

UTILIZAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

I. M. C. TAVARES^{1*}, B. B. NASCIMENTO-JUNIOR², M. FRANCO³

¹Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos

²Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas

³Universidade Estadual do sudoeste da Bahia Department of Ciências Exatas
*e-mail: iasnaiamct@gmail.com

RESUMO

Como alternativa à utilização de enzimas purificadas em processos, utilizou-se extrato enzimático bruto no processo de extração de óleos essenciais, no intuito de simplificar e diminuir os custos de produção. No processo de produção desse extrato enzimático bruto utilizou-se como substrato sólido resíduo de bagaço de caju o que leva tanto à diminuição de custos como à ação poluidora dos resíduos gerados na produção e industrialização de alimentos. A aplicação do extrato enzimático bruto, produzido na fermentação dos resíduos de caju com auxílio do fungo *Aspergillus niger*, antes do processo de hidrodestilação, proporcionou uma elevação na percentagem de rendimento na extração do óleo essencial da planta *Croton grewoides*. No presente estudo foi observado o efeito do tempo de pré-tratamento e do volume de extrato enzimático bruto sobre o rendimento da extração. Independente do tempo de extração foi observado o aumento de aproximadamente 6 %, para extratos de caju. A atividade da enzima carboximetilcelulase indicou que a adição de 10 mL do “pull” de enzimas proporcionou um incremento de 0,194 % de rendimento do óleo.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade da flora existente no Brasil, em particular na região da caatinga representa um grande potencial para a produção de óleos essenciais, porém tal estudo deve ser realizado com responsabilidade, de modo a não acarretar o desaparecimento de duas espécies naturais (COSTA FILHO *et al.*, 2012). É possível

explorar essa biodiversidade vegetal através da extração de óleos essenciais de modo sustentável (SIANI *et al.*, 2000).

Os óleos essenciais extraídos de muitas espécies vegetais oferecem ótimas condições para exploração econômica devido suas aplicações em fragrâncias, agricultura, pesticidas, alimentos entre outras. A exploração desses óleos é economicamente viável quando a planta a ser explorada

apresenta alto rendimento e alta concentração de um composto orgânico. Alguns exemplos de constituintes de óleos essenciais com exploração econômica são; o safrol (70-95%) em *Piper hispidinervum* e *Piper callosum*; α -tujona (95%) em *Tanacetum suaveolens*; Apiol (80%) em *Piper krukoffii*; α -pineno (70%) em *Ichthyothere cunabi* além dessas plantas as do gênero *Croton*, se destaca devido as altas concentrações de compostos químicos importantes para a indústria farmacêutica e alimentícia, como o eugenol (essência de cravo) e o metilchavecol (essência de erva-doce) (MAIA & ANDRADE, 2009).

Normalmente esses óleos estão armazenados em estruturas anatómicas específicas como os tricomas (ALAIMO, 2005). Na extração dos óleos podem ser aplicadas diversas técnicas como a including supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, pressurized hot water extraction, hydrothermal extraction, water vapour extraction, solvent extraction, membrane-assisted solvent extraction, solid-phase microextraction, stir bar sorptive extraction, microwave-assisted extraction, and hydrodistillation (FLAMINI *et al.*, 2007)

A hidrodestilação é um método de extração de óleo essencial tradicional largamente utilizado em escala laboratorial (YAMINI, 2007). Os métodos mais modernos, apesar de serem mais onerosos, sanam desvantagens da hidrodestilação como a baixa eficiência, e as perdas e degradação de alguns compostos voláteis devido aos longos tempos de extração (LUCCHESI *et al.*, 2004) (OKOH *et al.*, 2010).

