

PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS E APLICAÇÃO DA ENZIMA EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE GORDURA DO LEITE

Lílian Cristina Varaschin¹, Maria Luiza Fernandes Rodrigues²

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

²Doutora em Química Orgânica. 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

Neste trabalho foi isolado o fungo endofítico (*Penicillium sp*) da folha de *Ricinus communis L.* (mamona). O fungo endofítico presente na folha da mamona foi inicialmente inoculado em meio Ágar Rose e incubado a 28°C durante 15 dias. Após esse período, foi selecionada, através de cultivo em meio BDA (contendo rodamina B, óleo de oliva e sais minerais) a linhagem produtora de lipase, que foi mantida em meio sólido de Ágar Rose. Após o isolamento, foi realizada a produção de lipases fúngicas por Fermentação no Estado Sólido (FES), utilizando como suporte o resíduo agroindustrial erva-mate (*Ilex paraguariensis St. Hill*) e como substrato as sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), com alto valor lipídico. Para a FES, foi utilizado o meio Sabouraud contendo cloranfenicol em erlenmeyer. Após crescimento fúngico em tal meio, foi preparado o inóculo através do rompimento da membrana do fungo por ação do detergente Tween 80, onde foi diretamente aplicado sobre os substratos. A FES foi realizada a 28°C, 60% de umidade e 10 g de substrato (5g de erva-mate e 5g de gergelim). Após a fermentação, foi realizada a determinação da atividade lipolítica através de testes analíticos. A lipase foi aplicada na hidrólise da gordura do leite, simulando um efluente de laticínios.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; lipases; hidrólise de gordura.

ABSTRACT

This work was isolated from the endophytic fungus (*Penicillium sp*) of the leaf of *Ricinus communis L.* (*Ricinus communis*). The endophytic fungus present in the castor bean leaf was initially inoculated onto Rose Agar and incubated at 28 ° C for 15 days. After this period, was selected by growing on PDA medium (containing rhodamine B, olive oil and minerals) in the strain producing lipase, which was kept in solid Agar Rose. After isolation, we performed a fungal lipase production by solid state fermentation (SSF), using as support the agro-industrial residue yerba mate (*Ilex paraguariensis St. Hill*) as substrate and sesame seeds (*Sesamum indicum*), high lipid value. For the FES was used Sabouraud chloramphenicol in Erlenmeyer flask. After fungal growth on such medium, the inoculum was prepared by breaking the fungal membrane by action of the detergent Tween 80, which was applied directly onto substrates. FES was performed at 28 ° C, 60% humidity and 10 g of substrate (5 g of yerba mate and 5g sesame oil). After fermentation was carried out to determine the lipolytic activity through analytical testing. The lipase was applied in the hydrolysis of milk fat, simulating a dairy effluents.

Keywords: Endophytic fungi, lipases, hydrolysis of fat.

1. INTRODUÇÃO

A crescente degradação do meio ambiente tem gerado muitas preocupações de ordem global, por esse motivo tem se dado uma grande importância a esse assunto (MATTOS E FILHO, 1999; BRAILE & CAVALCANTI, 1993).

Um dos principais problemas das indústrias que geram efluentes com alto valor lipídico é o destino dos subprodutos, estima-se que a maior parte destes, é lançado em cursos d'água, sem tratamento adequado. Quando há um tratamento adequado, geralmente ocorre por processos físico-químicos, seguidos de tratamento biológico. A etapa físico-química consiste na separação do óleo por flotação, na floculação de sólidos totais e na coagulação da matéria orgânica; na etapa biológica a matéria orgânica é degradada pelos micro-organismos e pelas suas enzimas, que existem naturalmente nestes efluentes (AZBAR & YONAR, 2004).

