ágar Rose. Após o isolamento, a próxima etapa foi a produção de lipases fúngicas por Fermentação no Estado Sólido (FES), utilizando-se como substratos, resíduos agroindustriais como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), sementes com alto valor lipídico como o gergelim (*Sesamum indicum*), a linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e o girassol (*Helianthus annuus*). Para a preparação do inóculo, foi utilizado o meio Sabouraud. Após crescimento fúngico em tal meio, foi preparado o inóculo através do rompimento da membrana do fungo por ação do detergente Tween 80, que foi diretamente aplicada sobre os substratos citados acima. Após a FES, o sólido fermentado foi seco em estufa a 30 °C durante 48 h e a determinação da atividade enzimática foi realizada método titulométrico.

Palavras-chave: lipases; fungos endofíticos; Fermentação no Estado Sólido (FES)

ABSTRACT

The experimental part of this work was developed in the laboratory Microbiology, School of Biological Sciences and Health University of Tuiuti Paraná. It was initially isolated the endophytic fungus obtained from the castor bean leaf (*Ricinus communis L.*) and the conservation of fungal colonies isolated, we used half Agar inclined Rose. After isolation, the next step is the production of lipases yeast by Solid State Fermentation (SSF), using as substrates waste agribusiness as yerba mate (*Ilex paraguariensis*), seeds with high lipid value such as sesame (*Sesamum indicum*), flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) and sunflower (*Helianthus annuus*). For the preparation of inoculum was used Sabouraud. After fungal growth in such a way, After fungal growth in such medium, the inoculum was prepared by breaking the fungal membrane by action of the detergent Tween 80, which will directly applied on the substrates mentioned above. After SSF, the fermented solid was dried in an oven at 30 °C for 48 h and determination of enzyme activity was performed titration method.

Keywords: lipases; endophytic fungi; Solid State Fermentation (SSF)

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas pertencentes à família das α/β hidrolases que tem como função biológica primordial catalisar a hidrólise de triacilglicerois insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilglicerois e glicerol. Além de sua função natural, as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não-aquoso. As lipases catalisam reações de substratos insolúveis em água (Souza *et al.*, 2004).

O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos com aditivos (modificação de aromas), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (medicamentos e enzimas para diagnósticos) (Burke, 2002).

A produção de lipases pode ser realizada por Fermentação Submersa (FS) ou por Fermentação em Estado Sólido (FES). O primeiro processo utiliza um meio de cultura líquido. Já o segundo, baseia-se na utilização de substratos sólidos com baixas porcentagens de água em sua composição (Alonso, 2001).

O processo de FES é bastante característico e utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, os quais devem atuar tanto como suporte fisiológico quanto como fonte de nutrientes na ausência de água livre. Na formulação do meio de fermentação podem ser utilizados várias fontes de carbono (substrato principal), dentre elas cita-se: farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de cevada, farelo de gergelim, farelo de linhaça, farelo de girassol, entre outros, além de incorporação opcional de alguma fonte de carbono indutora para a produção de lipases (óleos, ácidos graxos, detergentes) (Alonso, 2001).

A mamona ou *Ricinus communis L.* é originária da região norte da África e suas sementes são ricas em óleo de rícino. Este tipo de óleo apresenta baixo ponto de congelamento e é muito utilizado na indústria. O gênero *Ricinus* é pertencente à família *Euphorbiaceae*, que compreende cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo, mas principalmente nas regiões tropicais (Joly *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho é a produção de lipases pelo fungo endófito R2 isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) por Fermentação em Estado Sólido (FES).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná, na Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – Campus Barigui, no período de Julho a Dezembro de 2009.

2.1. MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da mamona (*Ricinus communis L.*), caracterizadas pela professora Aurea Portes Ferriani, foram coletadas nas proximidades do Campus Schaffer da Universidade Tuiuti do Paraná que fica localizado no Jardim Schaffer, Curitiba.

As folhas coletadas aparentavam aspecto sadio e pertenciam a plantas já adultas. O reconhecimento da planta deu-se segundo Joly *et al.* (2002).

2.2. SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A seleção foi realizada em conjunto com o grupo de pesquisa da professora Roseli Mello, da Universidade Tuiuti do Paraná.

Após a coleta, este material foi lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos, matéria orgânica e resíduos sólidos. Em seguida, em câmara asséptica, as folhas foram lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes e posteriormente o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida em hipoclorito 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, para retirar o excesso de hipoclorito. Então, o material foi lavado três vezes em água destilada estéril da qual foi retirado 50 µL para fazer o controle da assepsia (Souza *et al.*, 2004).