A aplicação de enzimas celulolíticas é uma alternativa para otimizar processo de extração de óleos, pois consegue elevar a quantidade extraída e diminuir o tempo de extração (WU *et al.*, 2009) (CHABRAND & GLATZ, 2009) (DUSSAN *et al.*, 2010) (YOU *et al.*, 2011). Estas enzimas degradam a parede celular, rompendo da estrutura celular

e facilitando assim a extração de óleos (JUGE, 2006) (ARO *et al.*, 2004). Microrganismos celulolíticos conhecidas como verdadeiros, que são aqueles capazes de degradar a celulose natural. Celulases podem ser produzidos por fungos ou bactérias, sendo as enzimas fúngicas com mais aplicações comerciais devido aos seus elevados níveis de produção (CHANG, 2007; DIENES, EGYFAZI, RECZEY, 2004).

As duas principais estratégias para a produção de celulases são a fermentação no estado sólido (SSF) e a fermentação submersa (SF), que diferem entre si no que diz respeito às aos meios e as formas de realização. Um dos parâmetros mais eficientes em diferenciar estes tipos de processos é, sem dúvida, a análise do volume de água presente na reação (PANDEY, 2003; MAZUTTI *et al.*, 2010.). O nível de atividade da água com a finalidade de assegurar um crescimento e metabolismo das células, por outro lado, não exceda a capacidade de ligação máxima da água com matriz sólida (GERVAIS & MOLIN, 2003). O fungo filamentosos *Aspergillus* é considerada de grande importância econômica devido à sua produção de metabólitos, tais como enzimas (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001; PELIZER *et al.*, 2007;. GRAMINHA, GONÇALVES, PIROTA, BALSALOBRE, GOMES, 2008).

Apesar de diversos estudos desenvolvidos demonstrarem a eficiência desse processo o alto custo econômico das enzimas inviabiliza sua aplicação industrial. O custo de produção dos extratos enzimáticos depende de diversos fatores, como a quantidade e o processo de produção e recuperação, grau de pureza, entre outras (SAID & PIETRO, 2004).

Além do método alternativo para a produção de enzimas é possível utilizar o extrato enzimático bruto, sem a necessidade de purificação, essa possibilidade pode reduzir os custos operacionais e viabilizar a

aplicação de extratos enzimáticos no processo de extração dos óleos essenciais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As folhas do gênero *Croton grewioides*, foram coletadas na região semiárida da Bahia na cidade de Jequié. Os resíduos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) e de caju (*Anacardium occidentale* L.) foram cedidos por uma agroindústria de beneficiamento de polpa de frutas localizada na cidade de Ipiauí/BA. O fungo filamentosso *Aspergillus niger* foi obtido de uma cepa pertencente ao Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais da UESB. Os cabeçalhos de segunda ordem devem ser alinhados à margem esquerda, em negrito, sendo a primeira letra de cada palavra em maiúsculo. Deve existir um espaço separando o segundo cabeçalho do texto anterior.

2.2 Obtenção dos esporos Solução

A cultura esporulada (inclinado, acidificada PDA HIMEDIA) foi suspenso numa solução de 1% de Tween 80 (VETEC). O número de esporos em suspensão foi contada utilizando uma câmara de Neubauer espelho duplo e um microscópio binocular Bioval L1000. A quantidade de 10^7 esporos por grama de substrato base seca foi adicionada à suspensão.

2.3 Produção de extrato enzimático "pull"

Os ensaios foram realizadas em frascos de Erlenmeyer contendo 10 gramas de resíduo seco, ao qual foram adicionados 50% de água esterilizada. As incubações foram conduzidas por 48 horas em um modelo de estufa bacteriológica SOLAB número SL 101.

2.4 Extração enzimática da "Pull"

Seguindo o processo de fermentação, o extrato de enzima foi extraída mecanicamente utilizando uma solução tampão de citrato de

sódio (VETEC) com um pH de 4,8 a 50 mM. O extrato de enzima que resulta da fermentação foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos numa centrífuga CETRIBIO 80-2B.

2.5 Determinação da atividade de CMCase

O método escolhido para determinar a atividade de CMCase e que representa a dose de endoglucanases baseia-se na dose de açúcares redutores produzidos (GHOSE, 1987) por a degradação de carboximetilcelulose (CROMOLINE) a 2% (p / v), previamente diluído em uma solução de citrato de sódio com pH de 4,8 a 50 mM. O método do ácido dinitrossalicílico foi usado para a quantificação (DNS) (MILLER, 1959).

