

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DA LIPASE
POR *Geotrichum candidum* NRRL-Y552

Autora: Janáina Fernandes de Medeiros Burkert
Engenheira Química, UFRN, 1997
Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1999

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título
de Doutor em Engenharia de Alimentos

Campinas – SP

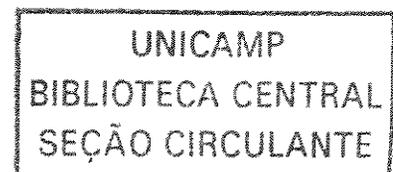
2003

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
**Janáina Fernandes de Medeiros
Burkert** aprovada pela Comissão
Julgadora em 08 de maio de 2003.

Campinas, 08 de maio de 2003.


Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca



UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP B9170
V	EX
TOMBO BCI	54527
PROC.	16.124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/10/10
Nº CPD	

CM00186549-6

BIB ID 294964

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

B9170 Burkert, Janaína Fernandes de
Otimização das condições de produção da lipase por
Geotrichum candidum NRRL-Y552 / Janaína Fernandes de
Burkert. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

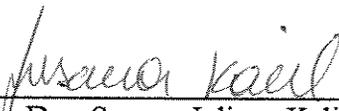
Orientador: Maria Isabel Rodrigues
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lipase. 2.*Geotrichum candium*. 3.Planejamento
experimental. I.Rodrigues, Maria Isabel. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

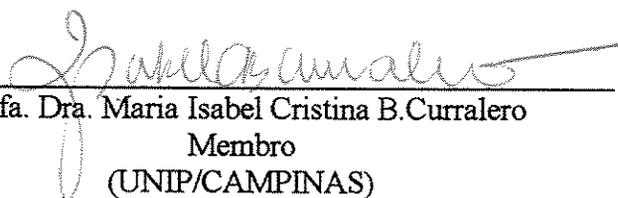
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Orientadora
(FEA/DEA/UNICAMP)



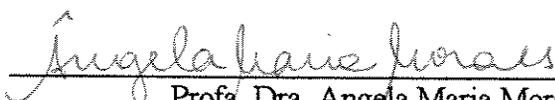
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil
Membro
(DQ/FURG)



Profa. Dra. Maria Isabel Cristina B. Currello
Membro
(UNIP/CAMPINAS)



Profa. Dra. Eliana Setsuko kamimura
Membro
(USP/PIRASSUNUNGA)



Profa. Dra. Angela Maria Moraes
Membro
(FEQ/DPB/UNICAMP)

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Membro
(FEA/DCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Membro
(FEA/DEA/UNICAMP)

0185586008

DEDICATÓRIA

Ao André, “O amor é forte...,
o mistério do amor é amar é o amor...” (Coral Fé e Amor).

A painho e mainha, Arildo e Evangelina,
pelo amor, apoio, confiança e compreensão.

AGRADECIMENTOS

- A Deus e à espiritualidade maior.
- À Profª. Dra. Maria Isabel Rodrigues, pela orientação, amizade, ensinamentos muito além de uma tese de Doutorado e confiança demonstrados ao longo deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri pelo auxílio em momentos cruciais deste trabalho e por toda tranquilidade transmitida que sempre foi possível contar.
- À Banca Examinadora, pela atenção, sugestões e correções.
- À CAPES, pelo apoio financeiro.
- A toda a minha família e em especial aos meus irmãos Kallen, Arildo Filho e Luanda que mesmo de longe sempre estiveram torcendo por mim.
- Aos meus grandes amigos que me ajudaram bastante em momentos muito difíceis Enilene, Freiria, Alessandra, Mauro, Flávio, Kity, e minha prima Jussi.
- Ao Rafael que me ajudou ao longo de todo este trabalho com muita paciência.
- Ao Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA/UNICAMP pela ajuda com a análise da composição de ácidos graxos dos óleos comerciais.
- À Fifa por ser uma pessoa incansável e estar sempre disposta a ajudar e aos amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos Lia, Eliana, Susana, Yemiko, Helen, Keli, Fernanda, Saartje, Thiany, Clarissa, Marcio, Bernardo, Carlos, Dani e Luuuuuu.....pelos momentos compartilhados, e pelo esforço físico de alguns que necessitei inúmeras vezes.
- Aos outros muitos amigos que fiz durante este tempo, em especial aos da “casinha”.
- A D. Maria, Sr. Aparecido, Edinho e ao Cosme que sempre foram prestativos em todos os momentos que necessitei.
- Aos colegas, funcionários e professores da FEA/UNICAMP.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – Reações catalisadas por lipases	5
2.2 – Aplicações de lipases	5
2.3 – Produção da enzima	10
2.3.1 – Microrganismos	11
2.3.2 – Fermentação em superfície	12
2.3.3 – Fermentação submersa	14
2.3.3.1 – Meio de cultura	14
2.3.3.2 – Condições operacionais	22
2.4 – Indução na produção de lipase	24
2.5 – Especificidade de lipase	24
2.6 – Caracterização de lipase	28
2.7 – Influência de alguns compostos na atividade enzimática	29
2.8 – Influência de agitadores	29
2.9 – Produção em fermentador “air-lift”	30
2.10 – Planejamento experimental e análise de superfície de resposta na produção de lipase e suas aplicações	33
2.11 – Considerações gerais	37
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 – Microrganismo	39
3.2 – Meio de cultivo de inóculo	39
3.2.1 – Condição inicial de inóculo	40
3.3 – Influência de diferentes indutores na produção da lipase	40
3.4 – Influência dos diferentes meios de cultura na produção da lipase	40
3.5 – Estudo do procedimento de inóculo	41
3.5.1 – Quantidade de microrganismo no inóculo	42

3.5.2 – Diâmetro da área circular do inóculo e volume do meio de inóculo	42
3.5.3 – Estudo do crescimento do inóculo	43
3.5.4 – Tempo de incubação do inóculo	44
3.5.5 – Condição otimizada do inóculo	44
3.6 – Cinética da produção de lipase em frascos agitados	44
3.7 – Otimização do meio de cultura para produção de lipase	45
3.8 – Caracterização da lipase	45
3.8.1 – Estudo da estabilidade da enzima congelada	45
3.8.2 – Determinação do pH ótimo	45
3.8.3 – Estudo da Temperatura ótima	46
3.8.4 – Estudo da estabilidade térmica da enzima	46
3.8.5 – Influência de íons na atividade lipolítica	46
3.9 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$	46
3.10 – Produção da lipase em reator com agitação mecânica convencional	46
3.10.1 – Influência do tipo de agitador na produção da lipase	47
3.10.2 – Influência da agitação e aeração na produção da lipase	47
3.11 – Produção de lipase em reator air-lift	47
3.12 – Métodos analíticos	48
3.12.1 – Determinação de pH	48
3.12.2 – Determinação de atividade lipolítica	48
3.12.3 – Determinação de atividade proteolítica	49
3.12.4 – Determinação da proteína solúvel	49
3.12.5 – Determinação da massa seca	49
3.12.6 – Determinação da composição de ácidos graxos dos óleos comerciais	50
3.12.7 – Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida ($K_{L,a}$)	50
3.13 – Cálculo da produtividade e da produtividade específica	51
3.14 – Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta	52
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 – Teste de indutores para produção da lipase	54
4.2 – Teste de diferentes meios de cultura para produção da lipase	57

4.3 – Primeiro planejamento experimental para produção de lipase: Estudo da concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja	59
4.4 – Estudo de padronização do inóculo	62
4.4.1 – Quantidade de microrganismo	62
4.4.2 – Diâmetro da área circular do inóculo e volume do meio de inóculo	64
4.4.3 – Acompanhamento da atividade enzimática durante o crescimento do inóculo	67
4.4.4 – Idade do inóculo de <i>Geotrichum candidum</i>	69
4.5 – Cinética da produção de lipase em frascos agitados	71
4.6 – Segundo planejamento experimental para produção da lipase: Estudo da concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja	75
4.6.1 – Efeito da concentração dos componentes do meio de cultura na atividade enzimática da lipase	77
4.7 – Terceiro planejamento experimental: Estudo da concentração de peptona e óleo de soja	79
4.7.1 – Efeito da concentração dos componentes do meio de cultura na atividade enzimática da lipase	82
4.8 – Estudo de validação dos resultados obtidos no terceiro planejamento experimental completo	83
4.8.1 – Teste de Tukey	85
4.9 – Quarto planejamento experimental: Estudo da influência do pH e da temperatura de produção da lipase	87
4.9.1 – Efeito do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de produção da lipase	90
4.9.2 – Verificação de um modelo empírico para a produção da lipase em função do pH inicial do meio de cultura e da temperatura	91
4.10 – Caracterização da lipase	95
4.10.1 – Estudo da estabilidade da enzima congelada	95
4.10.2 – Determinação do pH ótimo	95
4.10.3 – Estudo da temperatura ótima	96
4.10.4 – Estudo da estabilidade térmica da enzima	99
4.10.5 – Influência de íons na atividade lipolítica	105
4.11 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$	106

4.12 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo reator de mistura: Influência dos tipos de agitadores	108
4.12.1 – Cinética da fermentação com o agitador tipo Rushton	109
4.12.2 – Cinética da fermentação com o agitador tipo hélice naval	111
4.12.3 – Fermentação com o agitador tipo de pás inclinadas	112
4.12.4 – Comparação da performance dos agitadores	114
4.13 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo reator de mistura: Influência da agitação e aeração	116
4.13.1 – Verificação de um modelo empírico para a atividade lipolítica em função da agitação e aeração	131
4.13.2 – Efeito da agitação e aeração na produtividade	135
4.13.3 – Efeito da agitação e aeração na produtividade específica	138
4.13.4 – Efeito da agitação e aeração no K_La	141
4.14 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo “air-lift”	145
4.14.1 – Acompanhamento da cinética de fermentação para o reator “air-lift”	145
4.14.2 – Coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida para o reator “air-lift”	152
4.14.3 – Produtividade para o reator “air-lift”	153
4.15 – Comparação da performance do reator com agitação convencional e o reator “air-lift”	153
5 – CONCLUSÕES	157
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	160
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

NOMENCLATURA

K_M	Constante do modelo de Michaelis-Menten	mg/mL
V_{máx}	Velocidade máxima para obtenção de produto na equação de Michaelis-Menten	U/mL
S	Concentração do substrato	mg/mL
V	Velocidade da reação	U/mL
K_La	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio	h ⁻¹
C_L	Concentração de oxigênio no meio	%
C*	Concentração de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar	%
OD	Oxigênio dissolvido	%
Prod	Produtividade no tempo t de fermentação em	U/(mL.h)
P_t	Máxima atividade enzimática alcançada em cada ensaio	U/mL
t_r	Tempo de fermentação	h
Prod_x	Produtividade específica	U/(mg.h)
X	Biomassa no tempo t de fermentação	mg/mL
CS	Quantidade total de substrato	g
CM	Área inoculada	cm ²
d	Diâmetro do inóculo	cm
A	Área do inóculo	cm ²
V	Volume de meio do inóculo	mL
t	Teste t estatístico presente nas tabelas de efeito e coeficiente de regressão	
p	Teste p estatístico presente nas tabelas de efeito e coeficiente de regressão	
L	Termo linear de coeficiente de regressão para obtenção de modelo	
Q	Termo quadrático de coeficiente de regressão para obtenção de modelo	
R²	Varição explicada	%
(SQ_T-SQ_{EP})/SQ_T	Máxima variação explicável	%
R	Coefficiente de correlação	
MDS	Mínima diferença significativa a 95% de confiança	U/mL
q	Valor tabelado a número de tratamentos e graus de liberdade do resíduo	
MQResíduo	Média quadrática do resíduo da análise de variância do teste de Tukey	U/mL

n	Número de ensaios realizados no teste de Tukey	
V₀	Velocidade de reação na temperatura infinita	U/mL
E_a	Energia de ativação	Kcal/mol
R_g	Constante dos gases	cal/mol.K
K	Constante cinética de reação	
E	Concentração da enzima ativa	
T	Temperatura	K
t_{1/2}	Tempo de meia vida da enzima	h
K_d	Constante de desativação térmica	min ⁻¹
E_d	Energia de ativação da reação de desativação	Kcal/mol

RESUMO

O interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, devido ao seu amplo potencial de aplicações industriais, seja na indústria de alimentos como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e na área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos).

A produção de lipase pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o microrganismo produtor da enzima, as fontes de carbono, nitrogênio e lipídio, as condições de aeração e agitação, o tipo do impulsor, e até mesmo a geometria do reator.

Na primeira etapa deste trabalho foram realizados testes com diferentes indutores (óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola e óleo de oliva) para produção de lipase utilizando o microrganismo *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, obtendo como melhor indutor o óleo de soja. Em seguida, um estudo para padronização do inóculo foi realizado possibilitando o início da otimização do meio de cultura, em frascos agitados, obtendo como meio otimizado 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja, com pH inicial de 7,0 a 30°C e 250 rpm, alcançando 16 U/mL em 48 horas de fermentação. Utilizando as condições de produção otimizadas, a enzima foi caracterizada quanto a pH ótimo, temperatura ótima e de estabilidade, a influência de sais minerais na atividade enzimática e a determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$. Sequencialmente, com o meio de cultura otimizado, foi verificada a influência dos impulsores turbina de Rushton, hélice naval e pás inclinadas na produção da lipase em fermentadores de bancada, atingindo em torno de 25 g/L de biomassa para todos os impulsores e 19 U/mL em 30 horas, 12 U/mL em 30 horas e 22 U/mL em 54 horas, respectivamente, de atividade lipolítica. Utilizando o agitador tipo pás inclinadas foi investigado o efeito da agitação e aeração no processo fermentativo, sendo obtida as condições de 300 rpm e 1 vvm a 30°C como ótimas para produção da lipase, alcançando aproximadamente 22 U/mL em 54 horas de processo. Ainda foi investigado o efeito de diferentes taxas de aeração em um reator não convencional “air lift” que permitiu obter cerca de 20 U/mL de atividade lipolítica em 30 horas de fermentação, possibilitando nesta geometria de reator uma produtividade 40% maior em

relação aos reatores convencionais. Estes resultados para o processo de produção da lipase foram superiores em relação aos relatados na literatura para o mesmo microrganismo.

SUMMARY

The interest in microbial lipase production increased significantly in the last decades, because of the large potential in industrial applications such as: additives in foods (flavor modification), fine chemicals (synthesis of esters), detergents (hydrolysis of fats), waste water treatment (decomposition and removal of oily substances), leather (removal of lipids of animal skins), pharmaceutical and medical areas (remedies, digestives and enzymes for diagnostics).

The lipase production can be influenced by different variables such as the microorganism, the carbon sources, nitrogen and lipid, the aeration and agitation conditions, the impeller type, and also including the geometry of the reactor.

In the first stage of this work tests were carried out with different inductors (soy oil, corn oil, sunflower oil, canola oil and olive oil) for lipase production by *Geotrichum candidum* NRRL- Y552, getting as the best inductor the soy oil. After that, a study for standardization of inoculum was carried out, making possible the beginning of the optimization of the culture medium, in shaker-flasks, getting as half optimized 3.58% of peptone and 0.64% of soy oil, with initial pH of 7.0, 30°C and 250 rpm that conditions allow reaching 16 U/mL in 48 hours of fermentation. Using the optimized conditions of production, the enzyme was characterized concerning to optimum pH, optimum temperature and stability temperature, the influence of salts in the enzymatic activity and the determination of the kinetic parameters K_M and V_{max} . Sequentially, with the optimized medium culture, the influence of the impellers it was verified for Rushton turbine, helix naval and pitched blade up in the production of lipase in fermenter, reaching around 25 g/L of biomass for all impellers and 19 U/mL in 30 hours, 12 U/mL in 30 hours and 22 U/mL in 54 hours, respectively. Using the impeller type pitched blade up the effect of the agitation and aeration in the lipase production was investigated, being the optimum conditions 300 rpm and 1 vvm at 30°C for enzyme production, reaching approximately 21 U/mL in 54 hours of fermentation. The effect of different aeration rates in a non conventional reactor air lift was also investigated, resulting in about 20 U/mL of lipolytic activity in 30 hours of fermentation, making possible to obtain with this geometry of reactor a larger productivity (40% greater in comparison to the conventional reactors).

These results for the process of lipase production are larger than the reported ones in the literature for the same microorganism.

1 – INTRODUÇÃO

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas com grande ocorrência em plantas, animais e microrganismos. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Esta reação é reversível, pois as lipases também catalisam a formação de glicerídeos a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água (Hatzinikolaou et al., 1996).

As lipases têm sido intensamente estudadas nos últimos anos, pela possibilidade de serem produzidas em larga escala, pelo cultivo de microrganismos em fermentadores e, assim, serem utilizadas pela indústria.

Aproximadamente 3% das enzimas aplicadas industrialmente são lipases, e apresentam grandes perspectivas futuras em função de suas vastas aplicações, como nas indústrias de alimentos, química fina, detergentes, tratamento de efluentes, cosméticos, farmacêutica e médica.

Os fungos são os preferidos como produtores industriais de lipases, porque as enzimas produzidas por eles normalmente são extracelulares, o que facilita a sua extração do meio fermentado.

Uma das maiores limitações do uso industrial das lipases são os altos custos das matérias-primas utilizadas no meio de produção da enzima, como o óleo de oliva, que constituem aproximadamente 25% a 50% do custo total de produção (Arbige et al., 1989). Portanto, é de fundamental importância estudos de otimização do meio de cultura visando uma maior viabilidade econômica da produção da lipase.

Tendo em vista a experiência do LEB (Laboratório de Engenharia de Bioprocessos/FEA/UNICAMP) na produção e purificação de lipase por *Geotrichum* sp. (Kamimura, 2000; Mendieta, 1999; Medeiros, 1999) decidimos estudar a produção da lipase por uma linhagem pouco explorada na literatura, o *Geotrichum candidum* NRRL Y-552, cuja enzima apresenta alta especificidade por ligações cis-9 dos ácidos graxos

insaturados. Esta característica das lipases de *Geotrichum* faz delas um interessante catalisador para reações de alcoólise e interesterificação na indústria óleo-química. Assim, os objetivos deste trabalho foram investigar diferentes indutores na produção da lipase, estudar diferentes meios de cultura para produção da lipase, padronizar o inóculo utilizado na produção da enzima, otimizar o meio de cultura em frascos agitados, caracterizar a enzima, verificar a influência de diferentes impulsores no processo fermentativo, otimizar as condições de agitação e aeração para obtenção da lipase, estudar a produção da enzima em um reator “air lift” e comparar o desempenho da produção com o reator de mistura.

As etapas desenvolvidas neste trabalho para alcançar os objetivos propostos foram:

- Teste da influência do óleo de oliva, óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de girassol como indutores na produção de lipase, em frascos agitados, por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552.

- Estudo de diferentes meios de cultura apresentados na literatura para produção da lipase, em frascos agitados, com diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais.

- Estudo do melhoramento do procedimento de preparação do inóculo, que abrangeu testes de quantidade de microrganismo, volume do meio de inóculo, crescimento do inóculo e tempo de incubação do inóculo.

- Otimização do meio de cultura para produção de lipase, em frascos agitados, onde foi necessário a realização de:

- Dois planejamentos experimentais fracionários 2^{4-1} , que estudaram a influência da concentração de peptona (3 a 7%), sulfato de magnésio (0 a 0,2%), nitrato de sódio (0 a 0,2%), e óleo de soja (0,5 a 1,5%) na atividade lipolítica, com acompanhamento da cinética da fermentação. Um primeiro planejamento experimental foi realizado antes do estudo da padronização do inóculo e um segundo planejamento experimental após este estudo.

- Um terceiro planejamento experimental completo avaliando o efeito da concentração da peptona (3 a 7%) e da concentração de óleo de soja (0,5 a 1,5 %) na atividade lipolítica, com acompanhamento da cinética da fermentação.

- Um quarto planejamento experimental completo que foi possível estudar as variáveis pH inicial do meio de cultura (5,6 a 8,4) e a temperatura de produção da lipase (18°C a 42°C) na atividade lipolítica.
- Caracterização da lipase quanto a pH ótimo e de estabilidade, temperatura ótima e de estabilidade, a influência de sais minerais na atividade enzimática e a determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$.
- Um estudo comparativo da influência dos agitadores turbinas de Rushton, hélice naval e pás inclinadas sobre a produção de lipase em fermentador de bancada, tipo reator de mistura.
- Realização de um quinto planejamento experimental completo permitindo avaliar as condições de agitação (100 a 500 rpm) e aeração (0,2 a 1,8 vvm) no processo de produção da enzima em fermentador de bancada.
- Avaliação da produção de lipase em reator “air lift” utilizando as seguintes taxas de aeração 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 vvm.
- Comparação de parâmetros obtidos na produção de lipase em reator de mistura e reator “air lift”.

Um fluxograma apresentado na Figura 1.1 foi elaborado para melhor visualização das etapas realizadas durante o estudo da otimização das condições de obtenção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552.

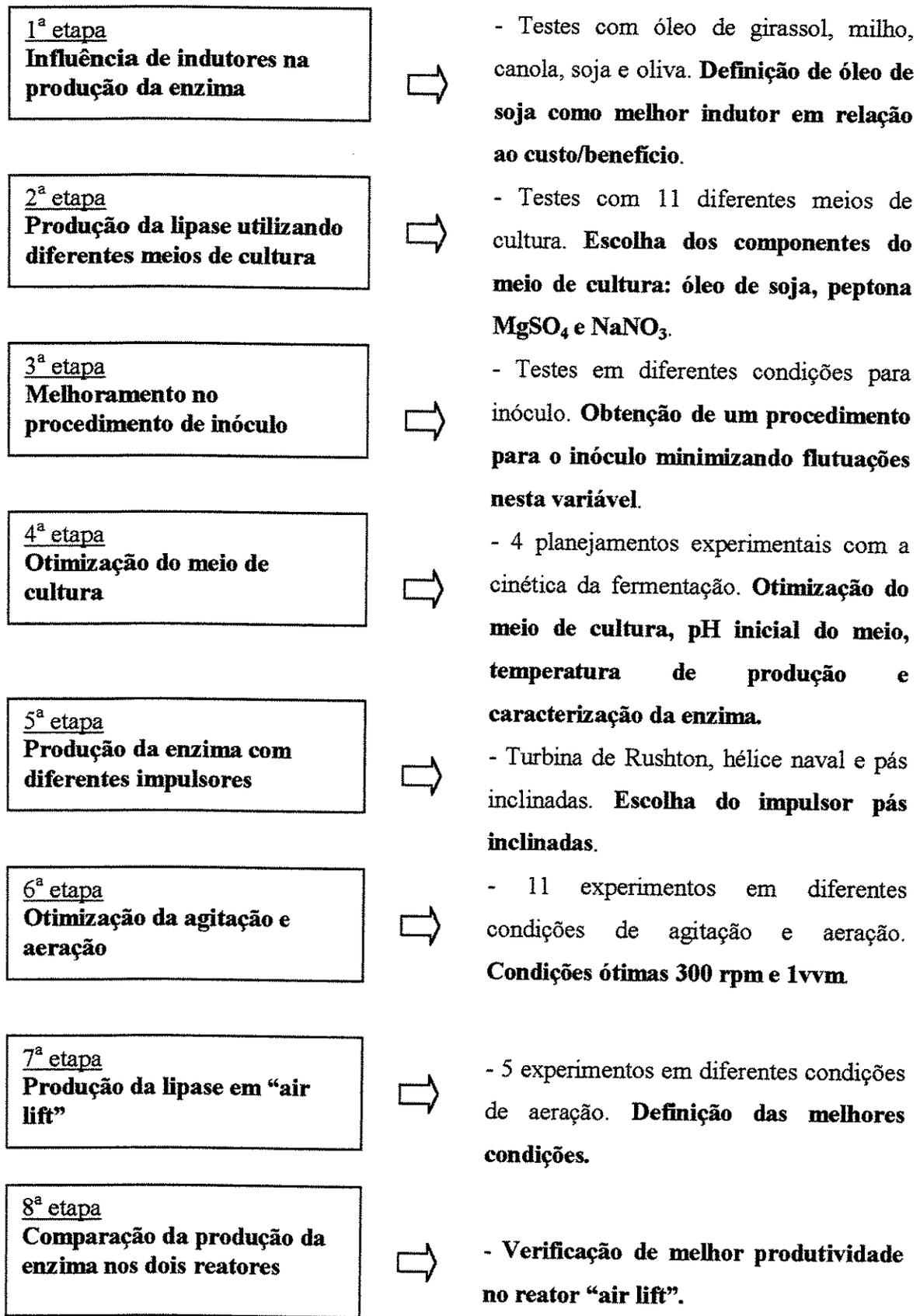


Figura 1.1. Etapas desenvolvidas ao longo deste trabalho.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Reações catalisadas por lipases

Segundo Vulfson (1993) as lipases agem sobre óleos e gorduras na clivagem das ligações ésteres de glicerídeos, liberando ácidos graxos, monoglicerídeos ou diglicerídeos, ou ainda nas interesterificações de óleos e gorduras, produzindo monoglicerídeos, ou diglicerídeos desejados ou alterando a composição de ácidos graxos, de óleos e gorduras.

Castro & Anderson (1995) descreveram que as lipases podem agir nas seguintes reações:

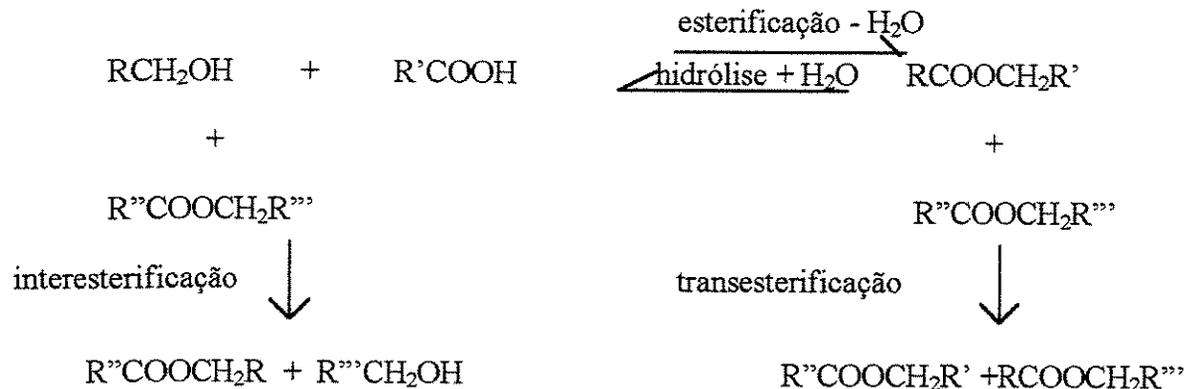


Figura 2.1. Reações em que a lipase pode atuar.

As propriedades catalíticas das lipases como a seletividade e a estereoespecificidade, dentre outras, podem ser de fácil controle através da manipulação nas condições das reações. A dependência destas propriedades catalíticas com o meio reacional pode ser uma consequência do complexo mecanismo de ação das lipases, que envolvem mudanças conformacionais em sua estrutura (Sabuquillo et al., 1998).

2.2 – Aplicações de lipases

As lipases estão envolvidas em cerca de 20% das biotransformações industriais realizadas atualmente segundo Gittlesen et al. (1997).

Devido à grande versatilidade das lipases, essas enzimas têm sido aplicadas em processos biotecnológicos para produção de compostos de interesse industrial e de química fina. As reações de síntese catalisadas por lipases requerem uma quantidade reduzida de água em vez de sistemas anidros, pois a água é essencial para a catálise enzimática, devido à contribuição para as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio, preservando a estrutura protéica. A quantidade de água influencia na solubilidade do substrato e dos produtos, causando efeito sobre a posição de equilíbrio e rendimento químico (Pimentel, 1996).

Em seguida são apresentados alguns exemplos da aplicação industrial das lipases:

- Alimentos

Na indústria alimentícia as lipases têm papel no desenvolvimento de sabores e odores específicos e característicos de alguns alimentos.

Seitz (1974) descreveu o uso de lipases microbianas por diversos microrganismos como *Alcaligenes viscolatis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter lipolyticus*, *Propiona bacterium* e *Penicillium roquefort* nas indústrias alimentícias, especialmente nas indústrias de laticínios e na maturação de queijos, onde há o desenvolvimento de aromas.

Para produção de bebidas alcoólicas fermentadas como o “Sakê” as lipases são utilizadas para formação do aroma específico e aceleram o processo fermentativo pela remoção dos lipídeos (Sousa, 1996).

O açúcar não natural L-glucose, que tem potencial de uso como adoçante não calórico, é sintetizado pelas lipases (Soberon-Chavez & Palmeros, 1994).

- Óleos e gorduras

Segundo Vulfson (1993) cerca de 3,5% da produção de óleos e gorduras mundial, em torno de 6×10^7 toneladas/ano, são utilizadas em reações de hidrólise, alcoólise e glicerólise.

As vantagens da aplicação de lipases na indústria de óleos e gorduras, em relação aos processos químicos tradicionais, foram citadas por Posorske (1984), como sendo a especificidade da enzima por posições nas cadeias dos triglicerídeos, o baixo custo de energia e equipamentos utilizados nos processos, o reduzido desperdício e o baixo custo com tratamentos de efluentes.

Visando a modificação das propriedades das misturas de triglicerídeos nas indústrias de óleos e gorduras, diversos artigos presentes na literatura abordam a reação de interesterificação. Como por exemplo, a interesterificação de 1,3-dipalmitoil-2-monooleína (POP), que é o principal triglicerídeo do óleo de palma, com o ácido esteárico ou triestearina para produção de 1(3)-palmitoil-3(1)-estearil-monooleína (POST) e 1,3-diesteroil-2-monooleína (StOSt), principais componentes da manteiga de cacau, que são utilizados na produção de chocolates (Macrae, 1983; Björkling et al., 1991; Vulfson, 1993).

- Produção de ésteres comerciais

Na indústria de alimentos, cosméticos, fármacos entre outras é grandemente utilizada a síntese de ácidos graxos.

A síntese de monoglicerídeos com lipase G de *Penicillium* sp. e lipase GC de *Geotrichum candidum*, como biocatalisadores, em solventes orgânicos, foi investigada por Akoh et al. (1992). A enzima G esterifica satisfatoriamente ácido oléico em glicerol ou ácido eicosapentaenóico (EPA) em hexano. A esterificação a 40 °C por 24 horas resultou em 86,3% e 64,3% de incorporação de 18:1n-9 e 20:5n-3, respectivamente. Nas mesmas condições experimentais a lipase GC não foi ativa na esterificação. A lipase G foi capaz de incorporar 98,5% e 98% de 18:1n-9 em glicerol em 24 horas ou menos, a 25°C e 37°C, respectivamente. Os produtos formados foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) combinado com “Evaporative Light Scattering Mass Detector” (ELSD) e detector com Ultravioleta a 206 nm.

Vulfson (1993) relata a vantagem do uso da síntese enzimática sobre a síntese química do emulsificante oleato de polioxietileno levando à obtenção de um produto biodegradável com propriedades semelhantes ao produto natural. Na síntese química, às

altas temperaturas utilizadas levam a produção de uma mistura de isômeros não biodegradáveis e de alta toxicidade.

Ésteres de baixo peso molecular constituídos por derivados de ácidos de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos representam uma importante classe de aromatizantes. A síntese enzimática destes compostos, em solventes orgânicos, é mais específica e mais viável que a extração química a partir de vegetais, pois independe da estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima (Razafindralambo et al., 1994).

- Compostos opticamente ativos

As lipases, devido à sua estereoseletividade, apresentam um grande potencial na síntese de compostos enantiomericamente puros como ésteres, ácidos e álcoois.

Estas enzimas podem ser aplicadas para síntese enzimática de intermediários quirais para a produção de β -adrenérgicos opticamente ativos, denominados β -bloqueadores que são usados no tratamento de hipertensão angina. Na indústria farmacêutica apenas 20% dos β -bloqueadores produzidos são aprovados para uso clínico. Geralmente, a atividade do β -bloqueador reside no (S)-enantiômero, como o (S)-propranolol é 100 vezes mais ativo que o (R)-enantiômero (Kloosterman et al., 1988).

As lipases também são utilizadas para síntese estereoseletiva de agentes anti-inflamatórios não-esteróides, largamente utilizados no tratamento de doenças do tecido conjuntivo. Como exemplo, a síntese do naproxeno, cujo (S)-enantiômero é 28 vezes mais ativo in vitro que o (R)-enantiômero. A síntese catalisada por lipases dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor* e *Candida* têm exibido alta seletividade por diferentes ésteres do naproxeno. Dentre estas, somente a lipase de *Candida cylindracea* apresentou preferência (S)-estereoquímica (Margolin, 1993).

Alguns trabalhos, mais recentes, têm apresentado a aplicação da lipase na resolução de misturas racêmicas para produzir compostos opticamente ativos (Rao et al., 1993 a). A utilização da propriedade hidrolítica da lipase aplicada na biodegradação de plásticos como os Polihidroxicanoatos (Jaeger et al., 1995) e Policaprolactonas (Mochizuki et al., 1995)

também tem sido estudada.

- Tratamento de efluentes

Ratledge (1992) tratou efluentes industriais que continham lipídios de cadeia longa utilizando fungos filamentosos como *Norcadia*, *Rhodococcus* e *Hicrothrix*, devido à capacidade destes microrganismos em assimilar por difusão direta esses compostos.

- Detergentes

Seitz (1974) relatou a utilização de lipases microbianas em sistemas de detergentes. Lipases de *Candida lipolytica*, *Candida cylindracea* e *Pseudomonas stutzeri* são preferidas em relação às obtidas de plantas ou fonte animal, devido à sua maior adequação quanto as características de pH e temperatura, para incorporação em sistemas detergentes e à estabilidade com surfactantes iônicos.

Nothernberg (1991) estudou a adição de lipases a sistemas detergentes para remoção de gordura e verificou que a temperatura e o tempo de lavagem podiam ser reduzidos, com consequente economia de energia.

Devido a alta estabilidade da lipase produzida por *Penicillium citrinum* à temperatura ambiente, Pimentel et al. (1994) sugeriram a aplicação desta enzima na indústria de detergentes ou produtos que tenham alta estabilidade à temperatura ambiente.

- Fármacos

Recentemente, as indústrias farmacêuticas mostram interesse nos óleos de peixe como anchova e sardinha de regiões frias devido aos efeitos fisiológicos e terapêuticos (atuam no sistema cardíaco, circulatório e imunológico e nos processos inflamatórios e carcinogênicos) encontrados nos ácidos graxos de cadeia longa, poliinsaturados do tipo $\omega-3$, como os ácidos cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) e cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), presentes nesses óleos. A maior parte da produção mundial dos ácidos EPA e DHA são hidrogenados para produção de margarinas e outros produtos, praticamente destruindo suas propriedades terapêuticas. Por isso é de interesse industrial obter triglicerídeos homogêneos a partir desses ácidos, já que os triglicerídeos são

encontrados nos alimentos e no organismo humano. Processos de esterificação pelos métodos químicos para preparação destes triglicerídeos não são viáveis, porque todas as ligações cis $\omega-3$ são parcialmente destruídas por oxidação, isomerização ou migração de duplas ligações. Portanto, a síntese catalisada por lipases é desejável para produção de triglicerídeos a partir desses ácidos com um alto grau de pureza (Haraldsson et al., 1995).

Na Tabela 2.1 podem ser verificadas outras aplicações das lipases na indústria (Castro & Anderson, 1995).

Tabela 2.1: Aplicações industriais das lipases

Indústria	Aplicação
Alimentos	
•Laticínios	•Hidrólise da gordura do leite
•Panificação	•Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
•Cervejaria	•Aumento do aroma e aceleração da fermentação em função de lipídios
•Molhos	•Aumento da qualidade do ovo pela hidrólise dos lipídios
•Processamento de carne	•Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Química	
•Processamento de óleo	•Transesterificação dos óleos
•Química fina	•Síntese de ésteres; resolução de racematos
•Detergentes	•Hidrólise de gorduras
Outras	
•Farmacêutica	•Digestão de óleos e gorduras em alimentos
•Médica	•Determinação de triglicerídeos no sangue
•Cosmética	•Remoção de lipídios
•Couro	•Remoção de lipídios da pele de animais
•Tratamento de resíduos	•Decomposição e remoção de substâncias oleosas
•Papel	•Tratamento de polpas de celulose

Fonte: Castro & Anderson, 1995.

2.3 - Produção da enzima

Para se desenvolverem, os microrganismos necessitam de nutrientes como carbono,

nitrogênio, fósforo, enxofre, etc. As lipases microbianas em geral são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura. A otimização das condições de fermentação para lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima, bem como na proporção de lipase extracelular e intracelular. A quantidade de lipase produzida é dependente de vários fatores como a composição do meio de cultura, concentração de nitrogênio, fontes de carbono e lipídio, concentração de sais inorgânicos, temperatura de cultivo, pH do meio de cultura, e ainda a oxigenação e agitação. A produção de lipase pode ser estimulada por certos lipídios tais como manteiga, óleo de oliva e ácidos graxos (Wooley & Peterson, 1994).

2.3.1 - Microrganismos

Uma grande variedade de microrganismos tem a habilidade de produzir lipases, dependendo dos parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, peso molecular, sensibilidade à temperatura e pH. No entanto, do ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, porque as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares facilitando a sua extração do meio fermentado.

Através da Tabela 2.2 é possível observar alguns microrganismos produtores de lipase relatados na literatura.

Rapp & Backhaus (1992) citam ainda outros gêneros de fungos filamentosos que têm sido estudados como fontes de lipases por exemplo, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Curvalaria*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Pecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Pycnopus*, *Sclerotium*, *Stachylidium*, *Staurophoma*, *Syncephalis*, *Thanatenopjorus*, *Thielavia*, *Trichocladium* e Utilizando fungos filamentosos como *Norcadia*, *Rhodococcus* e *Hicrothrix* Utilizando fungos filamentosos como *Norcadia*, *Rhodococcus* e *Hicrothrix* *Verticilium*.

Tabela 2.2: Microrganismos produtores de lipase.

Microrganismo	Referência
<i>Alcaligenes sp.</i>	Sousa (1996)
<i>Aspergillus niger</i>	Hatzinikolaou et al. (1996)
<i>Candida rugosa</i>	Pastore (1992), Rao et al. (1993), Gordillo et al. (1995), Shieh et al. (1996)
<i>Geotrichum candidum</i>	Tsujiisaka et al. (1973), Jacobsen et al. (1989 a, b), Baillargeon et al. (1989,1990), Veeraragavan et al. (1990), Sidebottom et al. (1991), Akoh et al. (1992)
<i>Geotrichum sp.</i>	Macêdo et al.(1997), Kamimura et al. (1999), Medeiros (1999)
<i>Penicillium camembertii</i>	Yamaguchi & Mase (1991)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Iwai et al.(1974)
<i>Penicillium roquefort</i>	Seitz (1974), Petrovic et al.(1990)
<i>Penicillium citrinum</i>	Sztajer & Maliszewska (1989), Maliszewska & Mastalerz (1992), Pimentel et al. (1994)
<i>Penicillium restrictum</i>	Freire et al. (1997 a, b) Gombert et al. (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Seitz (1974), Harris et al. (1990)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Pabai et al. (1995)
<i>Rhizopus delemar</i>	Park et al. (1988), Cruz et al. (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Castro & Anderson (1995)

2.3.2. - Fermentação em superfície

Riviera-Munhoz et al. (1991) compararam a produção de lipase por diferentes fungos no processo de fermentação em superfície e submersa, selecionando o *Mucor miehei*, *Penicillium candidum* e *Penicillium camembertii* como os melhores produtores. O meio de cultura utilizado foi composto de 20 g de farelo de trigo como fonte de carbono e nitrogênio que foi umidificado com 20 mL de uma solução contendo em g/L: KH_2PO_4 13,4;

K_2HPO_4 16,8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 e 1 mL/L de uma solução contendo traços de elementos. O pH foi ajustado a 7,0. As fermentações alcançaram atividades de 40 U/mL, 40 U/mL e 35 U/mL, para o *Penicillium candidum*, *Penicillium camembertii* e *Mucor miehei*, respectivamente, após 7 dias de cultivo a 29°C. Ainda foi realizada uma fermentação em meio líquido com o *Penicillium candidum* com o objetivo de compará-la à fermentação em meio sólido. Verificou-se que a produção da enzima na fermentação em meio sólido começou mais cedo e que a atividade enzimática alcançada foi duas vezes maior que na fermentação submersa.

A produção de lipase por *Candida rugosa* em meio sólido usando farelo de arroz como substrato foi estudada por Rao et al. (1993). O meio otimizado através da técnica de Análise de Superfície de Resposta para obtenção de biomassa foi 0,25% uréia, 4,5% maltose e 15% de óleo; e para a produção de lipase 0,5% uréia, 1,5% maltose e 7,5% óleo.

Bhushan & Hoodal (1994) produziram lipase de uma levedura alcalofílica identificada como *Candida* BG-55 por fermentação em meio sólido, utilizando como substratos farelo de arroz e farelo de trigo. O máximo rendimento de lipase, 58 LU/g de arroz seco, foi obtido após 96 horas, usando farelo de arroz suplementado com 10% de óleo de farelo de arroz e sais minerais.

Estudando a produção de lipase, Gombert et al. (1999) verificaram que *Penicillium restrictum* foi capaz de produzir a enzima através de fermentação semi-sólida atingindo uma atividade enzimática de 30 U/g após aproximadamente 25 horas, num meio basal contendo uma torta residual da indústria de óleo de babaçu enriquecido com 1% de peptona.

A produção de lipase através de fermentação submersa e de superfície utilizando o *Penicillium restrictum*, isolado de resíduo industrial do óleo de babaçu, foi estudada por Castilho et al. (2000). O meio de cultura da fermentação submersa foi composto por peptona, extrato de levedura e óleo de oliva e alcançou uma atividade de 17 U/mL em 64 horas de fermentação. A fermentação em estado sólido utilizou como substrato principal a torta de babaçu e óleo de oliva produzindo 5,8 U/mL de lipase após 24 horas.

2.3.3 – Fermentação submersa

2.3.3.1 – Meio de cultura

Para o estudo da indução na formação de lipase por *Geotrichum candidum*, Tsujisaka et al. (1973) cultivaram o microrganismo em um meio que continha 5% de peptona, 0,1% de NaNO₃, 0,1% de MgSO₄ e 1% de glicose como fonte de carbono para o crescimento. Para a produção de lipase foi utilizado como fonte de carbono 1% de óleo de oliva no meio de cultivo desde o início da fermentação ou após a fase de crescimento exponencial do microrganismo. O crescimento do *Geotrichum candidum* pareceu não ter sido influenciado pela presença do óleo de oliva. Porém, a adição do óleo de oliva somente após 8 horas de fermentação proporcionou uma maior atividade da enzima.

Em trabalhos de produção e purificação de lipase produzida por *Penicillium cyclopium* cultivado, a 27°C e 110 rpm, por 7 dias em um meio de cultura contendo 5% de farelo de arroz, 3% de água de maceração de milho, e 0,2% de (NH₄)₂PO₄ com o pH ajustado para 6,0 verificou-se que havia produção de duas lipases denominadas A e B. Após 6 dias de cultivo a quantidade de enzima excretada foi de 130 U/mL e 120 U/mL de lipase B e A, respectivamente (Iwai et al., 1974).

Tahoun et al. (1982) produziu lipase por *Geotrichum candidum* a 30° C durante 7 dias, em frascos agitados, com o meio de cultura utilizando 4% de tripticase, 0,10% NH₄Cl, 0,15% KH₂PO₄, 0,012% MgSO₄.7H₂O, 0,0001% FeSO₄.7H₂O, 0,0001% ZnSO₄. 7H₂O, 0,0001% MnSO₄. H₂O, 0,25% de glicose e pH ajustado para 5,5. Testou como fonte de carbono adicionados ao meio de cultura Tween 20, Tween 80, óleo de oliva, glicose e ácido oléico. Verificaram que 0,3% de Tween 20 e 0,2% de Tween 80 incrementaram a produção de lipase em aproximadamente 3 vezes, alcançando 2,5 U/mL e 3,3 U/mL, respectivamente.

Chander & Klostermeyer (1983) estudaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* com o meio de cultura basal contendo 2% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% NaCl, 4% de sacarose e o pH ajustado para 7,0. Foram testados diferentes temperaturas de produção (20, 30 e 37°C), pH (4, 5, 6, 7, 8 e 9), fontes de carboidratos a

4% (manitol, glicose, maltose, galactose, sacarose, xilose e frutose), fontes de nitrogênio a 2% (caseína hidrolisada, peptona, uréia, caseína de leite, sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio e cloreto de amônio), fontes de lipídios a 0,1% (trioleína, tributirina, óleo de oliva, “butter oil”, óleo de milho, óleo de mostarda e óleo de girassol). As melhores condições encontradas foram 30°C, pH 7,0, usando sacarose e peptona alcançando 12,5 U/mL. Todos os óleos testados diminuíram o crescimento do microrganismo e a produção da enzima.

Hegedus & Khachatourians (1988) pesquisaram a produção de lipase extracelular de *Beauveria bassiana* testando os meios de cultura com extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) e este mesmo meio com adição de glicose e alguns sais minerais (GMS). Também foi estudado o efeito da concentração do óleo de oliva, verificando-se que com o aumento de 0,02% para 5% alcançava-se atividades enzimáticas cinco vezes maiores. Utilizando o meio de cultura YPD observou-se 100 U/mL e 300 U/mL, sem a presença do óleo de oliva e com 2% de óleo de oliva, respectivamente. O mesmo estudo para o meio GMS proporcionou um menor incremento, de 100 U/mL para 150 U/mL com a presença do óleo após 10 dias de cultivo a 27°C e 150 rpm.

A produção de lipase extracelular e intracelular de *Geotrichum candidum* foi investigada por Jacobsen et al. (1989 a). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo basal contendo peptona e sua produção foi aumentada significativamente com a adição de óleo de oliva ou Tween 80 ao meio. Durante a fase inicial de crescimento do microrganismo no meio de cultivo com óleo de oliva, a produção de lipase intracelular foi maior que a extracelular, e uma interrupção na secreção de lipase extracelular foi encontrada. Porém, a produção total de lipase extracelular durante o crescimento do microrganismo, em meio basal com Tween 80 ou óleo de oliva, foi maior que a produção de lipase intracelular.

Em continuidade ao trabalho anterior, a produção e caracterização de múltiplas formas de lipases por *Geotrichum candidum* foram estudadas por Jacobsen et al. (1989 b). O meio de cultura tinha a seguinte composição, por litro de água destilada: uréia, 3 g; MgSO₄.7H₂O, 2 g; K₂HPO₄.3H₂O, 2g; ácido cítrico.1H₂O, 1g; óleo de oliva, 10 g; goma arábica, 1g. A produção máxima de lipase extracelular foi de aproximadamente 60 U/mL,

encontrada com 27 horas de incubação. Foi demonstrado um alto grau de heterogeneidade das lipases de *G. candidum* por técnicas imunoeletroforéticas, indicando várias formas da enzima.

Para o estudo da produção de lipase extracelular por *Penicillium citrinum* Sztajer & Maliszewska (1989) utilizando um meio basal (2% de amido, 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5% de CaCO_3 , 0,05% K_2HPO_4 e 0,1% de extrato de levedura) testaram 1% de vários indutores como: tributirina, óleo de oliva, óleo de canola, óleo de girassol e resíduos de indústrias de óleo vegetal, sendo o óleo de canola o melhor indutor. Foram testados como fonte de carbono na concentração de 2%: arabinose, celobiose, frutose, galactose, glicose, xilose, maltose, manitol, lactose, sacarose e amido resultando numa produção de lipase quatro vezes superior às demais. Uréia, sulfato de amônio, água de maceração de milho, peptona e farinha de soja foram testados como fontes de nitrogênio. Os resultados demonstraram que a uréia e o sulfato de amônio não estimularam a produção da enzima, no entanto 5% de peptona foi considerado a melhor fonte de nitrogênio para este microrganismo, nas seguintes condições: 22°C, 150 rpm e pH 7,2.

Hang & Woodams (1990) investigando a produção de lipase por *Geotrichum candidum* utilizaram um meio de cultura que continha como substrato a salmoura de chucrutes, com o objetivo de aproveitar os resíduos das indústrias de conservas, e uma pequena quantidade de óleo de oliva (0,3% v/v) como indutor, a 30°C, 240 rpm por 72 horas alcançando 140 U/mg de atividade específica.

Petrovic et al. (1990) pesquisando a produção de lipase por *Penicillium roqueforti* S-86 utilizou um meio de cultura contendo 0,2% de K_2HPO_4 , 0,05% de KCl, 6,5% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Foram testadas diferentes fontes de carbono como glicose, frutose e sacarose (2%), gordura de manteiga (1 e 2%) e óleo de oliva (2%) verificando-se que uma quantidade de lipase máxima de 10 U/mL foi obtida após 6 dias de produção, utilizando 2% de glicose com pH inicial 4,0 a 27°C e 220 rpm. Também foi testada a mudança da fonte de nitrogênio de sulfato de amônio para 1,5% de bactopectona observando-se uma diminuição de 6 para 4 dias para obtenção da produção máxima da enzima.

No estudo de purificação de uma nova lipase produzida por *Penicillium cammembertii*, Yamaguchi & Mase (1991) utilizaram um meio de cultura que continha 2% de óleo de soja, 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de NaNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,05% de KCl, 0,5% de MgSO₄.7H₂O, 0,001% de FeSO₄.12H₂O, sendo o pH ajustado para 6,0 com HCl alcançando 32 U/mg de atividade específica da lipase.

A produção de lipase extracelular de *Penicillium citrinum* foi investigada por Maliszewska & Mastalerz (1992). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo basal contendo 2% de amido, 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 0,025% de MgSO₄.7H₂O, 0,5% de CaCO₃, 0,05% K₂HPO₄, 0,1% de extrato de levedura e 5% de peptona a 22^oC e 122 rpm, e sua produção foi aumentada seis vezes alcançando 4,776 U/L em 168 horas de fermentação com a adição de 0,1% de óleo de oliva. Várias gorduras foram testadas, sendo a tributirina o melhor substrato para esta lipase. A atividade ótima ocorreu no pH 7,2 a 30^oC. A atividade da enzima foi estável na faixa de pH 5-7 e numa faixa de temperatura de 10 a 40^oC.

Com a finalidade de estudar a indução dos triglicerídeos e ácidos graxos na produção da lipase por *Geotrichum candidum* ATCC34614, Shimada et al. (1992) cultivaram a linhagem a 27 ^oC em meio que continha 5% de água de maceração de milho e 0,5% de NH₄NO₃ como fontes de nitrogênio, obtendo cerca de 80 U/mL de atividade enzimática de lipase.

Investigando a purificação de lipase produzida por *Penicillium simplicissimum* Sztajer et al. (1992) testaram 3 meios de cultura para produção da enzima. O meio I foi peptona 3%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,9% e 1% de indutor em tampão fosfato 50mM pH 7,0; o meio II com 2% de amido, 0,3% de NaNO₃, 0,05% KCl, 0,05% de MgSO₄.7H₂O, 0,001% FeSO₄.7H₂O e 1% de indutor em tampão fosfato 50mM pH 7,0; e o meio III contendo peptona 1%, farinha de soja 2%, MgSO₄.7H₂O 0,1%, CaCl₂ 0,005%, K₂HPO₄ 0,2% em 1 L de água destilada. As condições de produção em frascos agitados foram 30^oC e 120 rpm, utilizando como indutor a trioleína e alcançando com o meio I 2,4 U/mL após cerca de 48 horas de fermentação. Para os meios II e III não houve produção da lipase.

Pastore (1992) investigou exaustivamente 1285 linhagens de microrganismos

isoladas de amostras de solo, frutas e resíduos industriais, observando 8 linhagens de fungos como produtoras de enzimas lipolíticas. O *Trichoderma* sp. foi selecionado por apresentar uma alta produção de lipase, alcançando após 72 horas de fermentação, 2,4 U/mL utilizando monoleína como substrato. Com este microrganismo foi estudada a produção de lipase extracelular e a enzima foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose. A enzima purificada foi caracterizada e apresentou atividade ótima em pH 5,6 a 40 - 45 °C. Também foram estudados sistemas de lipases combinadas com especificidades diferentes para estudar o grau de hidrólise de óleos e gorduras para produção de ácidos graxos e glicérides, e verificou-se que um sistema de lipase de *Candida rugosa* e *Penicillium* sp. hidrolisou 95,9% de óleo de oliva com o tempo de reação de 20 horas. Ainda foi examinada a esterificação enzimática de ácido graxo e glicerol por lipase de *Penicillium* sp. sendo observado que esta enzima esterificou cerca de 71% de monoglicérido após 40 horas de reação.