Os Fungos endofíticos colonizam o interior de tecidos saudáveis de plantas sem lhes causar danos aparentes numa relação mutualística, sendo capazes de produzir metabólitos como enzimas, dentre elas as lipases, antimicrobianos, moléculas de alto valor agregado, entre outras. A produção de metabólitos primários e secundários pelos microrganismos é conhecida há muito tempo e explorado do ponto de vista biotecnológico (Maccheroni *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas hidrolíticas que “in vivo” catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (FERNANDES, 2007), e “in vitro” catalisam outras diversas reações, como reações de esterificação, interesterificação, e transesterificação (SALUM, *et al.*, 2007; JEGANATHAN, *et al.*, 2006; PANDEY, *et al.*, 2004; 1999).

A produção de lipases pode ser realizada por Fermentação Submersa (FS), que utiliza um meio de cultura líquido (MARTINS, 2001), ou por Fermentação no Estado Sólido (FES), que se baseia na utilização de substratos sólidos com baixas porcentagens de água em sua composição (ALONSO, 2001).

Esta classe de enzima é amplamente utilizada na indústria alimentícia, de papel, na indústria farmacêutica, bioquímica, química fina, óleo química e de couros. Atualmente muitos estudos estão sendo feitos com a utilização de lipases para o tratamento de efluentes como uma alternativa ou ajuda aos tratamentos já existentes, principalmente em indústrias que são ricas em graxas e óleos, provenientes de laticínios, frigoríficos, e restaurantes (DURLI, 2007).

O objetivo deste trabalho é realizar o tratamento de efluentes com alto teor de gordura do leite, utilizando-se a enzima lipase produzida pelo fungo endofítico (*Penicillium sp*) isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) através da FES.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Tuiuti do Paraná, na Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – Campus Barigui.

2.1. MICRO-ORGANISMOS

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o fungo endofítico isolado das folhas de mamona (*Ricinus communis* L.), chamado inicialmente como 3A, após classificado por microcultivo como *Penicillium* sp., que foi cedido pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná.

2.2. ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

2.3. ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS

As linhagens foram inoculadas em meio BDA e incubadas por 7 dias a 28°C, fazendo-se repiques mensais, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

2.4. SELEÇÃO DA LINHAGEM COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para verificar se a linhagem fúngica era produtora de lipase, foram realizados testes em placas de Petri com meio ágar BDA (batata dextrose ágar) contendo o corante Rodamina B 0,001%, óleo de oliva 1% como única fonte de carbono, MgSO₄.7H₂O 0,2 g/L; K₂HPO₄ 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 (figura 1), fosforescentes ao UV quando observado ao ultravioleta a 350 nm, após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação em estufa a 29°C (FERNANDES, 2007). As linhagens produtoras de lipases foram mantidas em meio sólido de ágar Rose com repiques mensais e também em estoque em óleo mineral.

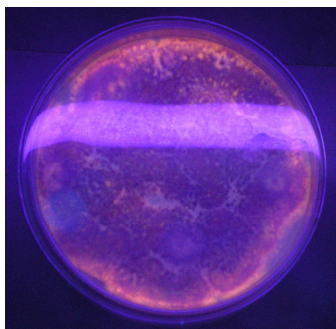


Figura 1: Teste de produção de lipase. O resultado positivo é indicado pelo halo de fosforescência alaranjada que é visualizado quando a placa é irradiada ao UV em 350 nm.

2.5. FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

2.5.1. Preparação dos Substratos

Nestes estudos foram utilizados como substratos a erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e as sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), que possuem alto valor lipídico.

Estes substratos foram utilizados na FES para a produção de lipases, os quais foram previamente secos a 55-60⁰C em estufa por 24 h. Depois de secos foram moídos, tamisados e embalados em sacos plásticos, sendo utilizadas as frações dos substratos com granulometria de 1 mm (dimensões da tamisa) de diâmetro para os estudos de FES.

2.5.2. Composição Físico-Química dos Substratos

A composição centesimal dos substratos, como umidade, resíduo mineral fixo (cinzas) e teor de óleo (extração soxhlet) foi determinada no Laboratório de Fertilizantes e Calcários do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), seguindo os métodos físico-químicos do Instituto Adolf Lutz (ZENEBON *et al.*, 2008).