2.6 Pré-tratamento enzimático

Folhas de *Croton Grewioides* (36 g) foram tratados com o extrato bruto enzimático. A mistura foi misturada teve o pH (5,0) do material ajustado para ácido cítrico aquoso e incubou-se a 50 °C por um período de 60 minutos (SOWBHAGYA, SRINIVAS & KRISHNAMURTHY, 2010 E SOWBHAGYA, *et al.*, 2009).

2.7 Extração do óleo essencial

Folhas de *Croton Grewioides* (36 g) e extrato enzimático bruto, obtidos com e sem (controle) pré-tratamento, foram colocadas em aparelho de Clevenger para a hidrodestilação. O óleo essencial recolhida no aparelho foi removido e seco sobre sulfato de sódio anidro. O rendimento do óleo obtido foi expressa como uma porcentagem.

2.8 Análises cromatográficas

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa em um CG-FID (cromatógrafo gasoso com detector de ionização por chama) Varian, modelo 3800 para identificação e análise de possível alteração dos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais. As condições

cromatográficas foram: Coluna DB5 (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μ m); Temperatura inicial de 50°C; Tempo inicial de 2 minutos; Tempo final de 70 minutos; Temperatura final de 240°C; Temperatura do injetor de 240°C; Temperatura do detector de 280°C; Gás de arraste nitrogênio; Programação de temperatura: 50°C até 280°C com rampa de aquecimento de 20°C/min. Modo de injeção com divisão de fluxo de 1:50.

Para serem injetadas no CG, todas as amostras de óleo foram diluídas em diclorometano, para serem injetadas na coluna, em uma proporção de 10 μ L de óleo para 1 mL de (1:100) diclorometano. Além de diclorometano e óleo, as amostras injetadas também continham uma terceira substância que foi utilizada como padrão interno, o anizol, em concentração idêntica ao do óleo (1 μ L). Através da razão entre o óleo e o anizol, foi possível saber se houve alteração quantitativa dos constituintes do óleo em função dos tratamentos e a variação na concentração destes constituintes.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas necessárias foram realizadas no pacote estatístico Statistical Analysis System® versão 9.0, procedimentos GLM e REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. Foi utilizado o teste F para as Análises de Variância (ANOVA) a 5% de probabilidade.

Aos dados experimentais foram ajustados modelos lineares, observando o coeficiente de determinação e a concordância com o fenômeno estudado. Os modelos foram avaliados e os respectivos gráficos construídos, utilizando o software SigmaPlot® 11.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização do tempo de extração

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios das massas de óleo essencial extraído sem pré-tratamento com EEB (OS), óleo essencial extraído após pré-tratamento com EEB obtido a partir da fermentação de resíduo de caju (OC), recolhido em tempos de 1 a 4 horas, assim como o rendimento obtido.

Tabela 1: Massa do óleo essencial obtido com e sem pré-tratamento com EEB, produzido a partir de resíduo de caju e acerola recolhido após diferentes tempos de extração e seu rendimento

Tempo de extração (h)	OS		OC	
	Massa* (g)	Rendimento (%)	Massa* (g)	Rendimento (%)
1	1,031 \pm 0,086	2,86	1,082 \pm 0,078	3,00
2	1,053 \pm 0,081	2,93	1,116 \pm 0,072	3,10
3	1,070 \pm 0,077	2,97	1,145 \pm 0,078	3,18
4	1,083 \pm 0,071	3,01	1,159 \pm 0,082	3,22

* Valores de massas correspondem à média \pm desvio padrão de extrações realizadas em duplicata. OS = óleo essencial extraído sem pré-tratamento com EEB (OS); OC = óleo essencial extraído após pré-tratamento com EEB obtido a partir da fermentação de resíduo de caju.