Cruz et al. (1993) avaliaram o uso de algumas fontes de carbono e nitrogênio utilizadas industrialmente. Glicose, dextrina amarela e amidex foram testados como fonte de carbono, visando a produção de lipase por *Rhizopus delemar*. Fontes de nitrogênio como o caseinato de sódio, pasta de soja, farinha de soja, extrato de levedura e casaminoácidos foram investigadas. Os resultados revelaram que a dextrina amarela e o amidex como fonte de carbono forneceram melhores rendimentos para o processo, os casaminoácidos e farinha de soja são insuficientes como fonte de nitrogênio e que a atividade lipolítica aumentou 4,6 vezes especialmente com caseinato de sódio, atingindo 3,0 U/mL e 5,6 vezes com pasta de soja alcançando 3,7 U/mL. Alguns agentes excretores foram testados e os pesquisadores observaram que a presença do surfactante Tween 80 estimulou a excreção da lipase produzida por *Rhizopus delemar* para o meio extracelular. Portanto, a produção de lipase extracelular pode ser influenciada pela presença de tensoativos que modificam a tensão superficial do meio, facilitando a excreção da enzima.

Uma linhagem brasileira de *Penicillium citrinum* foi investigada como produtora de lipase por Pimentel et al. (1994). O microrganismo cultivado em meio contendo 1% de óleo de oliva e 0,5% de extrato de levedura resultou em uma atividade máxima de 4,09 IU/L. Na

caracterização da enzima a temperatura ótima encontrada para atividade enzimática foi na faixa de 34 - 37 °C. Após tratamento a 60 °C por 30 minutos a enzima foi completamente inativada. O pH ótimo para atividade enzimática foi 8,0.

Estudos da estabilidade e o efeito da concentração inicial de ácido oléico na produção de lipase por *Candida rugosa* foram relatados por Gordillo et al. (1995). A concentração inicial da fonte de carbono, ácido oléico, revelou um efeito importante na atividade lipolítica. O máximo rendimento lipase/substrato e produtividade específica obtidos corresponderam à concentração inicial de ácido oléico de 2 g/L, enquanto que, em concentrações superiores a 8 g/L de ácido oléico houve um decréscimo na atividade lipolítica e não ocorreu produção para concentrações inferiores a 1 g/L.

Hatzinikolaou et al. (1996) estudaram como fonte de carbono para produção de lipases extracelulares por *Aspergillus niger* o óleo de milho, a glicose, a sacarose e o óleo de oliva. Os resultados demonstraram que a melhor fonte de carbono foi o óleo de milho na concentração de 2%. Ainda foram testadas três fontes de nitrogênio: fosfato de amônio, sulfato de amônio e peptona na concentração de 1%. A melhor atividade lipolítica equivalente a 40,5 U/mL foi encontrada quando utilizou-se peptona a 1% e óleo de milho a 2%.

Sousa (1996) realizou um “screening” de microrganismos e isolou uma linhagem de bactéria identificada como *Alcaligenes* sp., produtora de lipase alcalina que quando cultivada em meio composto por 2% de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato dibásico, 1% de água de maceração de milho atingiu 9 U/mL após 72 horas de fermentação a 30°C.

Aeromonas sobria produziu lipase num meio contendo 25%(v/v) de soro de leite, 1%(p/v) de farinha de soja, 0,1%(p/v) de glicose e 0,5%(p/v) de extrato de levedura, com suplemento de alguns sais minerais. A atividade enzimática aumentou cerca de 10 vezes até aproximadamente 450 U/mL, em um fermentador de bancada de 7 litros após 36 horas a 37°C, 250 rpm e 1vvm (Lotrakul & Dharmstithi, 1997).

Macêdo et al. (1997) estudaram a produção, purificação, caracterização bioquímica

e aplicação de lipases de *Geotrichum* sp. em frascos agitados. A linhagem especificada como *Geotrichum* sp. apresentou uma produção de lipase de 6 U/mL, em meio de cultivo composto por 1,5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 3% de extrato de levedura e 0,2% NH_4NO_3 , quando incubada a 30 °C por 48 horas.

Freire et al. (1997 a) estudaram como fonte de carbono para produção de lipases por *Penicillium restrictum* o óleo de oliva, a glicose e a lactose. Os resultados demonstraram que o crescimento celular para o óleo de oliva e a glicose foram semelhantes porém, a atividade enzimática foi cerca de 6 vezes superior com o uso do óleo de oliva, indicando que a produção da enzima pode ser regulada pela glicose. Na presença da lactose não houve crescimento celular e ocorreu baixa produção da enzima, devido ao microrganismo não metabolizar este açúcar. Peptonas de carne e soja e caseína a 2% foram investigadas como fontes de nitrogênio e resultaram em um crescimento celular semelhante, porém a capacidade de produção da enzima alcançou melhores níveis com a peptona de carne, obtendo um máximo de 13,0 U/mL de atividade enzimática. O microrganismo em estudo foi incapaz de crescer na presença de nitrogênio inorgânico.

Na continuação do trabalho anterior Freire et al. (1997 b) verificaram o efeito da temperatura e pH inicial do meio de cultura na produção de lipase utilizando o mesmo microrganismo. As temperaturas estudadas foram 25°C, 30°C e 37°C, e a faixa de pH variou de 5,5 a 8,0. Foi observado que a melhor condição de produção da enzima foi a 30°C e pH inicial de 5,5. A enzima foi caracterizada quanto à sua estabilidade e condições ótimas de atuação. Através deste estudo foi possível concluir que o pH e a temperatura ótima foram de 7,0 e 37°C, respectivamente. A enzima foi estável na faixa de 30°C a 37°C no pH 7,0.

Em trabalhos com o *Geotrichum* sp foram testados 2 meios de cultivo para a produção de lipase, em fermentadores de bancada. O meio de cultura sintético testado foi: 1% de óleo de oliva, 20 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de NH_4Cl , 1,5 g/L de K_2HPO_4 , 1,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 17 mg/L de FeSO_4 , 17 mg/L de ZnSO_4 17 mg/L de MnSO_4 . Os autores concluíram que a melhor produção de lipase foi obtida no meio de cultura com 1% de óleo de oliva, 0,5% NH_4NO_3 e 5% de água de maceração de milho, a 30 °C por 15 horas, verificando uma atividade máxima de aproximadamente 25 U/mL (Kamimura et al., 1999;

Mendieta, 1999; Kamimura, 2000).

Medeiros (1999) estudou os efeitos das fontes de carbono (óleo de soja, óleo de oliva e glicose) e fonte de nitrogênio (água de maceração de milho e nitrato de amônio) para a produção de lipase por *Geotrichum* sp a 30°C e 120 rpm em frascos agitados. A técnica de planejamento experimental e análise da superfície de resposta foi utilizada para otimização da produção de lipase. Os resultados obtidos com as condições otimizadas foram atividade enzimática de 18 U/mL utilizando 2,1-2,5% de nitrato de amônio, 13-15% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja.

Como pode ser visto na literatura descrita anteriormente a produção da lipase ocorre em diversos meios de cultura. A Tabela 2.3 apresenta de forma resumida as composições dos meios de cultura para produção da enzima pelo *Geotrichum*.

Tabela 2.3: Diferentes meios de cultura para produção de lipase por diferentes cepas de *Geotrichum*.

Composição do meio de cultura
Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Glicose 1% e Óleo de oliva ou Óleo de soja 1%
Triticase 4%, NH ₄ Cl 0,10%, KH ₂ PO ₄ 0,15%, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,012%, FeSO ₄ .12H ₂ O 0,0001%, ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,0001%, MnSO ₄ .H ₂ O 0,0001%, glicose 0,25% e 0,2% de Tween 80
Peptona 2%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,2% e 4% Sacarose
Peptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O 1,25 g/L e Tween 80 0,4%
Uréia 3 g/L, MgSO ₄ .7H ₂ O 2 g/L, K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O 2 g/L, Ácido cítrico 1 g/L, Óleo de oliva 10 g/L e Goma arábica 1 g/L
Salmoura e Óleo de oliva 0,3%
Água de maceração de milho 5%, NH ₄ NO ₃ 0,5% e Óleo de oliva 1%
Farinha de soja desengordurada 1,5%, Farinha de trigo 1%, Extrato de levedura 3% e NH ₄ NO ₃ 0,2%
Água de maceração de milho 15%, NH ₄ NO ₃ 2,5% e Óleo de soja 0,6%
Extrato de levedura 20 g/L, NH ₄ Cl 1g/L, K ₂ HPO ₄ 1,5 g/L, MgSO ₄ .7H ₂ O 1,2 g/L, FeSO ₄ 17 mg/L, ZnSO ₄ 17 mg/L, MnSO ₄ 17 mg/L e Óleo de oliva 1%

É possível observar que, para a maioria das composições dos meios de cultura é necessária uma boa concentração da fonte de nitrogênio seja peptona, extrato de levedura, tripiticase, uréia ou água de maceração de milho que variou de 3 g/L a 50 g/L. Fontes de nitrogênio inorgânico como NH_4NO_3 , NaNO_3 e NH_4Cl também apresentaram variações de concentrações de 0,1 a 2,5%. Alguns meios de cultura contêm sais de zinco, magnésio, manganês, sódio e potássio que provavelmente também estejam presentes em componentes como a água de maceração de milho. Algumas cepas de *Geotrichum* não precisam de glicose para produzir a lipase, no entanto é necessária a presença de um indutor como o óleo de oliva ou o Tween.

2.3.3.2 - Condições operacionais

Baillargeon et al. (1989) investigaram 3 linhagens de *Geotrichum candidum* (ATCC 34614, NRRLY-552 e NRRLY-553) para produção de lipase. Variáveis como composição do meio, pH, temperatura, velocidade de agitação e tempo de incubação foram estudadas. A maior atividade lipolítica obtida foi a 30°C, com 24 horas de incubação a 300 rpm de agitação e pH neutro. Para todas as linhagens de *G. candidum* a produção de lipase foi estimulada pela presença de óleo de oliva ou glicerol. As atividades lipolíticas nessas condições foram 3,7 U/mL, 5,5 U/mL e 5,5 U/mL, para as lipases ATCC 34614, NRRLY-552 e NRRLY-553, respectivamente.

De acordo com Jacobsen et al. (1989 a) foram produzidas lipases por *Geotrichum candidum* utilizando as seguintes condições operacionais: temperatura do meio 30 °C, velocidade de agitação 750 rpm e aeração de 1600 mL de ar min^{-1} . O máximo de concentração de massa celular de 5,9 g/L foi obtido após 22 horas de crescimento, e o máximo de lipase extracelular, após 27 horas. Foi observado que o pH diminuiu lentamente durante o início da fermentação, mas aumentou na fase estacionária para o valor de 7,4.

Produzindo a lipase de *Penicillium simplicissimum* em frascos agitados a 30°C com 120 rpm, Sztajer et al. (1992) alcançaram uma atividade enzimática de 2,4 U/mL, após cerca de 48 horas de fermentação. Trabalhando em um fermentador de bancada a 30°C, com 100 rpm e 120 L/h de aeração, os mesmos autores conseguiram 6,9 U/mL no mesmo tempo de fermentação.

Para a produção de lipases por *Penicillium restrictum*, Freire et al. (1997 a) pesquisaram as condições de aeração e agitação, em fermentadores de bancada com capacidade de 5 litros a temperatura de 30^o C e pH inicial de 5,5 variando a vazão de ar de 0,2 a 1,0 vvm e a rotação de 50 a 300 rpm. Os melhores resultados de atividade enzimática foram obtidos quando utilizou-se 200 rpm e 0,5 vvm, alcançando-se uma atividade enzimática de 13 U/mL.

Macêdo et al. (1997) estudaram a produção de lipase por *Geotrichum* sp., em frascos agitados, nas condições operacionais de 30^o C por 48 horas de incubação com 100 rpm de agitação. A lipase de *Geotrichum* sp. apresentou atividade máxima de 6 U/mL na faixa de pH 5 a 8 a 45^o C. A atividade enzimática foi acrescida em 45% na presença de 1 mM de MgSO₄ no sistema de reação.

Segundo Chen et.al (1999) a influência do oxigênio na produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* pode ser estudada de duas formas: com o controle da concentração de oxigênio dissolvido e com o controle da vazão de aeração. Observaram, também, que o fator intrínseco que determinou o crescimento celular e a produção de lipase foi a velocidade de transferência de oxigênio prioritariamente em relação à concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, a produtividade da lipase dependeu mais da agitação que da aeração e poderia estar relacionada ao coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida.

Kamimura et al. (1999), Mendieta (1999) e Kamimura (2000) produziram lipase por *Geotrichum* sp., em fermentador de bancada, nas condições operacionais de 400 rpm de agitação, 1vvm, à 30^o C por 15 horas alcançando cerca de 25 U/mL de atividade enzimática.

Portanto, conforme a literatura a produção de lipase ocorreu a 30^oC, com agitação variando de 100 a 300 rpm, com pH neutro, em frascos agitados e alcançando de 2,4 a 6 U/mL de atividade lipolítica dependendo do microrganismo utilizado. Através de uma ampliação de escala, em reatores de bancada, as condições operacionais também são bastante variáveis como a velocidade de agitação encontrando-se na faixa de 100 a 750 rpm e a taxa de aeração de 200 a 2000 mL/min, obtendo de 6 a 25 U/mL.

2.4 – Indução na produção de lipase

A indução da formação de lipase de *Geotrichum candidum* foi estudada por Tsujisaka et al. (1973). A formação de lipase somente na presença de triglicerídeos e ácidos graxos no meio de cultura foi a principal característica desta linhagem. O crescimento do microrganismo pareceu não ter sido afetado pela presença do óleo, porém a produção de lipase foi fortemente influenciada. A atividade máxima de 7,64 U/mL em 6 horas de incubação a 30 °C foi obtida utilizando óleo de oliva. Os ácidos graxos de cadeia longa como ácido oléico, linoléico ou span 80 (Sorbitol Monoestearato) na concentração de 1% induziram a produção de lipase. No entanto, os ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico, não induziram a formação da enzima.

Shimada et al. (1992) estudaram a indução dos triglicerídeos e ácidos graxos na produção da lipase por *Geotrichum candidum*. Diferentes ácidos graxos, triglicerídeos de cadeia saturada e insaturada, foram adicionados ao meio de cultivo e incubados por 50 horas. Foi verificado que a produção de lipase foi induzida por óleo de oliva, óleo de soja, trioleína, ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa tais como: ácido oléico, linoléico, palmítico, mirístico, láurico e capróico. No entanto, os autores verificaram que os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia curta e saturada e seus ésteres não induziram a produção de lipase.

Conforme Maliszewska & Mastalerz (1992), o óleo de oliva ou Tween 80 estimularam a produção de lipase por *Penicillium citrinum*. Uma concentração de 0,1% de óleo de oliva resultou num aumento de 6 vezes da atividade lipolítica quando comparada ao meio basal. Várias gorduras foram testadas, e tributirina foi o melhor substrato para lipase de *Penicillium citrinum*. A atividade ótima ocorreu no pH 7,2 a 30 °C. A atividade da enzima foi estável na faixa de pH 5-7 e numa faixa de temperatura de 10 a 40 °C.

2.5 – Especificidade de lipase

Park et al. (1988) estudaram um sistema combinado de lipases para hidrólise do óleo de soja. Lipases produzidas por *Rhizopus delemar* (D), *Rhizopus niveus* (N) e *Penicillium* sp.(G) hidrolisaram óleo de soja com os seguintes rendimentos: 44%, 42% e

7,2%, após 10 horas de reação, resultando em hidrólise incompleta. Quando um sistema de enzimas combinadas (G+D) e lipases (G+N) foi utilizado, o grau de hidrólise aumentou para 95-98% após 10 horas de reação.

A especificidade de lipases produzidas por linhagens diferentes de *Geotrichum candidum* (ATCC 34614, NRRLY-552 e NRRLY-553) pela hidrólise de ésteres de ácidos oléico e palmítico foi estudada por Baillargeon et al. (1989). A lipase de *G. candidum* NRRLY-553 mostrou preferência por hidrolisar ésteres de ácido oléico, enquanto as lipases ATCC 34614 e NRRLY-552 discriminaram ácido oléico e palmítico.

Estudos sobre purificação e especificidade por substratos de quatro lipases de duas linhagens de *Geotrichum candidum*, ATCC 34614 e CMICC 335426, foram realizados. Os autores denominaram as enzimas lipase I e II (ATCC 34614) e lipase A e B (CMICC 335426), que são unidades monoméricas, com massas moleculares e pontos isoelétricos (pI) similares. Lipases I e II têm massas moleculares de 50100 e 55500 Daltons e pI 4,61 e 4,47, respectivamente. A lipase B CMICC 335426 mostrou especificidade preferencial por substratos insaturados com dupla ligação na posição 9, sendo essa especificidade não observada em nenhuma das outras enzimas. Portanto, devido a essa característica, a lipase B pode ser de grande interesse na indústria (Sidebottom et al., 1991).

No estudo de lipases produzidas por *Penicillium camembertii*, Yamaguchi & Mase (1991) observaram que a lipase denominada B foi específica aos substratos mono e diacilglicerol e hidrolisou com mais eficiência monoacilgliceróis de cadeia longa. Triglicerídeos foram completamente inertes como substrato para esta enzima.

A investigação sobre o melhor método de atividade lipolítica foi realizada por Vorderwülbecke et al. (1992), selecionando seis lipases por diferentes métodos. Algumas lipases demonstraram ser muito mais ativas em alguns substratos artificiais em concentrações nas quais não era identificada atividade em outros substratos. Enzimas que naturalmente hidrolisam trioleína sempre hidrolisam p-nitrofenilpalmitato (pNPP), p-nitrofenilbutirato (pNPB), e, com uma exceção, hidrolisam também dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGR) e s,o,o-tributiril-1-tioglicerina (TBTG). Porém, a hidrólise em pNPP e pNPB não significaram necessariamente hidrólise de trioleína. Os pesquisadores sugerem

que as lipases devem ser classificadas como éster-hidrolases com a capacidade de formar ésteres, e em algumas condições, de reagir sem a presença da interface óleo-água, e que aceitem grupos NH₂ ou SH ao invés de OH. A classificação EC para o grupo é útil e importante quando se trata de estudos fisiológicos ou enzimológicos. No entanto, quando se trata de hidrólise de substratos diferentes, a classificação se torna limitada.

Segundo Macrae (1983), Foglia et al. (1993) e Pabai et al. (1995) as lipases podem ser divididas em 3 grupos: não específicas, 1,3 específicas e ácido graxo específica.

As lipases não específicas catalisam a hidrólise completa de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol em qualquer posição da estrutura do grupo acil, tendo como intermediários mono e diglicerídeos, atuando de modo aleatório. Como exemplos de enzimas desta classe são as produzidas por *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus curveus* que têm sido comumente usadas para a síntese de acilglicerol, alcoólise e interesterificação de glicerídeos, que pode ser observado através das reações na Figura 2.2.

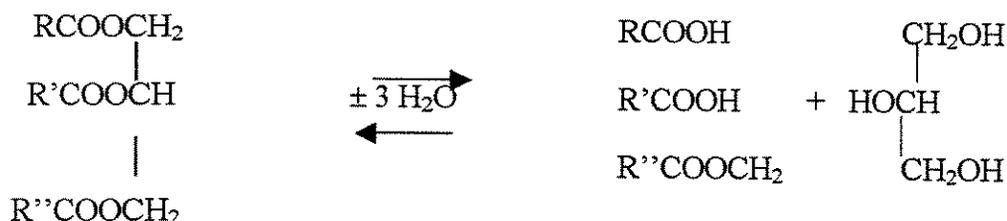


Figura 2.2. Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases não específicas.

As lipases 1,3 específicas catalisam a hidrólise dos ácidos graxos na posição 1,3 do triacilglicerol resultando na formação de ácidos graxos livres, 2-monoglicerídeos e 1,2 ou 2,4-diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diglicerídeos, ou 1- ou 3- monoglicerídeos. Neste grupo estão as lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei* e por diferentes espécies de *Rhizopus* (Figura 2.3).

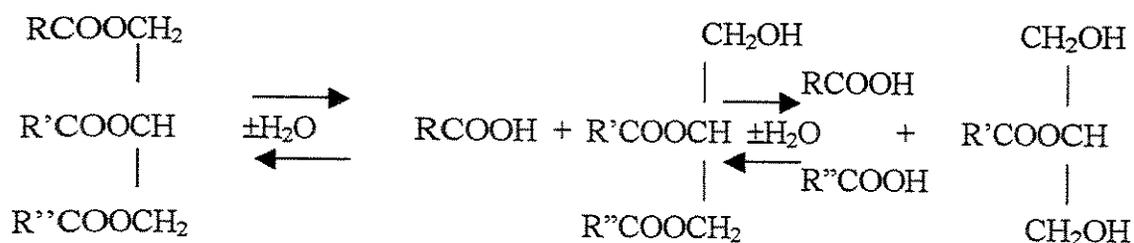


Figura 2.3. Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases 1,3- específicas.

As lipases ácido graxo específicas são específicas para hidrólise de ésteres com determinados ácidos graxos, como por exemplo, a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturados, com dupla ligação cis no C₉. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no C₉, são lentamente hidrolisados. Devido a esta especificidade, lipase de *Geotrichum candidum* tem sido muito estudada para reações de alcoólise de óleos selecionados que contém ácidos graxos poliinsaturados, conforme a Figura 2.4.

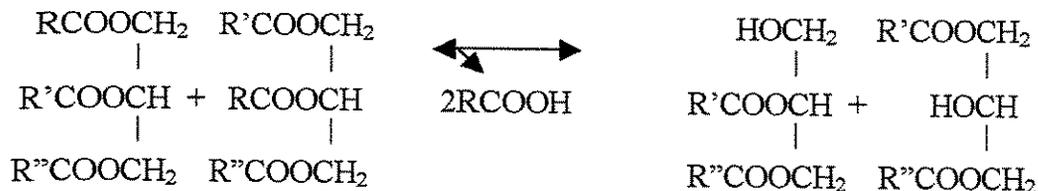


Figura 2.4. Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases ácido graxo específicas.

Carvalho (1998) relata o estudo de reações de hidrólise e estereificação catalisadas por lipases de *Rhizopus* sp. (específica posicionalmente), *Geotrichum* sp. (especificidade para ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição cis-9) e *Candida cylindracea* (inespecífica posicionalmente) que promoveram um enriquecimento significativo nos níveis de ácido gama-linolênico (GLA) em óleo de *Mucor* sp. e ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha.

Segundo Lozano (2001), o estudo da propriedade enantiosseletiva da lipase parcialmente purificada isolada de *Rhizopus* sp., realizado através da esterificação do ácido láurico e o álcool quiral 2-octanol, mostrou que a enzima catalisou com maior eficiência a

forma (R)-enantiômero do 2-octanol.

2.6 – Caracterização de lipase

De acordo com Baillargeon (1990) no estudo da purificação e especificidade de lipases de *Geotrichum candidum* a partir de um preparado bruto comercial da enzima foram isoladas duas enzimas denominadas lipase A e B. A lipase A continha 11,4% de carboidratos e mostrou ser estável com 99% de atividade residual após incubação a 30 °C por 24 horas. As lipases A e B apresentaram composição de aminoácidos similares.

A caracterização e purificação de duas lipases extracelulares de *Geotrichum candidum* foram estudadas por Veeraragavan et al. (1990). As lipases I e II foram purificadas 35 vezes com 62% de recuperação em atividade e 94 vezes com 18% de recuperação, respectivamente. Seus pesos moleculares foram estimados por peneira molecular em 56000 Daltons. As lipases I e II têm valores de pH ótimo de 6 e 6,8 e pontos isoelétricos de 4,56 e 4,46. As enzimas são estáveis na faixa de pH 6 a 8.

Philips & Pretorius (1991) purificaram e caracterizaram a lipase extracelular de *Galactomyces geotrichum*, um fungo teleomorfo do *Geotrichum candidum*, e compararam as características das duas enzimas. A quantidade máxima de lipase produzida pelo *Galactomyces geotrichum* foi observada após 24-36 horas de incubação, em meio preparado com óleo de oliva. A lipase modificada mostrou ter diferente composição de aminoácidos em relação à lipase do *G. candidum*. A atividade máxima da enzima de *G. geotrichum* obtida neste trabalho foi a pH 7,75 e 30 °C, e a mesma perdeu toda a atividade quando submetida a tratamento a 56 °C por 35 minutos. A especificidade das lipases por ácidos graxos insaturados foi semelhante.

A lipase obtida por *Geotrichum* sp. foi purificada 16,5 vezes através de fracionamento com sulfato de amônia e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50. A enzima apresentou atividade ótima na faixa de pH 5-8 a 45 °C (Macedo et al., 1997).

A caracterização e purificação da lipase produzida por *Alcaligenes* sp. foi estudada por Sousa (1996). A purificação através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 foi realizada. Na purificação das proteínas,

2 frações com atividade de lipase foram detectadas e denominadas frações I e II, que apresentaram atividade ótima em pH 8 a 40 °C e pH 9 a 45 °C, respectivamente.

2.7 – Influência de alguns compostos na atividade enzimática

Hegedus & Khachatourians (1988) testaram o efeito dos íons divalentes Fe^{++} e Cu^{++} na atividade lipolítica de *Beauveria bassiana* verificando que na concentração de 0,001M inibiram 15% e 31%, respectivamente a enzima. A presença de 0,3% de Tween 80 também inibiu a atividade da enzima enquanto que os sais de magnésio aumentaram significativamente a atividade.

Estudando as características da lipase de *Penicillium caseicollum*, Alhir et al. (1990) verificaram a influência dos sais cloreto de cálcio, taurocolato de sódio e desoxicolato de sódio na atividade lipolítica. Quando o substrato utilizado foi a tributirina, os três sais atuaram como inibidor na produção de lipase. Utilizando óleo de manteiga os sais biliares elevaram a atividade enzimática e o $CaCl_2$ continuou atuando como inibidor.

Maliszewska & Mastalerz (1992), estudando a caracterização da lipase de *Penicillium citrinum*, verificaram a influência de sais como o NaCl e KCl em concentrações superiores a 1M e observaram que não tinham efeito na atividade de lipase. Os íons Fe^{++} , Mg^{++} e Ca^{++} agiram como inibidores parciais para a atividade de lipase, enquanto que Cu^{++} e sulfato dodecil de sódio inibiram completamente a atividade da enzima.

2.8 – Influência de agitadores

Justen et al. (1998), estudaram a influência do tipo de agitador e a velocidade de agitação no crescimento, morfologia e produtividade de *Penicillium crysogenum* durante a fermentação em processo batelada, num fermentador de 15 L com volume de trabalho de 6L, na produção de penicilina G. Um agitador padrão Rushton de 4 pás e outro de 6 pás foram comparados. A agitação variou de 280 a 1000 rpm, com 1vvm de aeração, o oxigênio dissolvido foi mantido no mínimo a 40% de saturação, a 25°C e o pH controlado em 6,5. Na fase de crescimento, a taxa de crescimento específico foi proporcional à velocidade de agitação e ao tipo de agitador. A taxa de produção da penicilina foi maior para velocidades menores e agitadores menores. Devido ao fato que para maiores velocidades de agitação

detectou-se uma maior fragmentação do microrganismo e a formação de novos tipos de colônias, prejudicando a produtividade da penicilina.

Silva-Santisteban (2001) investigou a influência dos agitadores pás inclinadas, hélice naval e turbina de Rushton sobre a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 em reator de mistura com capacidade para 2 litros, nas condições de 30°C, 1 vvm e 450 rpm alcançando cerca de 126,1 U/mL para o agitador tipo hélice naval, com a turbina de Rushton um valor similar de 121,5 U/mL e com o agitador de pás inclinadas alcançou uma maior produção de 176,2 U/mL.

2.9 - Produção em fermentador “air-lift”

Os reatores “air-lift” são caracterizados por uma circulação de fluido num modelo cíclico definido, através de canais construídos com este propósito. A diferença entre o líquido contendo bolhas de ar na seção de fluxo ascendente (“riser”) e do líquido na seção de fluxo descendente (“downcomer”) promove a circulação do fluido no reator.

Diferentes variações de reatores “air-lift” têm sido desenvolvidas, com diferenças na geometria do reator contando com reatores cilíndricos e retangulares, com reciclo externo e tubos concêntricos, tipos de separadores gás-líquido com a finalidade de melhorar a transferência de oxigênio dissolvido em diferentes regiões no interior do reator.

As vantagens do reator “air-lift” quando comparado a reatores convencionais vão desde os custos de implantação até a operação. O reator “air-lift” destaca-se por necessitar de uma menor demanda de energia, uma vez que o “air-lift” não requer agitação mecânica, é um reator de simples construção em escala industrial, principalmente pela ausência de partes móveis e geometria simples, além de ter grande relação altura x diâmetro, razão pela qual pode ser construído em áreas com restrição de espaço. Entretanto, as maiores vantagens do reator “air-lift” em relação aos reatores convencionais são a maior transferência de oxigênio, com menor custo e menor área ocupada.

Através da investigação na produção de β -D-glucosidase (E.C.3.2.1.21), endo-1,4- β -D-glucanase (E.C.3.2.1.4) e D-xilanase (E.C.3.2.1.8) por *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 em fermentador com agitação convencional e fermentador “air-lift” foi possível

observar que, no fermentador “air-lift” as atividades enzimáticas alcançadas foram cerca de 20% maior que no fermentador com agitação mecânica. Este fato pode ser causado pela ação cisalhante do agitador que, embora não afete a enzima já produzida, provavelmente danifique o micélio do fungo, inibindo a subsequente produção da enzima (Wase *et al.*, 1985).

Chevalier & Noue (1987) investigaram a produção de α -amilase com células livres e imobilizadas de *Bacillus subtilis* em fermentadores de bancada e em fermentador “air-lift” utilizando as mesmas condições de aeração a 1/3 vvm e temperatura de 30°C. No fermentador convencional o crescimento foi mais lento que no “air-lift”, atingindo a concentração máxima de biomassa após 24 h. A taxa máxima de crescimento para o “air-lift” foi de 0,55 h⁻¹ e 0,37 h⁻¹ para o fermentador convencional. Porém, a diferença mais significativa foi na produção da enzima. Após 12h de fermentação no “air-lift” foram observados 18 U/mL de atividade enzimática enquanto no fermentador convencional, 15,7 U/mL após 24 h. Verificou-se ainda que 7,09 mg/L (99,4% de saturação) e 5,20 mg/L (71% de saturação) foram as medidas de oxigênio dissolvido no “air-lift” e no fermentador convencional, respectivamente.

Schmidhalter & Canevascini (1992) estudaram a produção de um sistema de enzimas celulolíticas de *Coniophora puteana* em fermentadores “air-lift” devido a este fungo ser muito sensível à agitação mecânica convencional. Foram testadas diferentes fontes de carbono como a glicose, celobiose e celulose amorfa que influenciaram na taxa de crescimento específico variando em 0,082, 0,068 e 0,062 h⁻¹ e o rendimento 0,45, 0,39 e 0,34 g/g, respectivamente.

A produção de fosfolipase D (PLD) em processo contínuo no “air-lift” e processo em batelada e batelada alimentada em fermentador com agitação mecânica convencional foi pesquisada usando células de *Streptomyces lydicus* livres e imobilizadas em quitosana. Na cultura contínua com células imobilizadas foi observada uma alta atividade e produtividade numa taxa de diluição de 0,33 h⁻¹. A atividade foi de aproximadamente 12,7 U/mL na cultura contínua com células imobilizadas, enquanto a produtividade foi de 4,19x10³ U/L.h, cerca de 3 vezes maior que a cultura em batelada (1,16x10³ U/L.h), 3,6

vezes a cultura em batelada alimentada ($1,27 \times 10^3$ U/L.h) e 3 vezes maior que a cultura contínua com células livres ($1,36 \times 10^3$ U/L.h) (Shinonaga et al., 1996).

Kim et al. (1997) verificaram a produção de celulase, xilanase e β -glucosidase de *Aspergillus niger* KKS em diferentes biorreatores. Foram utilizados os fermentadores tipo frascos agitados, agitação mecânica convencional, borbulhamento em coluna e “air-lift”, os três últimos foram testados em processo batelada e batelada alimentada. Em geral melhores rendimentos e produtividade das enzimas foram encontrados nos reatores com borbulhamento em coluna e “air-lift”. Os melhores resultados para a celulase foram um rendimento de 84 FPA IU/g, em reator com borbulhamento em coluna, e produtividade de 9,7 FPA IU/L.h, com agitação convencional, alcançados no modo de operação em batelada alimentada. A xilanase obteve um rendimento máximo de 9100 U/g em reator com borbulhamento em coluna operando em batelada, e produtividade de 823 U/L.h no “air-lift” em batelada alimentada. No caso da β -glucosidase o melhor desempenho foi conseguido com o fermentador “air-lift” em batelada, alcançando um rendimento de 370 U/g e 26 U/L.h de produtividade.

Siedenberg et al. (1997) estudaram a produção de xilanase por *Aspergillus awamori* em tanque agitado e aerado e em reator “air-lift”. Entre outros fatores verificaram que a produção da enzima foi influenciada pelo tamanho do “pellet” formado e pela concentração de esporos adicionados ao meio de cultivo. No tanque agitado, maiores produtividades no processo de produção de xilanase foram obtidas com pequenos “pellets”, em contraste com os resultados encontrados no “air-lift”. A produção no tanque agitado foi cerca de 8 vezes maior que no reator “air-lift”.

A produção de L(+) ácido láctico foi estudada por Yin et al. (1997) verificando-se que após 4 dias de cultura a concentração de L(+) ácido láctico foi de 82 g/L em um fermentador de bancada enquanto que no fermentador “air-lift” a produção de 92 g/L foi alcançada em 3 dias, sendo as taxas de produção de 0,85 g/L.h e 1,27 g/L.h e o rendimento de 68% e 78%, respectivamente. O menor rendimento obtido no fermentador com agitação pode ser devido a aderência do micélio no vidro, o que resultaria numa diminuição na transferência de oxigênio e substrato, fato este não observado no fermentador “air-lift”.

Jin et al. (1998), fazendo parte de um programa de tratamento de efluentes estudaram a produção de proteína de biomassa microbiana e α -amilase fúngica produzida por *Aspergillus oryzae* utilizando o efluente líquido do processamento do amido em um reator "air-lift", utilizando as condições ótimas de crescimento a pH 5,0 e 35°C conseguiram obter 6 g/L de proteína de biomassa microbiana contendo 38% de proteína e 55 EU/mL de α -amilase em 12 horas de cultivo em batelada com um reator com 3,5 litros.

2.10 - Planejamento experimental e análise de superfície de resposta na produção de lipase e suas aplicações

Os planejamentos fatoriais foram introduzidos por G. E. P. Box na década de 1950. Nos últimos 15 anos sua aplicação vem crescendo exponencialmente desde a revolução da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (Barros et al., 1996).

Na maioria dos processos químicos e bioquímicos a necessidade de se obter altos rendimentos acaba sempre comprometendo a produtividade. Atualmente, a imposição de minimizar custos tem levado os engenheiros de processo a analisar previamente as implantações dos sistemas, com o objetivo de determinar faixas de operação que continuem garantindo um bom rendimento sem prejuízos na produtividade, situação esta imprescindível para a viabilidade de um processo. Em processos bioquímicos geralmente se observa a influência de muitas variáveis, onde a importância de cada variável deve ser determinada. Portanto, a otimização baseada no planejamento experimental e análise de superfície de resposta é uma ferramenta muito útil de trabalho para melhor compreensão do sistema, permitindo a análise individual do efeito de cada variável e de suas interações nas respostas desejadas (Rodrigues, 1993).

Como já foi citado anteriormente por outros autores como Kalil et al. (2000), a importância do uso da técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta advém do fato desta metodologia possibilitar a análise dos efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as variáveis, que só podem ser verificados pela determinação dos efeitos de interação entre as mesmas através de um planejamento fatorial.

Harris et al. (1990), utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), estudaram as variáveis independentes temperatura do meio (8 a 41^oC), pH (6,32 a 9,68) e agitação (8 a 92 rpm) para maximização da síntese de lipase por *Pseudomonas fluorescens* cultivada em um meio à base de leite desnatado (NFDM: 10%, Fleming Co.). As condições ótimas deste estudo foram determinadas como: temperatura de 25 ^oC, pH de 8,07 e agitação de 65 rpm, obtendo após 5 dias de incubação aproximadamente 20 U/mL. A temperatura foi o fator que mais influenciou a produção da enzima, devido à ampla faixa estudada.

Cruz et al. (1993) estudaram a otimização do meio de cultura para produção de lipase extracelular por *Rhizopus delemar*. Inicialmente foram realizados ensaios experimentais com diferentes fontes industriais de carbono (glicose, dextrina amarela e Amidex) e nitrogênio (caseinato de sódio, pasta de soja, farinha de soja e extrato de levedura) e foram escolhidas a dextrina amarela e a pasta de soja como as melhores fontes de carbono e nitrogênio para produção da enzima. Utilizando estas fontes selecionadas dois planejamentos experimentais fracionários foram propostos. Um planejamento fracionário 2⁷⁻⁴ possibilitou o estudo das seguintes variáveis: dextrina amarela (5 a 15 g/L), pasta de soja (5 a 15 g/L), KNO₃ (1 a 3 g/L), MgSO₄ (0,25 a 0,75 g/L), K₂HPO₄ (0,5 a 1,5 g/L), óleo de oliva (10 a 30 g/L) e uma solução com traços de elementos (0,5 a 1,5 g/L) que permitiu a determinação dos componentes que tinham efeito na produção de lipase, bem como o ajuste de suas concentrações. Um planejamento experimental 2⁶⁻³ foi usado para um teste da presença de um outro ingrediente, o Tween 80. A composição do meio otimizado foi 6 g/L de dextrina amarela, 11 g/L de pasta de soja, 2,5 g/L de KNO₃, 0,5 g/L de MgSO₄, 1 g/L de K₂HPO₄, 10 mL/L de óleo de oliva, 1mL/L de traços de elementos e 2,3 mL/L de Tween 80. A otimização do meio possibilitou um incremento de 12 vezes na atividade enzimática após 2 dias de cultivo, em frascos agitados, a 150 rpm e a uma temperatura de 29 ^oC, alcançando 15 U/mL.

A produção de lipase por *Candida rugosa* na fermentação em meio sólido, usando farelo de arroz como substrato, foi investigada por Rao et al. (1993). Os autores realizaram um planejamento experimental Box-Behnken para desenvolver uma correlação matemática entre os fatores experimentais: concentração de uréia (0,25 a 0,75%), maltose(1,5 a 4,5%) e óleo (7,5 a 22,5%), em função do rendimento de biomassa e da atividade de lipase, em pH

6 numa temperatura de 30°C durante 48 horas. Foram determinadas as concentrações ótimas, através da Análise de Superfície de Resposta, cujos valores foram: 0,25% de uréia, 4,5% de maltose e 15% de óleo para produção de biomassa, alcançando 250 células/g de arroz úmido $\times 10^{-5}$ e 0,5% de uréia, 1,5% de maltose e 7,5% de óleo para produção de lipase, atingindo 30,1 U/g de arroz úmido.

A habilidade de lipases imobilizadas modificarem a composição de ácidos graxos com a finalidade de produzir lipídios estruturados foi relatada por Shieh et al. (1995). Através de um planejamento experimental linear 2^4 e usando a Metodologia de Superfície de Resposta foram estudadas as variáveis tempo de reação (12 a 36 horas), temperatura (25 a 65 °C), razão molar de substrato (ácido cáprico/trioleína 2:1 a 6:1) e quantidade de enzima (10 a 30%). A análise das curvas de contorno revelou que as condições ótimas para síntese de lipídios foram: tempo de reação de 9 horas, temperatura de 25 °C, razão molar de substrato (6:1) e quantidade de enzima de 10%, em relação ao porcentual em peso de triacilglicerol.

Hatzinikolaou et al. (1996) determinaram a atividade máxima da lipase extracelular por *Aspergillus niger*, em frascos agitados a 29°C e 225 rpm, utilizando dois planejamentos experimentais. No primeiro foram testadas 4 fontes de carbono (glicose, sacarose, óleo de milho e óleo de oliva) e 3 fontes de nitrogênio (fosfato de amônia, sulfato de amônia e peptona). A combinação de óleo de milho com peptona resultou em uma alta atividade enzimática. Com essas fontes de carbono e nitrogênio selecionadas foi proposto um novo planejamento experimental para otimização do meio de cultura. As variáveis estudadas foram a concentração do óleo de milho (1 a 3%) e concentração da peptona (0,5 a 1,5%). Analisando as curvas de contorno foi possível determinar a condição ótima como sendo a combinação de 1,76% de óleo de milho e 0,94% de peptona, resultando numa atividade ótima de 42,4 U/mL.

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada por Shieh et al. (1996) para avaliar o efeito das variáveis tempo de reação (1 a 9 horas), temperatura (25 a 65°C), quantidade de enzima (10 a 50%), razão molar de substrato geraniol/tributirina (1:0,33 a 1:1) e quantidade de água adicionada (0 a 20%) sobre a síntese de butirato de geranila usando lipase AY de *Candida rugosa*, através de um planejamento experimental

fracionário 2^{5-1} . O tempo de reação e a temperatura foram as variáveis mais importantes, enquanto que a razão molar de substrato não teve efeito na conversão. Com base nas curvas de contorno, as condições ótimas foram: tempo de reação de 9 horas, temperatura de 35 °C, quantidade de enzima de 50%, razão molar de substrato (1:0,33) e água adicionada 10%.

Macêdo (1997) estudou a síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico, e aplicou em duas etapas a técnica de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta. Em estudos iniciais foram testadas várias lipases para síntese de 54 ésteres de cadeia curta, e selecionadas as lipases de *Geotrichum* sp. e *Rhizopus* sp. para síntese dos ésteres acetato, propionato e butirato de isoamila tendo como finalidade um estudo da otimização. Um primeiro planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^4 foi realizado estudando as variáveis temperatura (40 a 60°C), relação molar entre substratos (1:2 a 4:1), quantidade de lipase (1 a 10%) e tipo de lipase no processo (*Geotrichum* sp. ou *Rhizopus* sp). Como resultado foi selecionada a lipase de *Rhizopus* sp. por apresentar um melhor rendimento e produtividade na síntese dos três ésteres. A concentração enzimática e a razão molar de substratos foram as variáveis mais importantes na síntese dos ésteres acetato e butirato de isoamila e para a síntese do propionato, a temperatura também foi importante. Em seguida, foi realizado um delineamento experimental para otimizar a síntese de cada éster. Com os resultados obtidos pelos planejamentos experimentais individuais para cada éster foi possível determinar as condições ótimas. Para o acetato e butirato de isoamila as condições ótimas foram: relação molar de substratos (1,5:1), concentração enzimática em massa dos reagentes de 5,5% e temperatura de 40°C após 48 horas de reação; e para a síntese do propionato de isoamila (3:1), 5,5% e 50°C, respectivamente, nas mesmas condições anteriores.

O estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp. a 30°C e 120 rpm foi realizado por Medeiros (1999) em frascos agitados através de cinco planejamentos experimentais, resultando em uma atividade enzimática três vezes maior que a inicial. Em um primeiro planejamento foi verificado o efeito das variáveis concentração de glicose (0-1%), nitrato de amônio (0-0,75%), água de maceração de milho (2-6%), óleo de oliva e óleo de soja (1%). A glicose influenciou negativamente a produção da enzima sendo, portanto, eliminada do meio de cultura, e o tipo de óleo não apresentou diferenças

significativas na produção da lipase. Portanto, foram realizados mais dois planejamentos experimentais com água de maceração de milho, nitrato de amônio e óleo de oliva e mais dois com óleo de soja para fins comparativos. As melhores condições de produção da enzima utilizando o óleo de oliva foram: nitrato de amônia 0,8-1%, água de maceração de milho 13-15% e óleo de oliva a 0,6%, alcançando 12 U/mL. Para o estudo da produção de lipase com óleo de soja as melhores condições foram: nitrato de amônia 2,1-2,5%, água de maceração de milho 13-15% e óleo de soja 0,6%, atingindo uma atividade de 18 U/mL.

2.11 – Considerações gerais

Como pôde ser observado através da revisão bibliográfica, há um grande interesse na obtenção da enzima lipase devido ao seu amplo potencial de aplicação industrial.

Verifica-se que, dependendo do microrganismo usado na fermentação, a lipase obtida possui uma especificidade em particular. As inúmeras variáveis que envolvem o processo de obtenção da enzima vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais e indutores) e as condições operacionais como pH, temperatura, agitação, aeração e tipo de impulsor utilizado na fermentação.

Por se tratar de um fungo filamentoso, o cultivo do *Geotrichum candidum* apresenta problemas inerentemente clássicos. O crescimento celular eleva a demanda de oxigênio do processo e simultaneamente a viscosidade aparente do caldo aumenta, dificultando a transferência de massa e reduzindo a concentração de oxigênio dissolvido, podendo limitar o crescimento microbiano e a própria biossíntese do produto de interesse.

Um outro ponto que também pode ser observado é que no caso de fungos filamentosos o processo de agitação convencional dos fermentadores pode danificar o micélio do fungo, influenciando na produção de biomassa e da enzima. Assim, torna-se interessante a investigação do uso de reatores não convencionais que possam apresentar um modelo menos agressivo para o microrganismo. No entanto, na própria literatura foram encontrados poucos trabalhos com a produção em reator “air-lift” de algumas enzimas e ácido lático e apenas um artigo com a produção de fosfolipase.

Portanto, é de grande valia estudos sistemáticos como é o caso do uso da

metodologia do Planejamento Experimental, para a definição de variáveis importantes como a concentração dos componentes do meio de cultura, as condições de temperatura, agitação e aeração visando obter as condições ótimas de produção da lipase. A produção da enzima em reator “air-lift” também torna-se uma investigação importante, que pode possibilitar uma melhor manutenção do “pellet” microbiano, influenciando na produção da enzima e tornando o processo de obtenção da lipase fúngica mais viável economicamente.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais e a metodologia analítica usados para o desenvolvimento do estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 durante a realização deste trabalho.

3.1 - Microrganismo

Foi utilizado o microrganismo *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 gentilmente cedido pela Agricultural Research Service Culture Collection. O microrganismo foi mantido em tubo de ensaio inclinado contendo meio ágar extrato de malte (3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5g/L de peptona, 10g/L de glicose e 30g/L de ágar) a 4°C. Uma foto deste microrganismo pode ser observada na Figura 3.1.

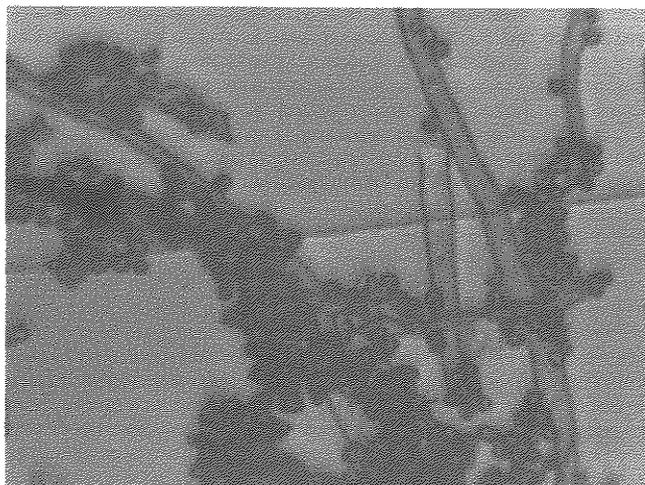


Figura 3.1. Morfologia do *Geotrichum candidum* NRRL-Y552 (ampliado 40 vezes).

3.2 – Meio de cultivo de inóculo

O meio de cultivo utilizado para o inóculo está descrito na Tabela 3.1. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 7,0 sendo posteriormente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Este meio de cultivo de inóculo foi utilizado para o mesmo microrganismo por Baillargeon et al. (1989).

Tabela 3.1. Meio de cultivo para inóculo.

Componente	Concentração (%)
Peptona	5
Nitrato de sódio	0,1
Sulfato de magnésio	0,1
Óleo de soja	1

3.2.1– Condição inicial de inóculo

O procedimento inicial de inóculo consistiu em retirar uma “alçada” de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 do tubo de ensaio com ágar inclinado em ágar extrato de malte e transferi-la para um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio descrito na Tabela 3.1. Este tubo foi incubado por 24 horas, a 30°C e 250 rpm. Após esse tempo, o conteúdo do tubo foi transferido assepticamente para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultura e incubado por mais 24 horas, a 30°C e 250 rpm. Uma quantidade de 10% (v/v) deste inóculo foi adicionada aos meios de fermentação.

3.3– Influência de diferentes indutores na produção de lipase

Com o objetivo de verificar a influência do tipo de óleo utilizado na produção de lipase foram testados cinco tipos diferentes de indutores como: óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja e óleo de oliva para a produção de lipase em frascos agitados de 500 mL, contendo 100 mL de meio, a 30°C, 250 rpm e pH inicial 7,0 utilizando o meio de fermentação apresentado na Tabela 3.1, modificando os tipos de óleos testados, e a metodologia inicial de inóculo descrita no item 3.2.1.

Para os óleos de canola, girassol, milho, soja e oliva foram utilizadas as marcas comerciais Purilev, Cocinero, Mazola, Soya e Malagueña, respectivamente.

3.4 – Influência de diferentes meios de cultura na produção de lipase

Para testar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de lipase foram realizados 11 ensaios em frascos agitados de 500 mL, contendo 100 mL de meio a 30°C e 250 rpm, com diferentes composições de meio de cultura apresentados na

literatura e utilizando a metodologia inicial de inóculo descrita no item 3.2.1. Na Tabela 3.2 estão apresentadas as composições dos meios de cultura testados nesta etapa.

Tabela 3.2: Diferentes meios de cultura testados para produção de lipase.

Ensaio	Composição do meio de cultura	pH inicial
1	Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
2	Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%, Tween 80 0,7%	7,0
3	Água de maceração de milho 10%, NH ₄ Cl 1%, Óleo de soja 1%	Sem ajuste
4	Água de maceração de milho 5%, NH ₄ Cl 1%, Óleo de soja 1%	Sem ajuste
5	Peptona 2%, NaCl 0,5% Extrato de levedura 0,1%, Óleo de soja 1%	5,5
6	Peptona 2%, NaCl 0,5% Extrato de levedura 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
7	Extrato de levedura 0,5%, NaNO ₃ 0,3% K ₂ HPO ₄ 0,1%, KCl 0,05%, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05%, FeSO ₄ .12H ₂ O 0,001%, Óleo de soja 1%	6,0
8	Extrato de levedura 0,5%, NaNO ₃ 0,3% K ₂ HPO ₄ 0,1%, KCl 0,05% MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05%, FeSO ₄ .12H ₂ O 0,001%, Óleo de soja 1%	7,0
9	Prodex-lac [®] 1%, Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1% MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
10	Prodex-lac [®] 4%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
11	Prodex-lac [®] 7%, NaNO ₃ 0,1% MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0

3.5 – Estudo do procedimento de inóculo

Em virtude da variação demasiada e da falta de reprodutibilidade dos resultados na atividade lipolítica, principalmente observada nos ensaios realizados em triplicatas, houve a necessidade nesta etapa de um estudo do procedimento do inóculo antes da otimização do meio de cultura.

3.5.1 – Quantidade de microrganismo no inóculo

Para o teste de quantidade de microrganismo foi utilizado o seguinte procedimento: A cultura contida no tubo de ensaio com ágar inclinado foi ressuspensa com 1 mL de água estéril, transferida para uma placa de petri, também contendo meio ágar extrato de malte, espalhada com alça de “Digrawski” e incubada durante 48 horas a 30°C. Após a incubação uma área circular de 1,54 cm² foi retirada, com o auxílio de um tubo de ensaio estéril de diâmetro de 1,4 cm e transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL do meio de cultivo descrito no item 3.2 e incubada sob agitação de 250 rpm a 30°C por 24 horas. Após esse tempo esse volume foi transferido para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultivo a 250 rpm e 30°C por 24 horas. Uma quantidade de 10% (v/v) deste inóculo foi adicionada ao meio de fermentação. Assim, foi estudada a influência da quantidade inoculada de microrganismo no meio de inóculo sobre a atividade enzimática no meio de fermentação. Foram inoculadas diferentes quantidades de áreas circulares contendo o microrganismo ($A=1,54 \text{ cm}^2$, $d=1,4 \text{ cm}$) nos tubos de ensaio conforme mostra a Tabela 3.3. A atividade lipolítica foi acompanhada ao longo do tempo de fermentação.