As folhas foram cortadas em fragmentos circulares de aproximadamente 6 mm. Estes fragmentos transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo Agar Sabouraud contendo cloranfenicol (AS) para o cultivo dos fungos. As placas com os fragmentos foram incubadas a 28°C e observadas diariamente até o início do crescimento fúngico nas placas. Após 7 dias obtiveram-se os primeiros crescimentos (grupos A, B, C, D e E). Com 16 dias na estufa surgiu um segundo grupo de fungos que foram classificados como F, G, H, I, J, K, L, M e, com 20 dias cresceram o terceiro e último grupo que foram designados em N, O, P, Q, R. As placas que restaram foram observadas até 30 dias, porém não apresentaram crescimento algum.

Os grupos obtidos, de A até R, foram subdivididos numericamente conforme a quantidade e diversidade de fungos que cada placa continha, obtendo-se a placa A1, A2, A3 e assim sucessivamente. Desta forma, houve o isolamento fúngico através da técnica do esfregaço com alça de Drigalsk, com placas que continham Agar Sabouraud – cloranfenicol. Após o procedimento as placas foram incubadas na estufa a 28°C para novo crescimento e, em seguida perfizeram-se as lâminas para a identificação fúngica por microscopia óptica. Para conservar as colônias fúngicas isoladas, utilizou-se meio inclinado Agar Rose.

2.3. SELEÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS

A seleção dos fungos endofíticos produtores de lipase foi realizada pela aluna Ana Carolina Debiasio, do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tuiuti do Paraná.

Para verificar se as cepas fúngicas são produtoras de lipase, foram realizados testes em placas de Petri com meio em Agar BDA (batata, dextrose Agar) contendo o corante Rodamina B 0,001 %, óleo de oliva 1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L, KH_2PO_4 0,4 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L e Tween 80 0,01 %.

A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV, após 24, 48, 72, 96, e 120 h de incubação em estufa a 29^oC.

As cepas produtoras de lipases foram mantidas em meio sólido de Agar Rose com repiques mensais.

2.4. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121^oC, durante 15 min.

2.5. FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

2.5.1. Preparação dos Substratos

Neste estudo foi utilizados como substratos o resíduo agroindustrial erva-mate (*Ilex paraguariensis*), a erva-mate foi utilizada apenas como um suporte, pois não contém nenhum valor lipídico, e sementes com alto valor lipídico como o gergelim (*Sesamum indicum*), a linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e o girassol (*Helianthus annuus*), com um teor de umidade 65%.

Estes substratos foram utilizados na FES para a produção de lipase. Os substratos foram previamente secos a 55-60^oC em estufa por 24 h. Depois de secos, os substratos foram moídos, tamisados e embalados em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações dos substratos com granulométrica entre 0,84 e 1,40 mm (dimensões da tamisa) de diâmetro para os estudos de FES.

2.5.2. Composição Físico-Química dos Substratos

A composição centesimal dos resíduos, como umidade, cinzas e teor de óleo foi determinada no Laboratório de Química da Universidade Tuiuti do Paraná.

Determinação do teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito conforme Zenebon (2008). As amostras foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, suas massas (~1 g) foram pesadas em cadinhos, previamente pesados e tratados em mufla a 650°C, utilizando balança analítica. Após a pesagem o mesmo foi colocado em estufa à temperatura de 110°C por 1 hora. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas à nova pesagem até a obtenção do peso constante. Essas medidas foram realizadas em duas repetições para cada amostra.

Determinação do teor de Cinzas

A determinação quantitativa das cinzas totais foi realizada também de acordo com o método descrito por Zenebon (2008). Para isso, foram pesados ~ 1 g dos substratos, transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de 700°C. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao substrato que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas, também, foram realizadas em duas repetições para cada amostra.

Determinação do teor de Óleo

Para a determinação do teor de óleo foi utilizado o método de Soxhlet, onde a amostra foi pesada em balança analítica e transferida para um cartucho que foi tampado com algodão. O cartucho foi colocado em um extrator, que foi encaixado em um balão volumétrico. Sobre o cartucho, foi vertido o hexano, responsável pela extração dos óleos. O condensador foi conectado e a manta de aquecimento foi ligada. O tempo necessário para este método foi de 6 horas após o início da ebulição. Após a amostra foi secada com a evaporação do solvente e novamente pesada (Zenebon, 2008).

2.5.3. Condições de Cultivo no Meio Sólido

Os ensaios de FES foram realizados baseando-se na metodologia descrita por

Fernandes (2007), em que cada frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g do substrato (5g de erva mate e 5g de gergelim, linhaça ou girrasol). Os experimentos foram realizados em duplicata. Para cada FES foi realizado um controle (sem a suspensão de esporos).