Em todos os tempos de extração, o rendimento dos óleos extraídos após aplicação de EEB na etapa de pré-tratamento foi maior do que o rendimento do óleo extraído sem a utilização dos extratos enzimáticos. Para todos os casos o rendimento foi crescente ao passar do tempo de extração. Após quatro horas de extração, tempo máximo utilizado, o rendimento do OS foi de 3,01%, enquanto do OC. Isso demonstra a eficiência da aplicação dos EEBs, pois houve aumento do rendimento dos óleos extraídos utilizando extrato enzimático.

Pode ser observado que, logo na primeira hora, o rendimento da extração de OC foi praticamente igual ao de OS com 4 horas de extração. Isso possibilita a redução do tempo de extração nos processos com a utilização das enzimas, diminuindo o custo do processo e possíveis alterações químicas durante a extração de óleos pouco estáveis.

3.2 Otimização do volume de enzima

Os experimentos utilizando diferentes concentrações de EEBs na etapa de pré-tratamento demonstraram a eficácia da utilização destes extratos enzimáticos, com um aumento máximo médio de 10,01%, para a produção de óleo, em relação à extração sem a aplicação das enzimas. Foram utilizadas concentrações de EEB/tampão crescentes os tratamentos com resíduos, e somente tampão nos tratamentos controles.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos volumes utilizados de EEB, proveniente da fermentação do resíduo de caju, que variam de 150 a 550 mL. Também estão apresentados os valores das massas do óleo extraído, com e sem o auxílio destas enzimas, e o aumento desta massa em porcentagem, que variaram entre 2,88 a 10,01%.

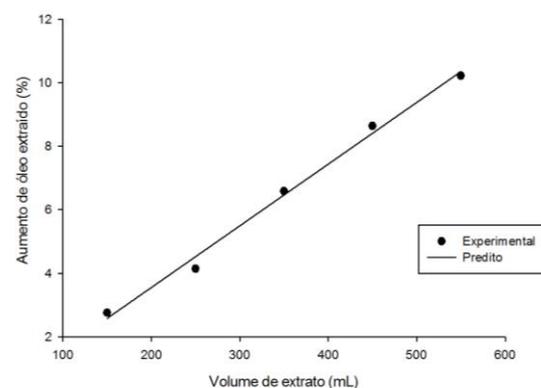
Tabela 2: Aumento da massa de óleo essencial de *Croton grewoides*, após 1 hora de extração, utilizando extrato enzimático bruto obtido a partir de resíduo de caju.

Amostra	Massa de óleo obtida (mg)*			
	Extrato enzimático (ml)	C/extrato	Aumento do óleo extraído (%)	
S/extrato				
1	150	488,5	503	2,88
2	250	472	493	4,25
3	350	544	583	6,7
4	450	564,6	515	8,72
5	550	607	681	10,1

A partir da análise estatística ANOVA dos resultados experimentais, observou-se que houve diferença significativa para a massa de óleo extraído com e sem pré-tratamento com EEB, a 5% de probabilidade pelo teste F. Essa diferença ocorreu, possivelmente, influenciada pela diferença entre os tipos e das proporções de enzimas presentes nos EEB, produzidos a partir de resíduo de caju. Analisando o comportamento da curva

(Figura 1), percebe-se que a quantidade de EEB aplicado no pré-tratamento para a extração de óleo exerceu influência, ou seja, com o aumento do volume de EEB aplicado, houve um aumento da extração de óleo.

Figura 1 – Aumento da massa de óleo essencial extraída, pelo volume de EEB produzido a partir de resíduo de caju, utilizado no pré-tratamento das folhas de *Croton grewoides*.