Tabela 3.3: Ensaios realizados no teste da quantidade de inóculo.

Ensaios	Nº de áreas circulares inoculadas	Área total inoculada (cm ²)
1	1	1,54
2	2	3,08
3	3	4,62
4	4	6,16

3.5.2. - Diâmetro da área circular do inóculo e volume do meio de inóculo

Neste segundo teste de procedimento para melhoramento do inóculo foi estudada a influência do diâmetro da área circular retirada da placa contendo o microrganismo ($d_1=1 \text{ cm}$ e $d_2=1,4 \text{ cm}$) e volume de meio de inóculo utilizado (50 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL e 300 mL). O procedimento de inóculo adotado neste teste foi diferente do anterior: A cultura contida no tubo de ensaio com ágar inclinado foi ressuspensa com 1 mL de água estéril, transferida para uma placa de petri, também contendo meio ágar extrato

de malte, espalhada com alça de “Digrawski” e incubada durante 48 horas a 30°C. Após esse tempo a área circular contendo o microrganismo foi transferida diretamente para Erlenmeyers de 500 mL contendo diferentes volumes de meio de cultivo (descrito no item 3.2) e incubados sob agitação de 250 rpm a 30°C por 48 horas, sendo a atividade enzimática acompanhada ao longo do tempo de incubação do próprio inóculo. Os ensaios foram realizados conforme estão descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Ensaios realizados no teste de diâmetro de inóculo e volume do meio de inóculo.

Ensaios	Volume de meio de inóculo (mL)	Diâmetro do círculo contendo o microrganismo (cm)	Área inoculada (cm²)
1	50	1,0	0,78
2	100	1,0	0,78
3	150	1,0	0,78
4	200	1,0	0,78
5	250	1,0	0,78
6	300	1,0	0,78
7	50	1,4	1,54
8	100	1,4	1,54
9	150	1,4	1,54
10	200	1,4	1,54
11	250	1,4	1,54
12	300	1,4	1,54

3.5.3 – Estudo do crescimento do inóculo

Como o microrganismo incubado em volumes de meio de cultivo de 50 mL e 100 mL apresentou resultados de atividades enzimáticas semelhantes decidiu-se fazer um acompanhamento da cinética de atividade enzimática no crescimento do inóculo. Foram realizados o ensaio 1 (50 mL e d=1,0 cm), o ensaio 2 (100 mL e d=1,0 cm), o ensaio 3 (50 mL e d=1,4 cm) e o ensaio 4 (100 mL e d=1,4 cm), com a metodologia de inóculo descrita no item 3.5.2.

3.5.4 – Tempo de incubação de inóculo

Uma das variáveis estudadas durante o processo de preparo de inóculo foi a influência do tempo de incubação do inóculo sobre a atividade enzimática no meio de fermentação. Após a ressuspensão do microrganismo do tubo de ensaio em água estéril e o crescimento do microrganismo durante 48 horas em placa de petri a 30°C, contendo o meio ágar extrato de malte, transferiu-se 0,78 cm² de inóculo e inoculou-se em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo descrito no item 3.2 nas condições de 250 rpm a 30°C por 15, 24, 36 e 48 horas. A cada tempo de incubação diferente uma quantidade de 10% (v/v) deste inóculo foi adicionada ao meio de fermentação.

3.5.5 – Condição otimizada de inóculo

Após os testes para o melhoramento de inóculo o procedimento ficou modificado da seguinte forma: O microrganismo mantido em ágar extrato de malte inclinado foi ressuspendido com 1 mL de água estéril e transferido para uma placa de petri, contendo o meio Yeast Malt, e incubado durante 48 horas a 30°C. Após este período de incubação uma área circular de 0,78 cm², contendo o microrganismo crescido, foi recortada da placa com um tubo de ensaio estéril de diâmetro de 1 cm e inoculada em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo descrito no item 3.2 nas condições de 250 rpm a 30°C por 15 horas. Uma quantidade de 10% (v/v) deste inóculo foi adicionada aos meios de fermentação.

3.6 – Cinética da produção de lipase em frascos agitados

Para verificar a cinética de produção de lipase em frascos agitados foram realizados quatro ensaios na condição do ponto central do primeiro planejamento experimental (5% de peptona, 0,1% de NaNO₃, 0,1% de MgSO₄ e 1% de óleo de soja) com um maior número de amostragem ao longo da fermentação, utilizando a condição otimizada de inóculo descrita no item anterior.

3.7 – Otimização do meio de cultura para produção de lipase

As composições dos meios das fermentações foram realizadas de acordo com os planejamentos experimentais descritos nos itens 4.3, 4.6, 4.7 a temperatura de 30°C e pH inicial de 7,0. No quarto planejamento experimental a composição do meio de cultura foi 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja variando o pH inicial do meio e a temperatura de produção, conforme apresentado no item 4.9. As fermentações foram realizadas com 250 rpm de agitação durante aproximadamente 72 horas, em frascos agitados de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Os meios de cultura foram inoculados com 10% (v/v) de inóculo nas condições descritas no item 3.5.5.

Nesta etapa de otimização do meio de cultura em frascos agitados, as amostras foram coletadas em tempos de amostragem pré-determinados para o acompanhamento de pH e determinação da atividade enzimática de lipase.

3.8 – Caracterização da lipase

Após o estudo da otimização da produção da lipase, a enzima foi obtida nas condições ótimas e caracterizada quanto a estabilidade da enzima congelada ao longo do tempo, pH ótimo, temperatura ótima, temperatura de estabilidade e influência de sais minerais na atividade lipolítica.

3.8.1 – Estudo da estabilidade da enzima congelada

O caldo fermentado livre de células foi congelado e a atividade lipolítica determinada em intervalos de tempo pré-determinados, utilizando a metodologia descrita no item 3.11.2.

3.8.2 – Determinação do pH ótimo

A influência do pH na reação enzimática foi determinada através da atividade lipolítica descrita no item 3.11.2 realizada em diferentes valores de pH (2,6-7,0 em tampão

citrato-fosfato 100 mM, 3,6-5,6 em tampão acetato 100 mM, 6,9-8,0 em tampão fosfato 100 mM e 7,2-8,8 em tampão tris-HCl 100 mM).

3.8.3 – Estudo da temperatura ótima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade lipolítica descrita no item 3.11.2 nas temperaturas de 27, 30, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 42, 50 e 60° C.

3.8.4 – Estudo da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da enzima foi estudada em termos de tempo de meia vida ($t_{1/2}$), incubando-se 30 mL do caldo fermentado livre de células em tampão fosfato 50 mM pH=7,0, nas temperaturas de 30, 33, 35, 37, 40, 43, 45 e 50°C. Sendo determinadas as atividades lipolíticas, ao longo do tempo, utilizando o método descrito no item 3.11.2.

3.8.5 – Influência de íons na atividade lipolítica

A influência de sais minerais na atividade enzimática foi verificada adicionando-se 1mM de sal, esta concentração não interfere no método de determinação de atividade lipolítica (Macedo et al., 1997), no sistema de reação descrito no item 3.11.2. Foram testados o MgSO₄, MnSO₄, CoCl₂, ZnSO₄, LiSO₄, CaCl₂, NaSO₄, CuSO₄, KCl, FeSO₄, AgNO₃.

3.9 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$

A determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{máx}$ foram realizadas medindo-se a atividade lipolítica em diferentes concentrações de óleo de oliva. As concentrações de óleo de oliva utilizadas foram: 5, 6, 8, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL.

3.10 – Produção da lipase em reator com agitação mecânica convencional

Os ensaios experimentais realizados para a produção da lipase em reator com agitação mecânica convencional utilizaram o meio de cultura otimizado na etapa de estudo em frascos agitados (3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja com pH inicial de 7,0). Os

meios de cultura foram inoculados com 10% (v/v) de inóculo nas condições descritas no item 3.5.5. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Os experimentos foram realizados com o fermentador de bancada BIOFLO III de 3 litros, com um volume útil de 2,2 litros.

Neste estudo foi feito o acompanhamento da produção da enzima realizando-se as análises de pH, atividade enzimática de lipase, atividade enzimática de protease, concentração de proteína, massa seca e a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida.

3.10.1 – Influência do tipo de agitador na produção da lipase

A influência do tipo de agitador no processo de produção da enzima em fermentador com agitação mecânica convencional foi realizado com três tipos de agitadores: Dois agitadores Rushton com 6 pás planas, dois agitadores hélice naval e um agitador de pás inclinadas. A condição de cada fermentação foi 1 vvm de aeração, 300 rpm de agitação a 30°C.

3.10.2 – Influência da agitação e aeração na produção de lipase

A influência da agitação e aeração na produção da lipase em fermentador com agitação mecânica convencional foi feita utilizando um agitador de pás inclinadas. As condições de agitação e aeração testadas em cada ensaio estão descritas no planejamento experimental apresentado no item 4.3. A temperatura das fermentações foi controlada a 30°C.

3.11 – Produção de lipase em reator “air-lift”

Os ensaios experimentais realizados para a produção da lipase em reator “air-lift” utilizaram o meio de cultura otimizado na etapa de estudo em frascos agitados (3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja com pH inicial de 7,0). Os meios de cultura foram inoculados com 10% (v/v) de inóculo nas condições descritas no item 3.5.5. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Os experimentos foram realizados com o fermentador de bancada com vaso “air lift” da B.Braun de 3 litros, com um volume útil de 2,2 litros nas condições de aeração de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, e 3,0 vvm a 30°C.

Neste reator foi feito o acompanhamento da produção da enzima com as análises de pH, atividade enzimática de lipase, atividade enzimática de protease, concentração de proteína, e a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida.

3.12 - Métodos analíticos

3.12.1 – Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um pHmetro Mettler Toledo 320.

3.12.2 - Determinação da atividade lipolítica

Na determinação da atividade lipolítica foi adotado o método utilizando goma arábica segundo Freire et al. (1997 a). O método é baseado na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo bruto fermentado, sobre os triglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 100 mL foram adicionados 19 mL de emulsão (5% de goma arábica e 5% de óleo de oliva) em tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,0. Esta mistura foi homogeneizada e neste sistema acrescentado 1 mL do meio de fermentado livre de células. A mistura foi mantida a 37°C por 30 minutos sob agitação recíproca.

Após esse tempo a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de solução acetona:etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH 0,05 N até o pH final 11 utilizando um titulador automático Mettler Toledo DL 50.

Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas. As análises foram realizadas em triplicata e a média entre as mesmas foi considerada. O branco para cada

amostra foi feito nas mesmas condições, colocando a enzima após a adição da acetona:etanol.

3.12.3 - Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada segundo Charney & Tomarelli (1947) que utiliza o método colorimétrico de determinação de atividade proteolítica onde 0,5 ml do meio fermentado livre de células foi incubado em tubo de centrifuga com 0,5 ml de uma solução de azocaseína 0,5% em tampão acetato 50 mM pH 5,0 durante 40 minutos a 37°C. Após este intervalo de tempo, 0,5 ml de ácido tricloro acético (TCA) 10% foi adicionado e colocado em banho de gelo com a finalidade de interromper a reação enzimática. Este meio reacional foi centrifugado a 7000 g por 2 minutos e 1 ml do sobrenadante foi transferido para um outro tubo contendo 1 ml de uma solução de KOH 5N. A absorbância desta solução foi determinada a 428 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter DU 640.

Uma unidade de atividade proteolítica é definida como a quantidade de enzima que provoca uma diferença unitária de absorbância entre a amostra e seu branco por minuto nas condições de ensaio descritas acima.

3.12.4 - Determinação da proteína solúvel

Para determinação da proteína foi realizado o método de Lowry et al. (1951).

3.12.5 - Determinação da massa seca

Para determinação da massa seca foi utilizado o método gravimétrico.

Com um volume conhecido do caldo fermentado, filtrou-se em papel Whatman nº44. O filtrado foi lavado uma vez com água destilada e depois ressuspendido num volume pequeno de água e seco em estufa a 75°C numa placa de Petri, cuja massa inicial foi determinada, e previamente tarada em balança até atingir peso constante (Freire et al., 1997 a).

3.12.6 - Determinação da composição de ácidos graxos dos óleos comerciais

A determinação da composição de ácidos graxos dos diferentes indutores testados na produção de lipase (óleos de canola, girassol, milho, soja e oliva) foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP. Com esta finalidade foi usada a metodologia da cromatografia gasosa nas condições usuais deste laboratório para análise de ácidos graxos de óleos comerciais.

Pesou-se 100mg do óleo em tubo de ensaio com tampa e adicionou-se 4mL do reagente de saponificação (NaOH ou KOH 0,5M em metanol anidro). O tubo de ensaio foi agitado e aquecido até tornar-se transparente, sendo resfriado em água corrente. Em seguida, adicionou-se 5mL de BF₃, sendo agitado, aquecido por 5 minutos e resfriado em água corrente, novamente. Adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaCl e agitou-se. Adicionou-se 10mL de éter de petróleo e agitou-se. A amostra foi mantida em repouso e após a separação das fases, a fase contendo os ésteres metílicos foi injetada no cromatógrafo gasoso capilar –Perkin Elmer 8420 contendo uma coluna capilar de sílica fundida CP-Sil-88 n° 985132, 50m x 0,25mm.

3.12.7 - Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na fase líquida (K_{La})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pelo método do borbulhamento, sendo determinado no meio de fermentação sem o microrganismo para o reator convencional e o “air-lift”. No reator convencional foi determinado utilizando os agitadores turbina de Rushton, hélice naval e pás inclinadas na condição de 1vvm de aeração, 300 rpm de agitação a 30°C; e determinado utilizando o agitador de pás inclinadas para diferentes combinações de agitação e aeração conforme o planejamento experimental descrito no item 4.13. No reator “air-lift” também foi determinado a 30°C nas condições de 1,0 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 vvm. As leituras de oxigênio dissolvido (OD) foram feitas com um eletrodo polarográfico de oxigênio. O meio foi borbulhado com nitrogênio até que as leituras de OD estivessem entre 0 e 0,2. Em seguida, injetou-se ar e tomaram-se as leituras de OD em função do tempo. Supondo transferência de massa em duas fases, a seguinte dedução foi utilizada para o cálculo do K_{La} :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) \quad (3.1)$$

Onde C_L é a concentração de oxigênio no meio e C^* é a concentração de saturação de oxigênio do meio em equilíbrio com o ar, logo integrando:

$$\int_0^c \frac{dC_L}{(C^* - C_L)} = \int_0^t K_L a^* t \quad (3.2)$$

Temos:

$$-\ln\left(\frac{C^* - C}{C^*}\right) = K_L a^* t \quad (3.3)$$

Fazendo $OD = \frac{C^* 100}{C^*}$ temos:

$$-K_L a^* t = \ln\left(\frac{100 - OD}{100}\right) \quad (3.4)$$

3. 13- Cálculo da produtividade e da produtividade específica

A produtividade foi calculada para os ensaios em reator com agitação mecânica e reator “air lift”, e a produtividade específica apenas para o reator com agitação mecânica. A produtividade foi definida como sendo a máxima atividade lipolítica alcançada em cada ensaio dividida pelo respectivo tempo. A produtividade específica foi definida como sendo a produtividade dividida pela biomassa alcançada no respectivo tempo de fermentação.

$$Pr od = \frac{P_t}{t_f} \quad (3.5)$$

$$Pr od_x = \frac{Pr od}{X} \quad (3.6)$$

Sendo:

Prod = Produtividade no tempo t de fermentação em U/(mL.h)

P_t = Máxima atividade enzimática alcançada em cada ensaio em U/mL

t_f = Tempo de fermentação em horas

Prod_x = Produtividade específica em U/(mg.h)

X = Biomassa no tempo t de fermentação em mg/mL

3.14 - Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta se baseia no método do planejamento fatorial consistindo num grupo de técnicas utilizadas para estudar as relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente e um número de variáveis de entrada, ou variáveis independentes que podem ser controladas (Box et al, 1978). Esta ferramenta vem sendo muito utilizada nos últimos anos, principalmente em processos bioquímicos onde muitas variáveis devem ser estudadas.

Esta metodologia permite uma direção às condições ótimas de operação muito mais rapidamente do que a análise convencional univariável e permite avaliar os dados estatisticamente fornecendo maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Assim, o estudo da otimização do meio de cultura, em frascos agitados, foi realizado através de planejamentos experimentais para análise dos efeitos das variáveis independentes, ou seja, concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja na resposta avaliada nesta etapa que foi a atividade lipolítica em função do tempo de fermentação.

Na primeira etapa do trabalho visando a otimização do meio de cultura foram realizados dois planejamentos experimentais fracionários 2^{4-1} iguais, com o objetivo de verificar a influência da concentração de peptona na faixa de 3 a 7%, sulfato de magnésio de 0 a 0,2%, nitrato de sódio de 0 a 0,2%, e óleo de soja de 0,5 a 1,5%.

No planejamento experimental fracionário 2^{4-1} , um planejamento de resolução IV, o efeito da variável principal apresenta ruído de 3ª ordem (que pode ser considerado nulo). Através deste planejamento fracionário é possível diminuir o número de ensaios pela metade sem haver perdas na qualidade das respostas obtidas.

Através da análise dos dois primeiros planejamentos experimentais foi possível elaborar um terceiro planejamento experimental completo (“estrela”) 2^2 com 5 níveis, com duas variáveis independentes. Este planejamento teve por objetivo estudar o efeito da concentração da peptona na faixa de 3 a 7% e da concentração de óleo de soja na faixa de 0,5 a 1,5 %, ou seja, a mesma faixa de concentração utilizada nos demais planejamentos, porém sem a presença dos sais minerais.

Com um quarto planejamento experimental completo 2^2 foi possível estudar as variáveis pH inicial do meio de cultura na faixa de 5,6 a 8,4 e a temperatura de produção da lipase de 18°C a 42°C.

O estudo da influência da agitação e aeração na produção da lipase também foi realizado através de um quinto planejamento experimental completo 2^2 no reator com agitação mecânica convencional. A agitação foi avaliada de 100 a 500 rpm e a aeração de 0,2 a 1,8 vvm.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software Statística V.5.0 (Statsoft).

4.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Teste de indutores para produção de lipase

Os resultados do teste de indutores para produção de lipase podem ser visualizados através da Figura 4.1, onde pode ser observado o perfil da atividade enzimática e pH para os diferentes ensaios após 24 horas e 49 horas de fermentação.

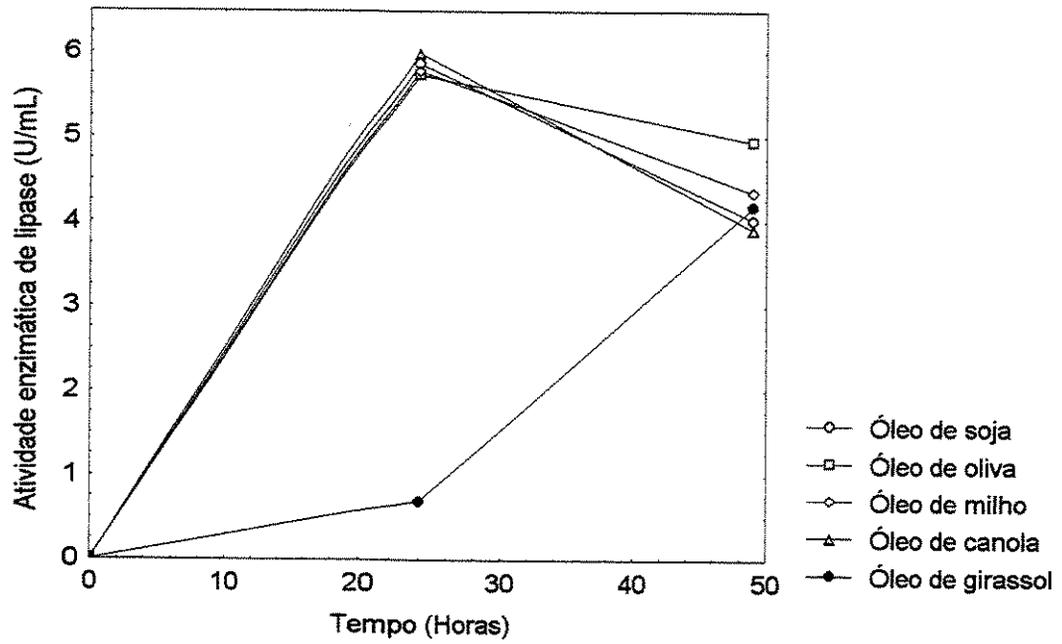
É possível verificar que os diferentes tipos de óleos alcançaram aproximadamente 6 U/mL nas primeiras 24 horas de fermentação com exceção do óleo de girassol, que só atingiu 4 U/mL após 49 horas de fermentação. O pH apresentou uma tendência de decréscimo para todos os ensaios até as 24 horas aumentando após esse tempo de fermentação.

Provavelmente, a queda na atividade enzimática foi devido ao microrganismo ter sido incubado por um período mais longo no meio de inóculo já que neste teste foi utilizada a metodologia inicial de inóculo descrita no item 3.2.1. Quando o inóculo foi transferido para o meio de fermentação deveria estar com uma menor percentagem de células vivas ou se encontrar na fase final de crescimento exponencial excretando assim, menor quantidade de lipase e liberando enzimas proteolíticas ou outras substâncias no meio de cultivo que degradem a lipase.

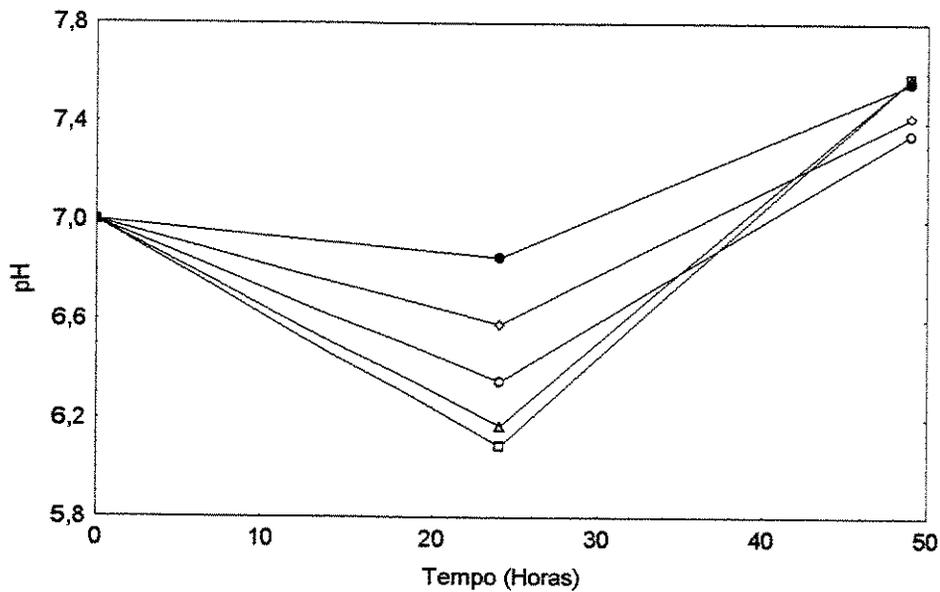
Apesar das diferentes composições de ácidos graxos dos indutores utilizados como pode ser notado através da Tabela 4.1 não foi observada diferença na quantidade de enzima excretada pelo microrganismo para o meio de fermentação em 49 horas, que será o tempo utilizado para análises posteriores.

Como pode-se observar na Tabela 4.1 o óleo de girassol possui uma composição de ácidos graxos mais rica em ácidos graxos insaturados do que os óleos de oliva, soja e milho. Estes três óleos apresentam composições bem semelhantes entre si, apresentando cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de ácidos graxos insaturados, o que explicaria o comportamento bastante semelhante na produção de lipase com a utilização destes três óleos. O óleo de girassol por sua vez é mais rico em ácidos graxos insaturados,

tendo cerca de 90% de insaturados e 10% de saturados. O mesmo perfil encontrado também para o óleo de canola.



(a)



(b)

Figura 4.1. Perfil de atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* (a) e pH (b) ao longo da fermentação dos diferentes tipos de indutores.

Tabela 4.1: Composição dos principais ácidos graxos saturados e insaturados presentes nos óleos vegetais utilizados para o teste de indutores na produção da lipase.

Ácidos graxos saturados	Óleo de oliva (%)	Óleo de soja (%)	Óleo de girassol (%)	Óleo de milho (%)	Óleo de canola (%)
Palmítico 16:0	10,06	11,47	5,89	13,12	4,92
Esteárico 18:0	2,62	3,68	3,48	2,40	2,46
Araquidônico 20:0	-	-	-	0,66	2,50
Behênico 22:0	-	-	0,76	-	-
Ácidos graxos insaturados					
Palmitoléico 16:1	0,73	-	-	-	-
Oléico 18:1	75,80	23,51	25,61	34,52	59,08
Linoléico 18:2	10,81	54,49	64,27	49,63	21,99
Linolênico 18:3	-	6,84	-	-	6,40
Gadoléico 20:1	-	-	-	-	1,63
Euríico 22:1	-	-	-	-	1,05

A diferença de composição entre a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados é importante para explicar a diferença de comportamento do óleo de girassol em relação aos óleos de soja, oliva e milho, indicando que o microrganismo deve consumir primeiramente os ácidos graxos saturados, presente em maior quantidade nestes três óleos, o que justificaria a menor atividade lipolítica no ensaio utilizando óleo de girassol após 24 horas de fermentação.

Em relação ao comportamento do óleo de canola era de se esperar pela composição de ácidos graxos saturados e insaturados que seu comportamento fosse semelhante ao do óleo de girassol, o que não foi observado, sendo seu comportamento semelhante ao dos outros óleos utilizados. Isto pode ter relação com a maior diversidade de ácidos graxos existentes no óleo de canola, mas alguma conclusão a este respeito exigiria um estudo mais detalhado do processo para cada óleo individualmente.

Pode-se perceber que a maior quantidade de ácidos graxos saturados presente no óleo utilizado como indutor favoreceu uma maior atividade lipolítica nas primeiras 24 horas

de processo. No entanto considerando-se 48 horas de processo, que tem sido o tempo de processo mais importante no estudo realizado, no qual se tem obtido o valor de máxima atividade enzimática, percebe-se que não há nenhuma diferença entre o uso de qualquer um dos indutores testados.

Outros trabalhos citados na literatura também investigaram a utilização de diferentes indutores para produção de lipase. Hatznikolaou et al. (1996) estudaram como fonte de carbono para produção de lipase por *Aspergillus niger* o óleo de milho, a glicose, a sacarose e o óleo de oliva. Os resultados demonstraram que o melhor indutor foi o óleo de milho a 2% resultando numa atividade enzimática de 40,5 U/mL.

Nahas (1995) estudou a concentração de 1, 2 e 4% de óleo de oliva, óleo de cartamo, óleo de girassol e óleo de milho para produção de lipase por *Rhizopus oligosporus*, verificando uma atividade máxima de 30 U/mL com óleo de girassol como indutor na produção da enzima.

Portanto, foi escolhido o óleo de soja para realizarmos a seqüência dos estudos de produção de lipase, pois a produção desta matéria-prima é mais abundante no Brasil, o que a faz mais viável economicamente. O preço do óleo de soja corresponde a 1/5 do preço do óleo de oliva e 1/3 dos demais óleos testados.

4.2 – Teste de diferentes meios de cultura para produção de lipase

A Figura 4.2 apresenta os resultados de acordo com os meios de cultura cujas composições estão descritas na Tabela 3.2, onde pode ser observado o perfil de atividade enzimática para os diferentes meios de cultura testados para a produção de lipase.

Ao compararmos o ensaio 1 e 2 verifica-se que a presença de Tween 80 praticamente não influenciou na produção da enzima, pois os ensaios alcançaram atividade enzimática semelhante ao redor de 11 U/mL. A produção da lipase utilizando água de maceração de milho foi testada na concentração de 10% (ensaio 3) e 5% (ensaio 4) que apresentou uma pequena produção da enzima em ambos os ensaios. Nos ensaios 5 e 6 foi testado o mesmo com pH diferentes, e quando o pH inicial do meio de cultura aumentou de 5,5 para 7,0 a atividade enzimática duplicou e alcançou 14 U/mL no ensaio 6.

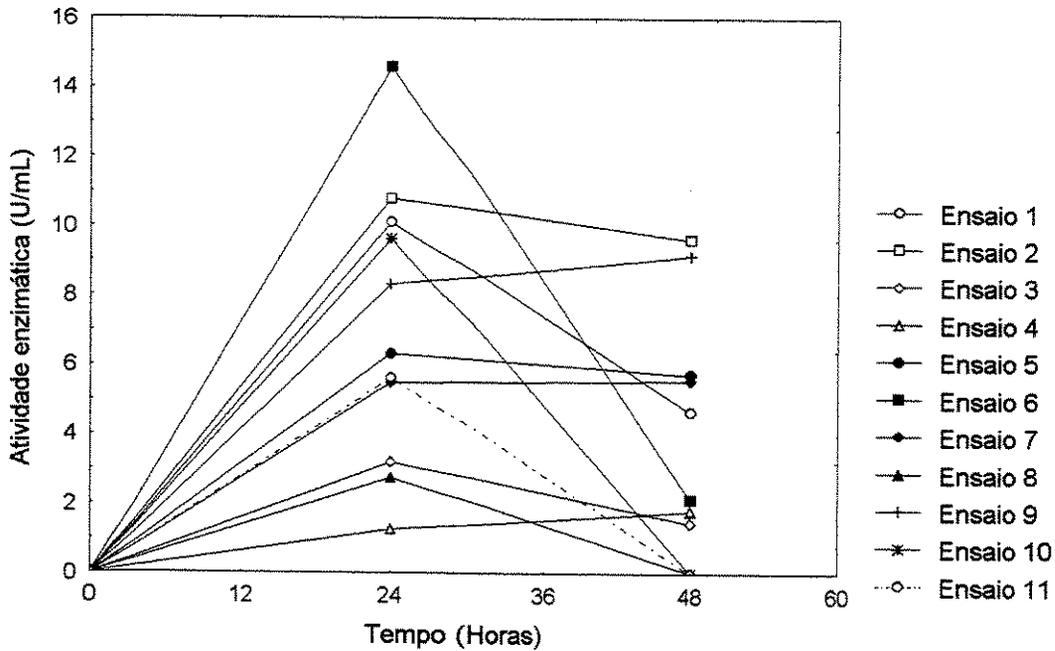


Figura 4.2. Perfil de atividade enzimática ao longo da fermentação de *Geotrichum candidum* para os diferentes meios de cultura.

Tabela 3.2: Diferentes meios de cultura testados para produção de lipase.

Ensaio	Composição do meio de cultura	pH inicial
1	Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
2	Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%, Tween 80 0,7%	7,0
3	Água de maceração de milho 10%, NH ₄ Cl 1%, Óleo de soja 1%	Sem ajuste
4	Água de maceração de milho 5%, NH ₄ Cl 1%, Óleo de soja 1%	Sem ajuste
5	Peptona 2%, NaCl 0,5%, Extrato de levedura 0,1%, Óleo de soja 1%	5,5
6	Peptona 2%, NaCl 0,5%, Extrato de levedura 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
7	Extrato de levedura 0,5%, NaNO ₃ 0,3%, K ₂ HPO ₄ 0,1%, KCl 0,05%, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05%, FeSO ₄ .12H ₂ O 0,001%, Óleo de soja 1%	6,0
8	Extrato de levedura 0,5%, NaNO ₃ 0,3%, K ₂ HPO ₄ 0,1%, KCl 0,05%, MgSO ₄ .7H ₂ O 0,05%, FeSO ₄ .12H ₂ O 0,001%, Óleo de soja 1%	7,0
9	Prodex-lac [®] 1%, Peptona 5%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
10	Prodex-lac [®] 4%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0
11	Prodex-lac [®] 7%, NaNO ₃ 0,1%, MgSO ₄ 0,1%, Óleo de soja 1%	7,0

A presença de diferentes sais minerais e extrato de levedura foi testado através do ensaio 7 e 8 observando uma produção da enzima em torno de 5,5 U/mL. Uma outra fonte de nitrogênio testada foi o Prodex-lac[®] (Hidrolisado de levedura) em diferentes

concentrações 1% (ensaio 9), 4% (ensaio 10) e 7% (ensaio 11) alcançando em torno de 9 U/mL de atividade enzimática.

Quando comparado os diferentes meios de culturas testados verificou-se que os melhores resultados foram alcançados nos ensaios 1, 2 e 6. A diferença do ensaio 1 e 2 foi apenas a presença de Tween 80 que praticamente não influenciou na atividade lipolítica, e o ensaio 6 utilizou peptona e extrato de levedura alcançando 14 U/mL. Decidiu-se estudar uma otimização do meio de cultura contendo peptona, $MgSO_4$, $NaNO_3$ e óleo de soja pois apresentou uma produção da enzima de aproximadamente 10 U/mL e não continha o extrato de levedura que levaria a um aumento do custo do meio de cultura.

O comportamento de queda na atividade lipolítica foi similar ao ocorrido no teste de indutores provavelmente devido ao tempo excessivo de incubação de inóculo.

4.3 – Primeiro planejamento experimental para produção de lipase: Estudo da concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja

Neste planejamento experimental 2^{4-1} as variáveis independentes estudadas foram: concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja, escolhido como indutor na etapa anterior do trabalho para a produção da enzima. A resposta avaliada foi a atividade enzimática de lipase no decorrer da fermentação, sendo também realizado o acompanhamento do pH. O procedimento de inóculo utilizado foi o descrito no item 3.2.1.

Os valores reais (descodificados) utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na Tabela 4.2 com seus respectivos níveis codificados. O planejamento experimental está apresentado na Tabela 4.3.

Tabela 4.2: Faixa de valores estudados nos planejamentos experimentais 2^{4-1} para o estudo da produção de lipase.

Nível	Peptona (%)	Nitrato de sódio (%)	Sulfato de magnésio (%)	Óleo de soja (%)
-1	3	0	0	0,5
0	5	0,1	0,1	1,0
+1	7	0,2	0,2	1,5

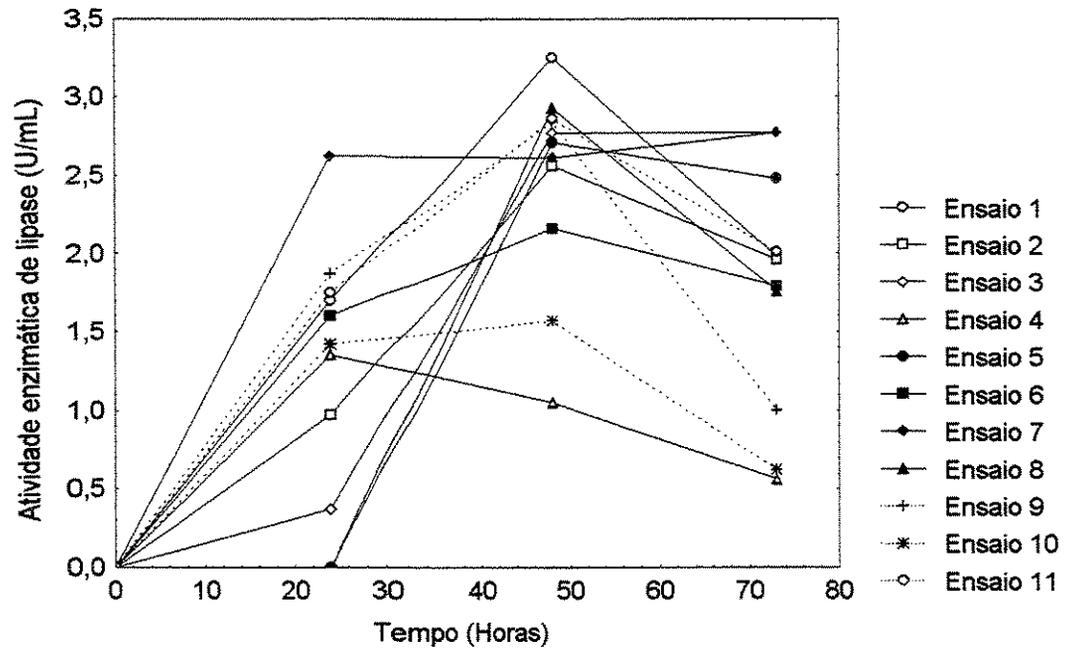
Tabela 4.3: Primeiro planejamento experimental 2^{4+1} para o estudo da produção de lipase.

Ensaio	Peptona	Nitrato de sódio	Sulfato de magnésio	Óleo de soja	Atividade enzimática (U/mL)		
					24h	48h	73h
1	-1	-1	-1	-1	1,70	3,25	1,98
2	+1	-1	-1	+1	0,97	2,56	1,96
3	-1	+1	-1	+1	0,37	2,77	2,77
4	+1	+1	-1	-1	1,35	1,05	0,56
5	-1	-1	+1	+1	0	2,71	2,48
6	+1	-1	+1	-1	1,60	2,16	1,79
7	-1	+1	+1	-1	2,62	2,61	2,77
8	+1	+1	+1	+1	0	2,93	1,76
9	0	0	0	0	1,87	2,83	1,00
10	0	0	0	0	1,42	1,57	0,62
11	0	0	0	0	1,75	2,86	2,01

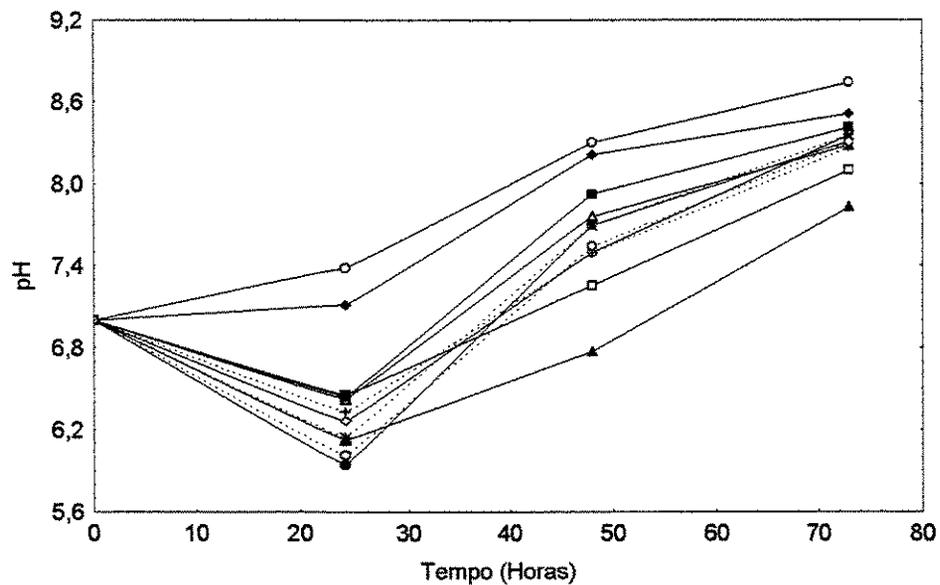
A produção de lipase foi observada através do acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação como mostrado na Figura 4.3 (a). Em 48 horas de fermentação pode ser verificado que os ensaios experimentais alcançaram o máximo de atividade enzimática apresentando variações de 1,05 a 3,25 U/mL.

Observando-se os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaios 9, 10 e 11) é possível perceber que houve uma grande variação nos valores da atividade lipolítica obtida indicando assim, uma falta de reprodutibilidade dos dados. Além deste fato, os resultados de atividade enzimática foram bastante inferiores aos alcançados anteriormente no teste de diferentes indutores.

O pH de todos os ensaios experimentais apresentou um decréscimo até 24 horas de fermentação e em seguida uma tendência de aumento até o final do processo que pode ser acompanhado através da Figura 4.3 (b). Este comportamento já foi observado no teste de indutores através da Figura 4.1 (b) e em outros trabalhos de produção de lipase como Jacobsen et al. (1989 a e b) e Medeiros (1999).



(a)



(b)

Figura 4.3. Acompanhamento da atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* (a) e pH (b) ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental.

Analisando os efeitos principais das variáveis no planejamento experimental

fracionário após 48 horas de fermentação como mostrado na Tabela 4.4 verificou-se que nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a atividade lipolítica quando a concentração passou do nível -1 para o nível +1.

Tabela 4.4: Efeitos principais das variáveis do primeiro planejamento experimental em 48 horas de fermentação para produção de lipase de *Geotrichum candidum*.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão	t	p
Média	2,48*	0,22*	11,14*	0,01*
Peptona	-0,66	0,52	2,312	0,260
NaNO ₃	-0,33	0,52	-0,989	0,504
MgSO ₄	0,20	0,52	-2,500	0,242
Óleo de soja	0,48	0,52	2,039	0,290

* valor estatisticamente significativo a 99% de confiança ($p < 0,01$)

Portanto, após a análise do primeiro planejamento experimental foi necessário realizar um estudo para padronização de inóculo, com o objetivo de minimizar o erro experimental e aumentar a reprodutibilidade dos resultados, promovendo um incremento na produção de lipase, para posteriormente realizar-se os planejamentos experimentais.

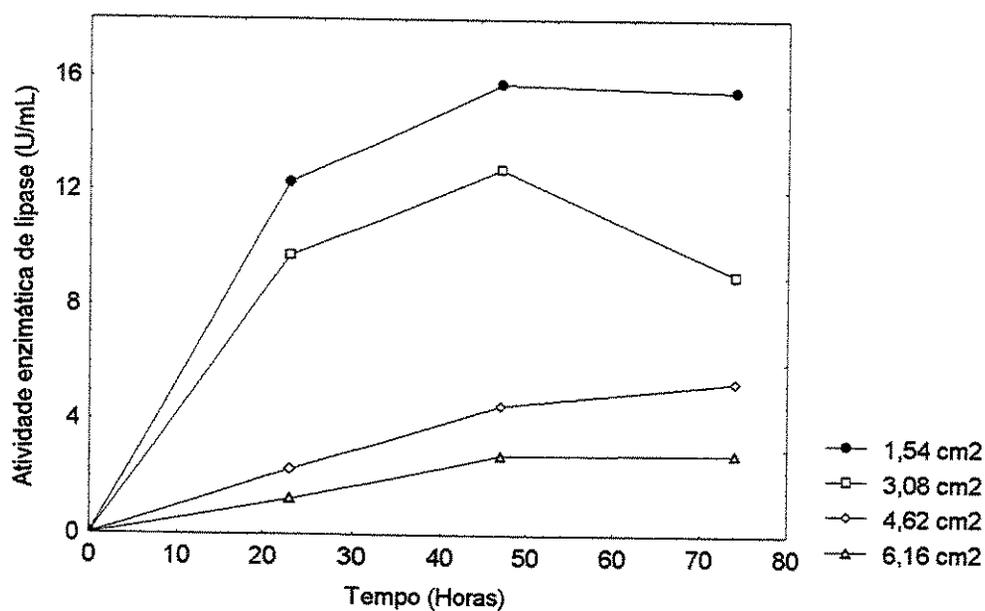
4.4 – Estudo de padronização do inóculo

No estudo do procedimento de padronização do inóculo foram avaliados: quantidade de microrganismo inoculado, volume do meio de cultivo para inóculo e tempo de incubação do inóculo. O meio de fermentação usado nos testes de inóculo foi o correspondente aos pontos centrais do primeiro planejamento experimental (5% peptona, 0,1% nitrato de sódio, 0,1% sulfato de magnésio, 1% de óleo de soja e pH=7,0).

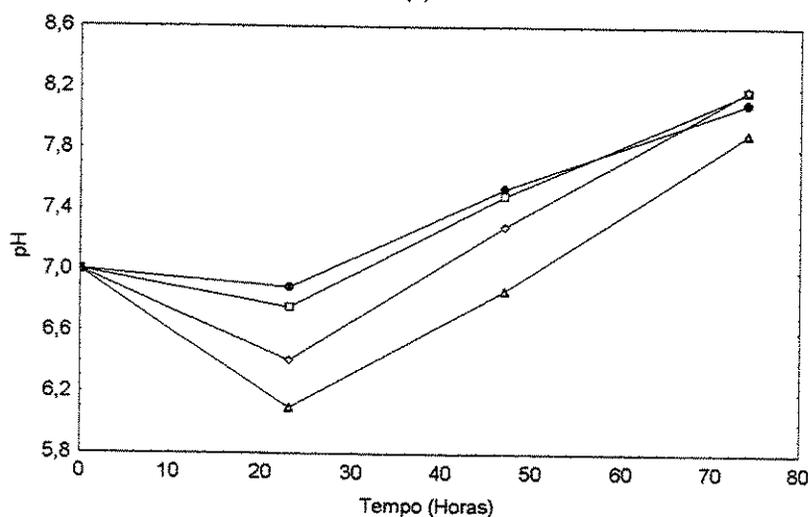
4.4.1 – Quantidade de microrganismo

Na Figura 4.4 pode ser acompanhada a atividade enzimática e o pH ao longo de 74 horas de fermentação. O pH apresentou o mesmo comportamento que as fermentações anteriores com uma ligeira diminuição no período inicial seguido de um aumento até o final da fermentação. Analisando-se a produção da enzima verifica-se que quanto menor a quantidade inóculo adicionado ao meio de cultivo, maior a atividade lipolítica. A maior

atividade enzimática foi alcançada com uma área circular de 1,54 cm² (ensaio 1).



(a)



(b)

Figura 4.4. Acompanhamento da atividade enzimática de lipase (a) e pH (b) ao longo da fermentação de *Geotrichum candidum* para diferentes quantidades de microrganismo inoculado.

Através da Figura 4.5 pode-se perceber que há uma relação entre atividade lipolítica e a razão CS/CM (CS: quantidade total de substrato (g); CM: área inoculada (cm²)) ao longo do tempo de fermentação. Quanto maior a razão CS/CM maior a atividade lipolítica, ou seja, quanto maior a disponibilidade de substrato no meio para o microrganismo maior a

atividade alcançada na fermentação, dentro da faixa estudada. Assim nesta etapa foi escolhido um inóculo com área circular de $1,54 \text{ cm}^2$ como melhor resultado.

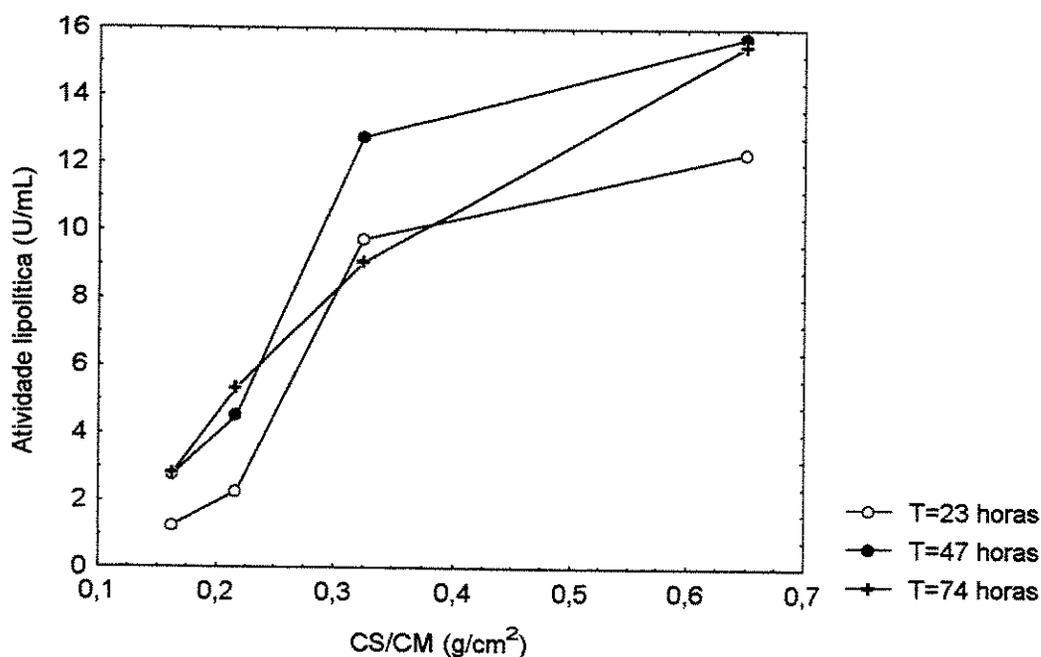


Figura 4.5. Atividade lipolítica de lipase de *Geotrichum candidum* em função da relação CS/CM.

4.4.2. - Diâmetro da área circular do inóculo e volume do meio de inóculo

Os resultados do teste de diâmetro de inóculo e volume de meio de inóculo estão contidos na Tabela 4.5 e podem ser melhor visualizados na Figura 4.6.

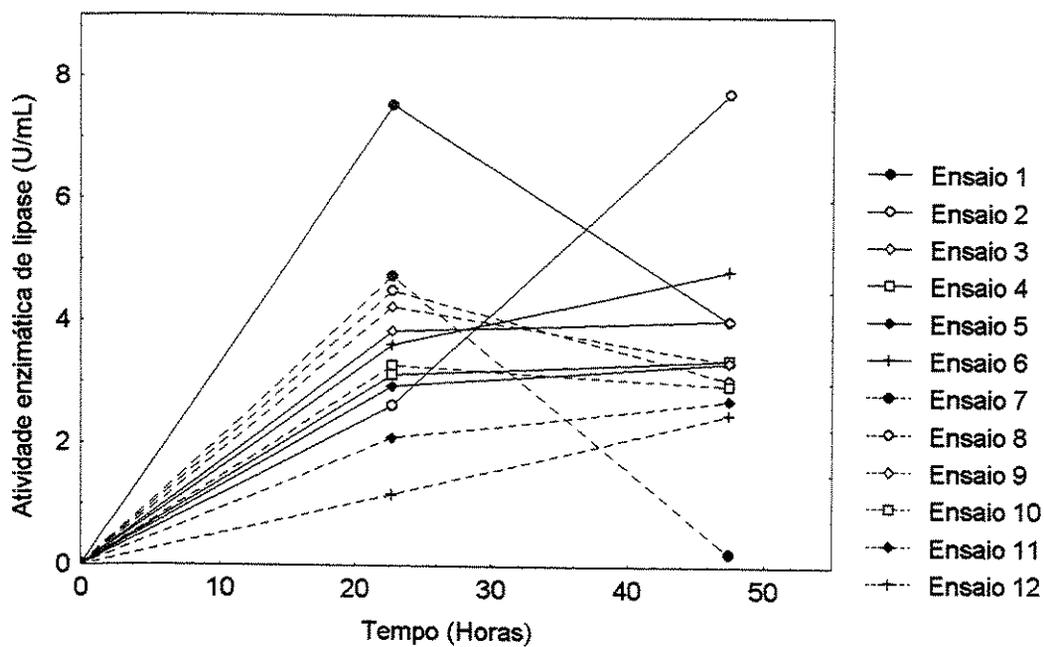
De acordo com os testes é possível observar que os melhores resultados de atividade lipolítica do inóculo foram obtidos nos ensaios experimentais com menor quantidade de microrganismo, ensaio 1 ($d=1 \text{ cm}$, $A=0,78 \text{ cm}^2$, $V=50 \text{ mL}$) após 22,7 horas de fermentação alcançando $7,53 \text{ U/mL}$ e 2 ($d=1 \text{ cm}$, $A=0,78 \text{ cm}^2$, $V=100 \text{ mL}$) após 47,5 horas $7,74 \text{ U/mL}$.