Neste trabalho utilizou-se o fungo endofítico R2 para a produção de lipase por FES.

O inóculo foi preparado após o crescimento do fungo R2 em meio Agar Sabouraud contendo cloranfenicol conforme a figura 1.



Figura 1. Fungo R2 em meio Agar Sabouraud.
(fotografado por Paula Condi)

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo, mantendo-se uma quantidade final no meio sólido de 2 mL. Após inoculação os sólidos foram incubados em estufa a 28°C durante 18, 48, 62, 72 e 96 h.

Os sólidos fermentados foram congelados a 0°C por 24h para interromper o crescimento do fungo. Após o material foi seco em estufa a 30°C por 48 h e acondicionado em sacos plásticos, os quais foram armazenados à temperatura ambiente.

A produção de lipase foi acompanhada pela dosagem da atividade lipolítica (método titulométrico) no material fermentado. A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido fermentado (U/gSS).

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

Método Titulométrico

Os ensaios de atividade frente ao triacilglicerol foram realizados utilizando-se o óleo de oliva como substrato. A determinação da atividade de lipases por titulometria (Figura 2) foi baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações. O método baseia-se

na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis.



Figura 2. Método Titulométrico.
(fotografado por Paula Condi)

O meio reacional para o substrato foi previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão foi composta por solução de Tris-HCl 0,25 mM e NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, goma arábica 3% e pelo substrato óleo de oliva 1,0 mM (La Violetera). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima foram titulados com NaOH 0,05 M e gotas de fenolftaleína (indicador ácido-base), a 37°C e pH 7,0 por 3 min. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Este trabalho apresenta um estudo da produção de lipase pelo fungo endofítico R2 isolado das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*) por FES.

Para obtenção dos fungos endofíticos, foi feito o isolamento das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*), e observado o crescimento durante 30 dias.

Com 7 dias de crescimento foi classificado como grupos A, B, C, D e E. Com 16 dias na estufa surgiu um segundo grupo de fungos que foram classificados como F, G, H, I, J, K, L, M e, com 20 dias cresceram o terceiro e último grupo que foram designados em N, O, P, Q, R. As placas que restaram foram observadas até 30 dias, porém não apresentaram crescimento

algum.

Após este procedimento foi feito um novo isolamento, utilizando-se a técnica do esfregão com alça de Drigalsk e novamente incubadas na estufa a 28°C para crescimento, e em seguida a verificação dos resultados do crescimento.

3.2. SELEÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS

A produção de lipase em placas de Petri foi confirmada pela presença de halos alaranjados, fosforescentes ao UV. Após 24 h de incubação em estufa a 29⁰C.

Os melhores resultados para a produção de lipases foram obtidos para os fungos denominados R1 e R2, sendo que neste trabalho utilizou-se o fungo R2. As cepas R1 e R2 são cepas selvagens e ainda não foram identificadas, mas serão classificadas na UFPR.

3.3. FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

3.3.1. Composição Físico-Química dos Substratos

Foram utilizados como substratos neste trabalho, resíduos agroindustriais como a erva-mate (EM) e sementes com alto valor lipídico como o farelo de semente gergelim (FSGE), o farelo de semente da linhaça (FSL) e o farelo de semente girassol (FSG). Na tabela 1 há descrição de alguns substratos e aplicações da Fermentação no Estado Sólido (FES). O resíduo de erva-mate foi fornecido pela indústria Leão S.A (Curitiba, PR). Todos estes substratos foram preparados nos laboratórios da Universidade Tuiuti do Paraná.

Como relação à composição físico-química dos farelos, verificou-se que o FSGE possui um maior teor de lipídeos (48,1 %) em relação ao FSL (28,4 %) e ao FSG (32,4 %). Estes resultados estão de acordo com a origem e o tipo de processamento que estes materiais sofreram antes de serem utilizados como substratos.

Existem vários exemplos na literatura relacionando o uso de substratos naturais e suportes inertes na produção de enzimas e outros compostos de alto valor comercial por FES. Os principais resíduos que podem ser utilizados são as tortas derivadas dos processos de extração do óleo de milho (torta de milho), óleo de girassol (torta de girassol) e soja (torta de soja), materiais abundantes no Brasil, e que normalmente oferecem um potencial poluente muito elevado.

Outros substratos que podem ser utilizados em FES são a torta de babaçu; farelo de trigo; o bagaço de mandioca, gerado pela indústria de processamento de amido, que possui

entre 40 a 60 % de amido residual; o bagaço de cana; e o pó de serra, gerado pela indústria madeireira. Estes representam somente uma pequena proporção dos substratos que podem ser utilizados na produção de metabólitos com aplicação industrial (Cammarota e Freire, 2006; Mahadik *et al.*, 2002; Ul-Haq *et al.*, 2002; Castilho *et al.*, 2000; Gombert *et al.*, 1999).