Os resultados obtidos de aumento da extração do óleo essencial em função da concentração enzimática de CMCase foram bem ajustados no modelo linear (Equações 1), R^2 igual a 0,992, para os valores apresentados na Figura 1, sendo todos os parâmetros significativo ($P < 0,001$). De acordo com estas equações, a variação positiva de um mL no volume de EEB aplicado na etapa de pré-tratamento, acarreta no aumento de 0,0194% de aumento da massa do OC.

$$R = -0,3326 + 0,0194V \quad R = 0,992 \quad (1)$$

O uso de enzimas na extração de óleos vegetais foi pesquisado intensamente há alguns anos e aplicado para todas as oleaginosas de interesse comercial, como mostrado nos trabalhos de revisão publicados por Rosenthal et al. (1996), Freitas et al. (1996) e Dominguez et al. (1994). Porém esta tecnologia é pouco empregada na indústria, em razão do alto custo das enzimas

purificadas, o que diferencia deste trabalho onde utilizamos extratos enzimáticos brutos. Em trabalho realizado por Sowbhagha et al (2010), testou-se quatro enzimas purificadas na extração de óleo volátil de aipo. O rendimento de óleo volátil, depois de aplicação individual por pulverização de celulase, pectinase, protease e viscozyme no pré-tratamento, teve aumento de 22 a 27%. A obtenção do óleo foi por hidrodestilação, sendo observada uma alteração na composição dos seus constituintes, o terpeno principal e o limoneno aumentaram sua concentração de 63% para 82% com tratamento enzimático; outros compostos principais tiveram alterações menos significativas, de 16 a 17%, o que não ocorreu neste trabalho.

3.3 Cromatografia gasosa

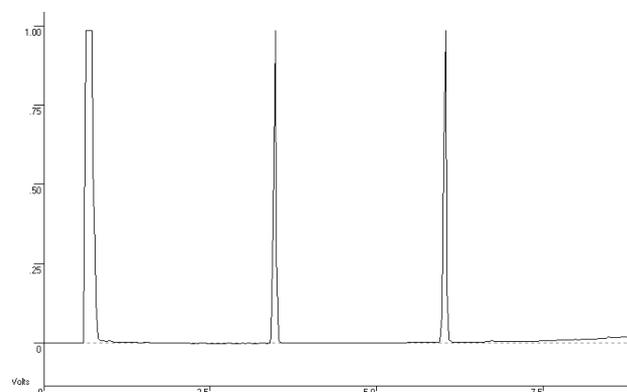
Através dos cromatogramas obtidas por meio de GC-FID, verificou-se a presença de um único composto majoritário, o metilchavicol, em todas as amostras (sem e com tratamento enzimático e de tempos de 1 a 4 horas). Assim, alterações na composição química dos OC decorrentes da exposição a altas temperaturas por um longo período de tempo ou ainda pela influência do EEB, não foram observadas.

Também não foi verificada nenhuma alteração na composição química dos óleos extraídos, nem a incorporação de nenhuma substância volátil do extrato enzimático. Mesmo com a utilização de concentrações máximas de EEB de caju

Os cromatogramas de todas as amostras apresentaram picos idênticos, como os apresentados na Figura 2. O primeiro pico que apresenta tempo de retenção de aproximadamente 0,7 minutos é correspondente ao solvente utilizado na amostra, o diclorometano. O segundo pico que aparece no tempo de aproximadamente 3,3 minutos é referente ao padrão interno, que é o anizol, já o terceiro pico que apresenta

tempo de retenção de aproximadamente de 5,9 minutos, é referente à substância presente no óleo, o metilchavicol. A razão entre as áreas dos picos do anizol e do metilchavicol é de aproximadamente 1, o que leva ao entendimento que o óleo está praticamente puro, podendo conter somente traços de outras substâncias, e que não houve alteração de sua constituição química, nem incorporação de outras substâncias voláteis.

Figura 2 – Cromatograma referente ao OC após pré-tratamento com 550 ml de EEB.