A partir disso decidiu-se trabalhar com um volume de meio de inóculo de 50 e 100 mL para um próximo teste, pois com estes volumes foram obtidos os melhores resultados de atividade lipolítica. Estes volumes de inóculo apresentaram melhores resultados de atividade provavelmente devido a uma melhor transferência de oxigênio. Considerando o

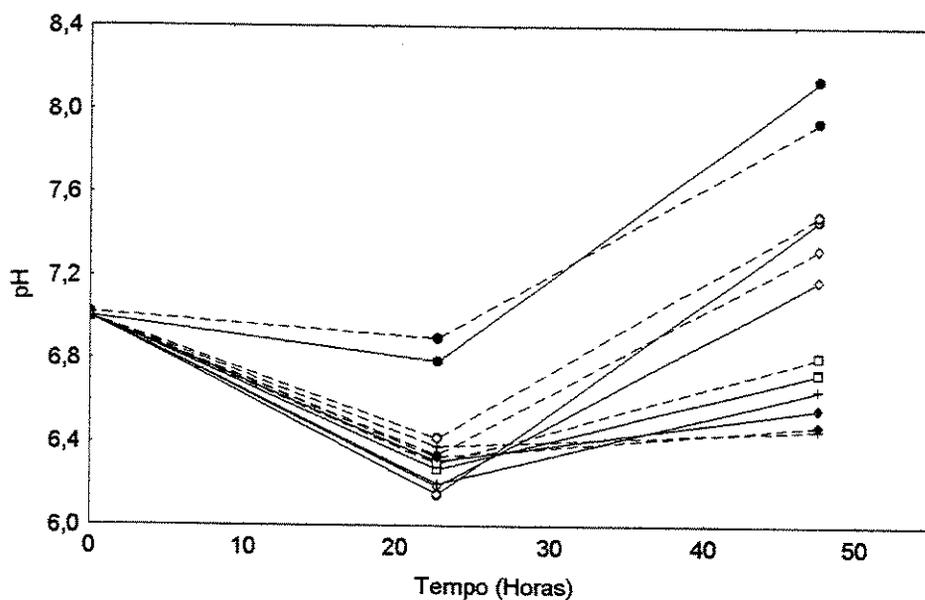
tamanho do frasco de inóculo fixo, pode-se supor que com um volume de meio de cultivo menor haja uma maior transferência de oxigênio, favorecendo o desenvolvimento do microrganismo e maiores atividades enzimáticas no inóculo. No entanto, para se obter uma relação entre a transferência de oxigênio no meio de cultivo e a atividade lipolítica é necessário um estudo em fermentador de bancada, com controle da aeração, o que foi realizado em etapa posterior neste trabalho.

Tabela 4.5: Resultado do teste de diâmetro de inóculo e volume do meio de inóculo de *Geotrichum candidum*.

Ensaio	Volume de meio de inóculo (mL)	Diâmetro do círculo contendo o microrganismo (cm)	Atividade enzimática (U/mL)	
			22,7 h	47,5 h
1	50	1,0	7,53	4,01
2	100	1,0	2,62	7,74
3	150	1,0	3,83	4,02
4	200	1,0	3,12	3,37
5	250	1,0	2,93	3,33
6	300	1,0	3,60	4,83
7	50	1,4	4,73	0,21
8	100	1,4	4,49	3,05
9	150	1,4	4,23	3,34
10	200	1,4	3,27	2,95
11	250	1,4	2,09	2,71
12	300	1,4	1,16	2,48



(a)



(b)

Figura 4.6. Acompanhamento da atividade enzimática de lipase *Geotrichum candidum* (a) e pH (b) para diferentes diâmetros de tubos de ensaio e volume de meio de cultura.

Quanto à escolha do diâmetro de inóculo a ser utilizado, levou-se em consideração o resultado do teste anterior (teste de quantidade de inóculo) que indicou que quanto menor a

quantidade de microrganismo inoculado no meio de cultivo de inóculo melhor o resultado de atividade lipolítica na fermentação. Com isso decidiu-se estudar neste teste dois diâmetros de inóculo diferentes, de 1,4 cm e 1cm. Para escolha do melhor diâmetro do inóculo foram comparados os ensaios 1 com 7 e 2 com 8 da Tabela 4.5. O ensaio 1 com $d=1,0$ cm apresentou melhor resultado que o ensaio 7 com $d=1,4$ cm, nas mesmas condições de volume de meio de inóculo e tamanho do frasco de fermentação. Já a comparação entre o ensaio 2 com $d=1,0$ cm e o ensaio 8 com $d=1,4$ cm, com as outras variáveis nas mesmas condições, mostrou que em 22,7 horas de fermentação o ensaio 8 foi melhor que o ensaio 2 e com 47,5 horas este resultado se inverteu.

Portanto, de acordo com os resultados, este teste não foi conclusivo para escolha do diâmetro do inóculo utilizado. No entanto, este estudo foi útil para reduzir o número de ensaios para realização de um teste de acompanhamento da atividade enzimática durante o crescimento de inóculo, que foi estudado novamente o diâmetro de inóculo ($d=1$ cm e $d=1,4$ cm) e o volume do meio de inóculo (50 mL e 100 mL).

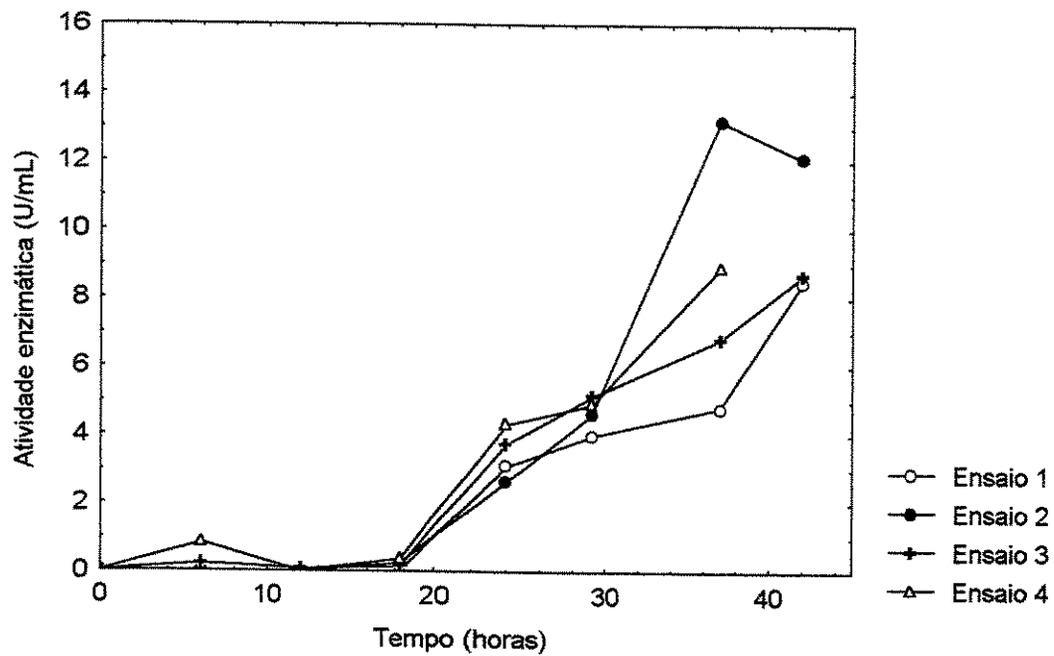
4.4.3 – Acompanhamento da atividade enzimática durante o crescimento do inóculo

A Figura 4.7 apresenta os resultados dos ensaios que acompanharam a atividade enzimática e o pH ao longo do crescimento do inóculo.

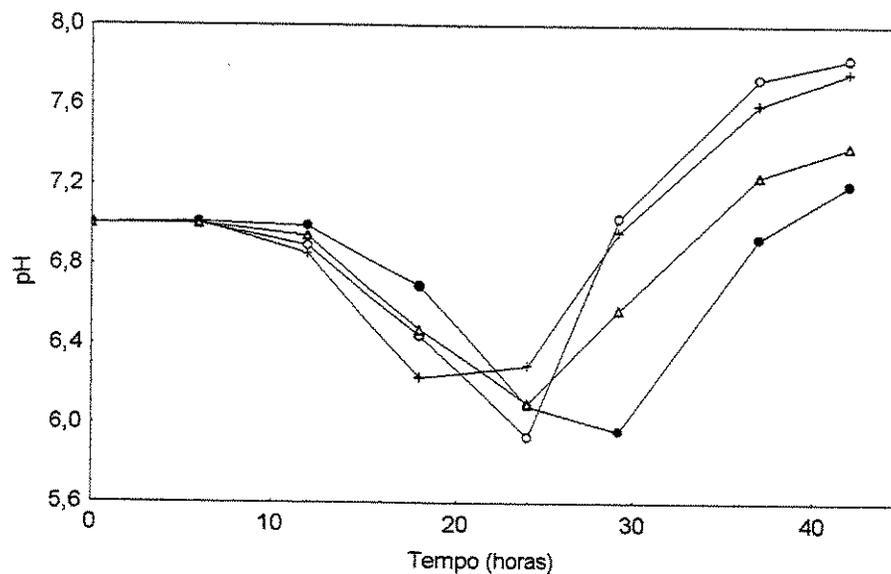
Através da Figura 4.7 verifica-se que o melhor resultado obtido neste teste foi com o ensaio 2 após 37 horas de incubação do inóculo, que é o ensaio que apresenta maior relação CS/CM neste teste ($1,27 \text{ g/cm}^2$). O perfil da atividade lipolítica para os ensaios 2 e 4 (com 100 mL de meio de inóculo) são maiores do que os ensaios 1 e 3 (com 50 mL de meio de inóculo) respectivamente, principalmente após 37 horas de incubação quando foi obtido o pico da atividade lipolítica. Portanto, quanto maior a relação CS/CM melhores resultados de atividade lipolítica vão ser alcançados.

Quanto ao diâmetro de inóculo, este teste confirmou que os melhores resultados de atividade lipolítica são obtidos quando se parte de uma quantidade menor de inóculo, ou seja, quando a relação CS/CM é maior, como já demonstravam os testes anteriores. Observa-se que o perfil de atividade dos ensaios 2 ($d=1,0$ cm e $V=100$ mL) é maior do que

do ensaio 4 ($d=1,4$ cm e $V=100$ mL) após 37 horas de fermentação. Dessa forma optou-se por utilizar um diâmetro de inóculo de 1,0 cm.



(a)



(b)

Figura 4.7. Atividade enzimática de lipase (a) e pH (b) durante o crescimento do inóculo de *Geotrichum candidum*.

Com a realização do estudo de quantidade de inóculo, do diâmetro de inóculo e volume do meio em relação ao inóculo, e ao acompanhamento da atividade enzimática durante o crescimento do inóculo foi possível determinar uma melhor condição de procedimento de inóculo. A última etapa realizada neste estudo foi o teste de tempo de incubação de inóculo.

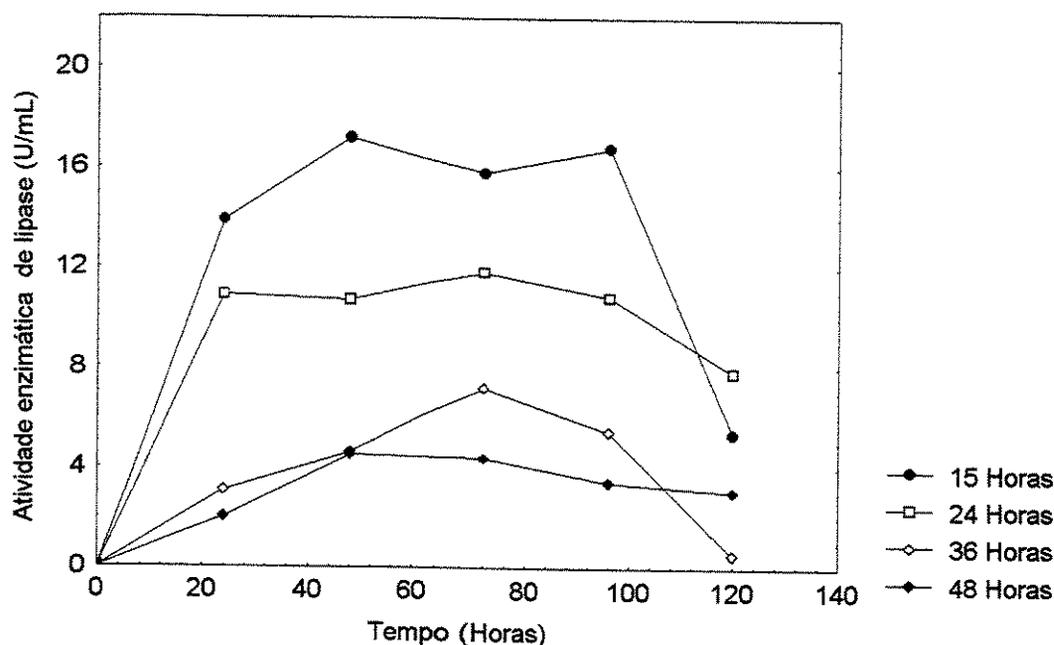
4.4.4 – Idade do inóculo de *Geotrichum candidum*

Neste experimento, variou-se o tempo de incubação ou idade do inóculo, ou seja, inóculos com diferentes tempos de incubação foram adicionados em meios de fermentação, e a atividade enzimática acompanhada durante o tempo de fermentação.

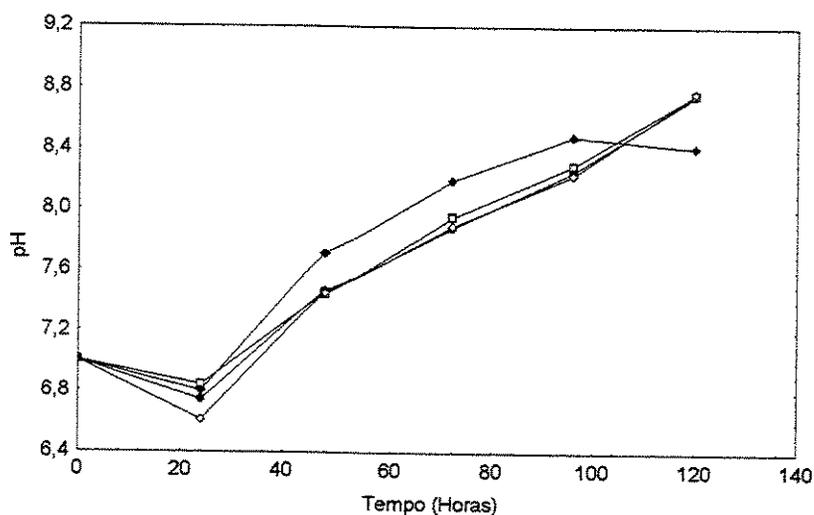
Na Figura 4.8 pode ser vista a atividade enzimática, que alcançou 16 U/mL com um tempo de incubação de 15 horas, e o pH que para os diversos experimentos apresentou uma queda nas primeiras 24 horas com uma tendência de aumento até aproximadamente 8,5 após 120 horas de fermentação. Nos demais ensaios nota-se que à medida em que aumenta o tempo de incubação do inóculo, ocorre uma diminuição da atividade lipolítica na fermentação, sendo que na maioria dos ensaios o pico de atividade ocorreu em torno de 48 horas. Isto pode ser um indicativo de que este microrganismo possua uma fase lag curta e conseqüentemente logo entre na fase de crescimento exponencial, onde provavelmente a lipase seja liberada no meio de cultivo. Dessa forma, o microrganismo que fica incubado por períodos mais longos no meio de inóculo quando transferidos para o meio de fermentação podem estar com uma menor percentagem de células vivas ou se encontrar na fase final de crescimento exponencial excretando assim, menor quantidade de lipase e liberando enzimas proteolíticas ou outras substâncias no meio que degradem a lipase.

A metodologia adotada nestes testes de procedimento de inóculo utilizou o crescimento do microrganismo em meio sólido e a transferência de uma área circular contendo o microrganismo para o meio líquido, ao invés da contagem de esporos na câmara de Newbauer, normalmente descrita na literatura para trabalhos que utilizam fungos. Esta opção de crescimento em meio sólido foi uma alternativa à técnica da contagem de esporos, que inicialmente foi testada e mostrou-se bastante imprecisa, levando a resultados com grande variabilidade no processo de produção da lipase. Além disso, esta técnica de

crescimento do microrganismo em meio sólido é de uso comum no laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/DCA/FEA/UNICAMP e foi adotada neste trabalho de pesquisa mostrando-se uma alternativa muito interessante, e que diminuiu significativamente a variabilidade nos resultados como observado nos próximos planejamentos experimentais.



(a)



(b)

Figura 4.8. Acompanhamento da atividade enzimática (a) e pH (b) ao longo da fermentação para produção de lipase para diferentes idades de inóculo.

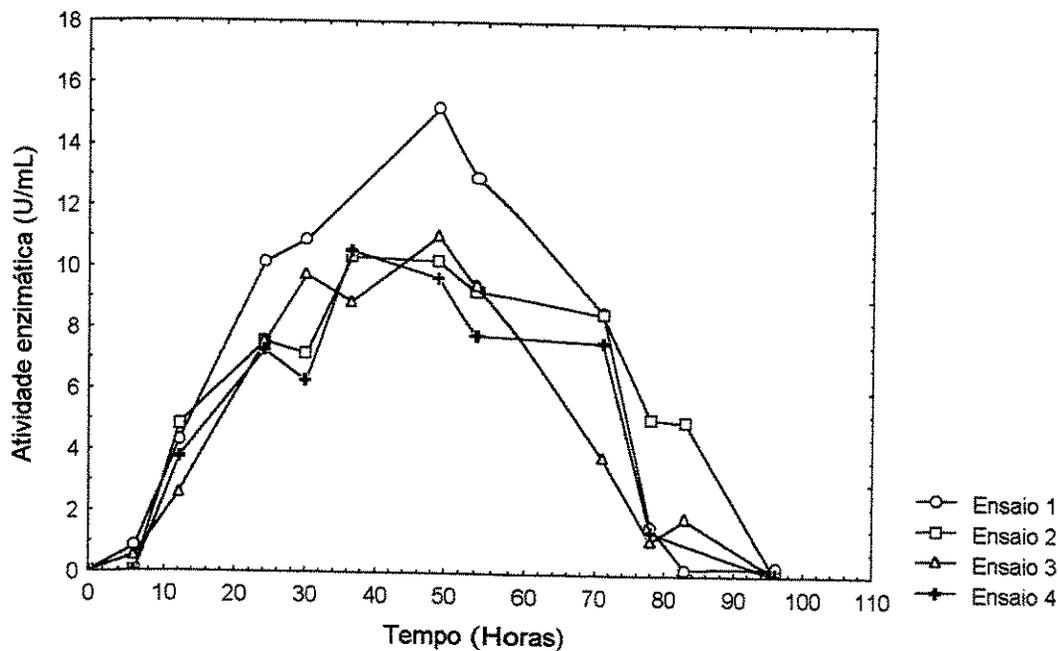
Com a realização do teste de tempo de incubação do inóculo foi concluída a etapa de estudo do melhoramento do inóculo e definido o procedimento a ser adotado para continuação dos trabalhos. Os testes realizados indicaram as melhores condições de procedimento de inóculo, que levam a obtenção de uma atividade enzimática bem maior durante a fermentação do que com o procedimento inicial utilizado neste trabalho.

Após todos os testes de inóculo concluímos que o procedimento otimizado para o inóculo foi: Após o crescimento do microrganismo durante 48 horas em placa de petri inoculava-se uma área circular de 0,78 cm² em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo, descrito na Tabela 3.1 no item 3.2, nas condições de 250 rpm a 30°C por 15 horas, o que proporcionou um aumento de 5 vezes na atividade enzimática do meio de fermentação de 3 U/mL, alcançado no primeiro planejamento experimental, para 16 U/mL.

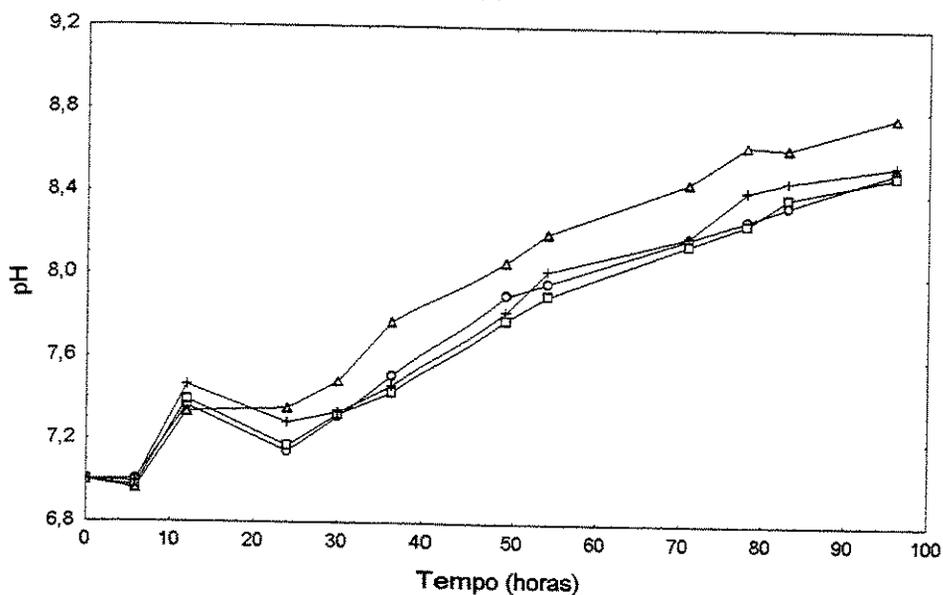
4.5 – Cinética da produção de lipase em frascos agitados

O teste de cinética de produção de lipase em frascos agitados foi útil para se conhecer o perfil da produção de lipase ao longo do tempo de fermentação. Também foram avaliados neste teste se os tempos de amostragem de 24, 48 e 72 horas eram adequados para a realização da análise de atividade lipolítica. A reprodutibilidade do processo também pode ser avaliada, uma vez que os quatro ensaios foram realizados na condição do ponto central do primeiro planejamento experimental (5% de peptona, 0,1% de NaNO₃, 0,1% de MgSO₄ e 1% de óleo de soja) com um maior número de amostragens ao longo da fermentação, e utilizando o inóculo padronizado do mesmo lote. Os perfis de atividade enzimática e de pH ao longo do tempo de fermentação podem ser visualizados na Figura 4.9. Os resultados obtidos e a sua análise estatística estão apresentados na Tabela 4.6.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 4.9 (a) nota-se que o perfil de atividade enzimática encontrado nos quatro ensaios foi semelhante havendo um aumento na atividade lipolítica até 48 horas de fermentação, que é quando ocorreu o pico de atividade enzimática. Esta análise está de acordo com os demais resultados que vinham sendo obtidos ao longo do estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 e com dados contidos na literatura (Baillargeon et al., 1989).



(a)



(b)

Figura 4.9. Acompanhamento do perfil de atividade enzimática (a) e pH ao longo da fermentação (b) para o teste de cinética da produção de lipase.

O comportamento do pH ao longo do tempo de fermentação está também de acordo com os ensaios realizados anteriormente. Foi possível ainda constatar que as amostragens em 24, 48 e 72 horas de fermentação são adequadas para avaliação do processo fermentativo. O valor máximo da atividade enzimática obtida foi de 11,51 U/mL no ensaio

1 após 48 horas de fermentação. Observa-se que para os resultados de baixa atividade enzimática os desvios percentuais são bastante elevados. No entanto, à medida que a fermentação evolui e as atividades lipolíticas atingem seus valores máximos (ao redor de 48 horas) o desvio fica ao redor de 20%, valor muito mais razoável do que no início do trabalho. Infelizmente, a maioria dos trabalhos da literatura não apresenta uma discussão sobre a falta de reprodutibilidade nos resultados de fermentação com fungos e a necessidade de sistematizar procedimentos que minimizem estas variações.

Tabela 4.6: Resultado do teste de cinética de produção de lipase em frascos agitados, utilizando 5% de peptona, 0,1% de NaNO_3 , 0,1% de MgSO_4 e 1% de óleo de soja como meio de cultura a 30°C , 250 rpm e o inóculo padronizado do mesmo lote.

Tempo (h)	Ensaio 1 (U/mL)	Ensaio 2 (U/mL)	Ensaio 3 (U/mL)	Ensaio 4 (U/mL)	Média (U/mL)	Desvio Padrão	Desvio percentual (%)
6,0	0,83	0	0,53	0	0,34	0,41	121
12	4,27	4,82	2,57	3,73	3,80	0,97	25,6
24	10,12	7,53	7,49	7,23	8,09	1,36	16,8
30	10,86	7,14	9,70	6,23	8,48	2,16	25,5
36,5	-	10,32	8,83	10,48	9,88	0,91	9,2
48	15,19	10,18	11,03	9,63	11,51	2,52	21,9
54	12,93	9,20	9,36	7,76	9,81	2,19	22,4
71	8,55	8,47	3,83	7,56	7,10	2,22	31,4
78	1,61	5,07	1,11	1,41	2,30	1,86	80,8
83	0,21	4,97	1,85	5,11	3,03	2,41	79,4
96	0,28	0	0,03	0	0,08	0,40	175

Por isso, neste trabalho foi estudado o procedimento de preparação do inóculo antes de se dar continuidade aos estudos de otimização de meio de cultivo. Observando-se o desvio padrão dos resultados mostrados na Tabela 4.6 é possível perceber que houve uma considerável variabilidade nos valores de atividade enzimática nos ensaios realizados, apesar destes terem sido conduzidos nas mesmas condições. No entanto, o intervalo de tempo mais importante para a análise dos resultados vai de 24 a 72 horas de processo, onde os valores de atividade enzimática são maiores, atingindo seu valor máximo dentro deste intervalo de tempo. O que se nota é que neste intervalo de tempo o desvio padrão em

relação à média ficou entre cerca de 10 a 30%, sendo que na maioria dos tempos analisados ela esteve entre 20 e 30%. Esta faixa de variabilidade também foi observada nos testes subseqüentes.

Dois fatores principais são importantes para explicar esta variação nos resultados. Primeiramente o trabalho com fungos apresenta dificuldades naturais devido à formação de hifas durante o desenvolvimento do microrganismo, o que dificulta a padronização das condições de inóculo e amostragem para análise. Este problema, apesar de ser inerente ao trabalho com fungos, foi consideravelmente reduzido após o estudo de sistematização do inóculo realizado na etapa anterior de trabalho. Como os valores de variabilidade dos resultados estiveram ao longo de toda esta etapa de trabalho na faixa de 20 a 30% é possível supor que esta variabilidade seja devido as características intrínsecas do processo e não à dificuldade nos procedimentos de inóculo como no início dos trabalhos. O outro fator que também contribui para a variabilidade do processo é o erro associado à análise da atividade lipolítica. A determinação de atividade é feita utilizando-se uma emulsão contendo 5% de óleo de oliva e 5% de goma arábica em solução de tampão fosfato 0,01 M pH 7,0. Esta emulsão é preparada no dia da análise e sofre variações devido à velocidade de agitação, homogeneização da solução de goma arábica, dentre outros erros indeterminados que acompanham o procedimento de análise. O que se tem observado ao longo dos trabalhos é que a variação dos resultados obtidos numa mesma amostra, cuja análise é realizada em triplicata, é da ordem de 1 a 5%. E este erro acaba sendo propagado para a variabilidade dos resultados. No entanto, é relevante citar que todo o cuidado para minimizar estes erros experimentais foram tomados, inclusive com a importação de um titulador automático que fornece resultados muito mais precisos do que a titulação através do ponto de viragem utilizando fenolftaleína.

Sendo assim, diante dos fatores mencionados no parágrafo anterior é possível considerar a variabilidade do processo em torno de 20 a 30% bastante satisfatória. Só foi possível avaliar e quantificar esta variabilidade porque foi usada uma ferramenta estatística que possibilitou esta detecção. Em muitos trabalhos de pesquisa os resultados alcançados não são reprodutíveis e se quer se utiliza uma metodologia para avaliá-los. Variabilidades maiores do que 30% só são detectadas em amostras cuja atividade lipolítica é baixa, que

não são de interesse deste estudo, que tem por objetivo alcançar o máximo de atividade enzimática possível. Outras considerações importantes reforçam a discussão feita aqui, como o perfil de atividade enzimática, que independentemente da variabilidade do processo tem se apresentado o mesmo ao longo de todo o trabalho, com o pico de atividade enzimática ocorrendo em torno de 48 horas de fermentação.

4.6 – Segundo planejamento experimental para produção de lipase: Estudo da concentração de peptona, nitrato de sódio, sulfato de magnésio e óleo de soja

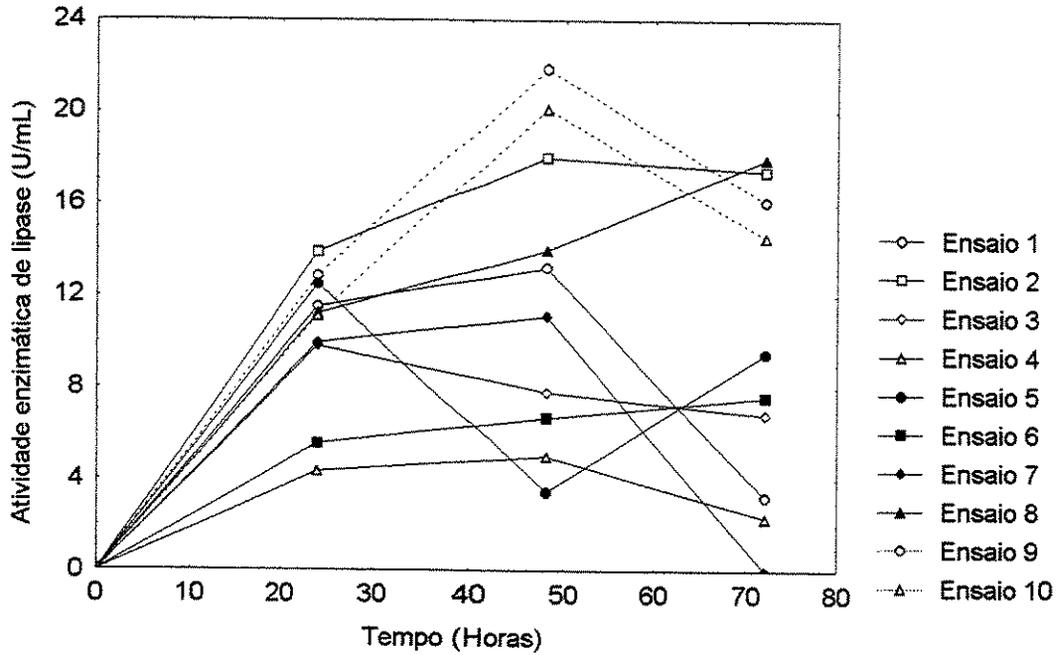
Este segundo planejamento experimental 2^{4-1} é uma repetição do primeiro planejamento experimental, porém usando a condição otimizada de inóculo descrita no item 3.5.5 e os tempos de amostragem de 24, 48 e 72 horas. O planejamento experimental está apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Segundo planejamento experimental 2^{4-1} para o estudo da produção de lipase.

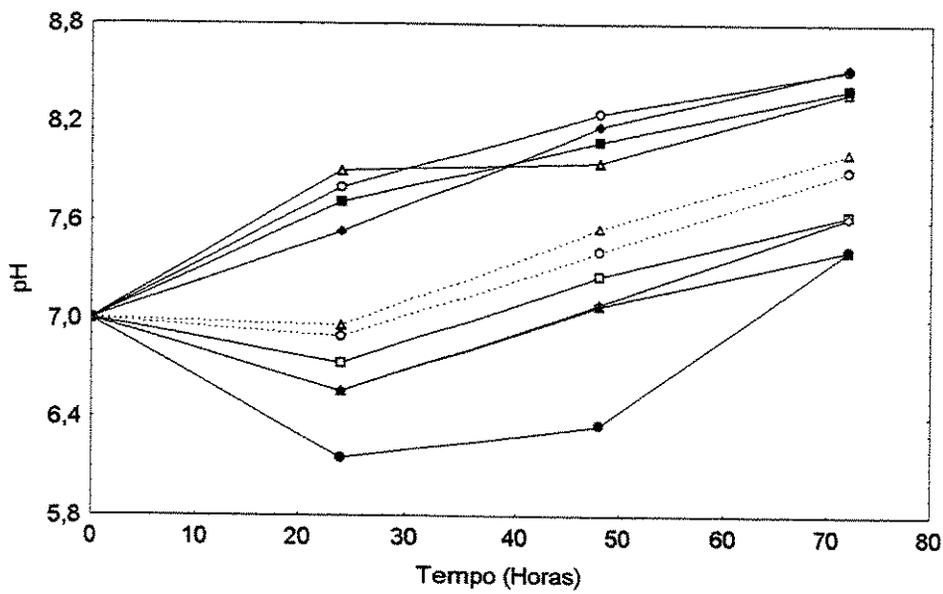
Ensaio	Peptona	Nitrato de sódio	Sulfato de magnésio	Óleo de soja	Atividade enzimática (U/mL)		
					24h	48h	72h
1	-1	-1	-1	-1	11,50	13,21	3,23
2	+1	-1	-1	+1	13,89	18,01	17,40
3	-1	+1	-1	+1	9,81	7,78	6,83
4	+1	+1	-1	-1	4,33	5,00	2,32
5	-1	-1	+1	+1	12,50	3,43	9,47
6	+1	-1	+1	-1	5,56	6,69	7,57
7	-1	+1	+1	-1	9,92	11,11	0
8	+1	+1	+1	+1	11,20	13,97	17,92
9	0	0	0	0	12,84	21,87	16,10
10	0	0	0	0	11,11	20,11	14,54

Através da Figura 4.10 (a) pode ser visto o acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação. A produção máxima de lipase foi alcançada em 48 horas na maioria dos ensaios experimentais, com a maior atividade em torno de 22 U/mL no ensaio 9, praticamente o dobro da atividade lipolítica alcançada no teste de cinética apresentado no item anterior.

Analisando-se os resultados dos pontos centrais ensaios 9 e 10 verifica-se que em 48 horas estes apresentam valores bem próximos, melhorando assim a reprodutibilidade do processo provavelmente devido ao melhoramento do inóculo.



(a)



(b)

Figura 4.10. Acompanhamento da atividade enzimática (a) e pH (b) ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental.

Em relação ao primeiro planejamento experimental, realizado antes do estudo de melhoramento das condições de cultivo de inóculo, é possível perceber que houve um incremento bastante significativo na atividade enzimática obtida. A atividade enzimática máxima obtida passou de 3,25 U/mL para 21,87 U/mL, o que corresponde a um aumento de 6,73 vezes na atividade lipolítica. Isto mostra que o estudo de melhoramento das condições de cultivo do inóculo foi de fundamental importância para a continuidade deste trabalho.

O pH pode ser verificado através da Figura 4.10 (b) e observa-se que os ensaios 1, 4, 6 e 7 apresentaram uma tendência de aumento de pH no decorrer de todo o processo enquanto os demais ensaios tiveram um perfil similar as demais fermentações com um ligeiro decréscimo inicial e uma tendência a aumentar. É interessante citar que os ensaios que apresentaram um comportamento diferente em relação ao pH estavam todos na mesma concentração de óleo de soja 0,5% (nível -1), o que pode sugerir que a quantidade de óleo de soja no meio tenha relação com o comportamento do pH ao longo da fermentação.

4.6.1 – Efeito da concentração dos componentes do meio de cultura na atividade enzimática da lipase

Como nas 48 horas de fermentação foi alcançado o máximo de atividade enzimática para a maioria dos ensaios experimentais foi escolhido este tempo de fermentação para realizar a análise dos efeitos da concentração dos componentes do meio de cultura sobre a atividade enzimática. Conforme a Tabela 4.8 e a Figura 4.11, verifica-se que a concentração de peptona e a concentração de óleo de soja tiveram um efeito positivo sobre a atividade lipolítica, ou seja, houve um aumento na atividade enzimática obtida quando as concentrações destas variáveis passaram do nível -1 para o nível +1. A concentração de peptona teve um efeito positivo de 2,04 U/mL, estatisticamente significativo a 74% de confiança, quando sua concentração passou do nível -1 (3,0%) para o nível +1 (7,0%) e a concentração de óleo de soja teve um efeito positivo de 1,80 U/mL, estatisticamente significativo a 71% de confiança, quando sua concentração passou do nível -1 (0,5%) para o nível +1 (1,5%). A concentração de NaNO_3 não apresentou efeito estatisticamente significativo sendo seu valor menor que o erro padrão calculado. A concentração de MgSO_4 teve um efeito negativo de -2,20 U/mL, estatisticamente significativo a 76% ($p < 0,24$) de confiança, ou seja, houve uma diminuição da atividade enzimática de 2,20 U/mL quando a

concentração do sulfato de magnésio passou do nível -1 (0%) para o nível +1 (0,2%).

Tabela 4.8: Efeitos principais das variáveis do segundo planejamento experimental em 48 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão	t	p
Média	12,12*	0,393	30,792	0,021
Peptona	2,04**	0,880	2,312	0,260
NaNO ₃	-0,87	0,880	-0,989	0,504
MgSO ₄	-2,20***	0,880	-2,500	0,242
Óleo de soja	1,80****	0,880	2,039	0,290

*98% nível de confiança

** 74% nível de confiança

*** 76% nível de confiança

**** 71% nível de confiança

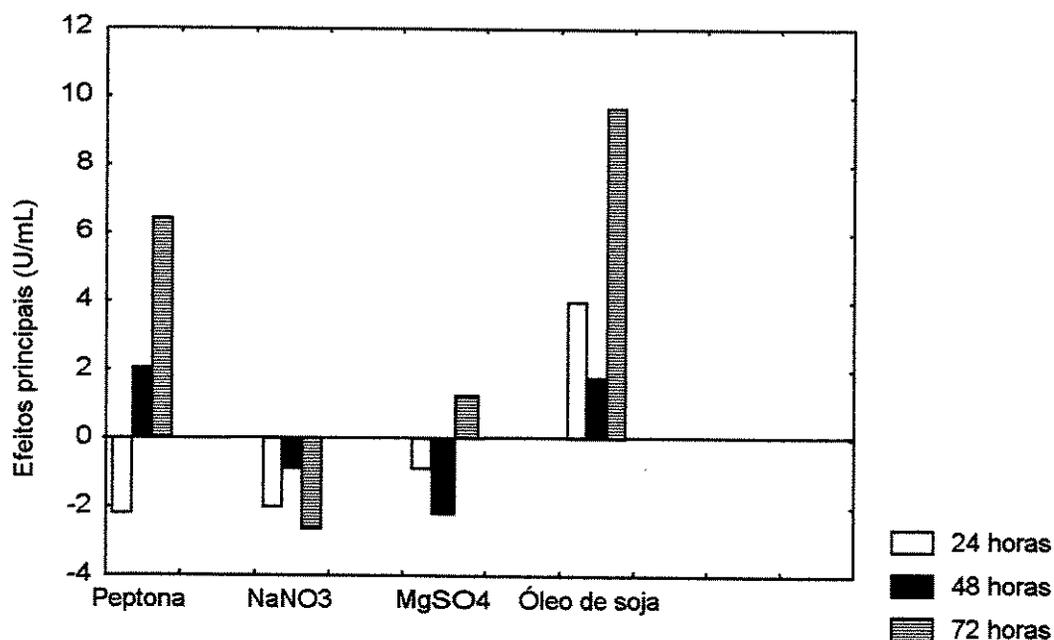


Figura 4.11. Efeitos principais das variáveis independentes do segundo planejamento experimental fracionário 2^{4-1} ao longo de toda a fermentação.

A partir dos resultados obtidos neste planejamento experimental selecionou-se a concentração de peptona e de óleo de soja como variáveis a serem estudadas num planejamento experimental completo, visando otimizar o meio de cultura. Quanto a

concentração de nitrato de sódio e de sulfato de magnésio, estas influenciaram negativamente a atividade lipolítica quando a concentração passou do nível -1 (0%) para o nível +1 (0,2%), por este motivo estes sais foram retirados do meio de cultura para continuidade do estudo de otimização, porque o nível - 1 correspondia à ausência destes sais no meio de cultura. Este tipo de resultado já foi observado em outros estudos realizados com outras enzimas, indicando que a concentração necessária destes microelementos está presente nos 10% de inóculo e o que o seu excesso no meio de fermentação provoca uma diminuição na atividade enzimática. Este resultado é economicamente muito interessante quando se projeta um processo em escala industrial, diminuindo o custo do meio de cultivo na produção da enzima desejada ou outro bioproduto.

4.7 – Terceiro planejamento experimental: Estudo da concentração de peptona e óleo de soja

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental fracionário foi estabelecida a realização de um planejamento experimental completo 2^2+4 pontos axiais+3 pontos centrais para estudar a influência de concentração de peptona e de óleo de soja na produção de lipase. As faixas utilizadas foram as mesmas do planejamento experimental fracionário e estão apresentadas na Tabela 4.9 e o resultado do planejamento na Tabela 4.10.

Tabela 4.9: Faixa de valores estudados no terceiro planejamento experimental 2^2 completo para produção de lipase.

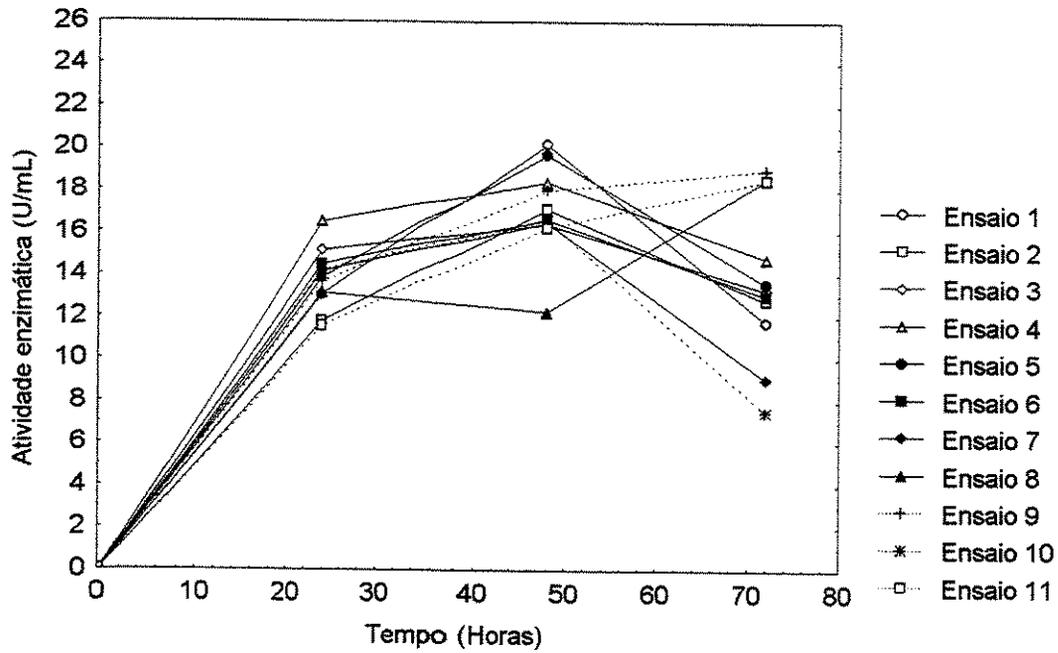
Nível	Peptona (%)	Óleo de soja (%)
-1,41	3	0,5
-1	3,58	0,64
0	5	1
+1	6,42	1,36
+1,41	7	1,5

Tabela 4.10: Terceiro planejamento experimental 2^2 completo para produção de lipase.

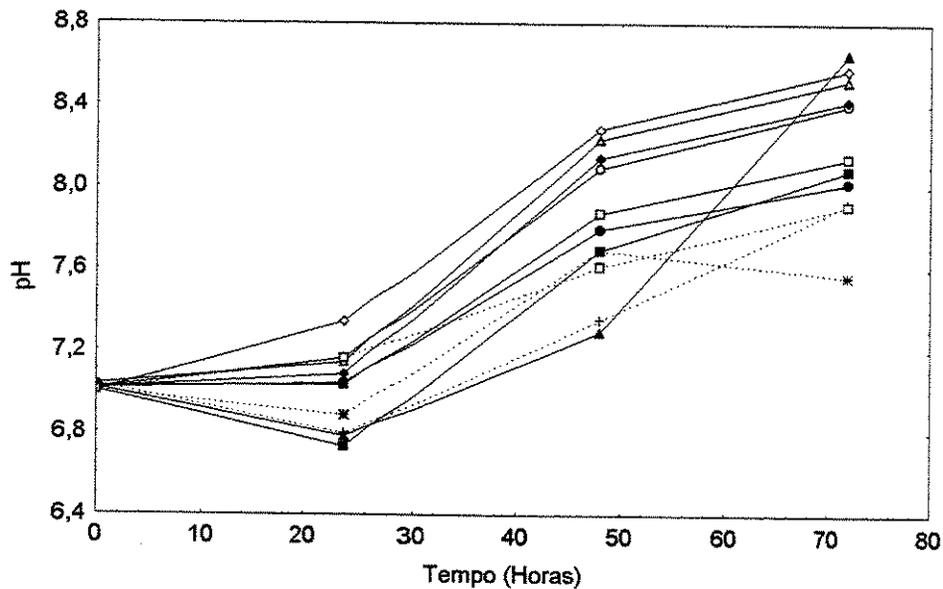
Ensaio	Peptona	Óleo de soja	Atividade enzimática (U/mL)		
			24h	48h	72h
1	-1	-1	12,99	20,18	11,74
2	+1	-1	11,76	17,07	12,75
3	-1	+1	15,12	16,37	13,25
4	+1	+1	16,48	18,37	14,74
5	-1,41	0	13,79	19,67	13,54
6	+1,41	0	14,45	16,59	12,97
7	0	-1,41	14,12	16,42	9,04
8	0	+1,41	13,10	12,19	18,53
9	0	0	13,61	17,99	18,97
10	0	0	14,17	16,55	7,47
11	0	0	11,53	16,21	18,49

A produção de lipase foi observada através do acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação como mostrado na figura 4.12 (a). Em 48 horas de fermentação pode ser verificado que os ensaios experimentais alcançaram o máximo de atividade enzimática 20,18 U/mL no ensaio 1, com exceção do ensaio 8, 9 e 11.

Analisando os resultados dos pontos centrais nos ensaios 9, 10 e 11 é possível observar a variabilidade do processo. Calculando as médias e desvios padrões destes três ensaios, obtém o desvio percentual destes três ensaios, que foi de 10,6%, 5,6% e 43,4% em 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Em relação aos testes anteriores, observa-se que houve uma menor variabilidade dos resultados após 24 e 48 horas de fermentação, enquanto que após 72 horas de fermentação, a variabilidade aumentou bastante. Em relação à diminuição da variabilidade dos resultados após 24 e 48 horas do processo isto pode indicar, que neste planejamento houve uma maior homogeneidade do inóculo. No caso do aumento da variabilidade do resultado após 72 horas, observa-se pelos dados claramente, que isto foi devido ao ensaio 10 onde a atividade enzimática caiu rapidamente, o que pode ter ocorrido por uma maior liberação de enzimas proteolíticas neste ensaio.



(a)



(b)

Figura 4.12. Acompanhamento da atividade enzimática (a) e pH (b) ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental.

O pH está apresentado na Figura 4.12 (b) e demonstrou um perfil semelhante ao das demais fermentações, com um pequeno decréscimo nas primeiras 24 horas de processo e tendência a aumentar.

4.7.1 – Efeito da concentração dos componentes do meio de cultura na atividade enzimática de lipase

A análise dos efeitos principais das variáveis e das interações entre elas está mostrada na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Efeitos principais e de interações das variáveis do terceiro planejamento experimental 2² em 48 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão	t	p
Média	17,53*	0,357	49,094	0,0004
Peptona	-0,55	0,945	-0,587	0,616
Óleo de soja	-1,25	0,945	-1,328	0,315
Peptona x Óleo de soja	2,55**	0,945	2,704	0,114

*99% nível de confiança

** 89% nível de confiança

É possível notar que o efeito das variáveis para 48 horas de fermentação, tempo no qual se verifica os maiores valores de atividade enzimática, foi muito pequeno, sendo menores que o erro padrão. Isto significa que o aumento da concentração da peptona e do óleo de soja não influenciaram no valor da atividade enzimática, a 90% de confiança. Através da Figura 4.13 pode-se observar que o efeito do aumento da concentração de peptona foi pequeno nos três tempos de amostragem, sendo inclusive negativo em 48 horas de fermentação. O aumento da concentração de óleo de soja por sua vez chegou a 3,42 U/mL em 24 horas de fermentação, sendo este resultado estatisticamente significativo a 87% de confiança, mas passou a ser negativo também após 48 horas de fermentação. A interação entre as duas variáveis foi entretanto positiva ao longo de todo o processo fermentativo, sendo maior após 48 horas de fermentação, chegando a 2,56 U/mL, estatisticamente significativo a 89% de confiança.

Os resultados obtidos neste planejamento mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade lipolítica obtidas nas condições inferiores (3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja) e superiores (6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja) de concentração, ensaios 1 e 4 respectivamente, sendo que os valores de atividade lipolítica ficaram em torno de 20 U/mL, resultado este bastante

superior aos 3,25 U/mL obtidos antes da realização do estudo de sistematização do inóculo e da realização dos planejamentos experimentais. Assim, como não foram detectadas diferenças entre as condições inferior e superior de concentração, foi realizado um estudo de validação destes resultados que está apresentado no próximo item.

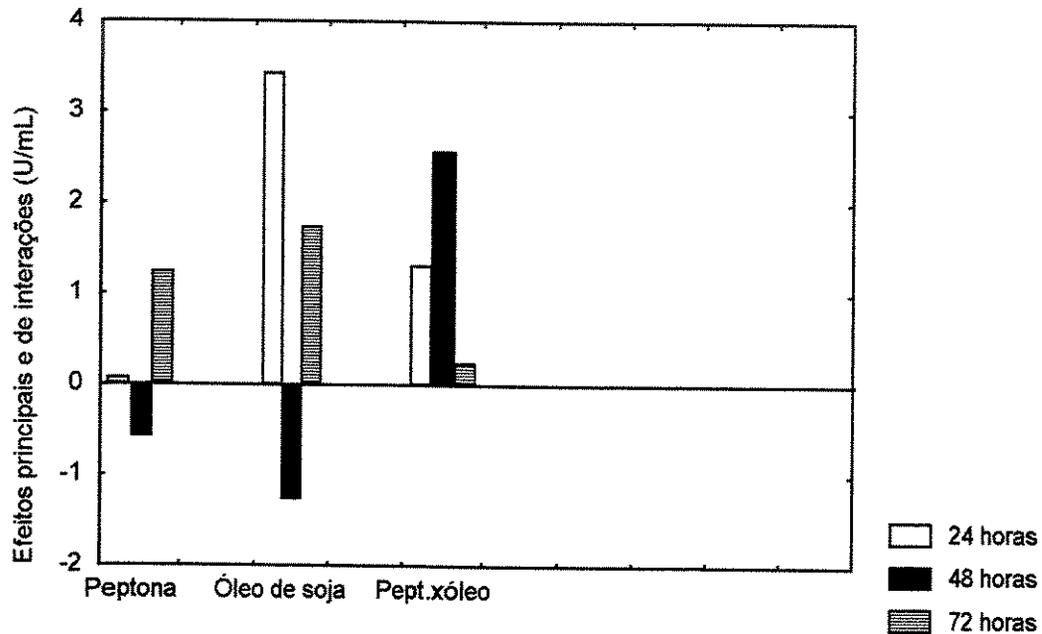


Figura 4.13. Efeitos principais e de interações das variáveis do terceiro planejamento experimental completo 2^2 ao longo de toda a fermentação.

4.8 – Estudo de validação dos resultados obtidos no terceiro planejamento experimental completo

Nesta etapa foram realizados três ensaios experimentais com a composição do meio de cultura 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja com pH inicial de 7,0 (ensaios 1, 2 e 3) e três ensaios experimentais com 6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja com pH inicial 7,0 (ensaios 4, 5, e 6), composições dos ensaios 1 e 4 do terceiro planejamento experimental apresentado no item anterior. As atividades enzimáticas alcançadas ao longo de 96 horas de fermentação estão apresentadas na Figura 4.14.