2.5.3. Otimização da produção de lipases

Para avaliar a produção da enzima, os substratos foram fermentados combinados (erva-mate e semente de gergelim).

2.5.4. Condições de Cultivo no Meio Sólido

Os ensaios de FES foram realizados conforme metodologia descrita por Fernandes (2007). Para a preparação do inóculo foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 125 ml contendo o meio Sabouraud – cloranfenicol. O fungo foi transferido do meio Ágar Rose para este meio e incubado em estufa a 28°C por sete dias. Após o crescimento foi feita a

maceração do meio através de Swabs esterilizados, após, foi adicionado o detergente Tween 80 e feita a solubilização em agitador mecânico.

Para a FES foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL, contendo 5 g do substrato erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e 5g das sementes gergelim (*Sesamum indicum*), com um teor de umidade de 60 %, utilizando-se tampão fosfato pH 7,0 (50 mM). Os experimentos foram realizados em duplicata e para cada FES foi utilizado um controle (sem a suspensão de esporos).

Após o preparo, os substratos foram inoculados assepticamente com o inóculo, mantendo-se uma quantidade final no meio sólido de aproximadamente 1,5 mL. Após inoculação, os sólidos foram incubados em estufa a 28°C durante 24, 48, 72 e 96 h.

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).

2.5.5. Secagem do Sólido Fermentado

Os sólidos fermentados foram congelados a 0 °C por 24 h para interromper o crescimento fúngico. Após, os sólidos foram secos em estufa a 30 °C por 48 h e acondicionados em sacos plásticos, os quais foram armazenados em temperatura ambiente.

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1. Ensaio Enzimático

a) Método Titulométrico (óleo de oliva)

Os ensaios de atividade frente à triacilgliceróis foram realizados utilizando-se o óleo de oliva como substrato. A determinação da atividade de lipases por titulometria 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).

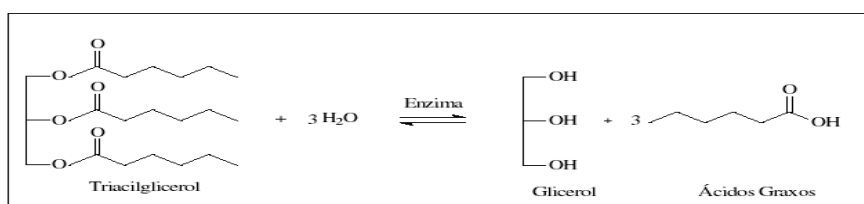


Figura 2. Reação de hidrólise do triacilglicerol catalisada por lipases.

O meio reacional para o substrato foi previamente preparado na forma de emulsão. A emulsão é composta por solução de Tris-HCl 0,25 mM e NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, goma arábica 10% e pelo substrato óleo de oliva (1,0 mM). Os ácidos graxos liberados do substrato emulsificado pela ação da enzima foi titulado com NaOH 0,05 M, a 37°C e pH 7,0 por 3 mim. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

b) Método Titulométrico (gordura do leite)

A dosagem da atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico descrito por FRANKEN (2007), com adaptações. Para as dosagens foi preparada uma emulsão contendo gordura do leite (7,15 %m/v) emulsificada em goma arábica (10% m/v) em tampão Tris-HCl contendo 150 mM de NaCl.

O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 20 mL da emulsão e 1g do sólido fermentado, obtido conforme item 2.5.4. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min a 30°C. A reação foi paralisada adicionando-se 15 mL de solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (0,05 N) até pH 10.3.

A atividade lipolítica foi calculada conforme a Equação 1 onde uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mM de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, sendo o resultado expresso em unidades por grama de substrato sólido (U/gSS).