4. Conclusão

Aplicando-se EEBs na etapa de pré-tratamento aumentou o rendimento do óleo extraído, comprovando-se assim a eficácia da utilização dos mesmos. Houve um aumento máximo da massa do óleo extraído em 10,1%, para o resíduo de caju, sendo que maiores concentrações de enzimas interferem diretamente na quantidade de óleo extraído.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesb (Fundação de Amparo à pesquisa da Bahia), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a concessão da bolsa de estudos ITI (Iniciação Tecnológica Industrial) e o Brasil Banco do Nordeste (BNB) para a concessão de apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALAIMO, M. G., VIZZI, D., MELATI, M. R. Histochemical properties and trace element concentrations in *Parietaria L.* from urban sites. **Aerobiologia**, v. 21, p. 21–31, 2005.
- ARO, N., PAKULA, T., & PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739, 2005.
- CHABRAND, R.M., GLATZ, C. E. Destabilization of the emulsion formed during the enzyme-assisted aqueous extraction of oil from soybean flour. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 28–35, 2009.
- CHANG, M. Harnessing energy from plant biomass. Current Opinion, **Chemical Biology**, v. 11, p. 677-684, 2007.
- COSTA FILHO, L. O., SILVA, M. H. M., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SILVA, S. I., OLIVEIRA, A. F. M. Foliar cuticular n-alkane of some *Croton* species from Brazilian semiarid Vegetation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 13–15, 2012.
- DOMINGUEZ, H., NÚÑEZ, M. J., LEMA, J. M. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. **Food Chemistry**, v. 49, p. 271-286, 1994.
- DUSSAN, K.J., CARDONA, C.A., GIRALDO, O.H., GUTIÉRREZ, L.F., PÉREZ, V.H. Analysis of a reactive extraction process for biodiesel production using a lipase immobilized on magnetic nanostructures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9542–9549, 2010.
- FATOPE, M. O., MARWAH, R. G., HADHRAMI, N. M., ONIFADE, A. K., WILLIAMS, J. R. Identification of the Chemotypes of *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR Spectroscopy. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 2457-2463, 2008.
- FLAMINI, G., TEBANO, M., CIONI, P. L., CECCARINI, L., RICCI, A. S., LONGO, I. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis L.* and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 36–40, 2007.
- FREITAS, S., HARTMAN, L., COURI, S. Alternativa biotecnológica ao uso de solventes orgânicos na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, v. 32, p. 29-32, 1996.
- JUGE, N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. Review Article. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 359-367, 2006.
- LUCCHESI, M. E., CHEMAT, F., SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 323–327, 2004.
- MAIA, J. G. S., ANDRADE, E. H. A. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 15, p. 1-29, 2000.
- MARTINS, E. R., CASALI, V. W. D., BARBOSA, L. C. A., CARAZZA, F. Essential oil in the taxonomy of *Ocimum selloi Benth.* **Journal Brazilian Chemistry society**, v. 8, p. 29-32, 1997.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 1, p. 426-28, 1959.

OKOH, O. O., SADIMENKO A. P., AFOLAYAN A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods Original Research. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

ROSENTHAL, A., PYLE, D. L., NIRANJAN, K. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 402-420, 1996.

SIANI, A. C., SAMPAIO, F. L. A., SOUSA, C. M., HENRIQUE, O. M. G. M., & RAMOS, S. F. M. Óleos essenciais. **Biociências e Desenvolvimento**, p. 3, n. 37-43, 2000.

SOWBHAGYA, H. B., PURNIMA, K. T. FLORENÇA, S. P., RAO, A. G. A., SRINIVAS, P. Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1234-1238, 2009.

SOWBHAGYA, H. B., SRINIVAS, P., & KRISHNAMURTHY, N. Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. **Food Chemistry**, n. 120, p. 230-234, 2010.

WU, J., JOHNSON, L.A., JUNG, S. Demulsification of oil-rich emulsion from enzyme-assisted aqueous extraction of extruded soybean flakes. **Bioresource Technology**, v. 100, p.527-533, 2009.

YAMINI, Y., KHAJEH M., GHASEMI, E., MIRZA M., JAVIDNIA, K. Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, v. 108, n. 41-346, 2008.

YOU, J.-Y., PENG, C., LIU, X., JI, X.-J., LU, J., TONG, Q., WEI, P., CONG, L., LI, Z., HUANG, H. Enzymatic hydrolysis and extraction of arachidonic acid rich lipids from *Mortierella Alpine*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6088-6094, 2011.