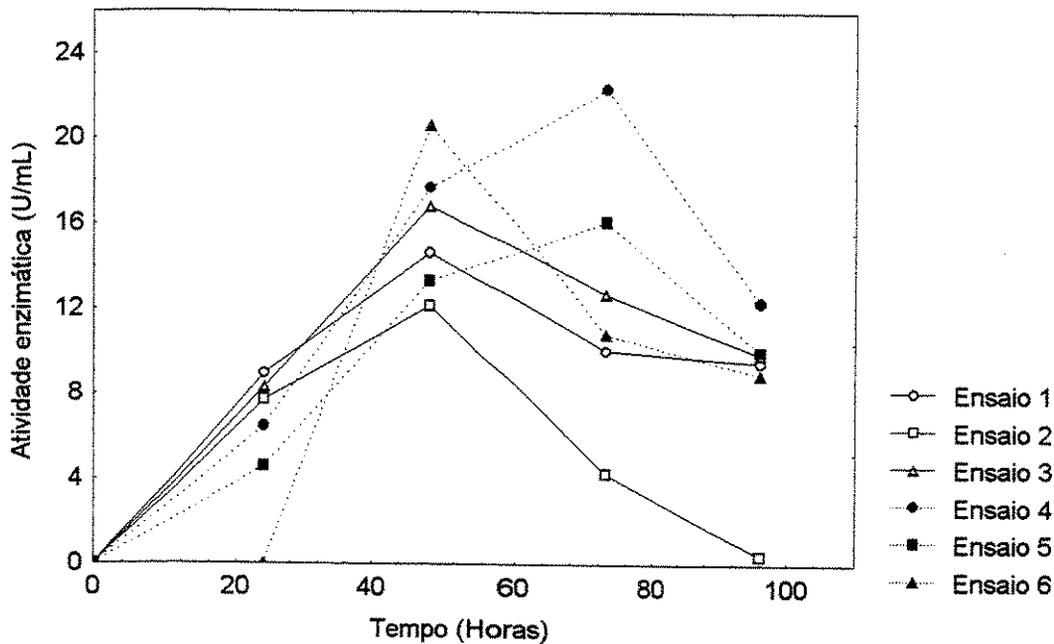


Figura 4.14. Acompanhamento da atividade enzimática de lipase ao longo da fermentação utilizando 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja (ensaio 1, 2 e 3) e 6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja (ensaio 4, 5 e 6).

Observa-se através da Figura 4.14 que os ensaios experimentais 4, 5 e 6 alcançaram atividade enzimática máxima de aproximadamente 22 U/mL e 16 U/mL, em 72 horas de fermentação e 20 U/mL em 48 horas de processo, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos ensaios 1, 2 e 3 que alcançaram 14 U/mL, 12 U/mL e 17 U/mL, respectivamente, por volta de 48 horas de fermentação.

Através da Figura 4.15 observa-se que o pH de todos os ensaios experimentais apresentou uma tendência de aumento, comportamento que foi um pouco mais acentuado nos ensaios 1, 2 e 3.

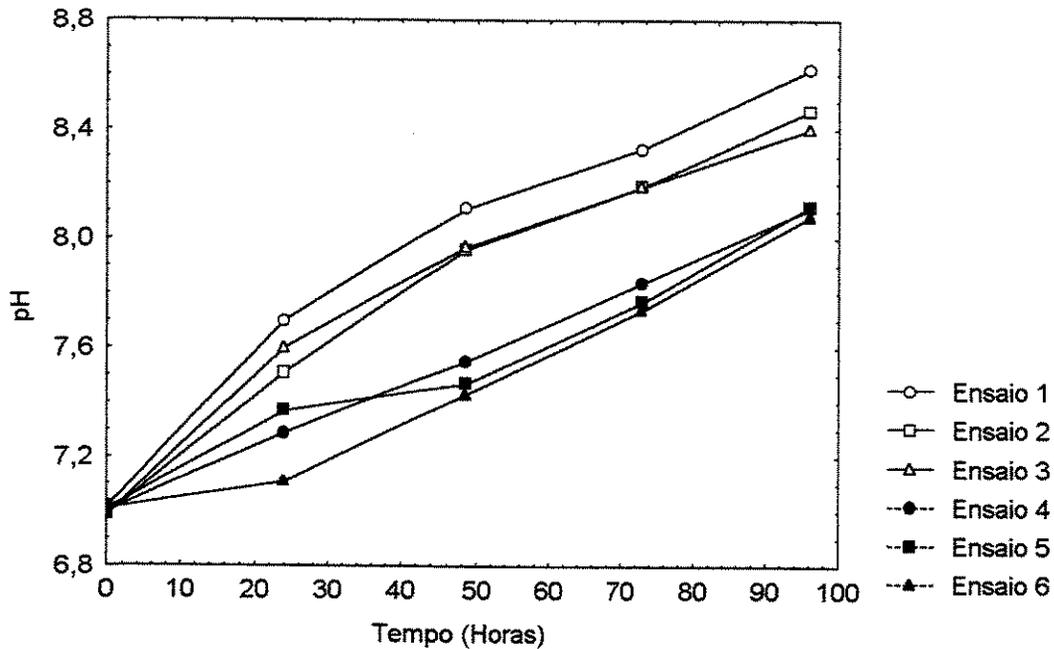


Figura 4.15. Acompanhamento do pH ao longo da fermentação utilizando 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja (ensaio 1, 2 e 3) e 6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja (ensaio 4, 5 e 6).

4.8.1 Teste de Tukey

Como os resultados experimentais das atividades enzimáticas alcançadas nos ensaios 1, 2 e 3 e dos ensaios 4, 5 e 6, mostrados no item 4.8 foram um pouco distintos realizou-se um teste de médias estatísticas para verificarmos se havia diferença significativa estatisticamente entre as amostras (95% de confiança). Com esta finalidade realizamos uma análise de variância (ANOVA) e aplicou-se o Teste de Tukey para as 48 horas de fermentação.

Com os dados experimentais presentes na Tabela 4.12 foi feita uma análise de variância mostrada na tabela 4.13.

Tabela 4.12: Ensaios experimentais nas condições utilizando 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja (A = ensaio 1, 2 e 3) e 6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja (B = ensaio 4, 5 e 6).

Ensaio	A (U/mL)	B (U/mL)
1	14,65	17,68
2	12,15	13,32
3	16,83	20,62

Tabela 4.13: Análise de variância para o teste de Tukey a 95% de confiança.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Tratamento	10,64	1	10,64	11,69	F _{0,95;1;2} =18,51
Ensaios	36,13	2	18,06		F _{0,95;2;2} =19,00
Resíduo	1,82	2	0,91		
Total	48,59	5	9,72		

O teste de Tukey fornece a mínima diferença significativa a 95% de confiança (MDS) para que duas amostras possam ser consideradas significativamente diferentes. A fórmula para o teste de Tukey está apresentada na Equação 4.1:

$$MDS = q \sqrt{\frac{MQ_{Residuo}}{n}} \quad (4.1)$$

Onde: q é tabelado a número de tratamentos e graus de liberdade do resíduo. Neste caso o valor de q utilizado foi q_{2,2}=6,08, uma vez que foram feitos 2 tratamentos e o resíduo possui 2 graus de liberdade. O valor n é o número de ensaios realizados.

Para este estudo o valor da menor diferença significativa (MDS) calculado a partir da Equação 4.1 foi de 3,35, a 95% de confiança (p < 0,05). Isto significa dizer que para que haja diferença significativa entre a atividade enzimática obtida nos dois meios de cultura testados é preciso que haja uma diferença maior ou igual a 3,35 entre as médias de atividade enzimática obtidas nos dois meios testados.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 4.12 a atividade enzimática média

na condição 3,58% de peptona + 0,64% de óleo de soja foi de $14,54 \pm 2,34$ U/mL e na condição 6,42% de peptona + 1,36% de óleo de soja foi de $17,21 \pm 3,67$ U/mL. Calculando a diferença entre as médias destas duas condições o valor obtido foi de 2,67. Comparando este valor com o da menor diferença significativa (MDS) nota-se que ele foi menor que a MDS, ou seja, pode-se afirmar que não há diferença significativa a 95% de confiança entre os valores de atividade enzimática obtidas nas duas condições testadas nas 48 horas de fermentação.

Com o resultado deste teste que verificou não haver diferença significativa a 95% de confiança na produção de lipase entre os dois meios testados decidiu-se então utilizar o meio de cultura que continha 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja como sendo a condição otimizada para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados. Todos os demais experimentos realizados utilizaram esta composição de meio de cultura.

4.9 – Quarto planejamento experimental: Estudo da influência do pH e temperatura de produção da lipase

Um planejamento experimental completo 2^2 foi realizado com as variáveis independentes pH inicial do meio de cultura e temperatura de produção da enzima, na faixa de valores encontrados na literatura. A resposta avaliada foi a atividade enzimática de lipase no decorrer da fermentação, sendo também realizado o acompanhamento do pH. A composição do meio de cultura utilizado foi de 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja.

Os níveis utilizados e o planejamento estão apresentados nas Tabelas 4.14 e 4.15.

Tabela 4.14: Faixa de valores estudados no quarto planejamento experimental 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura de produção da lipase.

Nível	PH	Temperatura (°C)
-1,41	5,6	18,0
-1	6,0	21,5
0	7,0	30
+1	8,0	38,5
+1,41	8,4	42

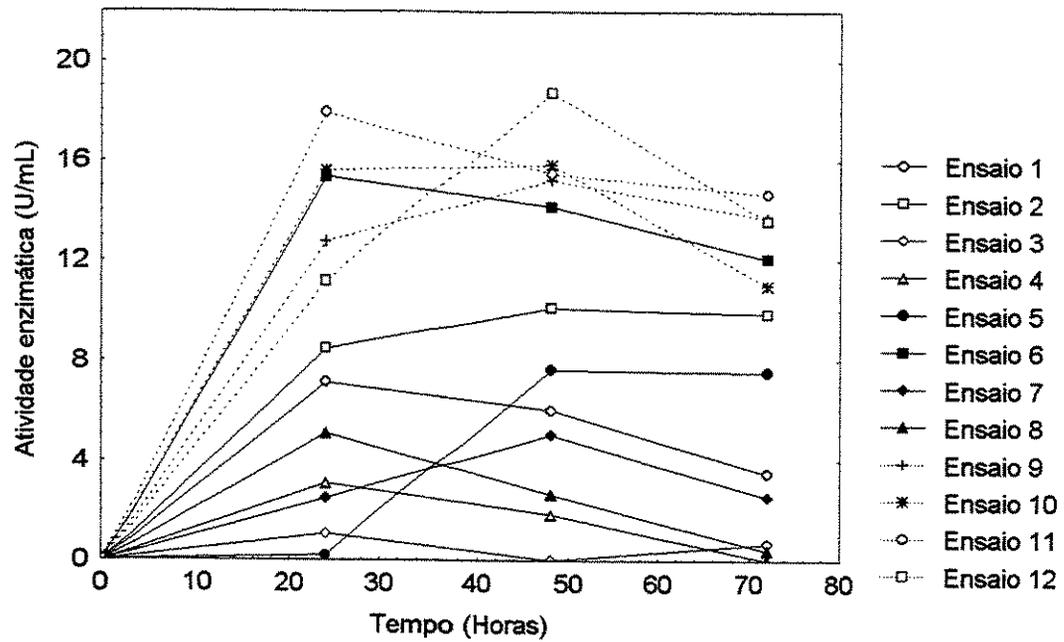
Tabela 4.15: Quarto planejamento experimental 2^2 para o estudo da influência do pH e temperatura de produção da lipase.

Ensaio	pH	Temperatura	Atividade enzimática (U/mL)		
			24h	48h	72h
1	-1	-1	7,12	6,00	3,48
2	+1	-1	8,47	10,12	9,88
3	-1	+1	1,05	0,00	0,67
4	+1	+1	3,07	1,82	0,00
5	-1,41	0	0,17	7,63	7,52
6	+1,41	0	15,35	14,15	12,08
7	0	-1,41	2,48	5,03	2,53
8	0	+1,41	5,07	2,62	0,38
9	0	0	12,75	15,23	13,70
10	0	0	15,58	15,83	11,00
11	0	0	17,93	15,47	14,67
12	0	0	11,17	18,73	13,60

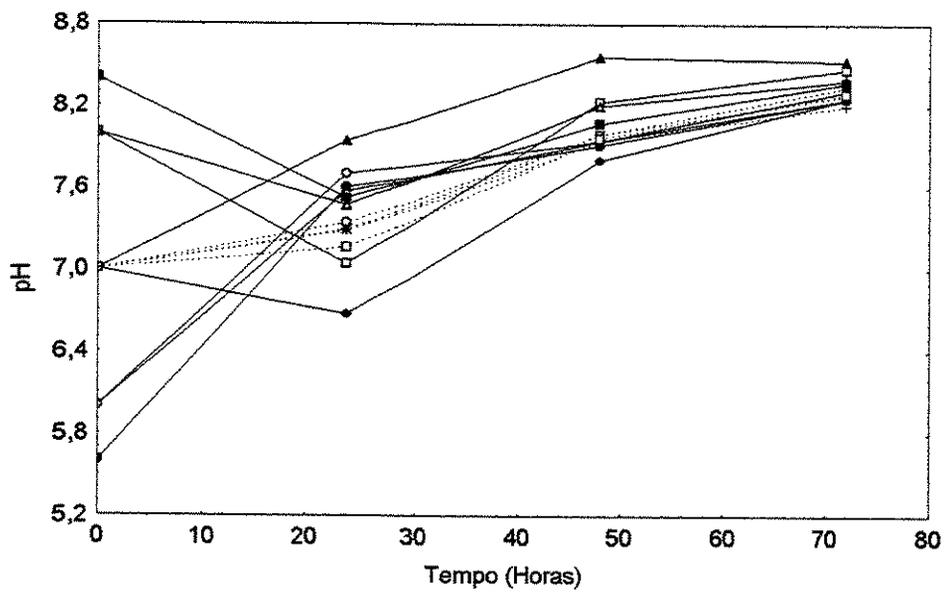
A partir da Figura 4.16 (a) e da Tabela 4.15 é possível observar que houve uma grande variação na atividade enzimática devido às diferentes condições experimentais utilizadas no planejamento. Após 48 horas de fermentação os valores de atividade enzimática variaram de 0 a 18,7 U/mL. Esta variabilidade dos resultados é um indicativo de que o microrganismo foi bastante sensível às variáveis estudadas, neste caso pH inicial e temperatura de produção.

Os resultados obtidos nos pontos centrais (ensaio 9, 10, 11 e 12) mostraram que a reprodutibilidade dos ensaios realizados foi semelhante ao que já vinha sendo obtido nos experimentos anteriores. Os desvios percentuais obtidos em relação a média foram de 20,8%, 10,0% e 11,9% após 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Em geral a variabilidade do processo observada ao longo deste trabalho ficou na faixa entre 10 e 30% de variação.

Os valores de pH dos ensaios experimentais do quarto planejamento podem ser verificados na Figura 4.16 (b). Os ensaios 2, 4, 6 e 7 inicialmente apresentaram uma diminuição do valor de pH com uma tendência de aumento, enquanto que os demais ensaios apresentaram valores crescentes de pH.



(a)



(b)

Figura 4.16. Acompanhamento da atividade enzimática (a) e pH (b) ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental para o estudo da influência do pH e da temperatura na produção da lipase.

4.9.1 – Efeito do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de produção da lipase

A análise dos efeitos principais das variáveis estudadas e as interações entre elas estão apresentadas na Tabela 4.16 e podem ser melhor visualizadas na Figura 4.17.

Tabela 4.16: Efeitos principais e de interações das variáveis do quarto planejamento experimental em 48 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro padrão	t	p
Média	10,40*	0,575	18,060	0,0004
pH	2,97**	1,629	1,823	0,166
Temperatura	-7,15***	1,629	-4,390	0,022
pH x Temperatura	-1,15	1,629	-0,706	0,531

* 99% nível de confiança

** 84% nível de confiança

*** 95% nível de confiança

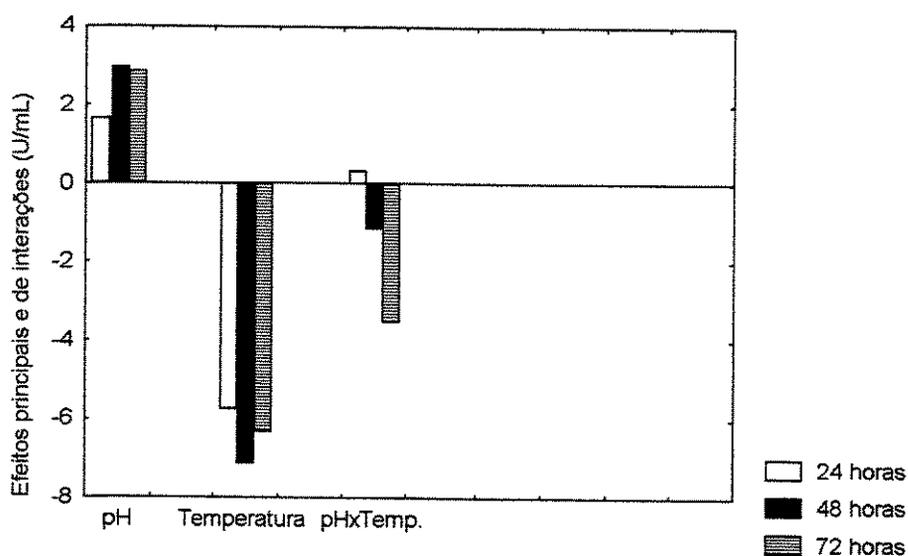


Figura 4.17. Efeitos principais e de interações das variáveis do quarto planejamento experimental completo 2^2 ao longo de toda a fermentação.

Após 48 horas de fermentação observou-se que apenas a temperatura de produção apresentou um efeito estatisticamente significativo a 95% de confiança, sendo este valor de -7,15, ou seja, houve uma diminuição da atividade enzimática em média de 7,15 U/mL quando a temperatura de produção da enzima passou do nível -1 (21,5°C) para o nível +1

(38,5°C). O pH inicial do meio apresentou um efeito positivo de 2,97 U/mL quando seu valor passou do nível -1 (6,0) para o nível +1 (8,0) e este efeito foi estatisticamente significativo a 84% de confiança. A interação entre as duas variáveis não apresentou efeito estatisticamente significativo para 48 horas de fermentação.

Observa-se na Figura 4.17 que o efeito do aumento do pH inicial do meio foi positivo ao longo de todo o processo, enquanto que o aumento da temperatura apresentou um efeito negativo em todos os tempos de amostragem. A interação pH x temperatura também apresentou efeito negativo sobre a atividade enzimática, exceto em 24 horas de fermentação quando apresentou um pequeno efeito positivo, mas que não foi estatisticamente significativo.

4.9.2 – Verificação de um modelo empírico para a produção da lipase em função do pH inicial do meio de cultura e da temperatura

Para verificação de um modelo quadrático para a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 considerando as variáveis pH inicial do meio de cultura e temperatura de produção, foram calculados os coeficientes de regressão e feita a ANOVA. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.17 e 4.18.

Tabela 4.17: Coeficientes de regressão para o quarto planejamento experimental após 48 h de fermentação pelo *Geotrichum candidum*.

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t (3)	p	-95% Cnf.Limite	+95% Cnf.Limite
Média	16,32*	0,81*	20,04*	0,00*	13,73*	18,92*
pH(L)	1,90*	0,57*	3,29*	0,05*	0,06*	3,73*
pH(Q)	-3,44*	0,65*	-5,32*	0,01*	-5,50*	-1,38*
T (L)	-2,22*	0,58*	-3,85*	0,03*	-4,05*	-0,38*
T (Q)	-7,00*	0,65*	-10,82*	0,03*	-9,05*	-4,94*
pH x T	-0,58	0,81	-0,71	0,53	-3,17	2,02

* valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

L – linear

Q – quadrático

T – temperatura

Tabela 4.18: Tabela ANOVA para o quarto planejamento experimental após 48 horas de fermentação de *Geotrichum candidum*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	406,68	4	101,67	17,29	2,13
Resíduos	41,20	7	5,88		
Falta de ajuste	33,24	4	8,31		
Erro puro	7,96	3	2,65		
Total	447,88	11	40,72		

% variação explicada (R^2) = 90,80

% máxima variação explicável ($(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T$) = 98,22

coeficiente de correlação (R) = 0,95

Observando a Tabela 4.17 é possível perceber que todos os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 95% de confiança, exceto o termo de interação entre pH e temperatura, sendo que este foi incorporado à falta de ajuste para cálculo da ANOVA que está apresentada na Tabela 4.18.

Pelos resultados mostrados na Tabela 4.18 de Análise de Variância (ANOVA) observa-se que o valor do teste F calculado de 17,29, é cerca de 8 vezes maior do que o valor tabelado $F_{0,95; 4; 7} = 2,13$, indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para o processo estudado. Desta forma a atividade enzimática para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL- Y552, pode ser predita em função do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de produção através da Equação codificada 4.2.

$$\text{Atividade enzimática} = 16,32 + 1,90 \text{ pH} - 3,44 \text{ pH}^2 - 2,22 T - 6,99 T^2 \quad (4.2)$$

A variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, de cerca de 90% e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,95, mostrando que o modelo obtido é adequado para explicar o processo estudado. A partir do valor da máxima variação explicável, que foi de 98,22% pode-se notar que o erro puro do processo foi pequeno, em torno de 2,0%.

A Figura 4.18 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos (modelo). Pode-se concluir que o modelo de 2^a ordem prevê bem o comportamento da atividade enzimática frente à variação do pH inicial do meio e da temperatura de produção.

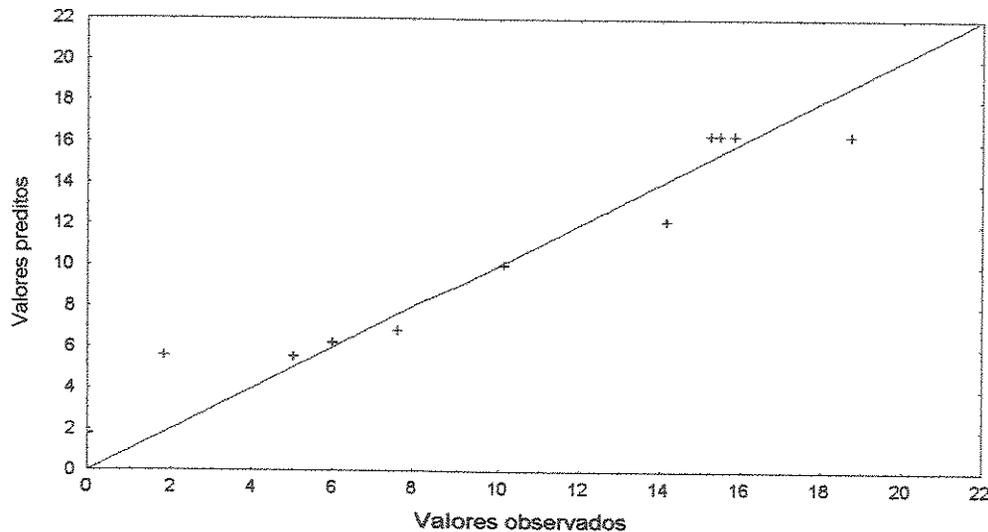
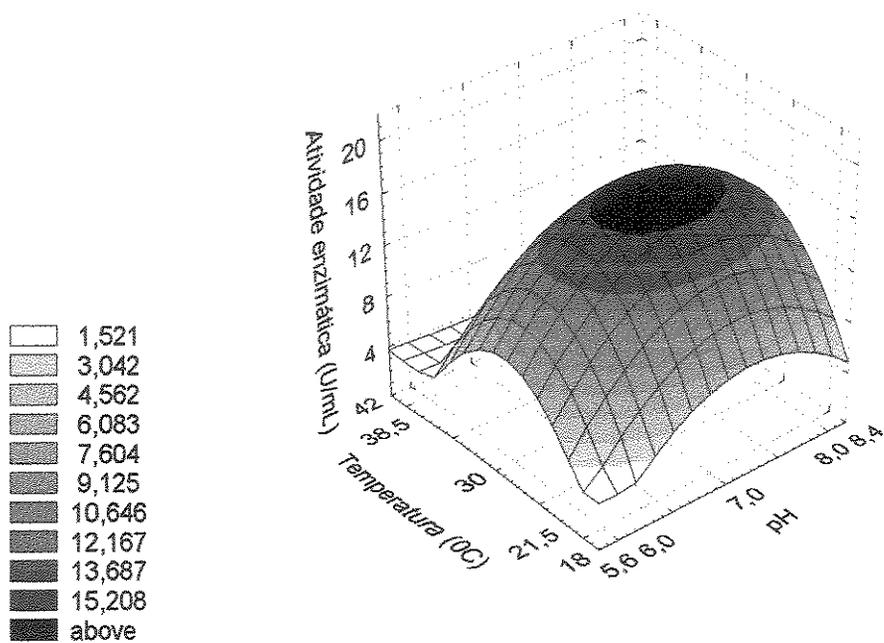


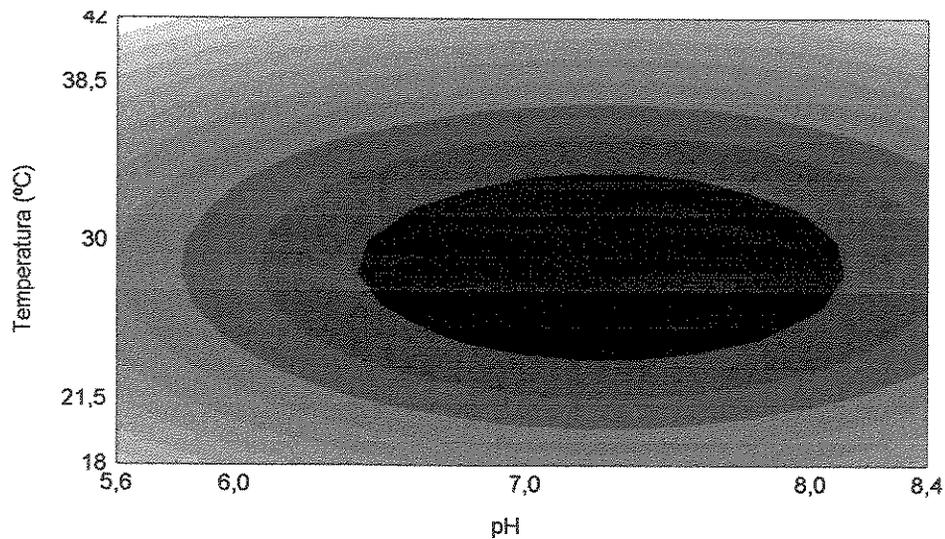
Figura 4.18. Valores observados versus valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o quarto planejamento experimental.

A partir do modelo obtido foi então possível obter as superfícies de resposta para analisar as melhores condições de pH inicial do meio de cultura e temperatura de produção da enzima que levam a um maior valor de atividade enzimática. A superfície de resposta obtida após 48 horas de fermentação está apresentada na Figura 4.19. É possível observar que tanto para temperaturas muito baixas na faixa de 21°C como para temperaturas muito altas em torno de 38°C, independente do valor de pH, a produção da enzima é muito baixa. Um incremento no valor do pH propiciou um pequeno aumento na atividade lipolítica mais significativo a temperaturas mais baixas. Assim verifica-se que a condição ótima para produção da enzima é em pH inicial de 7,0 e temperatura de produção de 30°C, atingindo uma atividade enzimática de cerca de 16,0 U/mL após 48 horas de fermentação.

Estes resultados mostraram que os ensaios realizados anteriormente foram conduzidos nas condições ótimas de pH e temperatura.



(a)



(b)

Figura 4.19. Superfície de resposta para a atividade lipolítica em função do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de produção (a) e Curva de contorno para a atividade lipolítica em função do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de produção (b).

4.10 – Caracterização da lipase

4.10.1 – Estudo da estabilidade da enzima congelada

A lipase no caldo bruto de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 foi estocada durante aproximadamente 08 meses, em congelador na temperatura de 4°C. Neste período foram determinadas as atividades enzimáticas em intervalos de tempos regulares. De acordo com os valores apresentados na Figura 4.20 pode-se verificar que a lipase congelada perdeu cerca de 30% de sua atividade enzimática no primeiro mês de estocagem, e permaneceu praticamente com a atividade estável ao longo dos 7 meses restantes da estocagem.

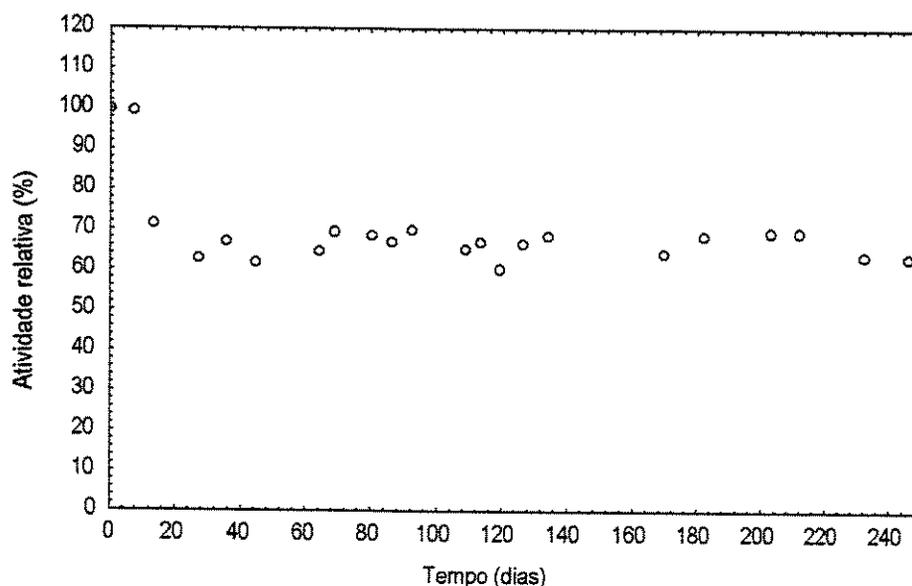


Figura 4.20. Estabilidade da lipase congelada ao longo do tempo

4.10.2 – Determinação do pH ótimo

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática a 37°C, utilizou-se quatro tampões: Tampão citrato-fosfato 100mM (pH 2,6-7,0), tampão acetato de sódio 100mM (pH 3,6-5,6), tampão fosfato de sódio 100mM (pH 6,9-8,0) e tampão tris-HCl 100mM (pH 7,2-8,8). De acordo com os resultados obtidos ilustrados na Figura 4.21 a enzima apresentou um pH ótimo de 7,0 no tampão citrato-fosfato 100mM, 5,6 no tampão acetato de sódio 100mM, 7,0 no tampão fosfato de sódio 100mM e 7,6 no tampão tris-HCl 100mM.

Comparando o comportamento da enzima nos diferentes tampões verificou-se que no tampão fosfato de sódio 100mM a enzima obteve melhores valores de atividade enzimática. Resultados similares foram observados para a lipase de *Penicillium restrictum* relatados por Freire et al. (1997 b). A diferença de atividade enzimática alcançada entre os tampões fosfato de sódio dos demais estudados foi 10% maior que o tampão citrato-fosfato, 37% superior ao tampão acetato de sódio e 26% maior que o tampão tris-HCl.

Os valores observados para pH ótimo da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 nos diversos tampões estudados estão de acordo com os dados da literatura para outras lipases, que apresentam valores de pH ótimo na faixa de 6,0 a 9,0 reportados nos trabalhos de Petrovic et al. (1990) e Maliszewska & Mastalerz (1992).

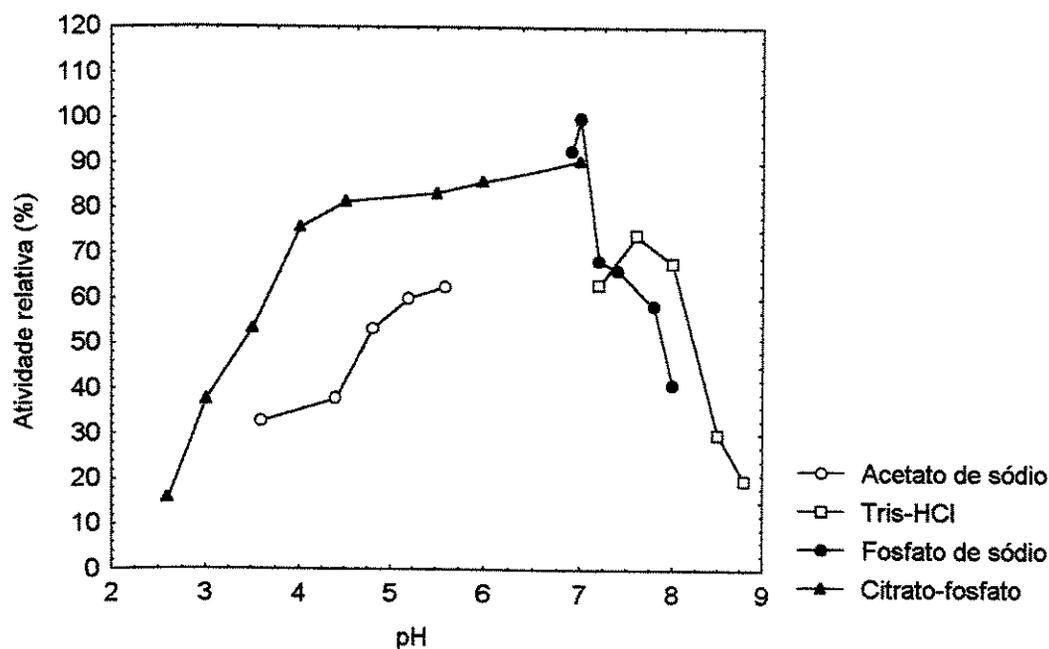


Figura 4.21. Atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 em função do pH ótimo, nos tampões citrato-fosfato 100mM, acetato de sódio 100mM, fosfato de sódio 100mM e tris-HCl 100mM.

4.10.3 – Estudo da Temperatura ótima

A enzima apresentou uma temperatura ótima de 37° C e começou a demonstrar uma desnaturação acentuada a partir de 40° C, com pH 7,0, como mostrado nos resultados da Tabela 4.19 e da Figura 4.22.

A literatura reporta em diversos trabalhos, para diferentes formas moleculares de lipase de *Geotrichum candidum* que a temperatura ótima está entre 30° e 40°C como verifica-se em Baillargeon et al. (1989) e Tsujisaka et al. (1973). Lipases de outros microrganismos também são citadas apresentando a mesma faixa de temperatura ótima segundo Menasa & Lambert (1982), Druet et al. (1992) e Pimentel et al. (1994).

Tabela 4.19: Atividade enzimática em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Atividade enzimática (U/mL)
27	14,40
30	15,57
33	17,21
35	17,27
36	25,13
37	26,40
38	25,70
39	24,33
40	23,75
42	19,18
50	17,00
60	3,32

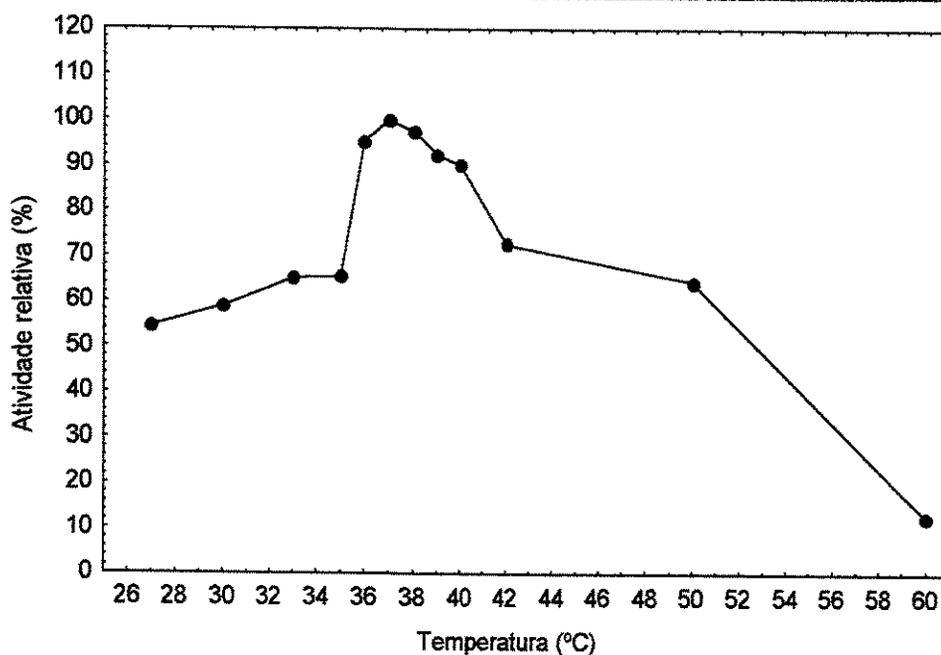


Figura 4.22. Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552.

Com os valores de atividade enzimática, em função da temperatura, foi possível determinar a energia de ativação. Através dos dados experimentais apresentados na Tabela 4.20 e correlacionando a equação de velocidade de reação (Eq. 4.3) e a equação de Arrhenius (Eq. 4.4) graficada na forma linearizada conforme a Figura 4.23 calculou-se a energia de ativação (E_a).

$$V = K[E] \quad (4.3)$$

$$V = V_0 \exp(-E_a/R_g T) \quad (4.4)$$

Onde:

V= velocidade de reação

V_0 = velocidade de reação na temperatura infinita

E_a = energia de ativação

R_g = constante dos gases ($R = 1,9872 \text{ cal/mol.K}$)

K= constante cinética de reação

E= concentração da enzima ativa

T= temperatura (K)

Tabela 4.20: Atividade enzimática em função da temperatura.

T (°C)	T (K)	$(1/T) \times 10^{-3}$	V($\mu\text{mol/min.mL}$)	V/ V_0	$-\ln(V/V_0)$
27	300,15	3,332	14,40	0,5454	0,606
30	303,15	3,299	15,57	0,5898	0,528
33	306,15	3,266	17,21	0,6519	0,428
35	308,15	3,245	17,27	0,6542	0,424

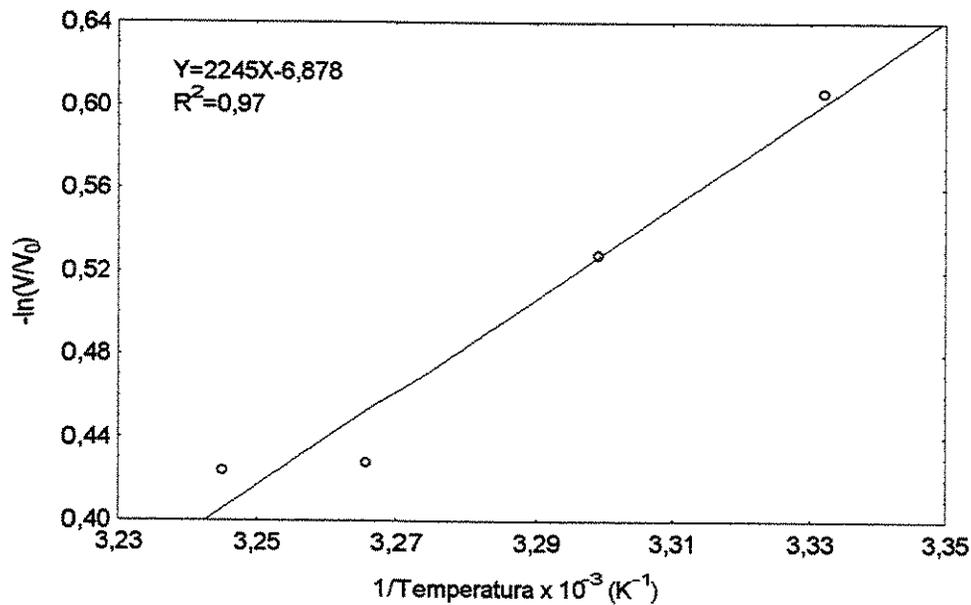


Figura 4.23. Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 para o cálculo da energia de ativação.

A partir da equação linearizada de Arrhenius, obtida da Figura 4.23, que está apresentada na Equação 4.5 determinou-se a energia de ativação como sendo 10,85 Kcal/mol.

$$-\ln\left(\frac{V}{V_0}\right) = 2245 \frac{1}{T} - 6,878 \quad (4.5)$$

Assim, $E_a/R_g = 2245$ e $E_a = 4,46$ Kcal/mol

Santos (2002) determinou a energia de ativação para inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* como sendo 11,73 Kcal/mol.

4.10.4 – Estudo da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da lipase foi estudada através determinação do tempo de meia vida da enzima. De cada solução incubada, foram retiradas amostras em intervalos de tempo pré-determinados e determinou-se as constantes de desativação térmica (K_d) para cada temperatura, a meia-vida em função da temperatura ($t_{1/2}$) e em seguida a energia de

ativação da reação de desnaturação (E_d) para a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552.

Levando em consideração que em altas temperaturas a desnaturação é importante e que a cinética de desnaturação é de 1ª ordem, tem-se na Equação 4.6:

$$\frac{dE}{dt} = -K_d \cdot E \quad (4.6)$$

integrando-se a Equação 4.6, obtém-se a Equação 4.7:

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -K_d \cdot t \quad (4.7)$$

Considerando-se ainda a Equação de Arrhenius 4.4 e que K é constante quando a temperatura é mantida constante, teremos a Equação 4.8:

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = \ln \frac{[V/K]}{[V_0/K]} - K_d \cdot t \quad (4.8)$$

Onde:

V= velocidade de reação

V_0 = velocidade de reação no instante $t=0$

A meia vida da enzima é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial, ou seja $[E]/[E_0]=0,5$. Logo, a meia vida ($t_{1/2}$) pode ser determinada a partir da Equação 4.9 abaixo:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{K_d} \quad (4.9)$$

Graficando-se $\ln(V/V_0)$ em função do tempo determina-se o valor de K_d para cada temperatura. Os resultados obtidos com as incubações em diferentes temperaturas estão apresentados nas Tabelas 4.21 a 4.28. Um exemplo do cálculo do K_d é mostrado através da Figura 4.24 para a temperatura de 40°C.

Tabela 4.21: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=30°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	28,59	1,0000	0
255	25,52	0,8926	0,1136
360	24,75	0,8657	0,1442
480	22,74	0,7954	0,2289
1320	20,54	0,7184	0,3307
1440	21,98	0,7688	0,2629
1560	16,03	0,5607	0,5786

Tabela 4.22: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=33°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	30	1,0000	0
180	28,53	0,951	0,0502
1200	25,33	0,8443	0,1692
1459,8	26,93	0,8977	0,1079
2175	15,00	0,5	0,6931
2880	14,87	0,4957	0,7018

Tabela 4.23: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=35°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	24,2	1,0000	0
120	18,9	0,7810	0,2471
255	15,54	0,6421	0,4429
1120,2	11,5	0,4752	0,7440
1260	11,29	0,4665	0,7624
1440	8,76	0,3620	1,0161

Tabela 4.24: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=37°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	34,05	1,0000	0
30	20,4	0,5991	0,5123
60	19,82	0,5821	0,5411
90	14,72	0,4323	0,8386
180	14,31	0,4203	0,8669
210	14,26	0,4188	0,8704
240	13,28	0,3900	0,9416

Tabela 4.25: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=40°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	19,9	1,0000	0
15	16,02	0,8050	0,2169
30	12,81	0,6437	0,4405
45	10,99	0,5522	0,5937
60	6,63	0,3332	1,0991
75	6,2	0,3116	1,1662
90	5,55	0,2789	1,2769
105	3,89	0,1955	1,6323
120	3,51	0,1764	1,7351

Tabela 4.26: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=43°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	26,07	1,0000	0
2	19,9	0,7633	0,2701
3	18,31	0,7023	0,3533
4	16,03	0,6149	0,4863
6	15,67	0,6011	0,5090
10	12,94	0,4963	0,7005

Tabela 4.27: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=45°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	20,91	1,0000	0
3	17,23	0,8240	0,1936
5	12,22	0,5844	0,5371
7	9,28	0,4438	0,8124
10	8,08	0,3864	0,9508
15	5,48	0,2621	1,3391
20	5,19	0,2482	1,3935
25	3,04	0,1454	1,9284
30	2,0	0,0956	2,3471

Tabela 4.28: Atividade enzimática da lipase em função do tempo de incubação a T=50°C.

Tempo (min)	V($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)	V/V ₀	-ln(V/V ₀)
0	26,07	1,0000	0
0,5	18,25	0,7000	0,3566
1	17,8	0,6828	0,3816
1,5	17,44	0,6690	0,4020
2	16,13	0,6187	0,4801
3	7,37	0,2827	1,2634
4	5,15	0,1975	1,6218
5	4,55	0,1745	1,7456

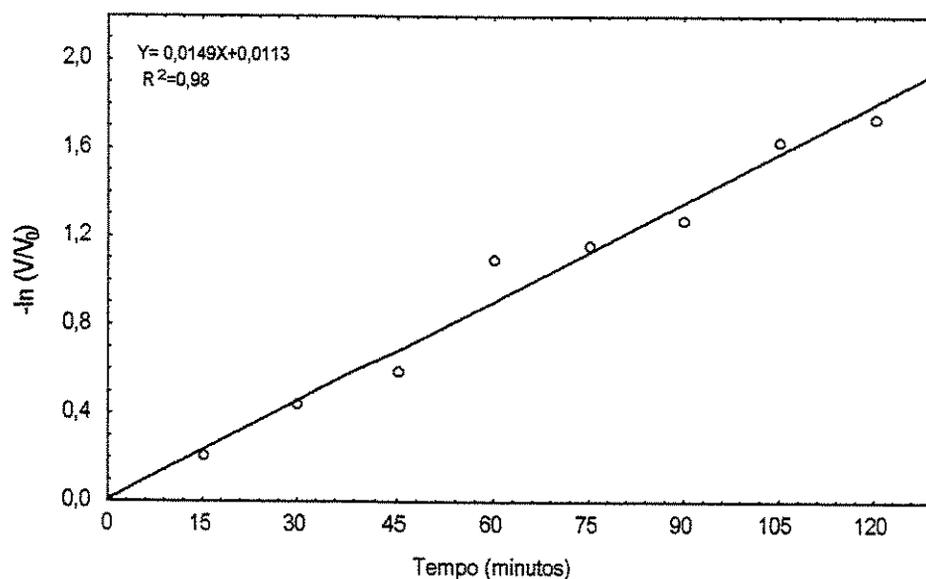


Figura 4.24. Efeito da temperatura em função do tempo de incubação da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552, para o cálculo da constante de desativação para $T=40^{\circ}\text{C}$.

Os valores de K_d e tempo de meia vida calculados para cada temperatura estão apresentados na Tabela 4.29. Sendo K_d função da temperatura segundo a equação de Arrhenius pode-se determinar E_d conforme apresentado na Figura 4.25.

Tabela 4.29: Valores experimentais e estimados da constante de desativação térmica (K_d) e da meia vida da lipase ($t_{1/2}$) em função da temperatura.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	K_d (min-1) experimental	$t_{1/2}$ (h) experimental	K_d (min-1) estimado	$t_{1/2}$ (h) estimado
30	0,0003	38,51	0,0002	74,23
33	0,0003	38,51	0,0006	20,57
35	0,0006	19,25	0,0013	8,86
37	0,0032	3,61	0,0030	3,86
40	0,0149	0,77	0,0102	1,13
43	0,0651	0,18	0,0340	0,34
45	0,0737	0,16	0,0748	0,15
50	0,367	0,03	0,5160	0,02

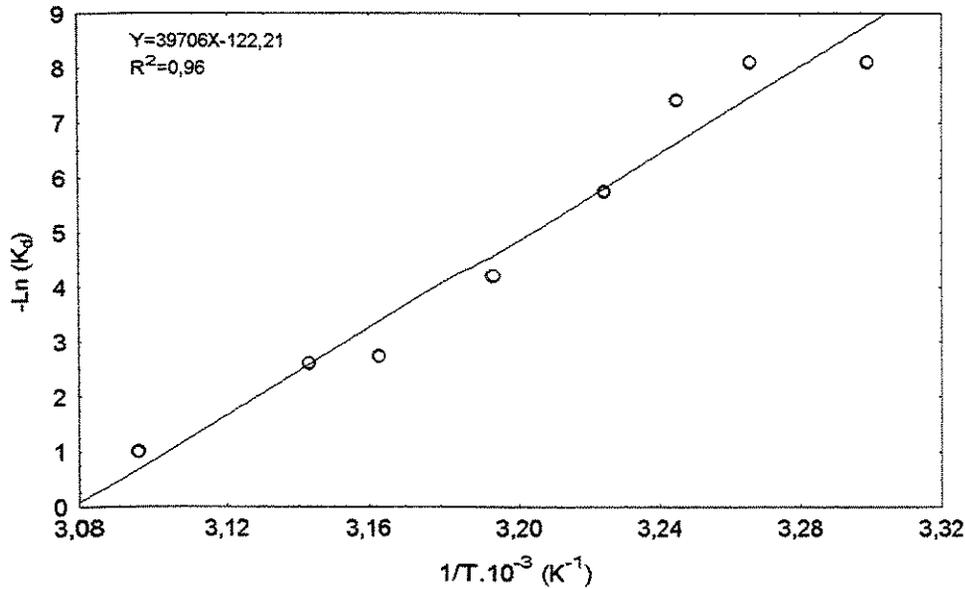


Figura 4.25. Dados experimentais das constantes de desativação (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desativação (E_d).

Assim, a partir da equação de Arrhenius, fornecida pela Figura 4.25 que está apresentada na Equação 4.10 e com $R=1,98 \text{ cal}/(\text{gmol.K})$, determinou-se a energia de ativação da reação de desativação (E_d) como sendo $78,90 \text{ Kcal/mol}$.

$$\ln K_d = \ln K - \frac{E_d}{R_g T} \quad (4.10)$$

$$e \ Y=39706X-122,21$$

$$\frac{E_d}{R_g} = 39706$$

Portanto, $E_d= 78,90\text{Kcal/mol}$

Para obtermos a equação final de Arrhenius, calcula-se o valor de K a partir de $\ln K=122,21$. Então $K= \exp^{122,21}= 1,19 \times 10^{53}$. Desta forma, a expressão para determinar os valores de K_d estimados é:

$$K_d = 1,19 \times 10^{53} \exp(-39706/T) \quad (4.11)$$

Foram estimados através da Equação 4.11 os valores de K_d e $t_{1/2}$ para as temperaturas estudadas, como mostra a Tabela 4.29.

Como pode-se verificar que à medida em que se aumenta a temperatura, menor é a estabilidade da lipase. Assim, podemos dizer que a enzima é mais estável a baixas temperaturas, como a 30 °C.

A lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y552 mostrou ser bem menos estável que a lipase de *Penicillium restrictum* reportada pelos autores Freire et al. (1997 b), que apresentou um $t_{1/2}$ =4.800 horas para 30°C a pH =7,0 e $t_{1/2}$ =67 horas para 37°C a pH =7,0. A do microrganismo em estudo apresentou um $t_{1/2}$ =38,51 horas a 30°C e pH =7,0 e $t_{1/2}$ =3,61 horas para 37°C a pH =7,0.

4.10.5 – Influência de íons na atividade lipolítica

O efeito de sais minerais na atividade da enzima foi testado de acordo com o item 3.8.5. Através da Tabela 4.30 observa-se que a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 não sofreu forte ativação pela presença de nenhum dos sais testados na concentração de 1mM. No entanto, foi fortemente inibida pela presença de CuSO_4 e AgNO_3 , e foi inibida em 12%,13% e 14% na presença de ZnSO_4 , Li SO_4 e FeSO_4 , respectivamente.

A inibição significativa da lipase de *Penicillium camembertii* U-150, pela presença de íons Fe^{+++} e Hg^{++} também foi observada segundo Yamaguchi & Mase (1991). Resultados similares também foram obtidos por Bhushan & Hoodal (1994) para a lipase produzida por *Candida* BG-55.

Petrovic et al. (1990) verificaram a influência dos seguintes sais Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} e Fe^{+++} em diferentes concentrações (0,5-50 mMol/L) na atividade de lipase produzida por *Penicillium roqueforti* S-86. Os resultados indicaram que os sais monovalentes estimularam a produção da enzima até a concentração de 1mmol/l, o Mn^{++} a 10 mMol/L e o Ca^{++} a 1mMol/L também apresentaram o mesmo comportamento, enquanto que Mg^{++} e Fe^{+++} atuaram como inibidores da lipase.

Estudando lipases extracelulares de *Geotrichum candidum*, Veeraragavan et al. (1990) relataram que a presença de íons monovalentes (Na^+ e K^+) teve um pequeno efeito na atividade enzimática, enquanto que íons divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} e SO_4^-) em concentrações acima de 50 mM inibiram a atividade de lipase. Observaram também que Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) em concentrações inferiores a 10 mM inibiu completamente a atividade lipolítica.

Tabela 4.30: Efeito de sais minerais na atividade de lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552.