Cálculo da Atividade

$$A = \left[\frac{\Sigma V}{\Delta t} \right] \times \frac{[N(\text{NaOH})] \times Fc \times (60 \text{ sg})}{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ min}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde :

A: Atividade Enzimática (U/gSS – Unidades por grama de substrato seco)

ΣV: Média dos volumes obtidos em cada tempo

Δ t: Variação do tempo de hidrólise

N: Normalidade da solução de hidróxido de sódio

Fc: Fator de correção do NaOH obtido da padronização

2.5.2. Extração de gordura do leite pelo método a frio

O método utilizado para extração de gordura do leite foi o método BLIGH & DYER (1959). O princípio do método consiste em utilizar uma mistura de solventes de diferentes polaridades para extração de material lipídico a frio. Os solventes utilizados foram o clorofórmio, o metanol e a água. A amostra foi difundida juntamente com o metanol e clorofórmio em proporção 1:2 de modo que fosse formada apenas uma fase. Após, adicionou-se mais clorofórmio, de modo que formassem duas fases e o material de interesse permanecesse no clorofórmio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

Neste trabalho, foram empregados os substratos farelo de semente de gergelim (FSGE) e o resíduo agroindustrial da erva-mate (EM), preparados no laboratório. O resíduo de erva-mate foi fornecido pela indústria Leão S.A (Curitiba, PR).

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição físico-química dos substratos descritos acima. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Fertilizantes e Calcários – TECPAR.

Como pode ser observado na Tabela 1, o FSGE possui um maior teor de lipídeos (56,73%) em relação á erva-mate. Estes resultados estão de acordo com a origem e o tipo de processamento que estes materiais sofreram antes de serem utilizados como substratos.

Tabela 1: Composição físico-química dos substratos utilizados para produção de lipases.

Substrato	Umidade % / Média	Cinzas % / Média	Gordura Total %
Erva-Mate	8,09	5,54	1
Gergelim	4,42	2,96	56,73

3.2. PRODUÇÃO DE LIPASE FÚNGICA POR FES

Para a produção de lipases foram utilizados os substratos: farelo de semente de gergelim (FSGE) e o resíduo agroindustrial da erva-mate (EM), preparados no laboratório. O resíduo de erva-mate foi fornecido pela indústria Leão S.A (Curitiba, PR).

O farelo agiu como fonte de nutriente, principalmente de lipídeos, enquanto que o resíduo agroindustrial EM apenas como suporte físico, pois apresenta baixo teor de lipídeos (menos de 2 %). Para a determinação de produção de enzimas lipolíticas utilizou-se o método titulométrico, conforme descrito em 2.6.1.

Com relação aos substratos utilizados, o FSGE possui um maior teor de lipídeos (56,73 %) em relação à erva-mate. Estes resultados estão de acordo com a origem e o tipo de processamento que estes materiais sofreram antes de serem utilizados como substratos.

Analisando-se a Figura 3 abaixo, verifica-se que a maior produção de lipases ocorreu em 72 h de fermentação para o substrato de interesse (gergelim), com uma atividade de 19 U/gSS ou 190 U.

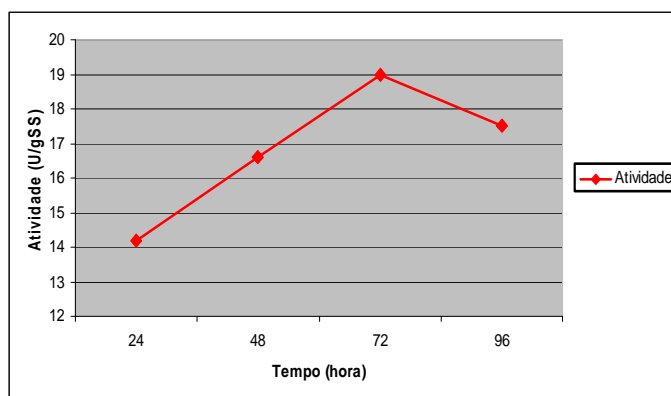


Figura 3: Produção de lipase fúngica pelo fungo endofítico *Penicillium sp* por Fermentação no Estado Sólido. Meio de cultivo: farelo de semente de gergelim (FSGE) e resíduo de erva-mate. Os ensaios foram realizados com umidade de 60 %. Experimentos realizados em duplicata com temperatura de 30°C.