A FES tem sido utilizada para a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos (toxinas, antibióticos), enzimas, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos, na alimentação (laticínios, aromas), vitaminas, etanol e biopesticidas, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Substratos e Aplicações da Fermentação no Estado Sólido (FES).

Substratos/ Suportes	Aplicações
Lignocelulósicos	
<u>Palha de trigo</u>	Enriquecimento protéico Degradação de lignina para ruminantes Rações
<u>Farelo de trigo</u>	Cultivo de cogumelos Produção de enzimas, drogas imunossupressivas Produção de aromas
<u>Bagaço de cana de açúcar</u>	Enriquecimento protéico Produção de antibióticos (Penicilina) Produção de ácido cítrico; enzimas; aromas e pigmentos.
<u>Bagaço de mandioca</u>	Produção de aromas Produção de cogumelos
<u>Torta de girassol</u>	Produção de antibióticos (Cefamicina C)
<u>Torta de óleo de babassu</u>	Produção de enzimas
<u>Torta de banana</u>	Produção de enzimas
<u>Torta de milho</u>	Produção de enzimas
<u>(açúcar da polpa da beterraba)</u>	Enriquecimento protéico para rações
<u>Polpa do café</u>	Produção de aromas Produção de hormônios (ácido giberélico)
<u>(Farelo amiláceo de arroz)</u>	Produção de aromas, lipases, proteases e pigmentos
Sementes de soja	Produção de alimentos fermentados
Sintéticos	
<u>Espuma de poliuretano</u>	Produção de enzimas
<u>Resina polimérica</u>	Produção de lipases e ácido giberélico
Frutas	
<u>resíduos de maçã</u>	Produção de etanol, gás natural, goma xantana, ácido cítrico. Enriquecimento protéico para rações.
<u>Casca do kiwi</u>	Produção de ácido cítrico
<u>Semente de amaranto</u>	Produção de compostos voláteis

Fonte: Fernandes, 2007.

3.3.2. Determinação da Atividade Lipolítica

Para determinação da atividade das lipases, foram realizadas reações de hidrólise do triacilglicerol (óleo de oliva) pelo método titulométrico. As atividades foram dosadas após 18, 48, 62, 72 e 96 h de fermentação.

Os melhores resultados foram obtidos no tempo de 62 horas de fermentação. A maior produção de lipase ocorreu para o substrato FSGE com uma atividade lipolítica de 40,8 U/gSS (408 U), seguido FSG com 33 U/gSS (330 U) e do FSL com 22 U/gSS (220 U).

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi verificada a produção de lipase a partir de um fungo endofítico (R2) isolado das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*) por FES usando substratos com alto valor lipídico.

A maior produção de lipases ocorreu no tempo de 62 horas de fermentação para o substrato FSGE (40,8 U/gSS ou 408 U).

Os resultados obtidos neste trabalho são inéditos, pois não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando-se fungos endofíticos isolados das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*) para a produção de lipases por FES.

Futuramente poderão ser realizados novos estudos de FES com a cepa R2 isolada da mamona (*Ricinus communis L.*), como a variação do pH do meio, temperatura, adição de indutor e diferentes tipos de substrato. As enzimas obtidas poderão catalisar diferentes reações químicas com aplicações biotecnológicas, como a síntese de biodiesel.

5. AGRADECIMENTOS

Agradeço a pesquisadora e orientadora Maria Luiza F. Rodrigues, a pesquisadora Roseli Mello, a Biotecnóloga Evandra Mello Pereira, a todos os técnicos e funcionários da Universidade Tuiuti do Paraná, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [2] BURKE, J.F. de M. **Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum***. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [3] CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.MG. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technol.**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

- [4] CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT`ANNA, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochem. Eng. J.**, v. 4, p. 239-247, 2000.
- [5] FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 130f. Dissertação de doutorado (Doutorado em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.
- [6] GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L., CASTILHO,LR.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry.**, v. 35, p. 85-90, 1999.
- [7] JOLY A. B. **Botânica Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo, v.4, p.398-404, 2002.
- [8] MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry.**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- [9] SOUZA, A.Q.L; SOUZA, A.D.L; ASTOLFI, S.F.; PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2004. p. 185-195.
- [10] STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.
- [11] UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry.**, v. 37, p. 637-641, 2002.
- [12] ZENEBON,O., PASCUET, N.S., TIGLEA, P. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.