Sal (1mM)	Atividade relativa (%)
MgSO ₄	106,8
MnSO ₄	102,1
ZnSO ₄	88,7
LiSO ₄	87,1
NaSO ₄	90,8
CuSO ₄	42,1
FeSO ₄	86,2
CoCl ₂	92,3
CaCl ₂	100,8
KCl	102,0
AgNO ₃	2,6

4.11 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{\text{máx}}$

Para determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{\text{máx}}$ foi utilizada uma faixa de concentração de 5 a 50 mg/mL de óleo de oliva e medida a atividade enzimática. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.31.

Tabela 4.31: Valores experimentais de atividade enzimática em função da concentração de óleo de oliva para a determinação dos parâmetros cinéticos.

Concentração de óleo de oliva (mg/mL)	Atividade enzimática (U/mL)
5	3,53
6	3,99
8	4,23
10	5,57
20	10,78
30	11,31
40	13,56
50	15,14

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{m\acute{a}x}$, utilizou-se o método gráfico de Lineweaver-Burk, considerando a Equação 4.12.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (4.12)$$

Através da linearização da Equação 4.12 teremos:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{S} * \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

Então grafica-se $1/S \times 1/V$, conforme mostra a Figura 4.26.

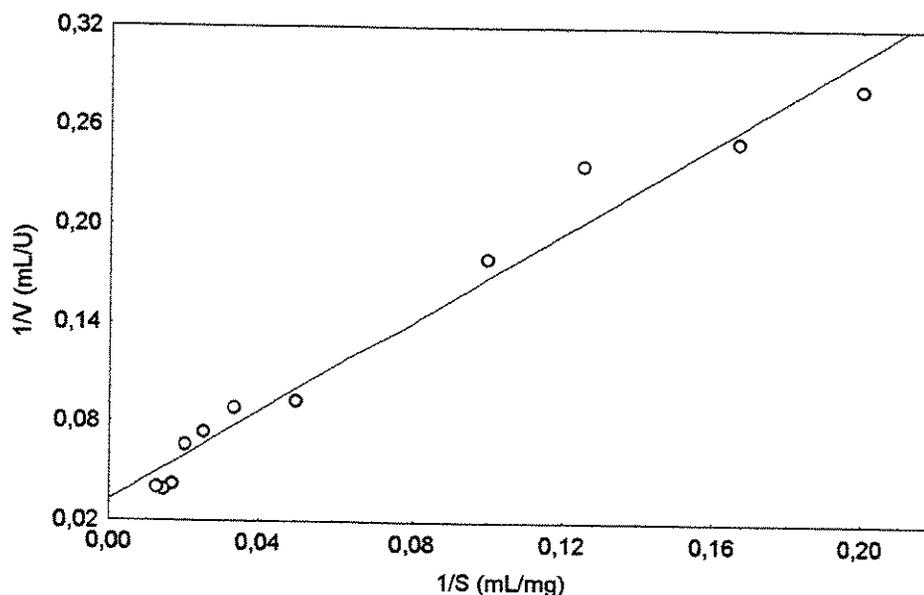


Figura 4.26. Forma de Lineweaver-Burk aplicada aos dados experimentais para a lipase a 37°C.

Pela equação do gráfico linearizado, otem-se os valores de $K_M = 28,73$ mg/mL e $V_{m\acute{a}x} = 22,57$ U/mL. A Figura 4.27 apresenta os dados previstos pelo modelo de Michaelis-Menten para a velocidade de reação e os dados obtidos experimentalmente, podendo-se verificar que o modelo ajusta muito bem os dados experimentais.

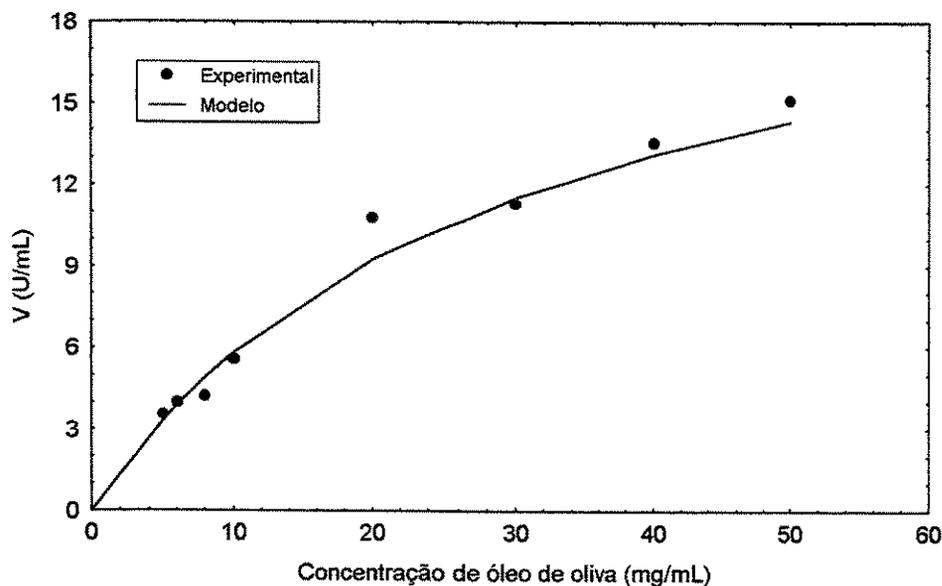


Figura 4.27. Velocidade de reação da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 em função da concentração de óleo de oliva a $T = 37^{\circ}\text{C}$.

Jesus et al. (1999) estudando lipase de *Penicillium restrictum* observaram valores de parâmetros cinéticos semelhantes aos obtidos neste trabalho utilizando as mesmas condições de análises de reação. Para a tributirina, óleo de babaçu e óleo de oliva o $K_M = 5,1 \text{ mg/mL}$ e $V_{\text{máx}} = 4,88 \text{ U/mL}$, $K_M = 13,9 \text{ mg/mL}$ e $V_{\text{máx}} = 13,1 \text{ U/mL}$, $K_M = 21,56 \text{ mg/mL}$ e $V_{\text{máx}} = 11,2 \text{ U/mL}$, respectivamente.

4.12 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo reator de mistura: Influência dos tipos de agitadores

Com o objetivo de verificar a influência do tipo de agitador na produção de lipase foram realizadas três fermentações a 300 rpm, 1vvm e 30°C variando o tipo de agitador. A primeira fermentação utilizou duas turbinas Rushton no mesmo eixo, a segunda duas hélices navais no mesmo eixo e a terceira um agitador de pás inclinadas. Através da Figura 4.28 pode ser observada a diferença entre os agitadores.

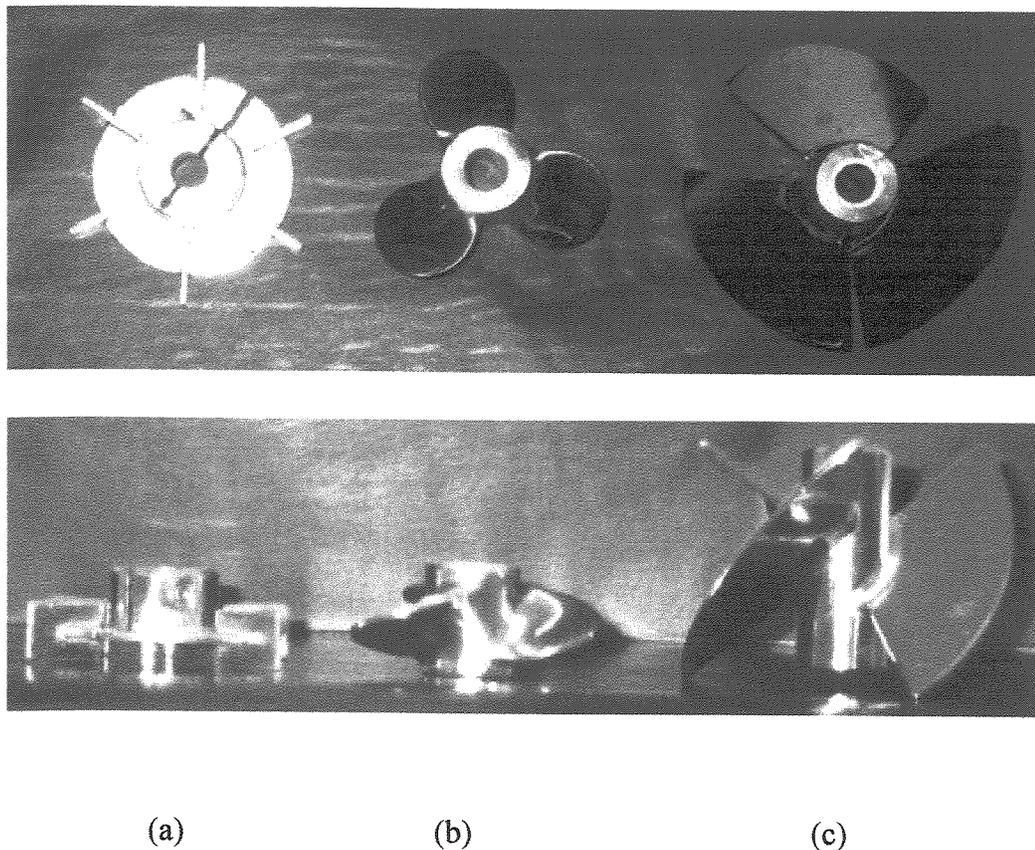


Figura 4.28. Tipos de agitadores (a) Turbina Rushton (b) Hélice naval (c) Pás inclinadas.

4.12.1 – Cinética da fermentação com o agitador tipo Rushton

Os dados obtidos na fermentação com o agitador tipo Rushton podem ser observados na Tabela 4.32 e o acompanhamento do processo fermentativo na Figura 4.29.

Pode ser observado na Figura 4.29 o mesmo comportamento em frascos agitados que o pH diminuiu ligeiramente do valor inicial 6,68 até um mínimo de 6,46 o que aconteceu nas primeiras 10 horas de fermentação. Logo o pH apresenta uma tendência a aumentar alcançando um valor de 8,29 ao final do processo. O incremento da biomassa ocorreu até as 30 horas obtendo cerca de 25 g/L de massa celular. A concentração de proteína solúvel foi constante até as 50 horas aumentando ao fim da fermentação. A produção de lipase foi detectada em aproximadamente 8 horas com 7 U/mL e em 23 horas apresentou um pequeno decréscimo para 4,40 U/mL, provavelmente devido a quantidade

de protease em torno de 4,6 U/L presente no meio, que pode ter hidrolisado a lipase. A atividade enzimática alcançou um pico de 19 U/mL em 30 horas de fermentação, mantendo-se constante até as 72 horas e chegando a 0 U/mL em 78 horas, quando a lise celular provavelmente já deve ter acontecido. Foi possível observar também que o microrganismo excreta protease, e que a quantidade dessa enzima foi crescente até as 24 horas atingindo 4,60 U/L e permanecendo em queda até o final do processo.

Tabela 4.32: Dados da fermentação com o agitador tipo Rushton.

Tempo (Horas)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade proteolítica (U/L)	Massa seca (g/L)	Proteína (g/L)	pH
0	0	1,47	9,49	22,02	6,68
4,84	0	0,83	11,42	21,06	6,70
8,09	6,99	0	10,44	25,35	6,46
23,25	4,40	4,60	17,81	23,28	6,52
29,09	18,92	2,37	24,91	22,03	6,73
32,84	15,62	2,12	19,49	24,75	6,85
46,92	14,83	0	23,09	27,53	7,58
53,25	16,62	0,89	22,69	27,11	7,77
56,84	17,25	0,49	18,01	38,50	7,84
71,09	19,71	0,98	19,63	33,79	8,14
78,67	0	0,70	18,23	28,88	8,29

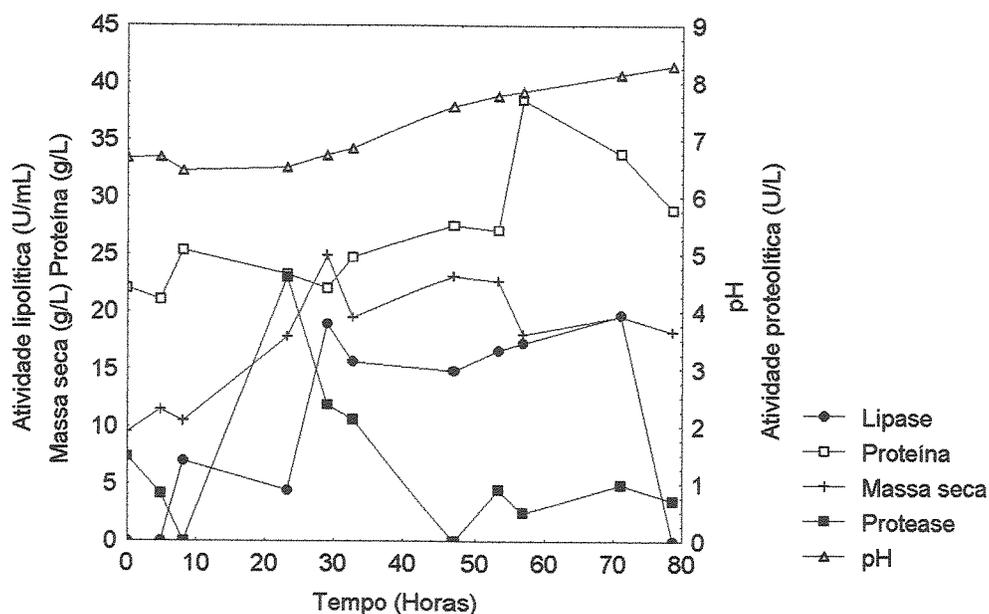


Figura 4.29. Acompanhamento da fermentação para produção de lipase com o agitador tipo Rushton (300 rpm, 1vvm, pH inicial 7,0).

4.12.2 – Cinética da fermentação com o agitador tipo hélice naval

Os resultados da fermentação com o agitador tipo Hélice Naval estão apresentados na Tabela 4.33 e o acompanhamento do processo fermentativo, na Figura 4.30.

Tabela 4.33: Dados da fermentação com o agitador tipo Hélice Naval.

Tempo (Horas)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade proteolítica (U/L)	Massa seca (g/L)	Proteína (g/L)	pH
0	0	0,17	-	20,68	6,78
5,17	0	2,22	18,53	22,03	6,39
8,42	6,77	0,81	19,15	24,67	6,49
23,58	0	1,36	17,18	23,73	6,71
29,42	12,14	0	17,83	23,45	6,73
33,17	9,49	0,25	22,11	25,49	6,71
47,25	9,16	0,19	17,36	25,02	6,81
53,58	8,06	0,80	14,91	25,75	6,86
57,17	3,10	0	11,39	25,70	6,88
71,42	2,71	0	11,35	27,41	6,99
79,00	0	2,17	-	30,75	7,08

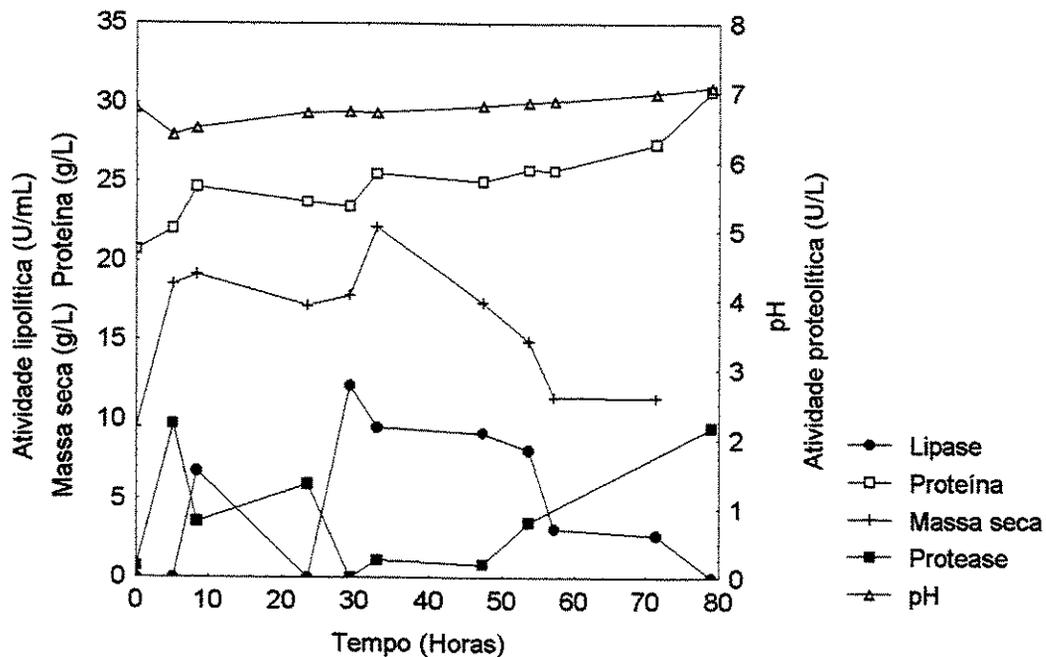


Figura 4.30. Acompanhamento da fermentação para produção de lipase com o agitador tipo Hélice Naval (300 rpm, 1vvm, pH inicial 7,0).

Como é mostrado na Figura 4.30 o pH diminuiu ligeiramente do valor inicial 6,78 até 6,39 nas primeiras 5 horas de fermentação. Em seguida o pH aumentou até um valor de 7,08 no fim da fermentação. O crescimento celular é verificado até as 33 horas obtendo 22,11 g/L de biomassa. A concentração de proteína solúvel apresentou um perfil de aumento ao longo de toda fermentação. A atividade enzimática de lipase começou a ser detectada em 8,5 horas com 6,77 U/mL, em 23,5 horas no meio de fermentação não foi verificada a presença da lipase, porém foi detectado 1,36 U/L de atividade proteolítica que pode mais uma vez ter hidrolisado a lipase. A máxima atividade lipolítica alcançada foi em 29,5 horas com 12,14 U/mL. Houve em seguida uma queda crescente atingindo 0 U/mL em 79 horas, quando a lise celular deve ter ocorrido e a quantidade de protease estava aumentando em torno de 2 U/L. A protease apresentou um perfil instável com aumentos e quedas ao longo do processo fermentativo, com picos em aproximadamente 5 horas, 23,5 horas e 79 horas.

4.12.3 – Fermentação com o agitador de pás inclinadas

Na Tabela 4.34 estão apresentados os dados coletados na fermentação com o agitador de pás inclinadas e na Figura 4.31 o perfil da fermentação pode ser acompanhado.

Tabela 4.34: Dados da fermentação com o agitador de pás inclinadas.

Tempo (Horas)	Atividade lipolítica (U/mL)	Atividade proteolítica (U/L)	Massa seca (g/L)	Proteína (g/L)	pH
0	0	0,35	7,03	22,46	6,91
6,00	0,41	1,36	9,54	23,61	6,83
24,00	11,06	2,38	16,28	23,44	6,48
30,00	10,64	2,23	24,98	20,51	6,60
35,67	15,34	-	25,93	21,27	6,87
48,00	16,59	3,58	-	21,20	7,29
54,00	21,27	2,56	25,65	23,26	7,64
59,00	20,68	1,64	23,41	24,18	7,87
72,00	18,97	1,76	23,42	23,72	8,06
78,00	18,30	1,56	19,53	22,43	8,21
97,00	14,03	6,48	20,45	21,49	8,75
102,67	12,62	-	19,03	21,42	8,80

A Figura 4.31 apresenta o perfil de pH ao longo da fermentação que mostra um pequeno decréscimo de 6,91 a 6,48 em 24 horas de processo, e a partir deste tempo mostrou uma tendência de aumento, alcançando um valor de 8,80. O incremento da biomassa pode ser visto até aproximadamente 36 horas, obtendo-se 25,93 g/L. A concentração de proteína apresentou estabilidade durante a fermentação alcançando em torno de 23 g/L. O início da produção da enzima lipase foi verificado a partir das 24 horas com 11 U/mL, alcançando a máxima atividade em 54 horas em torno de 22 U/mL apresentando uma queda até o final da fermentação alcançando 12,62 U/mL, provavelmente devido à protease no meio, em torno de 6,5 U/L.

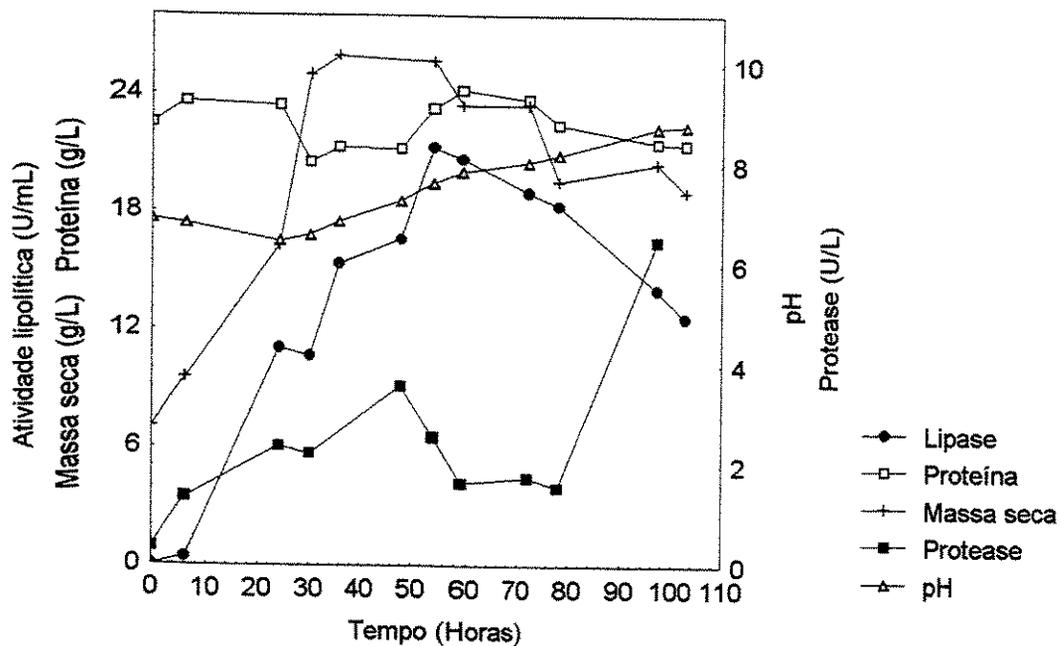


Figura 4.31. Acompanhamento da fermentação com o agitador de pás inclinadas (300 rpm, 1vvm e pH inicial 7,0).

Na Figura 4.32, mostra-se o acompanhamento do oxigênio dissolvido ao longo da fermentação. Observa-se que o oxigênio dissolvido praticamente cai a valores próximos de zero em torno das 20 horas de fermentação e permanece com níveis baixos de oxigênio dissolvido até as 80 horas quando torna a aumentar, provavelmente neste ponto a taxa de respiração do microrganismo diminuiu e analisando conjuntamente os dados, verificou-se também a queda na produção da enzima, o que caracteriza possivelmente a fase final da fermentação, onde já deve estar ocorrendo a lise celular.

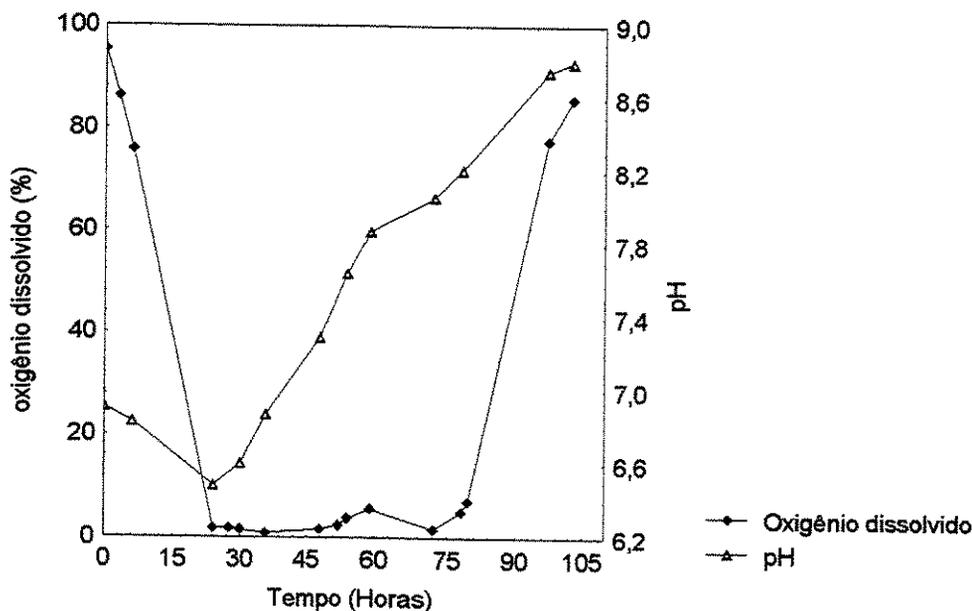


Figura 4.32. Acompanhamento do oxigênio dissolvido e pH na fermentação para produção de lipase com o agitador de pás inclinadas.

4.12.4 – Comparação da performance dos agitadores

Através da Figura 4.33 pode ser comparado o perfil de atividade enzimática para cada tipo de agitador utilizado verificando-se novamente que a menor produção da enzima ocorreu com o agitador hélice naval alcançando em 29,5 horas 12,14 U/mL. Com a turbina de Rushton a atividade lipolítica atingiu 19 U/mL em 30 horas de fermentação e o melhor desempenho foi com o agitador de pás inclinadas com 22 U/mL em 54 horas de processo.

O coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida ($K_{L,a}$) foi determinado e calculado conforme descrito no item 3.12.7 para os agitadores hélice naval, turbina de Rushton e pás inclinadas na condição de 300 rpm, 1 vvm a 30°C. Na Tabela 4.35 verifica-se que com um $K_{L,a}$ de 14,60 h⁻¹ pode-se produzir 12 U/mL de lipase utilizando o impulsor hélice naval, já com a turbina de Rushton o $K_{L,a}$ foi maior, igual a 35,97 h⁻¹, aumentando a produção da enzima para 19 U/mL. No entanto, com o uso das pás inclinadas o $K_{L,a}$ foi um valor intermediário 20,06 h⁻¹ e a produção de lipase foi maior, alcançando 22 U/mL. A produção de biomassa alcançada foi similar para os três tipos de agitadores. Portanto, observamos que o tipo de agitador influencia não só a transferência de massa, através dos valores do $K_{L,a}$, mas também a produção da enzima. Então, escolhemos dar seqüência aos

trabalhos utilizando o agitador de pás inclinadas por ter promovido uma maior produção da lipase, provavelmente devido a algum mecanismo de fluxo inerente ao tipo de impulsor que acarretou num menor cisalhamento do micélio do fungo, levando a maiores níveis de produção.

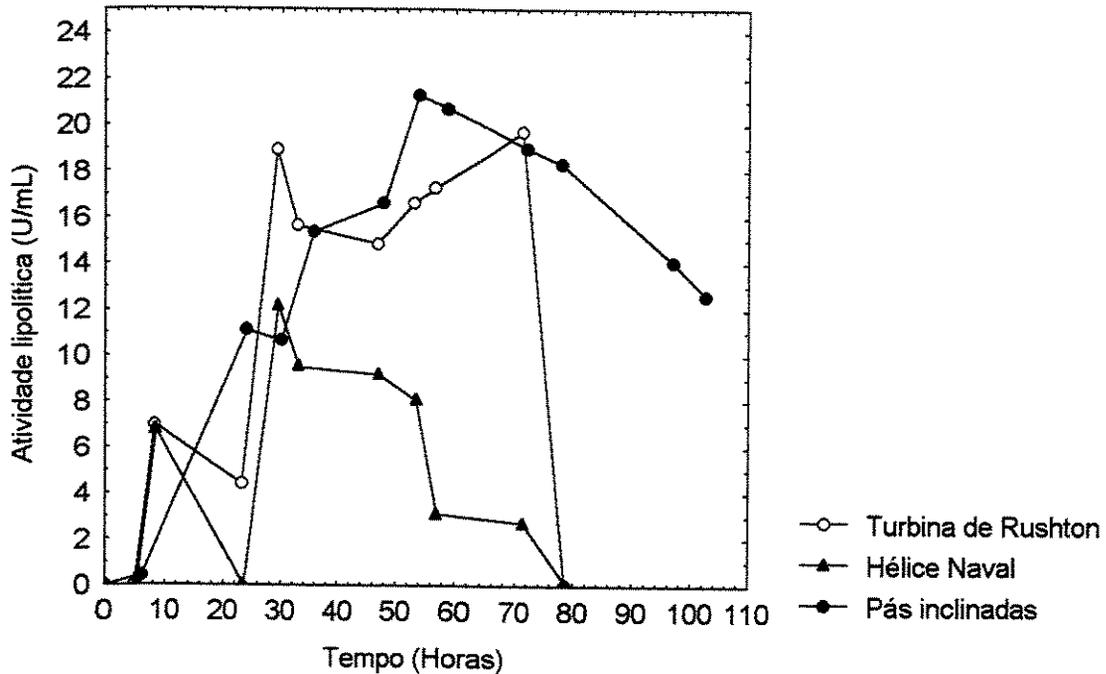


Figura 4.33. Comparação do perfil de atividade enzimática para os diferentes tipos de agitadores.

Tabela 4.35: Valores de K_{La} para os diferentes tipos de agitadores.

Tipo de agitador	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade lipolítica (U/mL)	Massa seca (g/L)	K_{La} (h^{-1})
2 Hélices navais	300	1,0	12	22	14,60
2 Turbinas de Rushton	300	1,0	19	25	35,97
1 Pás inclinadas	300	1,0	22	25	20,06

Um estudo similar com estes impulsores foi realizado por Silva-Santisteban (2001) para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 a 450 rpm, 1 vvm e 30°C, onde com a hélice naval obteve um K_{La} de 16,87 h^{-1} e a produção

de inulinase de 126,1 U/mL, com a turbina de Rushton um K_{La} de 101,65 h⁻¹ e 121,5 U/mL de enzima, e utilizando as pás inclinadas, um K_{La} de 74,53 h⁻¹, alcançando 176,2 U/mL. Ou seja, este estudo também encontrou numa condição intermediária de K_{La} uma maior produção da inulinase com o mesmo tipo de agitador.

4.13 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo reator de mistura: Influência da agitação e aeração

Um planejamento experimental completo 2² foi realizado com as variáveis independentes agitação e aeração. As respostas avaliadas foram a atividade enzimática de lipase no decorrer da fermentação, a produtividade, a produtividade específica e o K_{La} . Também foi realizado o acompanhamento do pH e da proteína. A composição do meio de cultura utilizado foi de 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja.

Os níveis utilizados nos ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados na Tabela 4.36 e o planejamento, na Tabela 4.37. Na Tabela 4.37 também estão apresentados os dados de atividade enzimática prevista pelo modelo fornecido pela Equação 4.13, e os desvios relativos dos ensaios experimentais em relação ao modelo.

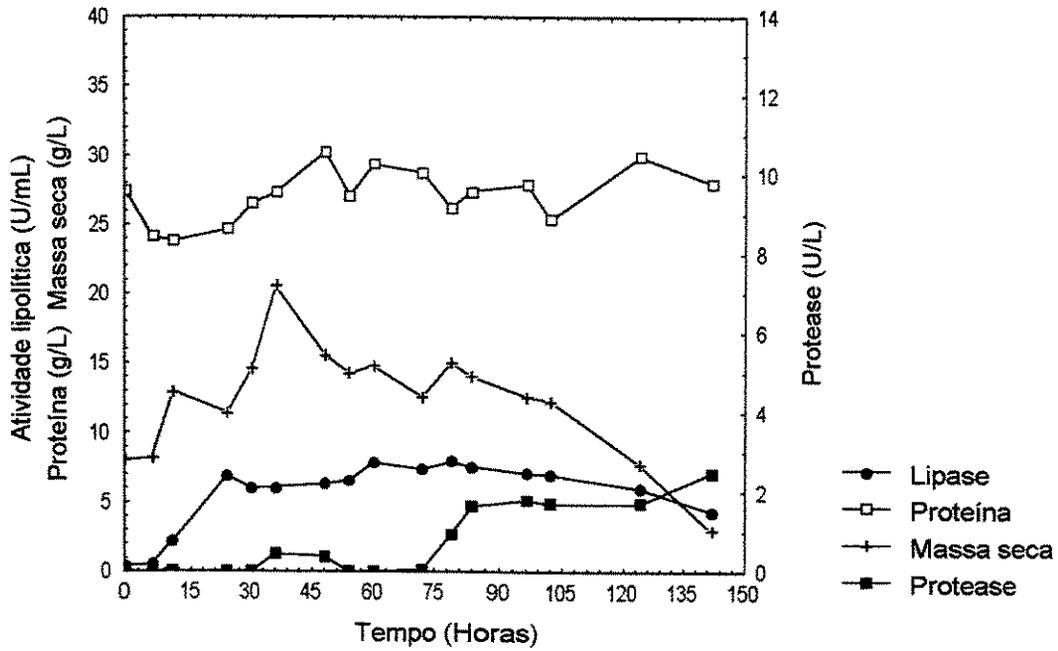
Tabela 4.36: Faixa de valores estudados no quinto planejamento experimental para produção de lipase.

Nível	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
-1,41	100	0,2
-1	160	0,43
0	300	1,0
+1	440	1,57
+1,41	500	1,8

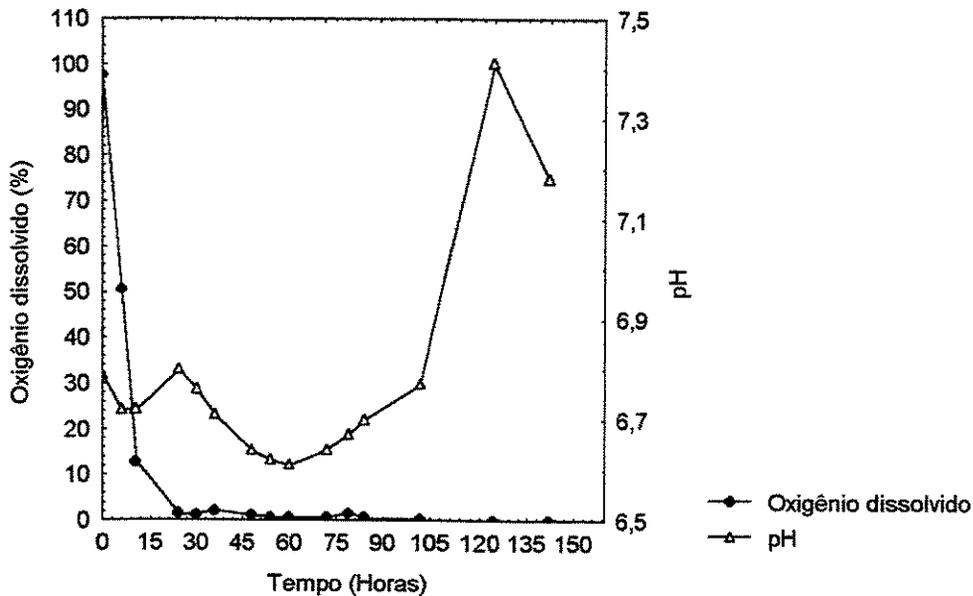
Tabela 4.37: Quinto planejamento experimental 2^2 para produção de lipase.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade lipolítica em 54 horas (U/mL)	Atividade prevista pelo modelo da Eq. 4.13 (U/mL)	Desvio relativo (%)
1	-1 (160)	-1 (0,43)	6,55	8,07	-23,21
2	+1 (440)	-1 (0,43)	7,73	4,65	39,84
3	-1 (160)	+1 (1,57)	6,38	8,07	-26,94
4	+1 (440)	+1 (1,57)	5,17	4,65	10,06
5	-1,41 (100)	0 (1,0)	10,25	7,93	22,59
6	+1,41 (500)	0 (1,0)	0,60	3,11	-418,68
7	0 (300)	-1,41 (0,2)	7,29	7,38	-1,13
8	0 (300)	+1,41 (1,8)	7,28	7,38	-1,26
9	0 (300)	0 (1,0)	22,14	21,09	4,74
10	0 (300)	0 (1,0)	21,27	21,09	0,85
11	0 (300)	0 (1,0)	19,88	21,09	-6,08

As Figuras 4.34 a 4.44 apresentam as cinéticas das fermentações, com o acompanhamento da atividade lipolítica, atividade proteolítica, proteína, massa seca, pH e concentração de oxigênio dissolvido, para as diferentes combinações de agitação e aeração definidas no planejamento experimental.

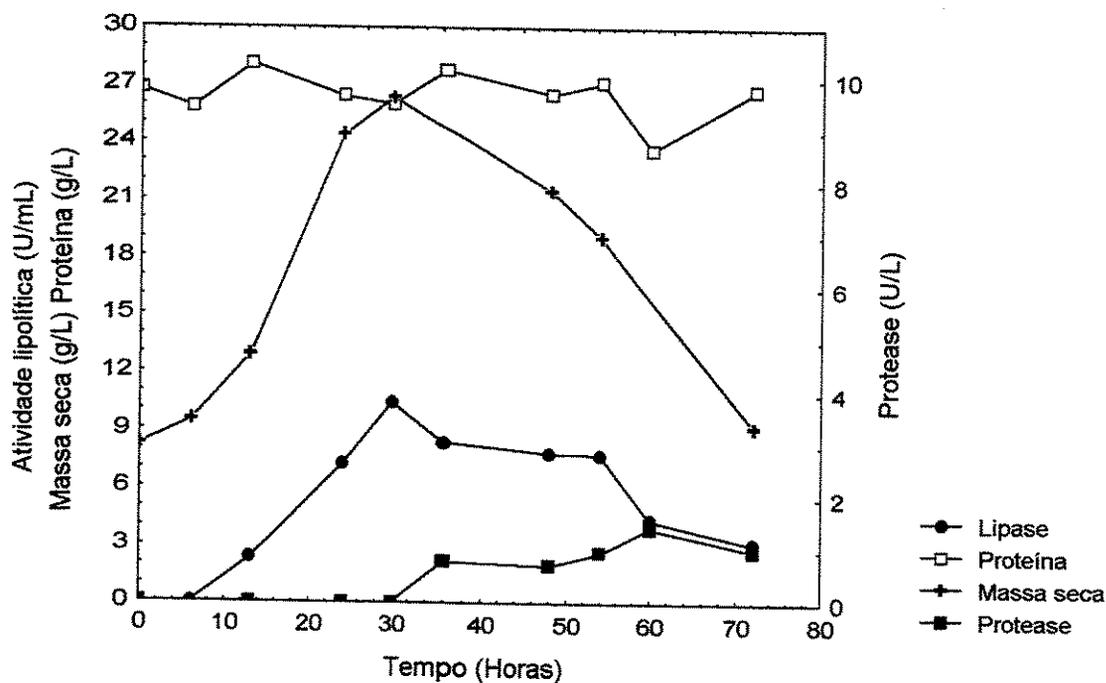


(a)

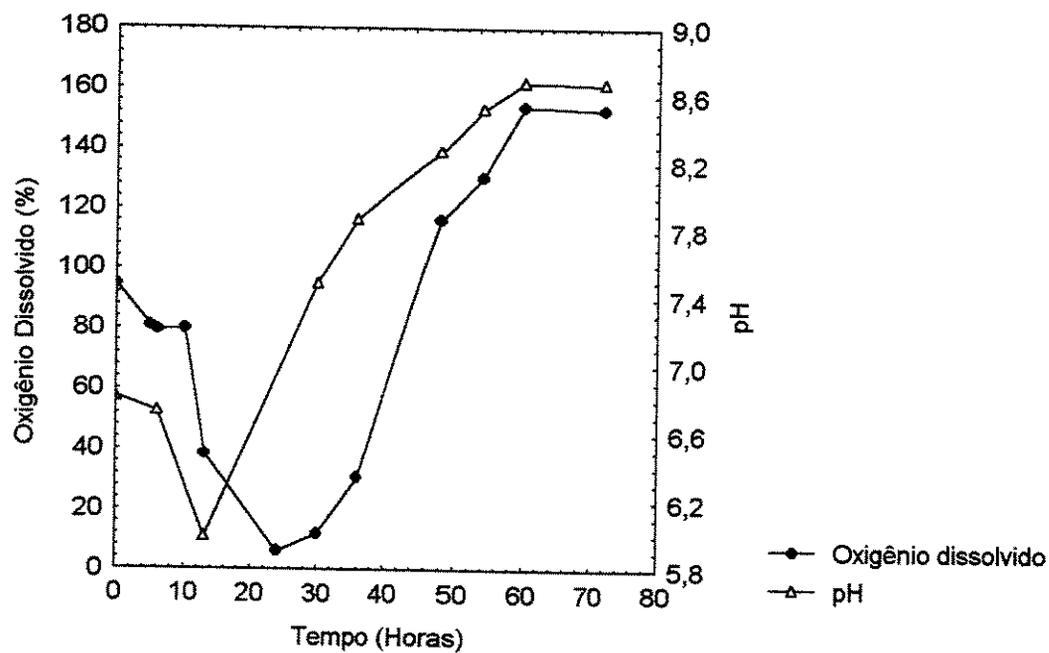


(b)

Figura 4.34. Ensaio 1: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 160 rpm e 0,43 vvm.



(a)



(b)

Figura 4.35. Ensaio 2: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 440 rpm e 0,43 vvm.

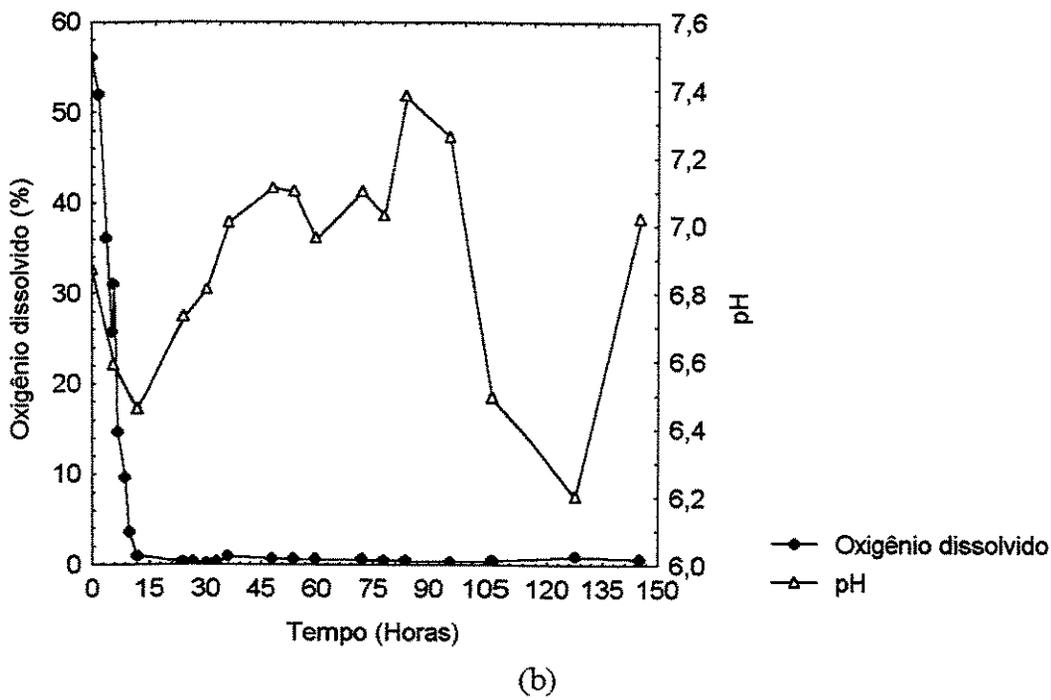
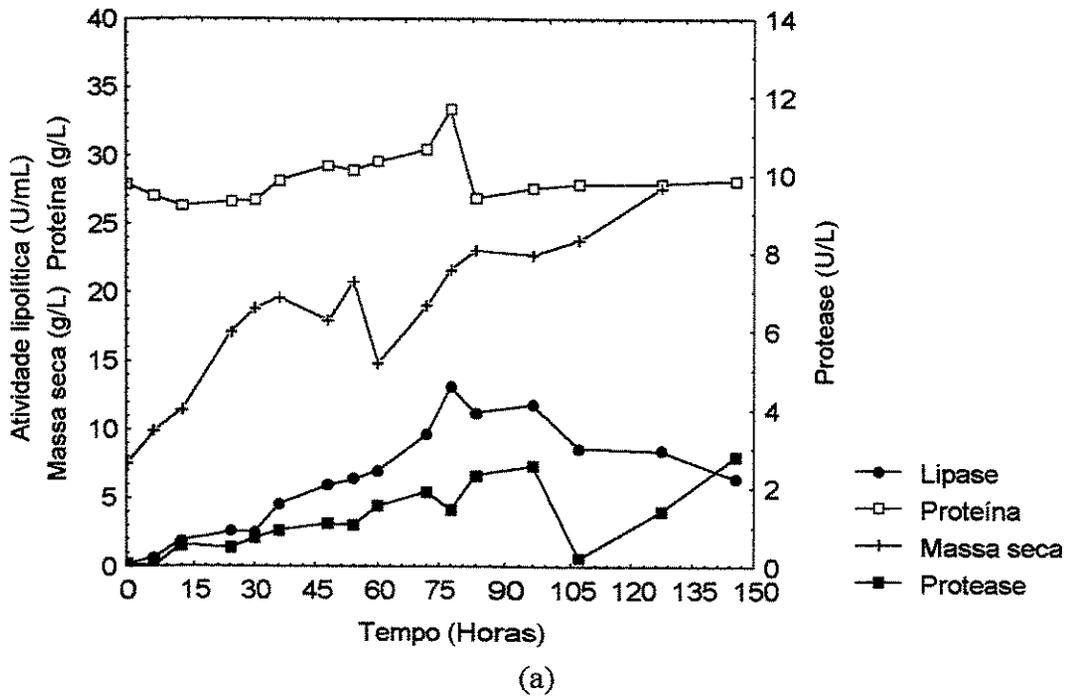


Figura 4.36. Ensaio 3: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 160 rpm e 1,57 vvm.

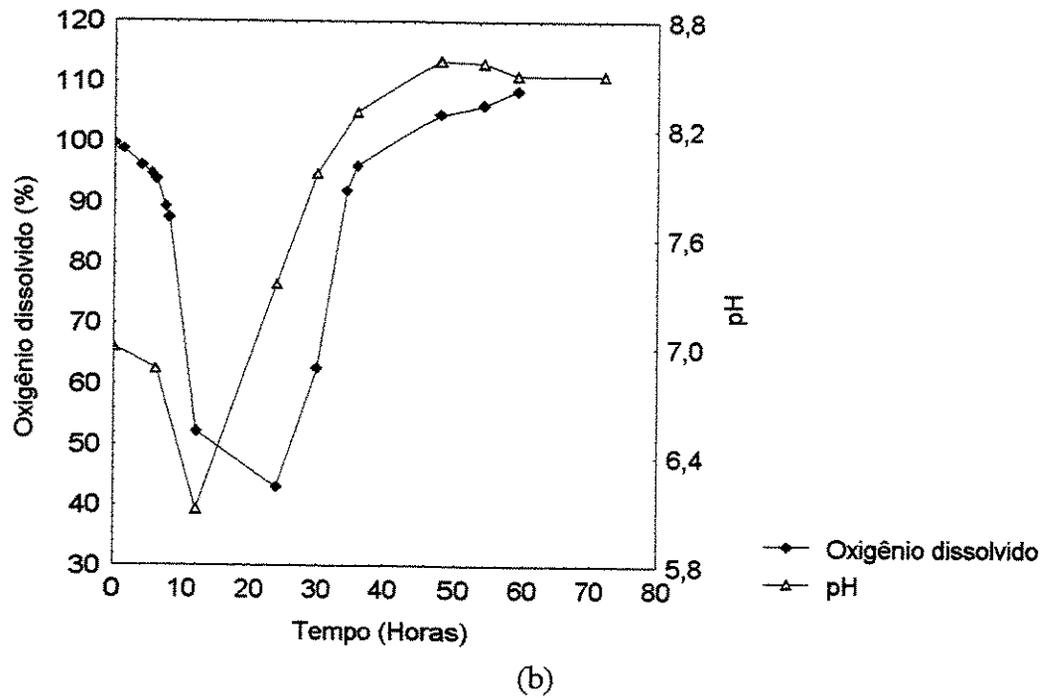
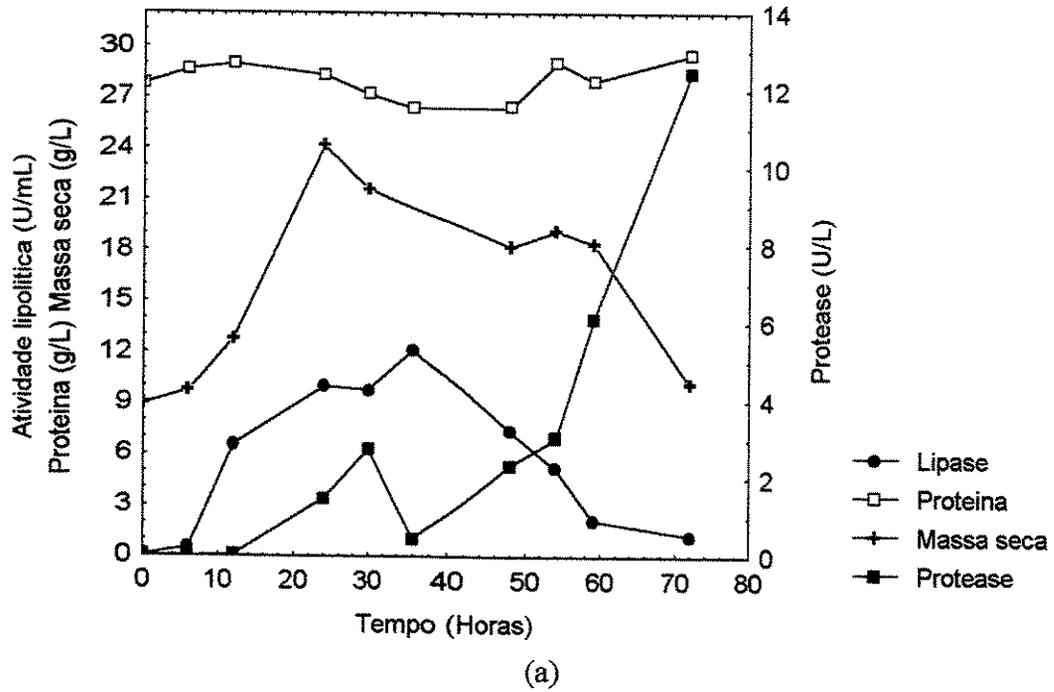


Figura 4.37. Ensaio 4: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 440 rpm e 1,57 vvm.