Comparando-se os resultados aqui obtidos, verifica-se que estes foram próximos dos reportados na literatura.

MOREIRA *et al.* (2009) obteve uma maior produção de lipases por FES, utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farelo de semente de girassol (FSG) em 18 h de fermentação para os três fungos filamentosos estudados (*Rhizopus* R 64 a; *Rhizopus* 51 a; *Rhizopus* R 8a). A maior produção de lipase ocorreu para o fungo *Rhizopus* 51 a (37 U/gSS), seguido dos fungos *Rhizopus* R 8a (32 U/gSS) e *Rhizopus* 64a (31 U/gSS). Ul-Haq *et al.* (2002) realizaram estudos sobre a produção de lipases fúngicas de *Rhizopus oligosporous* em FES, sem adição de indutores. Eles estudaram diferentes resíduos agroindustriais, tais como o farelo de trigo, arroz e semente de soja, torta de girassol e de amêndoa. Eles verificaram a produção máxima de enzima (48 U/gSS) com a torta de amêndoa, após 72 h de fermentação.

CORDOVA *et al.* (1998) também estudaram a produção de lipases fúngicas por FES, com os micro-organismos *Rhizomucor pusillus* e *R. rhizopodiformis*, utilizando-se torta da extração do óleo de oliva e bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Eles verificaram a produção máxima de lipase de *R. pusillus* (5,0 U/gss) e *R. rhizopodiformis* (2,7 U/gSS) com o bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, DIAZ *et al.* (2006) estudaram a produção de lipases de *R. homothallicus* por FES, utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato e obtiveram uma atividade máxima de 1500 U/gSS.

Este trabalho é inédito, uma vez que não foram encontrados trabalhos publicados sobre a produção de lipases por FES utilizando-se fungos endofíticos isolados das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*).

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O Efluente utilizado foi obtido diluindo-se 500 kg de nata em 2 L de leite integral, simulando a concentração de um efluente de laticínios.

3.4. REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA GORDURA DO LEITE

A reação de hidrólise da gordura do leite foi realizada comparativamente com a hidrólise do óleo de oliva (trioleína). De acordo com a literatura, verifica-se que o principal substrato para as lipases é a trioleína (FERNANDES, 2007).

A dosagem da atividade enzimática para as reações de hidrólise da gordura do leite e do óleo de oliva, foi determinada pelo método titulométrico descrito por FRANKEN (2007), com adaptações. O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 125 mL, adicionando-se 20 mL da emulsão e 1g do sólido fermentado, obtido conforme item 2.5.6. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min a 30°C. A reação foi paralisada adicionando-se 15 mL de solução de etanol/acetona (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados em solução de NaOH (0,05 N) até pH 10.3.

Analisando-se a Figura 4 abaixo, verifica-se que a atividade da enzima frente aos dois substratos foi muito próxima. A atividade enzimática máxima ocorreu em 60 min de hidrólise, para os substratos gordura do leite (85 U/gSS ou 850 U) e óleo de oliva (80 U/gSS ou 800 U).

Este trabalho é inédito, uma vez que não foram encontrados trabalhos publicados sobre a produção de lipases por FES utilizando-se fungos endofíticos isolados das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*).