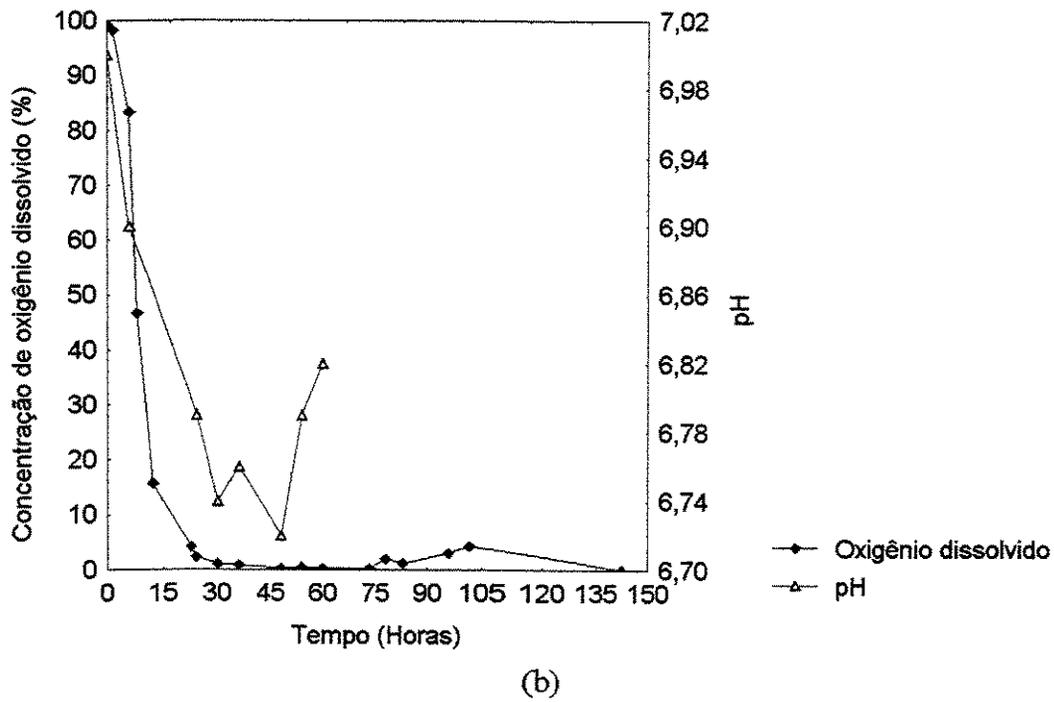
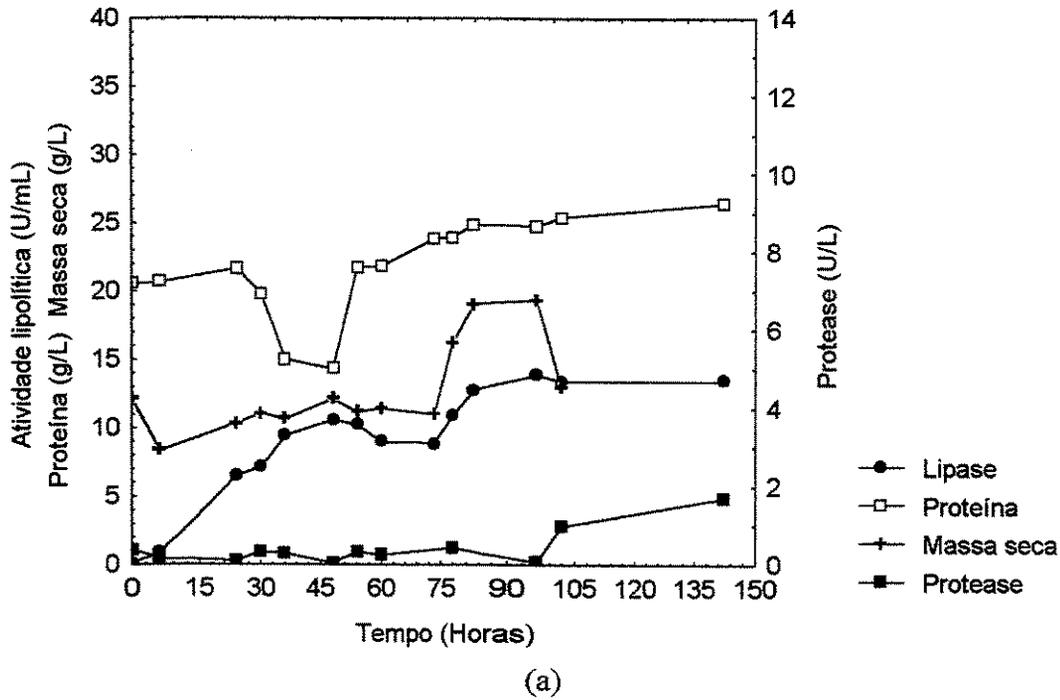
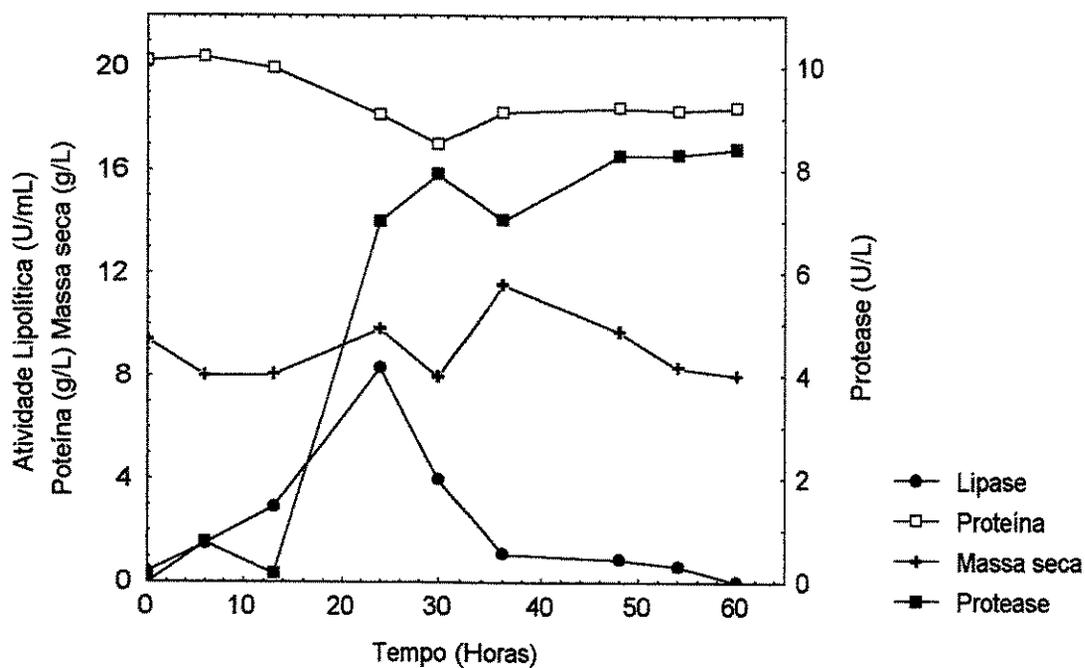
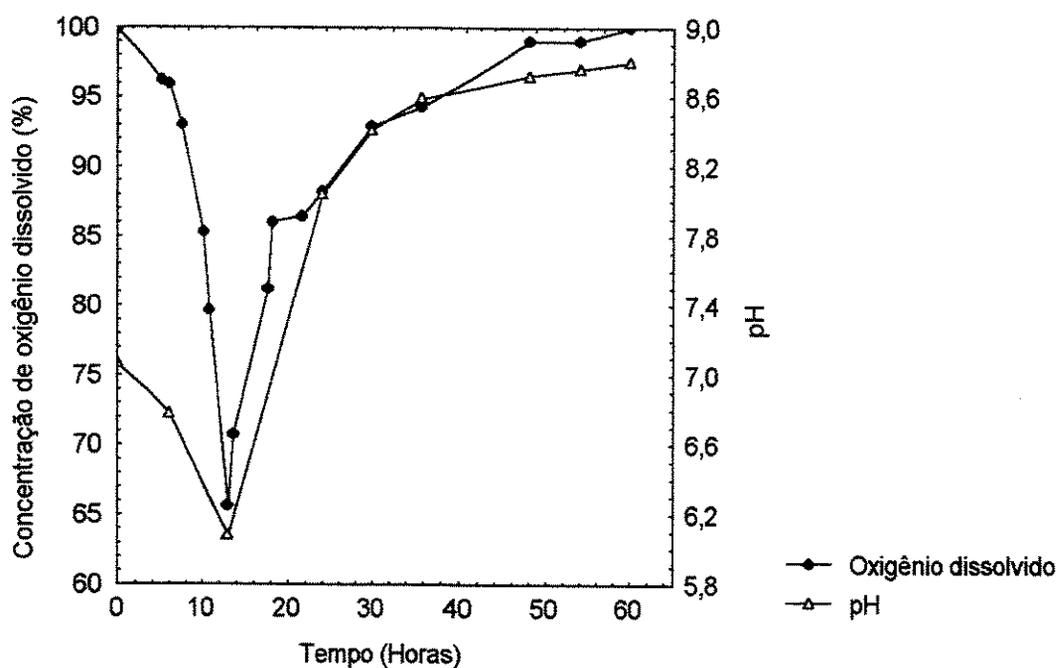


Figura 4.38. Ensaio 5: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 100 rpm e 1,0 vvm.

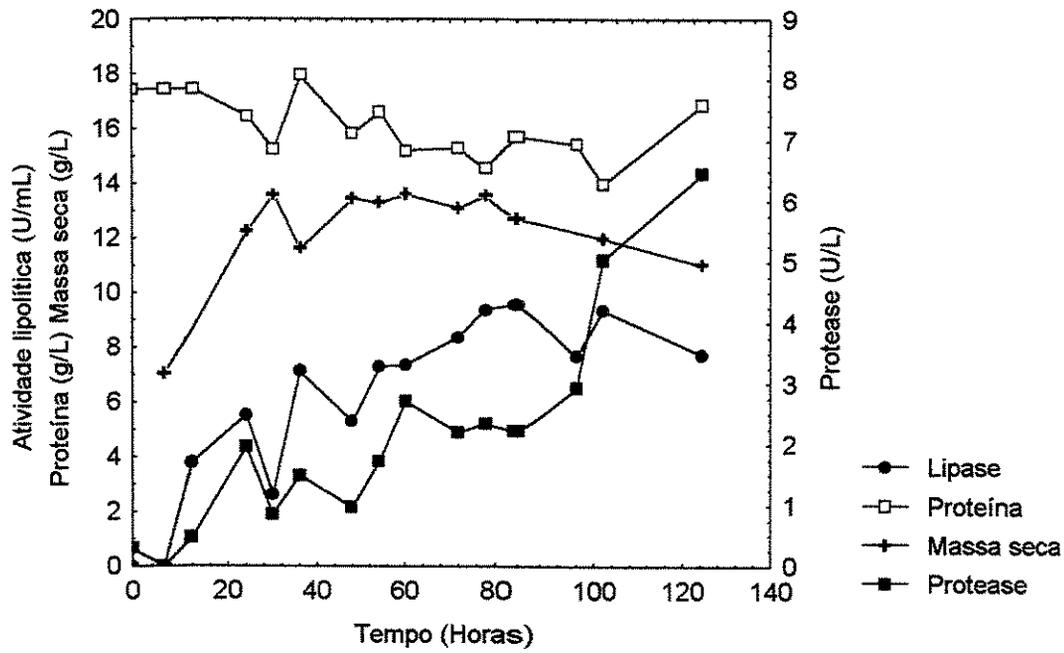


(a)

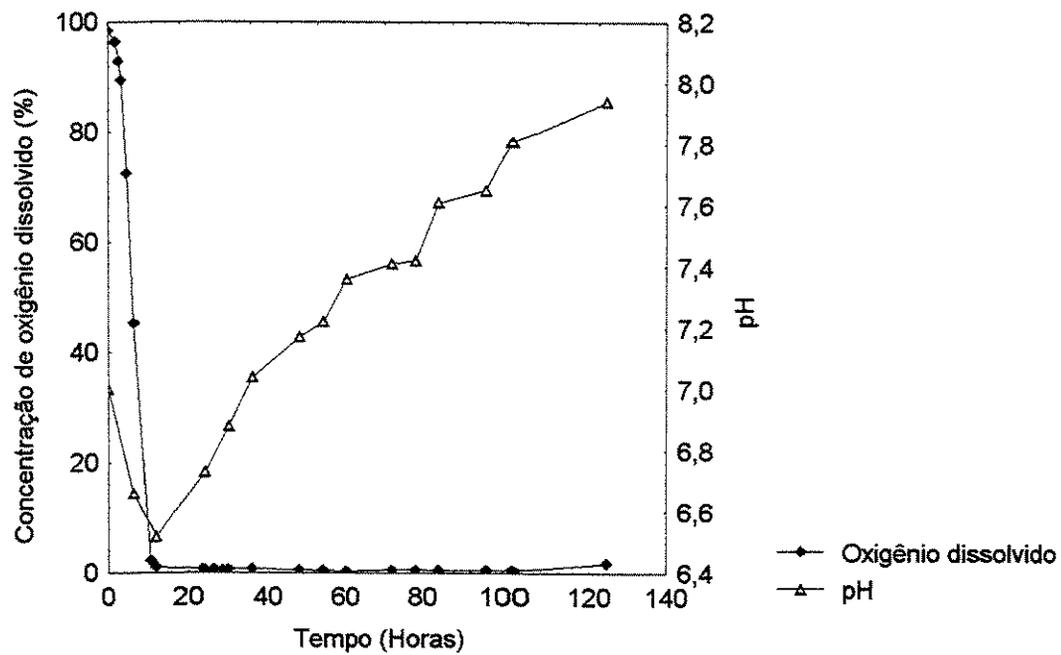


(b)

Figura 4.39. Ensaio 6: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm.

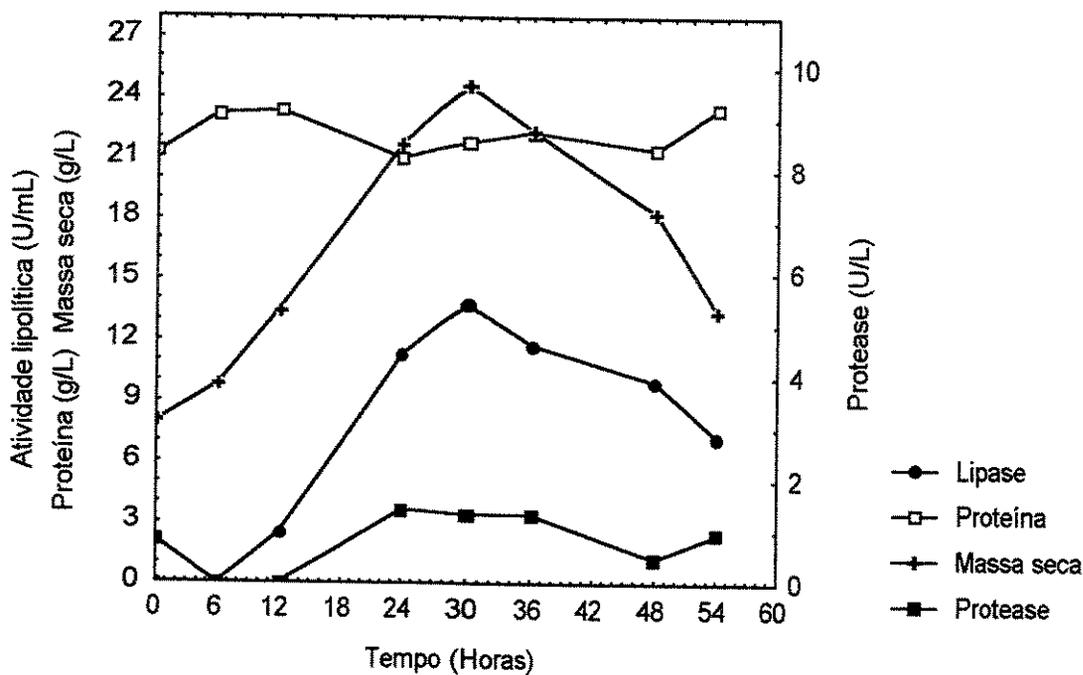


(a)

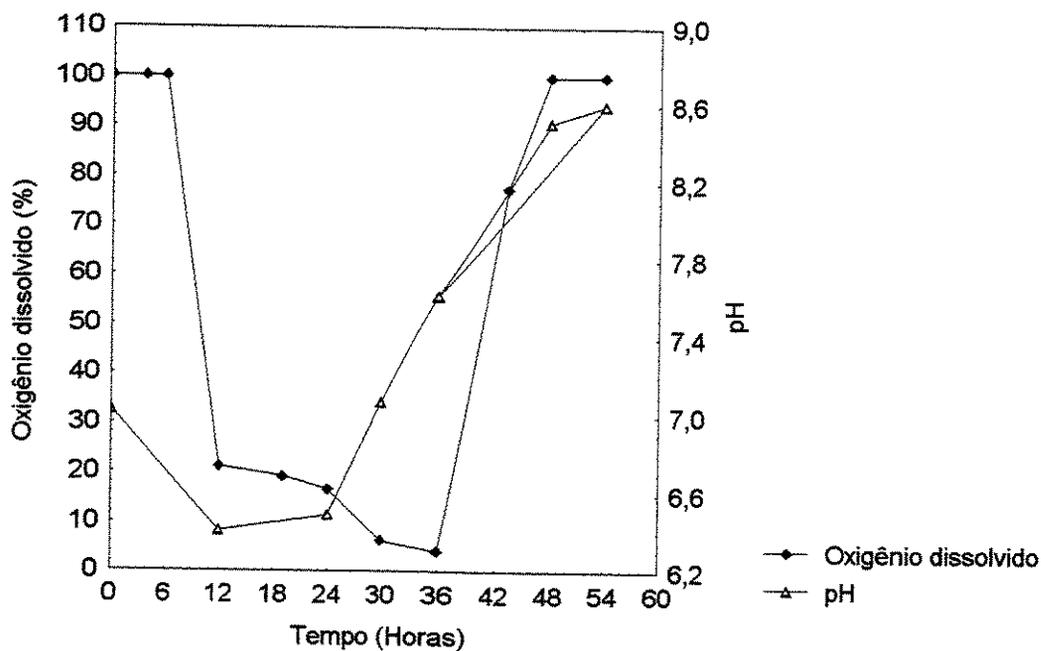


(b)

Figura 4.40. Ensaio 7: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 300 rpm e 0,2 vvm.



(a)



(b)

Figura 4.41. Ensaio 8: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 300 rpm e 1,8 vvm.

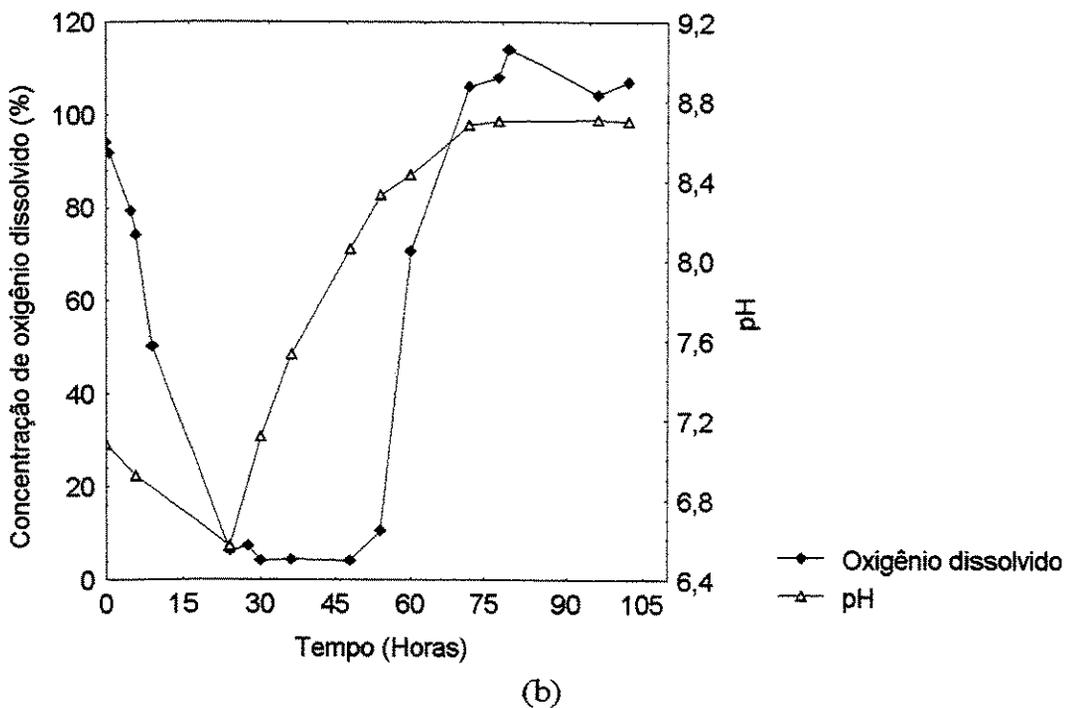
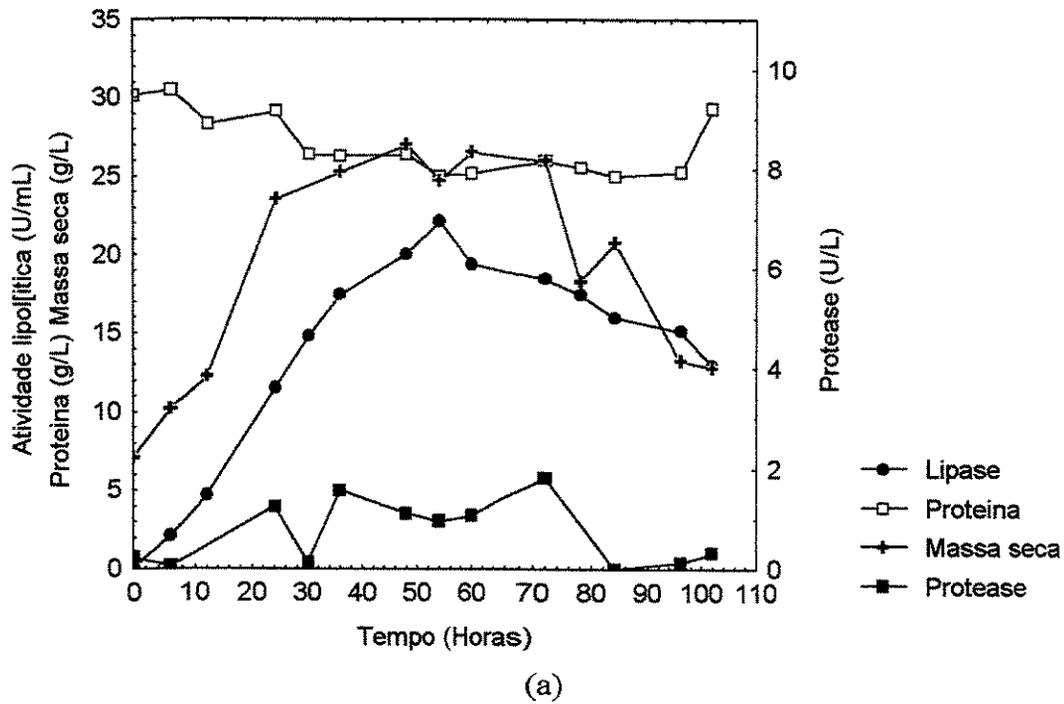
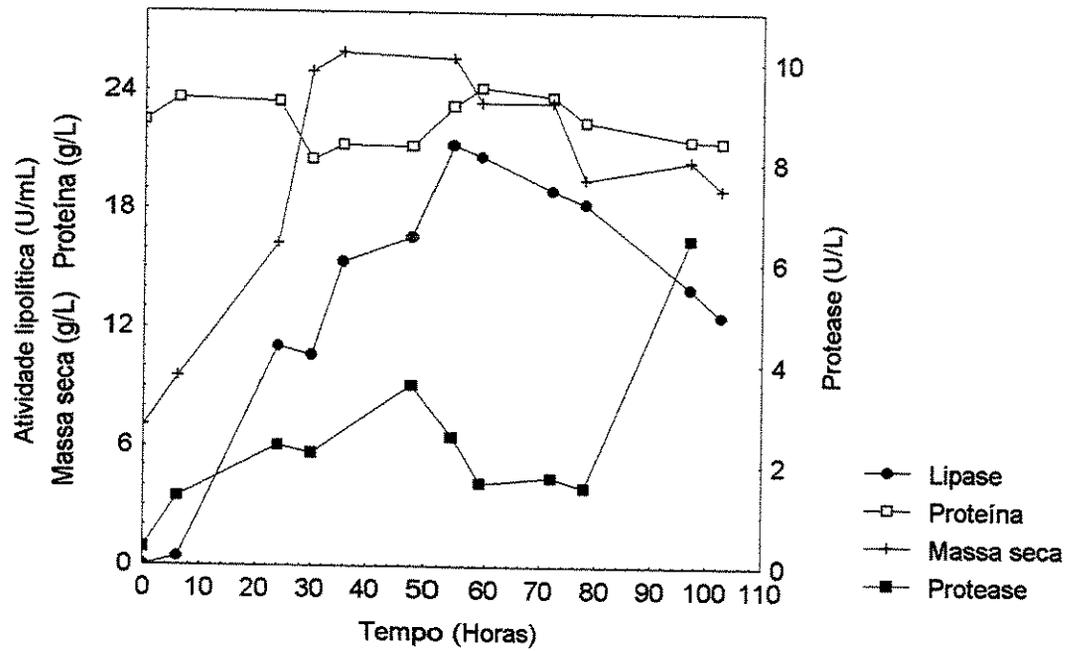
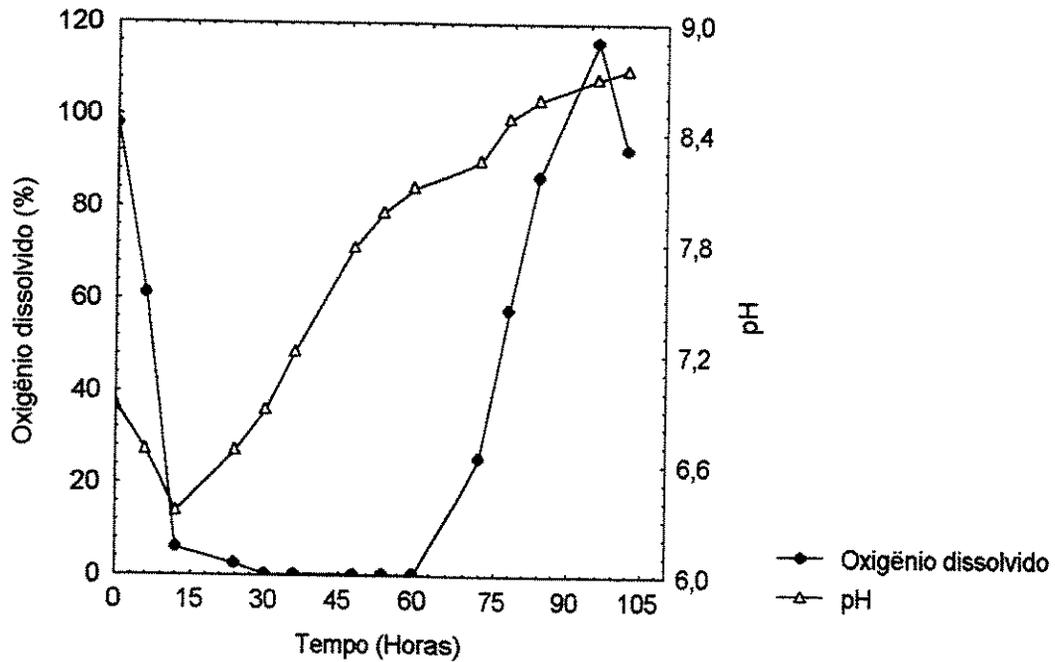


Figura 4.42. Ensaio 9: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 300 rpm e 1,0 vvm.

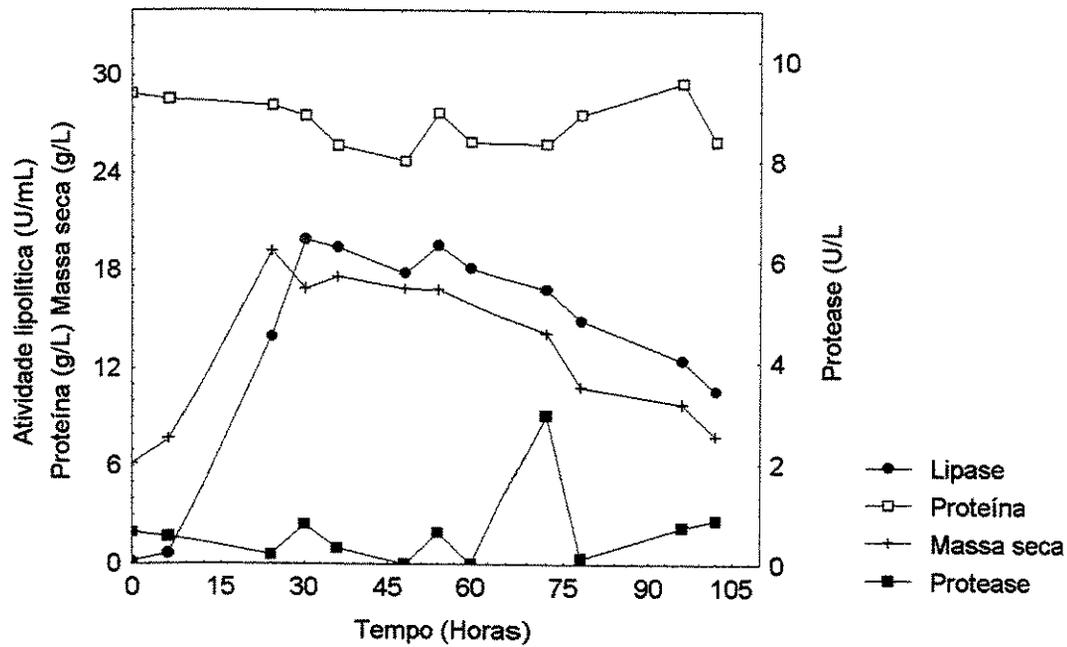


(a)

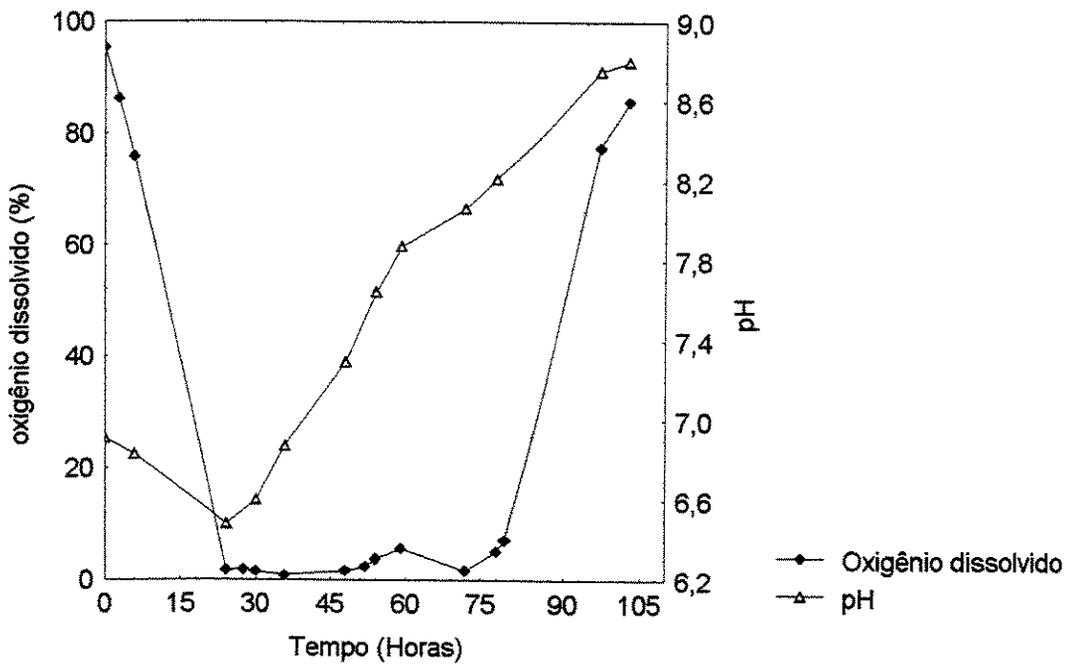


(b)

Figura 4.43. Ensaio 10: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 300 rpm e 1,0 vvm.



(a)



(b)

Figura 4.44. Ensaio 11: Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C, 300 rpm e 1,0 vvm.

Nas fermentações anteriores o perfil do pH foi similar com uma queda do valor inicial (7,0-7,2) até um mínimo (6,0-6,3), o que aconteceu aproximadamente entre as 12 e 15 horas de fermentação, com um aumento até o final da fermentação atingindo valores em torno de 8,6. Ao final de cada fermentação pode-se observar que quando ocorre um aumento de pH coincide com a queda na produção da lipase provavelmente devido a morte celular já estar acontecendo.

A partir da inoculação pode-se verificar que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) cai bruscamente desde o nível de saturação até níveis baixos, na ordem de 10 a 1%, durante as 12 horas iniciais de fermentação. Os níveis baixos de OD se mantiveram durante um certo período da fermentação que variou segundo o ensaio de agitação e aeração. Após esse período, para a maioria dos ensaios, houve um incremento igualmente brusco até atingir leituras de OD consideravelmente maiores. É importante destacar que esse incremento muitas vezes coincide com o início da diminuição da biomassa, ou seja o aumento da morte celular levaria a uma diminuição na taxa de respiração do microrganismo que acarretaria num aumento do OD no meio de cultura. Um outro ponto observado é que o incremento do OD coincide com o momento em que o pH apresenta valores próximos a 8,0.

O incremento da biomassa foi dependente de cada condição de ensaio. Nota-se que o máximo de biomassa alcançada foi em torno de 25 g/L para os ensaios 2, 3, 4, 8, 9 e 10, em tempos distintos de fermentação. Os ensaios 6 (500 rpm e 1 vvm) e 7 (300 rpm e 0,2 vvm) apresentaram o menor crescimento microbiano, provavelmente por excesso de agitação que deve ter provocado um maior cisalhamento ao micélio fúngico no ensaio 6, ou falta de oxigênio necessário ao crescimento do microrganismo devido à baixa taxa de aeração fornecida no ensaio 7.

A produção da lipase foi a variável que mais sofreu influência da combinação da agitação e aeração apresentando diferentes perfis dependentes do ensaio experimental, conforme apresentado na Figura 4.45. O máximo de atividade lipolítica para cada ensaio variou desde cerca de 6 U/mL até 22 U/mL, sendo atingido em tempos de fermentação diferentes. O decaimento na produção da lipase em muitos experimentos se deve à combinação de fatores como a lise celular observada através da diminuição da biomassa, ao

aumento de pH até valores maiores que 8,0 onde a enzima não apresenta uma boa estabilidade ou a um aumento na atividade proteolítica que hidrolisa a lipase.

A atividade proteolítica apresentou um perfil similar para a maioria dos ensaios onde houve um aumento de proteases ao longo do tempo de fermentação, como ocorreu nos ensaios 1, 2, 5, 6, 7 e 8. Nos demais ensaios a atividade proteolítica mostrou-se variável, com aumentos seguidos de queda na quantidade de proteases durante a fermentação, provavelmente um tipo de protease contida no meio sofreu hidrólise de outras proteases, diminuindo assim a quantidade de protease total no meio de cultura.

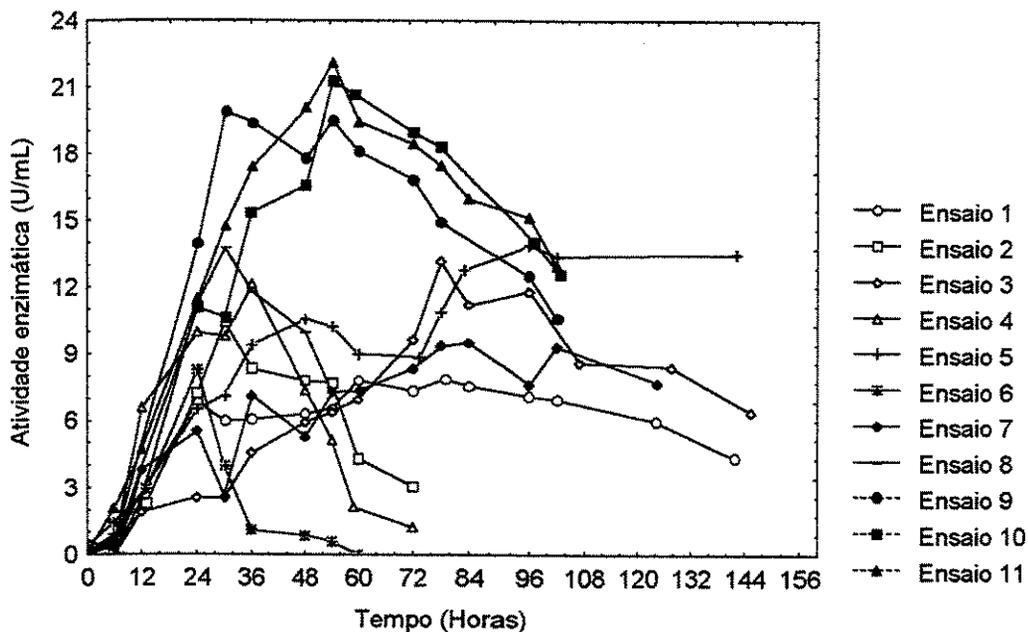


Figura 4.45. Acompanhamento da atividade lipolítica para o quinto planejamento.

A produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 em reator convencional pode ser observada através da Figura 4.46.

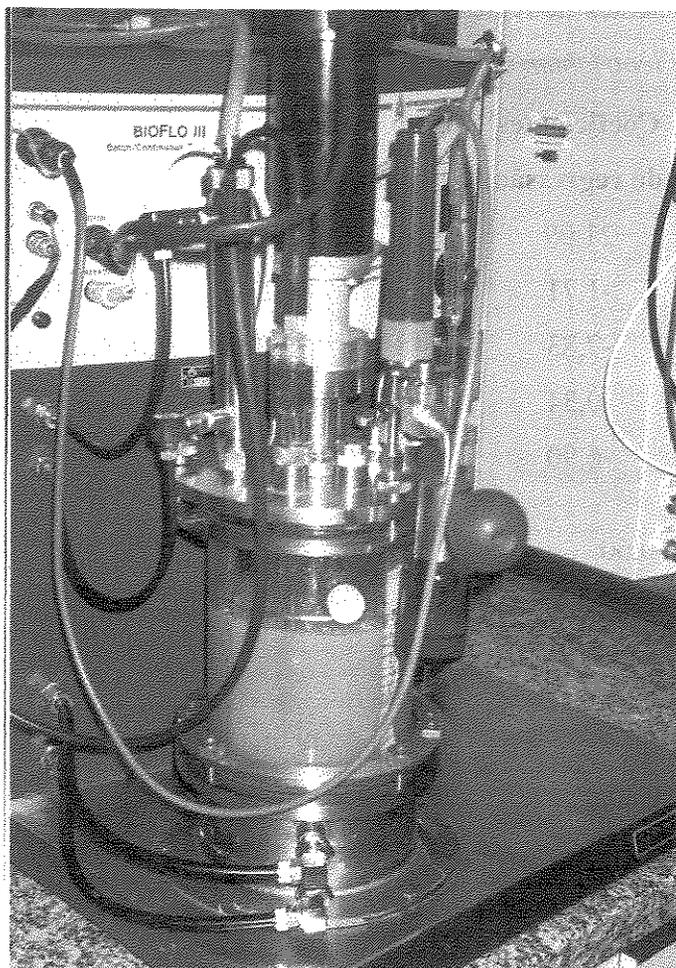


Figura 4.46. Produção da lipase em reator com agitação mecânica convencional.

4.13.1 – Verificação de um modelo empírico para a atividade lipolítica em função da agitação e aeração

Para verificação de um modelo quadrático para a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 considerando as variáveis agitação e aeração foi escolhido um tempo fixo de 54 horas de fermentação para análise estatística. Pode-se observar através da Figura 4.45, que no tempo de 54 horas foram alcançadas as maiores atividades lipolíticas para os diversos ensaios realizados no quinto planejamento experimental. Foram calculados os coeficientes de regressão e realizada a análise de variância (ANOVA). Os resultados estão apresentados, nas Tabelas 4.38 e 4.39, respectivamente.

Tabela 4.38: Coeficientes de regressão para o quinto planejamento experimental após 54 h de fermentação de *Geotrichum candidum*.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t	p	-90% Lim. Conf.	+90% Lim. Conf.
Média	21,09	0,66	32,05	0,0009*	19,17	23,02
Agitação (L)	-1,71	0,40	-4,23	0,0515*	-2,88	-0,53
Agitação (Q)	-7,83	0,48	-16,27	0,0037*	-9,24	-6,42
Aeração (L)	-0,34	0,40	-0,85	0,4838	-1,52	0,83
Aeração (Q)	-6,90	0,48	-14,32	0,0048*	-8,30	5,49
Agitação x Aeração	-0,60	0,57	-1,04	0,4045	-2,26	1,07

* valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,1$)

L - linear

Q - quadrático

Tabela 4.39: Tabela ANOVA para o quinto planejamento experimental após 54 horas de fermentação para produção de lipase.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	497,58	3	165,86	39,77	3,07
Resíduos	29,21	7	4,17		
Falta de ajuste	26,61	5	5,32		
Erro puro	2,60	2	1,30		
Total	526,79	10	52,68		

% variação explicada (R^2) = 94,45

% máxima variação explicável $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,51$

coeficiente de correlação (R) = 0,97

Observando a Tabela 4.38 é possível perceber que os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, exceto o termo da aeração linear e a interação entre agitação e aeração, sendo estes incorporados à falta de ajuste para cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 4.39.

Pelos resultados mostrados na Tabela 4.39 observa-se que o valor do teste F

calculado de 39,77 foi cerca de 13 vezes maior do que o valor tabelado $F_{0,90; 3; 7} = 3,07$, indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para a variável estudada. Dessa forma, a atividade lipolítica da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL- Y 552 para 54 horas pode ser predita em função da agitação e aeração através da Equação codificada 4.13.

$$\text{Atividade enzimática} = 21,09 - 1,71 \text{ agitação} - 7,83 \text{ agitação}^2 - 6,90 \text{ aeração}^2 \quad (4.13)$$

A variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, cerca de 95% e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,97, o que também mostra que o modelo obtido é adequado para explicar o processo estudado. A partir do valor da máxima variação explicável, que foi de 99,51% pode-se notar que o erro puro do processo foi bem pequeno, em torno de 0,5%.

A partir do modelo obtido foi então possível obter as superfícies de resposta para analisar as melhores condições de agitação e aeração para a produção lipase que levam a um maior valor de atividade lipolítica. A superfície de resposta obtida após 54 horas de fermentação está apresentada na Figura 4.47. É possível verificar que tanto para a agitação quanto para a aeração um aumento dessas variáveis, numa faixa restrita, proporcionou um incremento na atividade lipolítica. Observa-se que foi alcançada uma condição ótima para a atividade lipolítica com agitação de 300 rpm e aeração de 1 vvm a 30°C, atingindo cerca de 20 U/mL em 54 horas de fermentação.

Freire et al. (1997 a) estudando a produção de lipase por *Penicillium restrictum* a 200 rpm, 0,5 vvm e 30°C, utilizando o meio de cultura contendo 2% de peptona, 1% de óleo de oliva, 0,5% de NaCl e 0,1% de extrato de levedura com um pH inicial de 5,5, alcançaram um máximo de atividade lipolítica em 70 horas de fermentação com 13,4 U/mL.

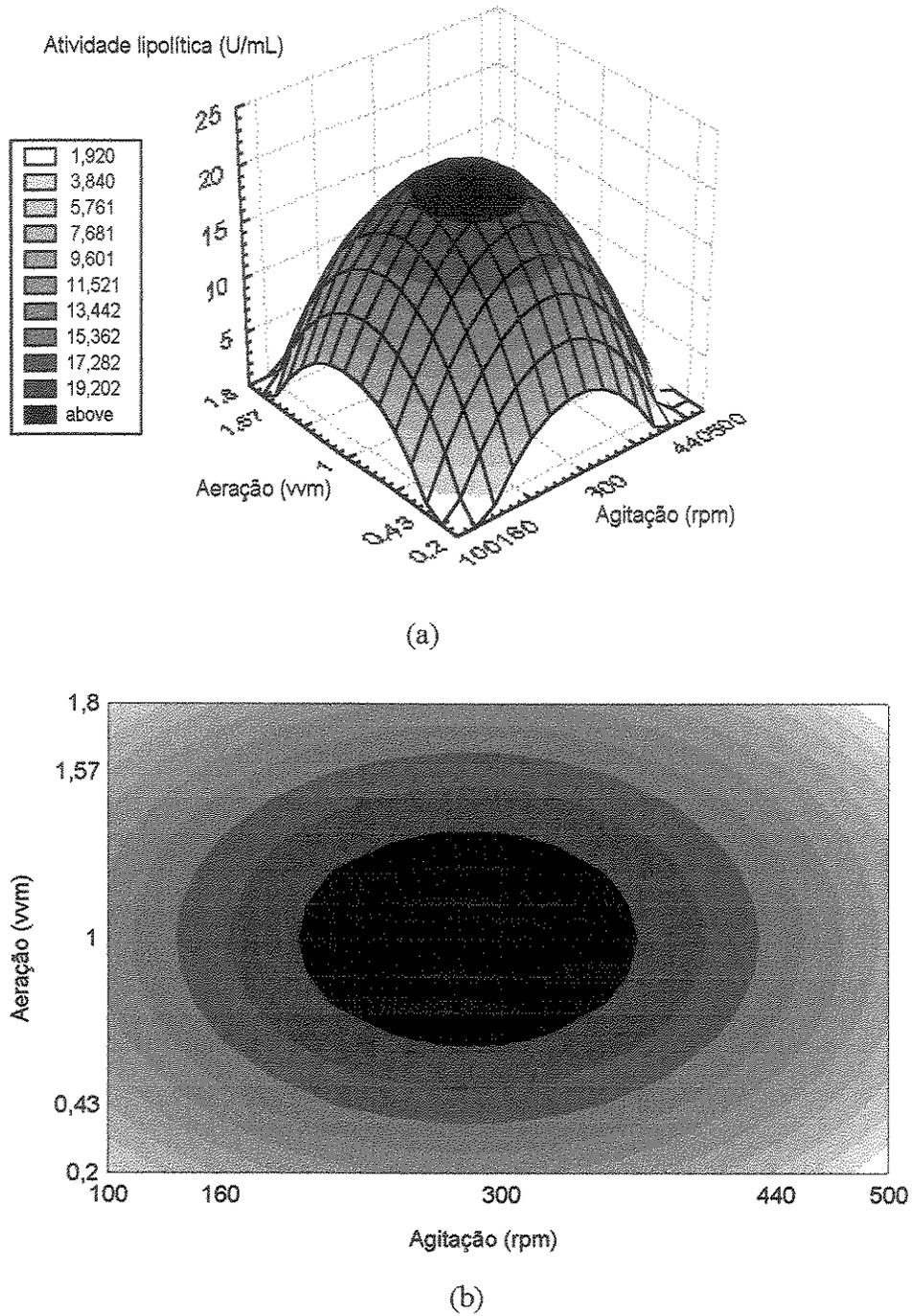


Figura 4.47. Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para a atividade lipolítica em função da agitação e aeração (b).

4.13.2 – Efeito da agitação e aeração na produtividade

A produtividade foi calculada conforme descrito no item 3.12 e os valores estão reportados na Tabela 4.40. Nesta mesma tabela também estão apresentados os dados da produtividade prevista pelo modelo fornecido pela Equação 4.14, bem como os desvios relativos dos ensaios experimentais em relação ao modelo.

Tabela 4.40: Produtividade para os ensaios do quinto planejamento experimental 2^2 para produção da lipase.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Produtividade (U/mL.h)	Produtividade predita pela Eq. 4.14 (U/mL.h)	Desvio relativo (%)
1	160	0,43	0,1305	0,1299	0,46
2	440	0,43	0,3477	0,2711	22,03
3	160	1,57	0,1690	0,2587	-53,08
4	440	1,57	0,3367	0,3999	-18,77
5	100	1,0	0,2200	0,1646	25,18
6	500	1,0	0,3463	0,3637	-5,03
7	300	0,2	0,1136	0,1763	-55,23
8	300	1,8	0,4587	0,3579	21,97
9	300	1,0	0,4100	0,3908	4,68
10	300	1,0	0,3939	0,3908	0,79
11	300	1,0	0,3681	0,3908	-6,17

Para observar se existia alguma relação entre as diferentes condições de agitação e aeração estudadas e a produtividade alcançada na produção da lipase foi avaliado um modelo quadrático. Através da Tabela 4.41 verifica-se que os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, exceto o termo da interação entre agitação e aeração que foi incorporado à falta de ajuste para o cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 4.42.

Pelos resultados mostrados na Tabela 4.42 observa-se que o valor do teste F calculado de 4,39 foi apenas cerca de 1,38 vezes maior que o valor tabelado $F_{0,90; 4; 6} = 3,18$. Mesmo com essa análise de teste F calculado não sendo 5 vezes maior que o F tabelado foi determinado o modelo e foram calculados os desvios relativos para cada ensaio. Na Tabela 4.40 estão reportados os desvios relativos para cada ensaio e verifica-se que em geral os maiores níveis de produtividade, na faixa de 0,4 U/(mL.h), foram alcançados nas condições de 300 rpm e 1 vvm (condições dos pontos centrais do estudo) e nesta faixa os desvios

relativos do modelo são muito baixos, da ordem de 5%. Assim, a produtividade pode ser predita em função da agitação e aeração através da Equação 4.14.

Tabela 4.41: Coeficientes de regressão para a produtividade alcançada no quinto planejamento experimental.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t	p	-90% Cnf.Lim.	+90% Cnf.Lim.
Média	0,3908	0,0122	32,03	0,0010*	0,3552	0,4264
Agitação (L)	0,0706	0,0075	9,43	0,0110*	0,0487	0,0924
Agitação (Q)	-0,0637	0,0089	-7,13	0,0191*	-0,0898	-0,0376
Aeração (L)	0,0644	0,0075	8,61	0,0132*	0,0426	0,0863
Aeração (Q)	-0,0622	0,0089	-6,97	0,0200*	-0,0883	-0,0361
Agitação x Aeração	-0,0124	0,0106	-1,17	0,3622	-0,0432	0,0185

* valores estatisticamente significativos a 90% de confiança ($p < 0,1$)

Tabela 4.42: Tabela ANOVA para a produtividade alcançada no quinto planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,1072	4	0,0268	4,39	3,18
Resíduos	0,0363	6	0,0061		
Falta de ajuste	0,0354	4	0,0089		
Erro puro	0,0009	2	0,0005		
Total	0,1435	10	0,0143		

% variação explicada (R^2) = 74,74

% máxima variação explicável ($(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T$) = 99,37

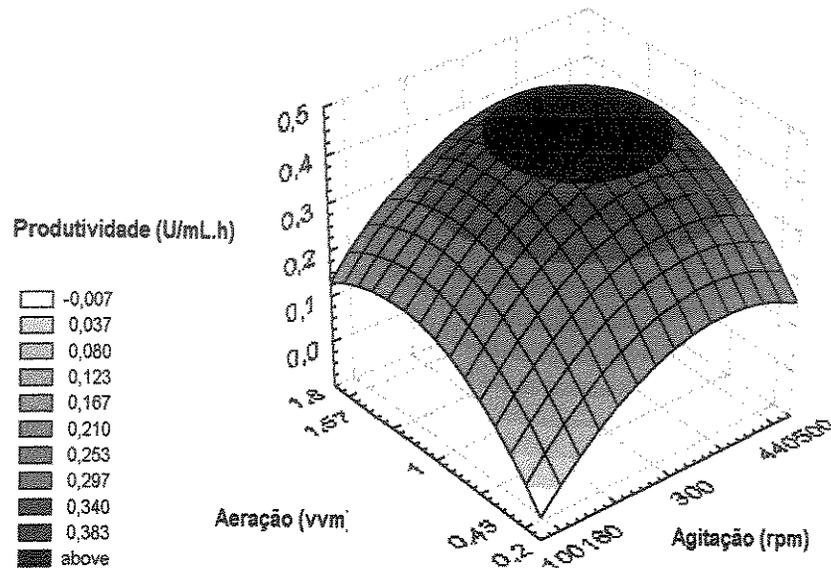
coeficiente de correlação (R) = 0,86

$$\begin{aligned}
 \text{Produtividade} = & 0,3908 + 0,0706 \text{ agitação} - 0,0637 \text{ agitação}^2 + 0,0644 \text{ aeração} \\
 & - 0,0622 \text{ aeração}^2
 \end{aligned}
 \tag{4.14}$$

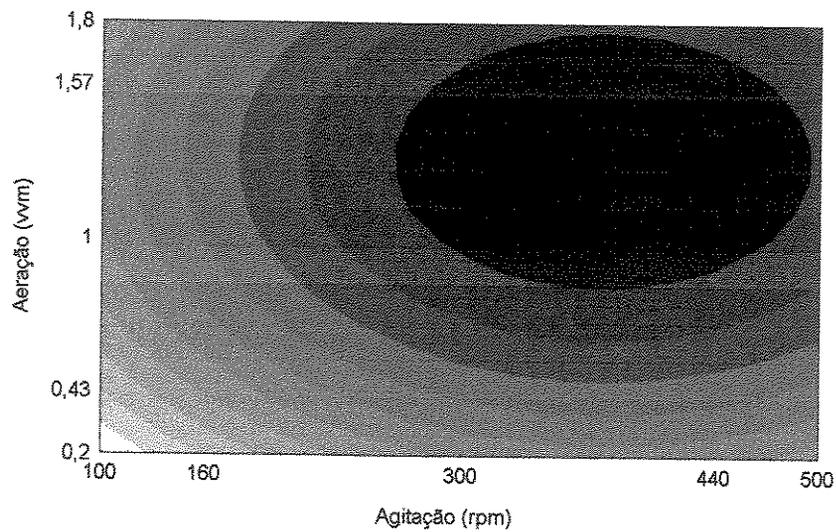
Através da figura 4.48 observa-se que o incremento da agitação e aeração provocaram um aumento na produtividade. Verifica-se ainda pela Análise de Superfície de Resposta que dentro da faixa de 300 a 490 rpm e 0,9 a 1,7 vvm temos o mesmo valor de produtividade obtida, alcançando cerca de 0,39 U/mL. Estes resultados são muito

importantes para verificar a robustez do processo, principalmente na área de controle de processo.