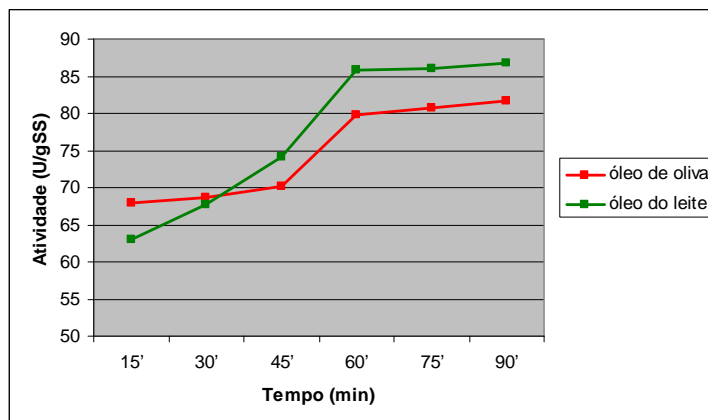


Figura 4: Reação de hidrólise do óleo de oliva e gordura do leite utilizando-se como catalisador da reação a lipase fúngica produzida pelo fungo endofítico *Penicillium sp* por Fermentação no Estado Sólido. Condições: 20 mL da emulsão e 1g do sólido fermentado. As amostras foram incubadas em Shaker, sob agitação, por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min a 30°C.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estudada a produção de lipase fúngica a partir do fungo endofítico *Penicillium sp.* isolado das folhas da mamona (*Ricinus communis L.*) por FES.

Na etapa de produção de enzimas por FES utilizando-se resíduos agroindustriais, os resultados de hidrólise do óleo de oliva demonstraram que a maior produção de lipases ocorreu em 72 h de fermentação com o substrato FSGE, obtendo-se uma atividade de 19 U/gSS ou 190 U.

Na etapa das reações de hidrólise do óleo de oliva e gordura do leite, verificou-se que a atividade enzimática máxima ocorreu em 60 min de hidrólise, para os substratos gordura do leite (85 U/gSS ou 850 U) e óleo de oliva (80 U/gSS ou 800 U).

A lipase produzida pelo fundo endofítico (*Penicillium sp*) conseguiu fazer a hidrólise do efluente. Podendo ser utilizada futuramente em efluentes com alta concentração de gordura, como de frigoríficos e laticínios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- AZBAR, N.; YONAR, T. **Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater.** Process Biochemistry. 39, 869-875, 2004
- BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias.** São Paulo : Cetesb, 1993.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. **A rapid method for total lipid extraction and purification.** Can J . Biochem. Physiol. V. 37, p. 911-917, 1959.
- BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias.** São Paulo : Cetesb, 1993.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI- ALAOU, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. **Lipase production by solid state fermentation of olive oil cake and sugar cane bagasse.** Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 5, p. 75-78, 1998.
- DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHA.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. **“Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures”.** Enzyme Microbial Technol., v. 39, p. 1042-1050, 2006.
- DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia*.** 2007. 111f. Dissertação de Doutorado (Doutorado em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.
- 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.
- FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.; MEIRA, J.A., RAMOS, L.P.; MITCHEL, D.; KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solid substrate into organic reaction medium.** J. Mol. Catalysis. B, Enzymatic., 2007.
- FRANKEN, L.P.G. **Avaliação da atividade hidrolítica de lipases em propano pressurizado.** 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2007.
- JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. **Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation.** Journal of Hazardous Materials B Vol. 137, p.121-128, 2006.

MACCHERONI J.; ARAUJO. W.L.; LIMA, A.O.S. **Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias.** In. ESPOSITO. E.; AZEVEDO J.L. (Orgs). Fungos; uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

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

MATTOS, K.M.C; FILHO, N.J.F. **Instrumentos da Gestão Ambiental para o Desenvolvimento Sustentável.** IV Encontro de Engenharia de Produção. Porto Alegre, 1999.

MOREIRA, M.A., RODRIGUES, M.L.F. **Produção de lipases fúngicas por FES com aplicações biotecnológicas.** 10f. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, 2009.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid station fermentation for production of industrial enzymes.** Revista, V.77, p. 149-162, 1999.

SALUM, T.F.C; BARON, A.M; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. **Ester synthesis by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase.** Biocatalysis and Biotransformation, 2007.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U. **Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Bacteriol., v. 168, p. 1070-1074, 1986.

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.

ZENEON, O., PASCUET, N.S., TIGLEA, P. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.