A forte influência da agitação na produtividade no processo de produção de lipase também foi verificada por Freire et al. (1997 a), que alcançaram uma produtividade máxima de 0,306 U/mL.h, ou seja, menor que a produtividade alcançada neste trabalho.



(a)



(b)

Figura 4.48. Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para a produtividade em função da agitação e aeração (b).

4.13.3 – Efeito da agitação e aeração na produtividade específica

A produtividade específica foi calculada conforme descrito no item 3.12 e os valores estão reportados na Tabela 4.43. Nesta mesma tabela também estão apresentados os dados da produtividade específica prevista pelo modelo fornecido pela Equação 4.15, bem como os desvios relativos dos ensaios experimentais em relação ao modelo.

Tabela 4.43: Produtividade específica para os ensaios do quinto planejamento experimental.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Produtividade específica (U/mg.h)	Produtividade predita (U/mg.h)	Desvio relativo (%)
1	160	0,43	0,0088	0,0061	30,68
2	440	0,43	0,0132	0,0167	-26,51
3	160	1,57	0,0078	0,0115	-47,44
4	440	1,57	0,0220	0,0221	-0,45
5	100	1,0	0,0182	0,0105	42,16
6	500	1,0	0,0352	0,0255	27,63
7	300	0,2	0,0090	0,0064	28,45
8	300	1,8	0,0187	0,0140	24,85
9	300	1,0	0,0166	0,0180	-8,43
10	300	1,0	0,0154	0,0180	-16,88
11	300	1,0	0,0219	0,0180	17,81

Para verificação de uma correlação entre o crescimento microbiano e a produtividade com a agitação e aeração foi avaliado um modelo quadrático. Foram calculados os coeficientes de regressão mostrados na Tabela 4.44 onde observam-se que os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 80% de confiança, exceto o termo da agitação quadrática e a interação entre agitação e aeração que foram incorporados a falta de ajuste para o cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 4.45.

Analisando a Tabela 4.45 verifica-se que o F calculado de 4,99 foi duas vezes maior que o valor tabelado $F_{0,90; 3; 7} = 2,17$ tabelado. Da mesma forma que para a produtividade, foi possível obter um modelo que apresentou desvios relativos baixos na região dos pontos centrais, a mesma análise foi realizada para a produtividade específica, determinando-se o modelo e calculando os desvios relativos para cada ensaio que estão apresentados na Tabela 4.43, onde para os pontos centrais ficaram na ordem de 15%. Assim, a produtividade

específica pode ser predita em função da agitação e aeração através da Equação 4.15.

Tabela 4.44: Coeficientes de regressão para a produtividade específica.

Fatores	Coefficientes de regressão	Erro padrão	t	p	-80% Cnf.Lim.	+80% Cnf.Lim.
Média	0,0180	0,0020	9,01	0,0121*	0,0142	0,0218
Agitação (L)	0,0053	0,0012	4,36	0,0488*	0,0030	0,0076
Agitação (Q)	0,0025	0,0015	1,73	0,2252	-0,0002	0,0053
Aeração (L)	0,0027	0,0012	2,20	0,1590*	0,0004	0,0050
Aeração (Q)	-0,0039	0,0015	-2,69	0,1149*	-0,0067	-0,0012
Agitação x Aeração	0,0024	0,0017	1,42	0,2923	-0,0008	0,0057

* valores estatisticamente significativos a 80% de confiança ($p < 0,2$)

Tabela 4.45: Tabela ANOVA para a produtividade específica.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,000419	3	0,000140	4,99	2,17
Resíduos	0,000199	7	0,000028		
Falta de ajuste	0,000175	5	0,000035		
Erro puro	0,000024	2	0,000012		
Total	0,000618	10	0,0000618		

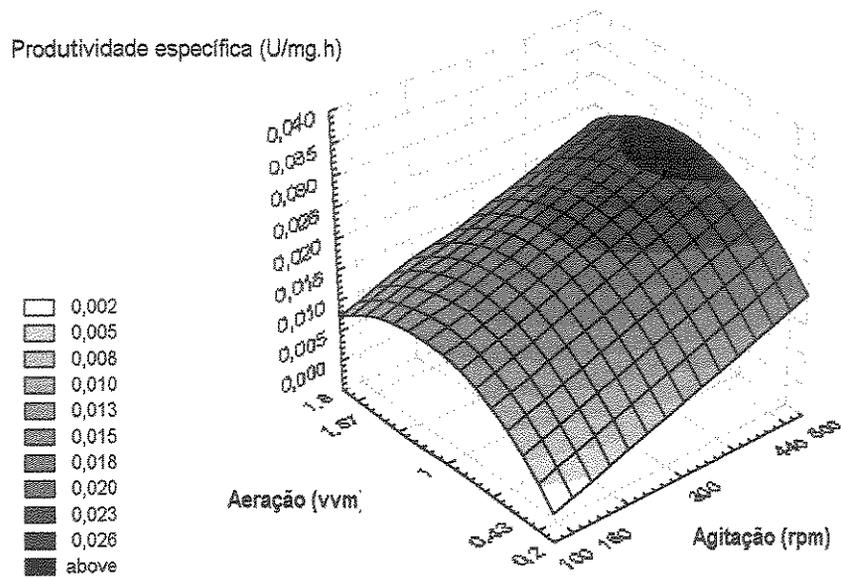
% variação explicada (R^2) = 67,75

% máxima variação explicável ($(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T$) = 96,12

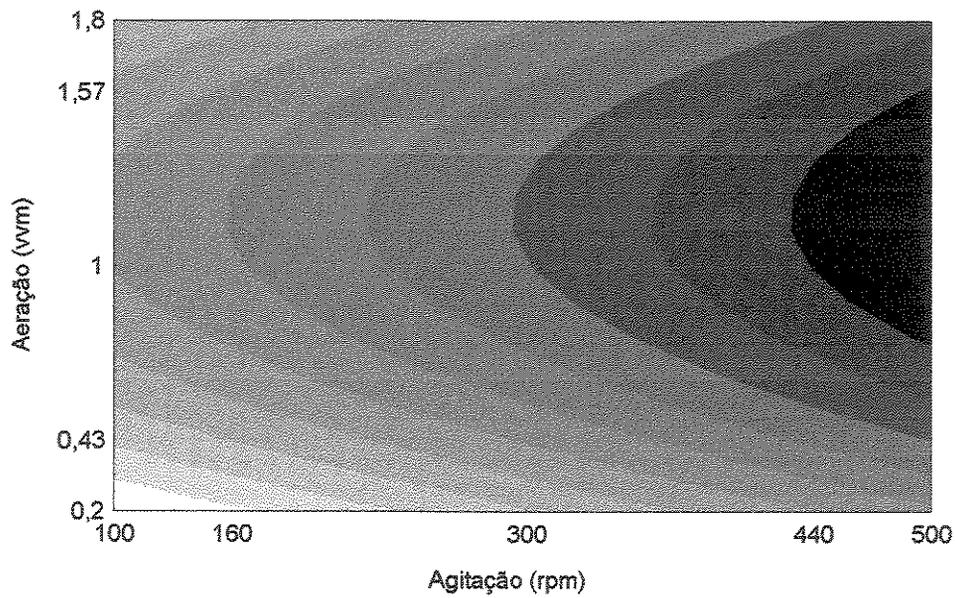
coeficiente de correlação (R) = 0,82

$$\begin{aligned} \text{Produtividade específica} = & 0,0180 + 0,0053 \text{ agitação} + 0,0027 \text{ aeração} \\ & - 0,0039 \text{ aeração}^2 \end{aligned} \quad (4.15)$$

Com o modelo obtém-se as superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.49. É possível verificar que com o aumento da agitação, independentemente do nível de aeração houve um incremento na produtividade específica. Também verifica-se que o incremento da aeração até 1,4 vvm com agitação superior a 300 rpm aumentou a produtividade específica.



(a)



(b)

Figura 4.49. Superfície de resposta (a) e Curva de contorno (b) para a produtividade específica em função da agitação e aeração (b).

4.13.4 – Efeito da agitação e aeração no K_{La}

O K_{La} foi determinado e calculado conforme descrito no item 3.11.7 e os valores estão reportados na Tabela 4.46.

Tabela 4.46: K_{La} para os ensaios do quinto planejamento experimental.

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	K_{La} (h^{-1})
1	160	0,43	2,27
2	440	0,43	51,95
3	160	1,57	11,74
4	440	1,57	74,0
5	100	1,0	5,68
6	500	1,0	85,58
7	300	0,2	12,63
8	300	1,8	41,83
9	300	1,0	21,68
10	300	1,0	21,26
11	300	1,0	20,06

Através da Tabela 4.47 verifica-se que todos os termos dos coeficientes de regressão obtidos para um modelo quadrático foram estatisticamente significativos a 95% de confiança. A análise de variância está apresentada na Tabela 4.48.

Pela análise da ANOVA observa-se que o valor do teste F calculado de 422,91 é bem superior, aproximadamente 80 vezes maior, ao tabelado $F_{0,95; 5; 5} = 5,05$, indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para o coeficiente de transferência de massa na fase líquida. Assim, o K_{La} pode ser previsto em função da agitação e aeração através da Equação codificada 4.16.

$$K_{La} = 21,01 + 28,16 \text{ agitação} + 12,00 \text{ agitação}^2 + 9,11 \text{ aeração} + 2,74 \text{ aeração}^2 + 3,14 \text{ agitação} \times \text{aeração} \quad (4.16)$$

A variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, cerca de 99% e o coeficiente de correlação (R) foi de 0,99. O que também mostra que o modelo obtido é bom para prever o K_{La} . A partir do valor da máxima variação explicável, que foi de 99,76% pode-se notar que o erro puro foi bem pequeno, em torno de 0,24%.

Tabela 4.47: Coeficientes de regressão para o K_{La} .

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t	p	-95% Cnf.Lim.	+95% Cnf.Lim.
Média	21,01	0,48	43,28	0,0005*	18,92	23,09
Agitação (L)	28,16	0,30	94,59	0,0001*	26,88	29,44
Agitação (Q)	12,00	0,35	33,78	0,0009*	10,47	13,53
Aeração (L)	9,11	0,30	30,61	0,0011*	7,83	10,39
Aeração (Q)	2,74	0,35	7,73	0,0163*	1,22	4,27
Agitação x Aeração	3,14	0,42	7,48	0,0174*	1,34	4,95

* valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$)

Tabela 4.48: Tabela ANOVA para o K_{La} .

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Regressão	7836,61	5	1567,32	422,91	5,05
Resíduos	18,53	5	3,71		
Falta de ajuste	17,12	3	5,71		
Erro puro	1,41	2	0,70		
Total	7855,14	10	785,51		

% variação explicada (R^2) = 99,76

% máxima variação explicável $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,98$

coeficiente de correlação (R) = 0,99

A Figura 4.50 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos (modelo). Pode-se concluir que o modelo de 2ª ordem prevê muito bem o comportamento do K_{La} com a variação da agitação e aeração.

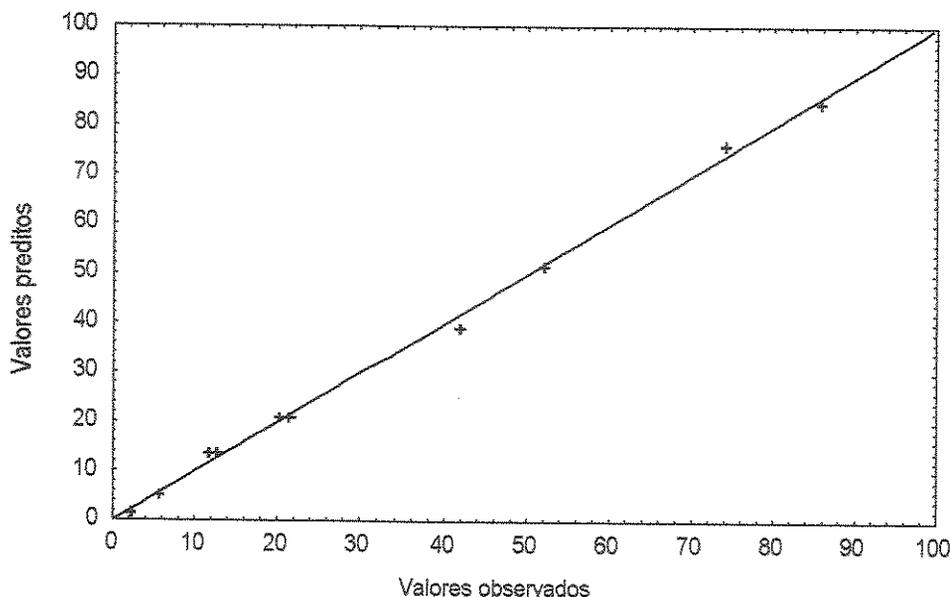


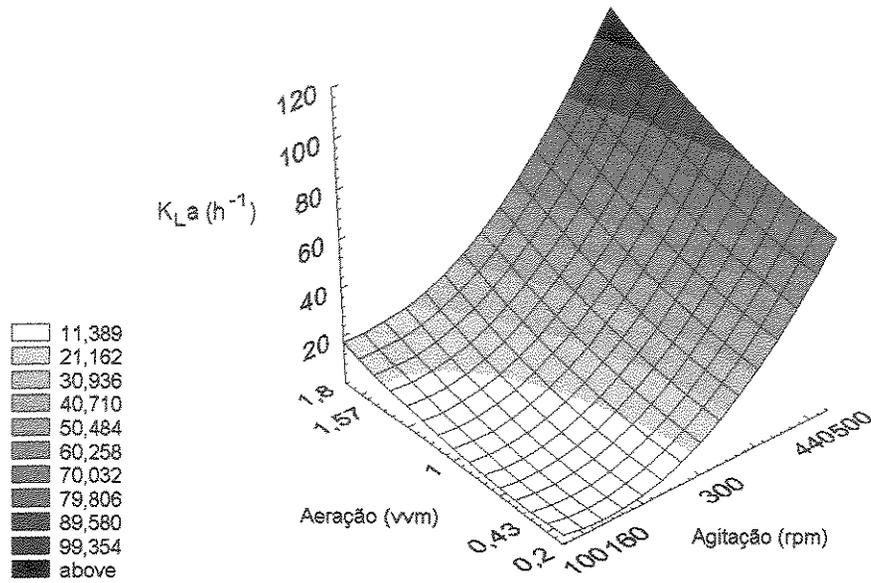
Figura 4.50. Valores observados versus valores preditos para o K_{La} .

A partir do modelo obtido foi então possível obter as superfícies de resposta para analisar a influência da condição de agitação e aeração no K_{La} . A Figura 4.51 apresenta a superfície de resposta obtida. É possível verificar que quando houve um aumento da aeração mantendo a agitação em níveis mais baixos, ocorreu um pequeno incremento no K_{La} . No entanto, para agitações maiores os valores de K_{La} foram maiores. Um aumento da agitação independentemente do valor de aeração utilizado levou a um aumento significativo do K_{La} . Observa-se que utilizando 500 rpm e 1,0 ou 1,57 ou 1,8 vvm é possível obter valores de K_{La} em torno de 90 h^{-1} .

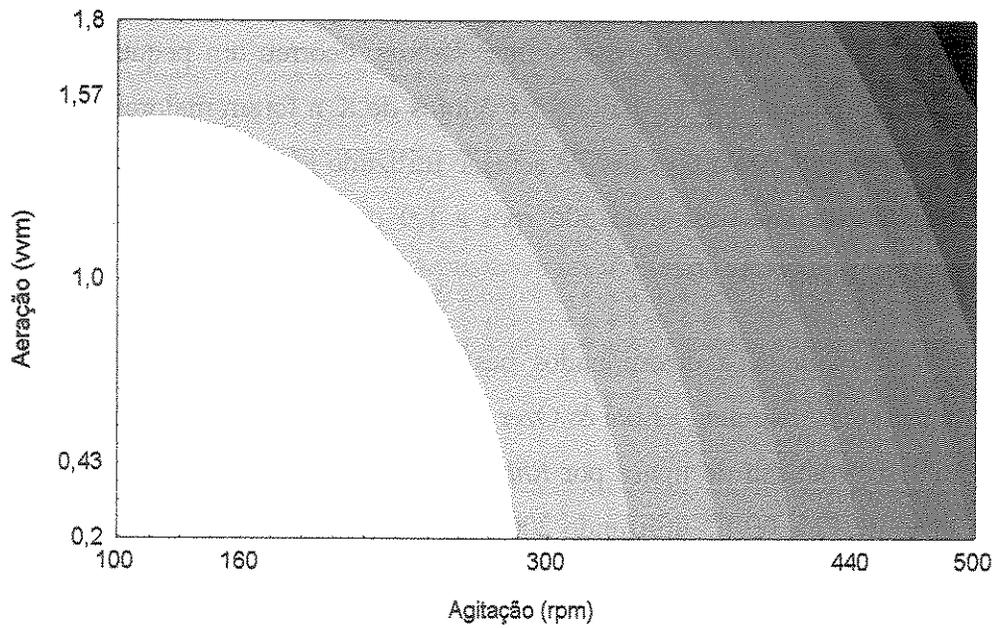
Os valores de K_{La} determinados neste trabalho estão de acordo com os dados citados na literatura. Segundo Elibol & Ozer (2000) estudando a influência da transferência de oxigênio na produção de lipase por *Rhizopus arrhizus* determinaram valores de K_{La} a 30°C na faixa de 12 a 60 h^{-1} utilizando 200 rpm e 0,25 a 1,5 vvm e K_{La} entre 22 a 118 h^{-1} utilizando 300 rpm e 0,25 a 1,5 vvm.

Chen et al (1999) também verificou a influência da transferência de oxigênio na produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* a 30°C utilizando uma agitação maior e determinou o K_{La} para as seguintes condições: 400 rpm e 0,5 vvm $31,32 \text{ h}^{-1}$, 400 rpm e

1,0 vvm 48,60 h⁻¹, 400 rpm e 1,5 vvm 52,20 h⁻¹, 500 rpm e 0,5 vvm 68,40 h⁻¹, 500 rpm e 1,0 vvm 97,20 h⁻¹, 500 rpm e 1,5 vvm como 122,40 h⁻¹.



(a)



(b)

Figura 4.51. Superfície de resposta para o K_{La} em função da agitação e aeração (a) e Curva de contorno para o K_{La} em função da agitação e aeração (b).

4.14 – Estudo da produção de lipase em fermentador tipo “air-lift”

Foram realizados cinco ensaios experimentais variando a aeração em 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 vvm a 30°C utilizando o meio de cultura com 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja, ou seja, o mesmo utilizado no estudo com o reator convencional. As fermentações foram acompanhadas verificando o pH, a proteína, a atividade lipolítica e a atividade proteolítica.

4.14.1 – Acompanhamento da cinética de fermentação para o reator “air-lift”

As Figuras 4.52 a 4.56 apresentam as cinéticas das fermentações, com o acompanhamento da atividade lipolítica, atividade proteolítica, proteína, pH e concentração de oxigênio dissolvido, para as diferentes taxas de aeração estudadas.

Comparando as cinéticas das cinco fermentações observa-se que o perfil do pH mostrou-se com o mesmo comportamento obtido no reator tipo mistura e nos ensaios anteriores em frascos agitados, com uma queda do valor inicial (6,98-7,0) até um mínimo (6,35-6,53), entre as primeiras 20 a 25 horas de fermentação, atingindo valores em torno de 8,4. Neste tipo de reator também foi observado que o aumento de pH provavelmente foi uma das variáveis que contribuiu para a queda na produção da lipase.

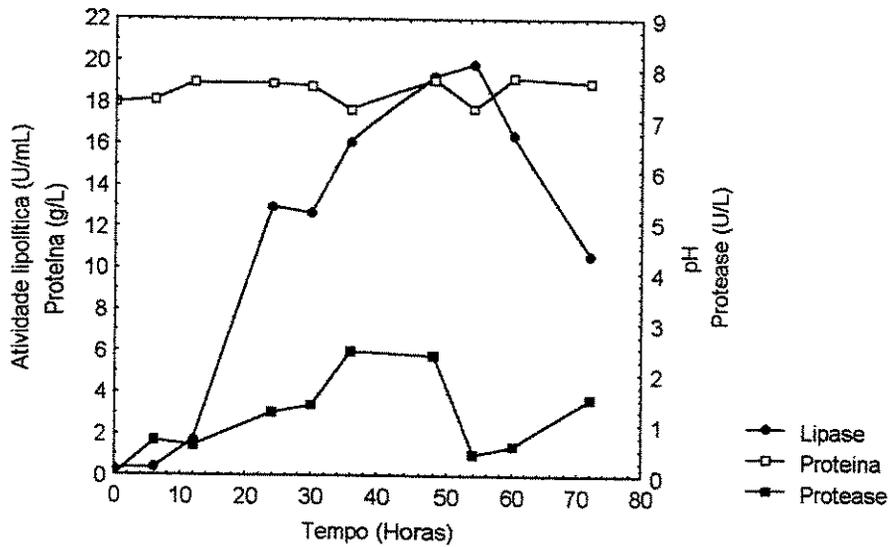
A concentração de proteína mostrou um perfil praticamente constante ao longo de cada fermentação.

Com o início da fermentação pode-se verificar que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) cai rapidamente desde o nível de saturação até níveis baixos durante as 20 horas iniciais de fermentação. Os níveis baixos de OD se mantêm durante um certo período que é variável em cada fermentação. Em seguida, as leituras de OD apresentam valores crescentes que no caso das fermentações com 1,5 vvm e 2,5 vvm aumentaram e chegaram ao final do processo fermentativo em torno de 70%.

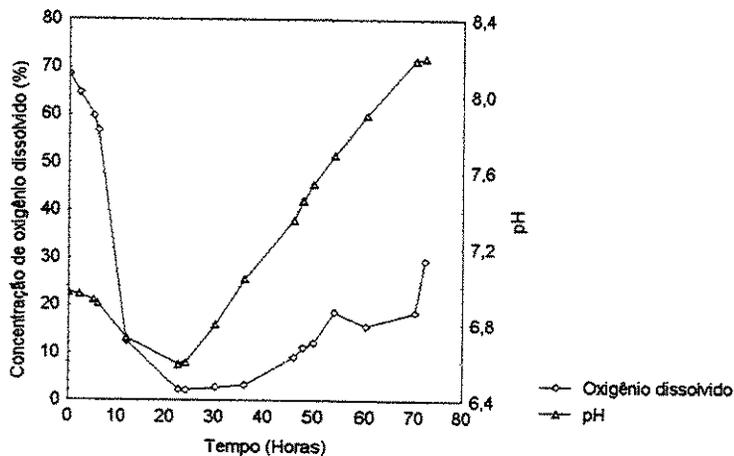
A produção da lipase para as diferentes taxas de aeração estudadas está apresentada na Figura 4.57. O máximo de atividade lipolítica variou de aproximadamente 12 U/mL até 20 U/mL, em tempos distintos de fermentação. Para 1,0 vvm, 1,5 vvm, 2,0 vvm, 2,5 vvm e

3,0 vvm o máximo de atividade lipolítica alcançada nos respectivos tempos de fermentação foram: 19,87 U/mL em 54 horas, 16,36 em 54 horas, 19,72 U/mL em 34 h, 19,27 U/mL em 30 horas e 11,65 U/mL em 35 horas, respectivamente. A queda na produção da lipase como no reator tipo mistura também se deve à combinação de fatores como a lise celular, o aumento de pH ou a um aumento na atividade proteolítica.

A atividade proteolítica apresentou um perfil similar para o observado no estudo do reator convencional.

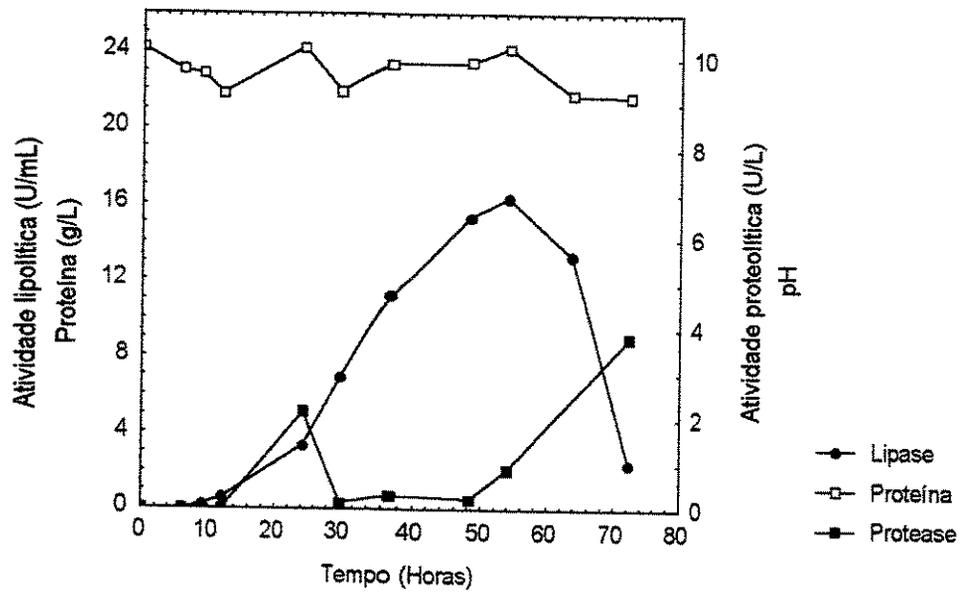


(a)

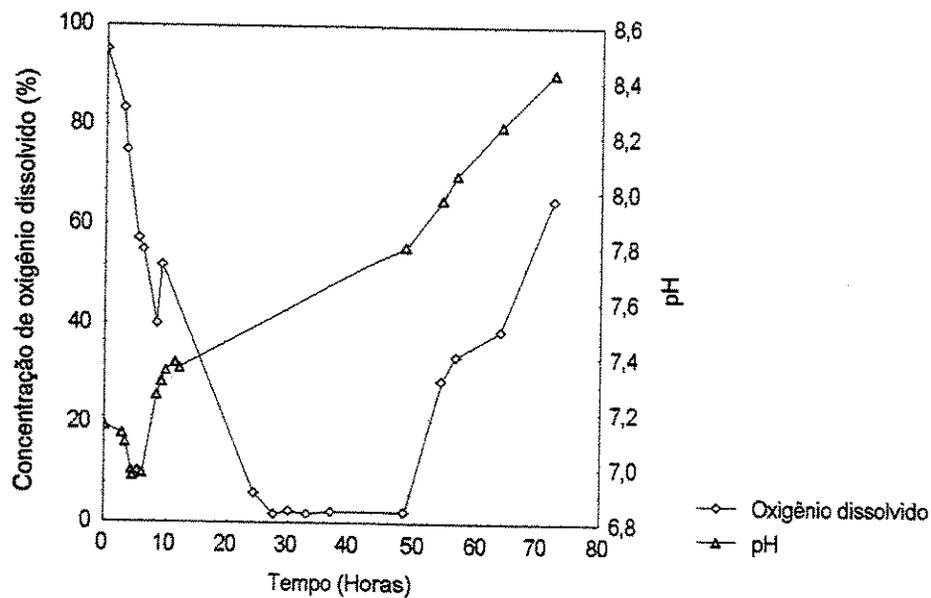


(b)

Figura 4.52. Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C e 1,0 vvm.

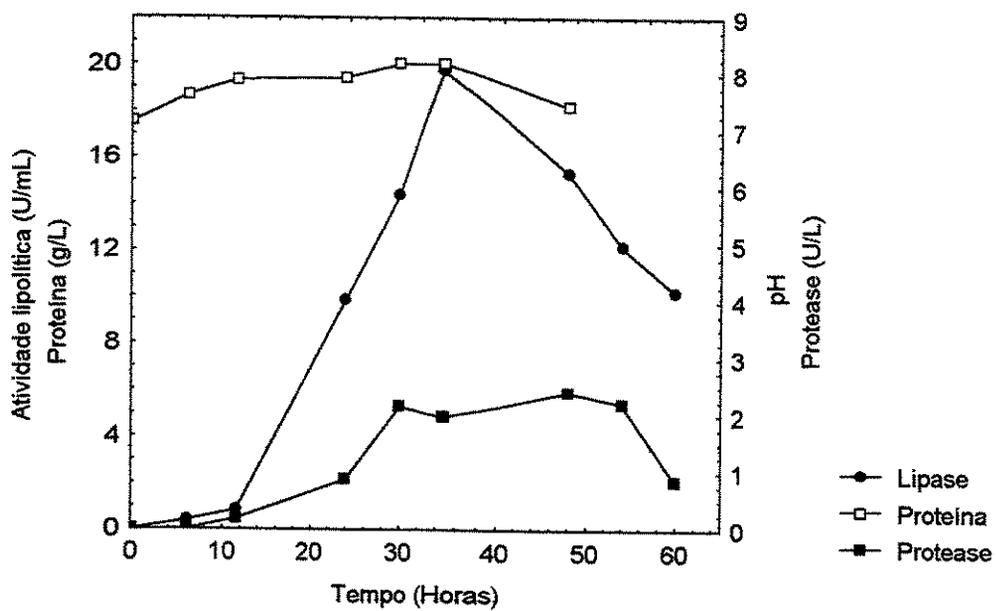


(a)

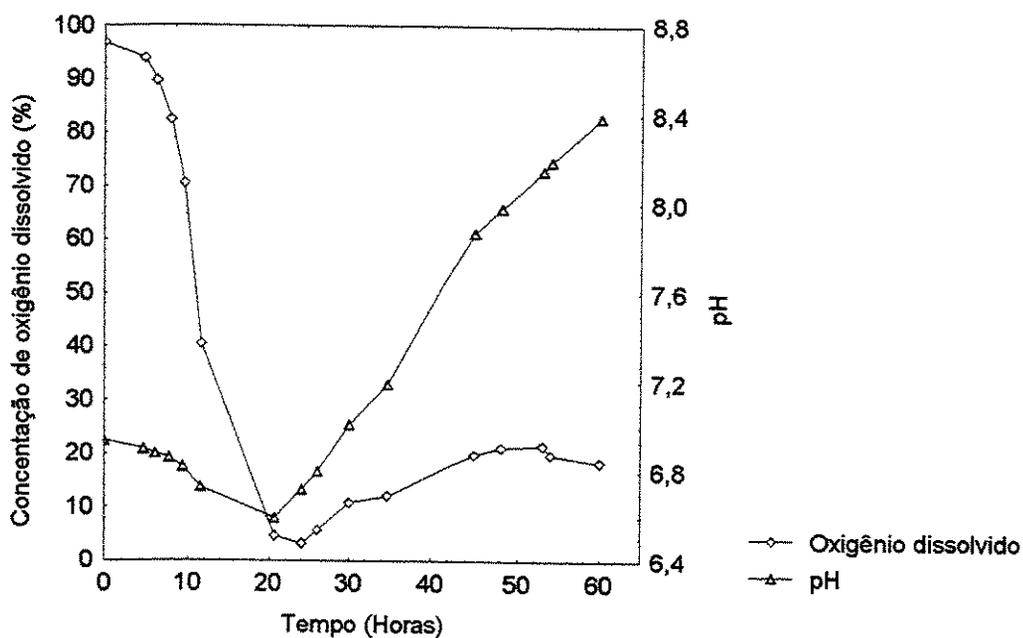


(b)

Figura 4.53. Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C e 1,5 vvm.

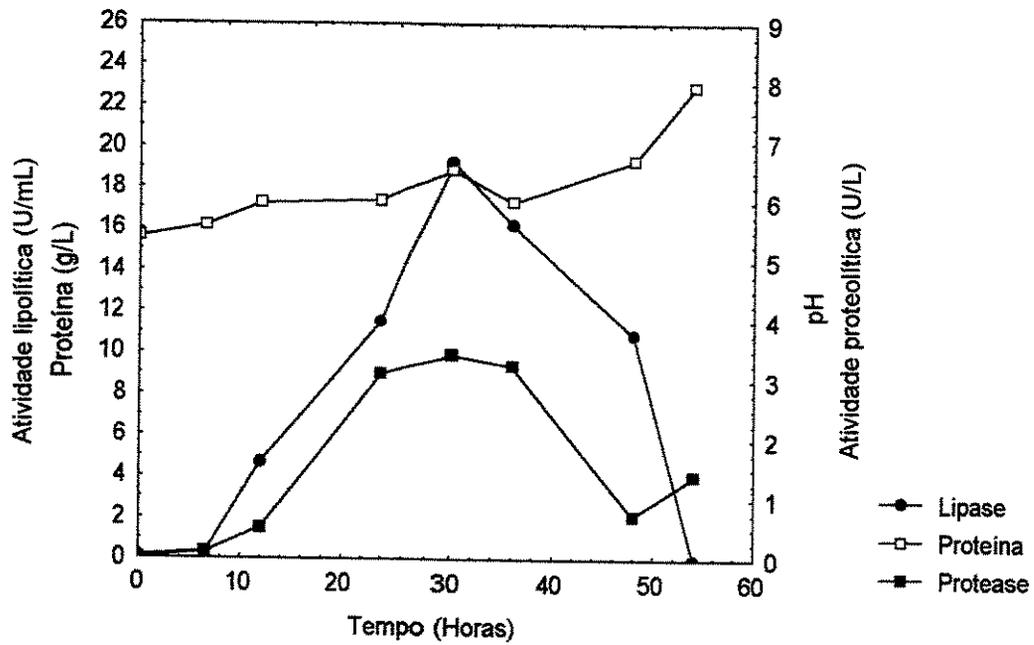


(a)

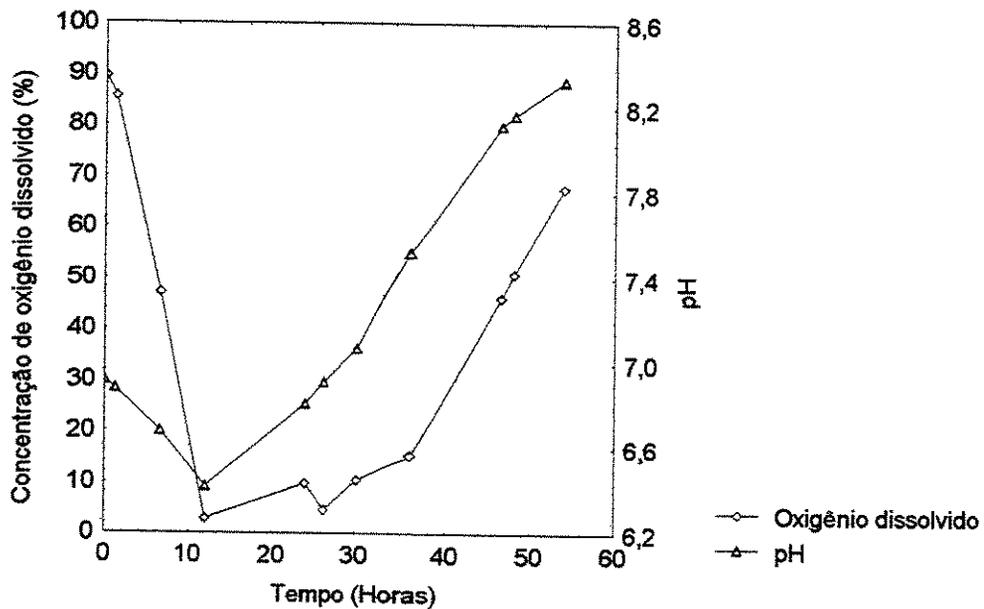


(b)

Figura 4.54. Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C e 2,0 vvm.

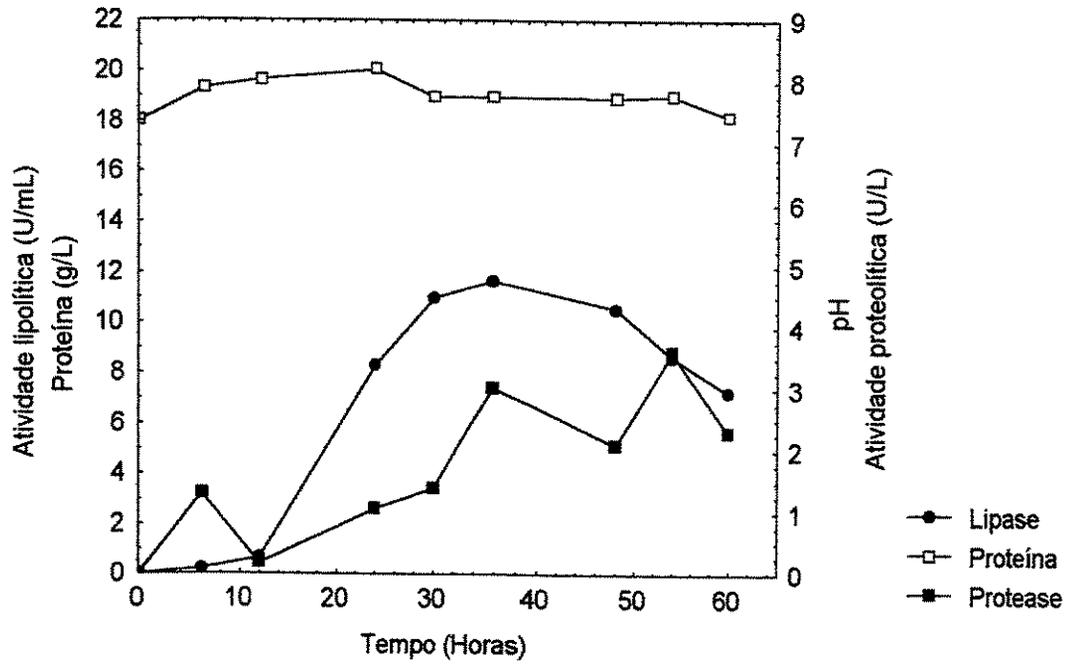


(a)

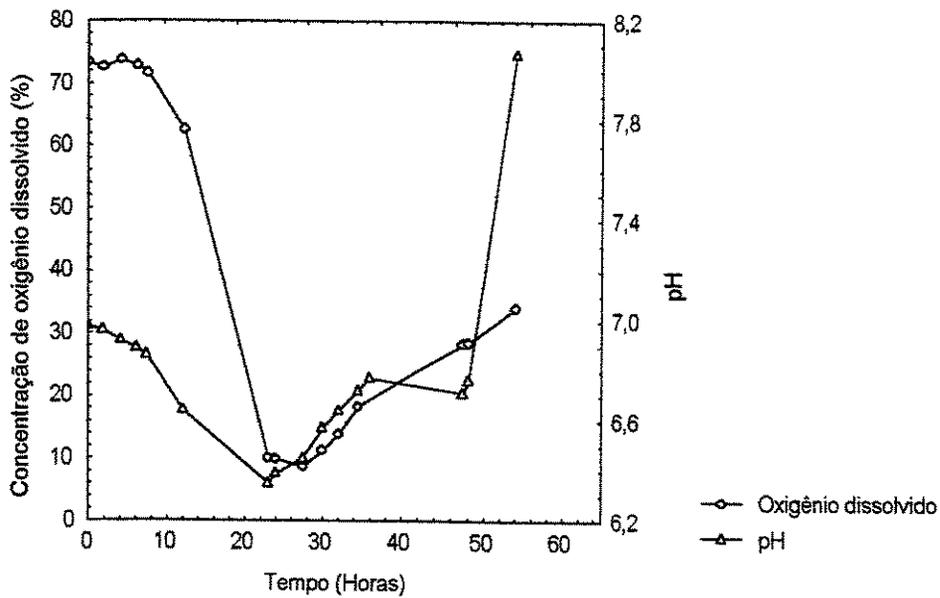


(b)

Figura 4.55. Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C e 2,5 vvm.



(a)



(b)

Figura 4.56. Acompanhamento da cinética de fermentação (a) e concentração de oxigênio dissolvido e pH (b) para produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 a 30°C e 3,0 vvm.

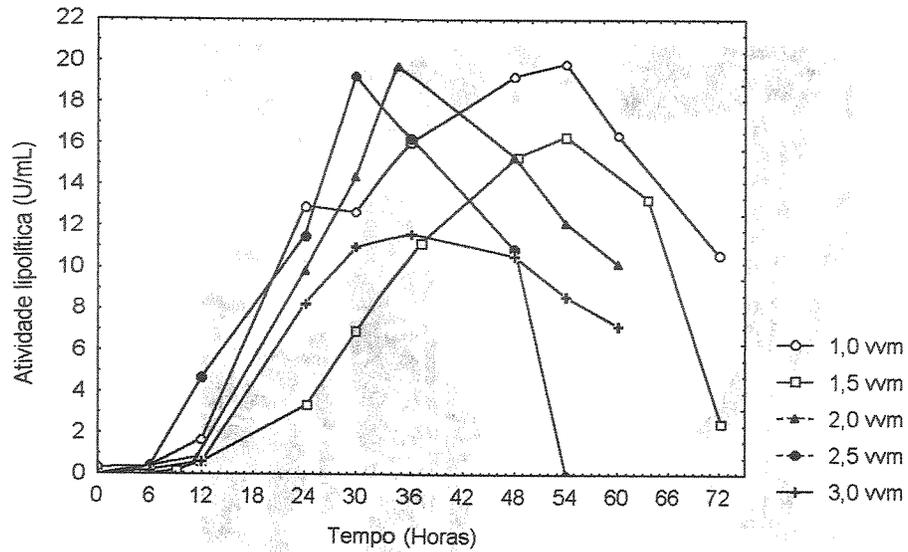


Figura 4.57. Acompanhamento da atividade lipolítica para a produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 utilizando as taxas de aeração de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 vvm a 30°C no reator “air-lift”.

Na Figura 4.58 pode ser observada a produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 no reator “air-lift”.

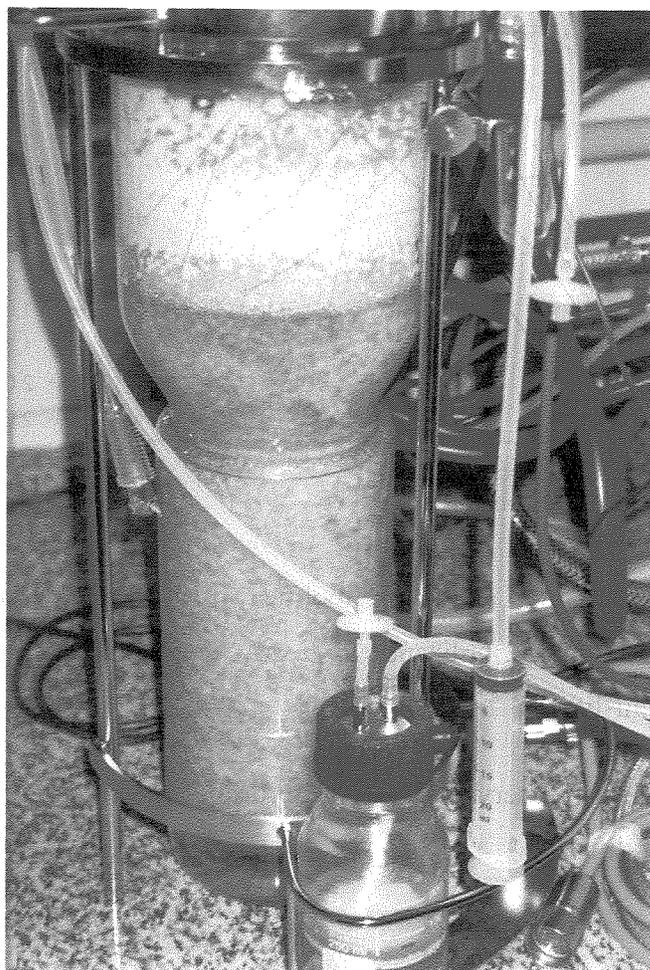


Figura 4.58. Produção de lipase no reator “air-lift”.

4.14.2 – Coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida para o reator “air-lift”

O K_{La} foi determinado e calculado conforme descrito no item 3.11.7 e os valores estão apresentados na Tabela 4.49. Como é de se esperar quanto maior a taxa de aeração, fornecida maior o K_{La} . No entanto, o aumento do K_{La} não significou um incremento na máxima atividade lipolítica alcançada, fato esse já observado anteriormente no estudo do reator com agitação mecânica convencional. Vale a pena ressaltar que para os ensaios que alcançaram uma maior atividade lipolítica em um menor tempo de fermentação, ensaio 3 (2,0 vvm com 19,72 U/mL) e ensaio 4 (2,5 vvm com 19,27 U/mL), o K_{La} determinado

ficou na mesma ordem de grandeza que o K_{La} para o reator convencional, nas condições de 300 rpm e 1,0 vvm onde se alcançou o pico de atividade lipolítica.

Tabela 4.49: K_{La} para os ensaios no reator air-lift.

Ensaio	Aeração (vvm)	K_{La} (h^{-1})
1	1,0	12,55
2	1,5	16,29
3	2,0	21,07
4	2,5	23,94
5	3,0	29,05

4.14.3 – Produtividade para o reator “air-lift”

A produtividade foi calculada segundo o item 3.12 e os valores estão mostrados na Tabela 4.50, que apresenta os maiores níveis de produtividade alcançados no ensaio 3 (2,0 vvm) uma produtividade de 0,5688 U/(mL.h) e no ensaio 4 (2,5 vvm) uma produtividade maior de 0,6423 U/(mL.h).

Tabela 4.50: Produtividade para os ensaios no reator “air-lift”.

Ensaio	Aeração (vvm)	Produtividade (U/mL.h)
1	1,0	0,3680
2	1,5	0,3030
3	2,0	0,5688
4	2,5	0,6423
5	3,0	0,3251

4.15 – Comparação da performance do reator com agitação convencional e o reator “air-lift”

Para fazer uma comparação da performance do reator com agitação convencional e do reator “air-lift”, pode-se discutir três aspectos: o coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida, a produção da lipase através da atividade lipolítica e a produtividade alcançada no processo de produção da enzima.

Os valores de K_{La} determinados para cada ensaio em reator com agitação convencional e reator “air-lift” está apresentado na Tabela 4.51.

Tabela 4.51: Valores de K_{La} para os ensaios realizados em reator com agitação convencional e “air-lift” utilizando o meio de cultura para produção de lipase.

Ensaio	Tipo de reator	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	K_{La} (h^{-1})	Máxima atividade lipolítica (U/mL)
1	Convencional	160	0,43	2,27	7,89
2	Convencional	440	0,43	51,95	10,43
3	Convencional	160	1,57	11,74	13,18
4	Convencional	440	1,57	74,0	12,12
5	Convencional	100	1,0	5,68	13,88
6	Convencional	500	1,0	85,58	8,31
7	Convencional	300	0,2	12,63	9,54
8	Convencional	300	1,8	41,83	13,76
9	Convencional	300	1,0	21,68	19,88
10	Convencional	300	1,0	21,26	22,14
11	Convencional	300	1,0	20,06	21,27
1	“air-lift”	-	1,0	12,55	19,87
2	“air-lift”	-	1,5	16,29	16,36
3	“air-lift”	-	2,0	21,07	19,72
4	“air-lift”	-	2,5	23,94	19,27
5	“air-lift”	-	3,0	29,05	11,65

Verifica-se que para o ensaio 1 (1 vvm) no reator “air-lift” e os ensaios 3 (160 rpm e 1,57 vvm) e 7 (300 rpm e 0,2 vvm) do reator convencional o K_{La} foi similar no entanto, a atividade lipolítica máxima alcançada para o ensaio 1 no “air-lift” foi cerca de 40% maior que o ensaio 3 e 50% maior que o ensaio 7 em um menor tempo de fermentação. O ensaio 3 (2,0 vvm) $K_{La}=21,07 h^{-1}$ e o ensaio 4 (2,5 vvm) $K_{La}= 23,94 h^{-1}$ podem ser comparados aos ensaios no ponto central do quinto planejamento experimental (ensaios 9, 10 e 11 a 300 rpm e 1,0 vvm) que apresentaram um K_{La} na mesma faixa, onde as atividades lipolíticas também foram muito similares em ambos os reatores, alcançando em torno dos 20 a 21 U/mL. Porém, observa-se que o pico da atividade lipolítica no reator “air-lift” é alcançado ao redor de 34 horas para o ensaio 3 e 30 horas para o ensaio 4, enquanto que no reator com agitação convencional o máximo de produção foi alcançado em 54 horas. Os ensaios no reator “air -lift” devem ser investigados mais profundamente, no entanto, uma hipótese para que o pico de atividade lipolítica seja alcançado bem mais cedo é que com a ausência de partes móveis e agitadores neste reator, ocorreu um menor cisalhamento do micélio do

Geotrichum candidum NRRL-Y 552 com uma melhor formação e manutenção de “pellets” do fungo, ao longo da fermentação facilitando a produção mais rápida da enzima.

Apesar da similaridade dos coeficientes de transferência de oxigênio o perfil de produção da enzima foi bastante distinto nos dois reatores estudados, como pode ser melhor visualizado através da Figura 4.59, se compararmos os ensaios 9, 10 e 11 do reator com agitação convencional com os ensaios 3 e 4 do reator “air-lift”. Como o pico de produção máxima ocorreu bem mais cedo no reator “air-lift” esse fato levou a uma maior produtividade neste design de reator para a produção da lipase. Ao compararmos a média da produtividade alcançada no ensaio 9= 0,4100 U/(mL.h), ensaio 10= 0,3939 U/(mL.h) e ensaio 11= 0,3681 U/(mL.h) do reator convencional em relação ao ensaio 3= 0,5688 U/mL.h e ao ensaio 4= 0,6423 U/(mL.h) do reator “air-lift” verifica-se que a produtividade alcançado no reator “air-lift” é aproximadamente 31% e 40% maior para os ensaios 3 e 4, respectivamente.

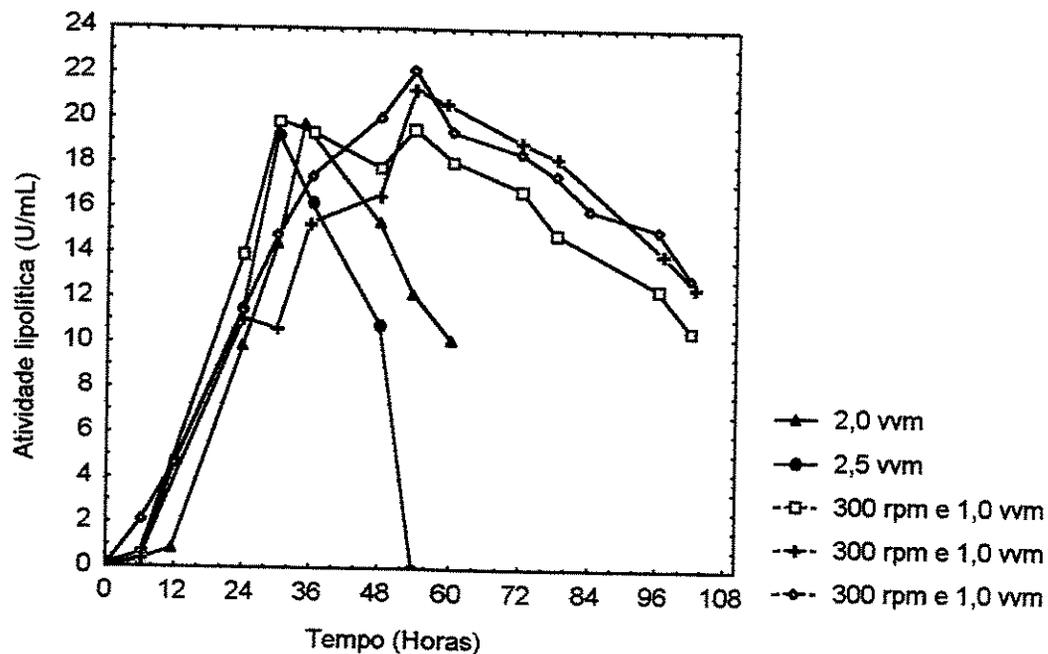


Figura 4.59. Acompanhamento da atividade lipolítica para a produção da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 para os ensaios no reator air-lift com 2,0 e 2,5 vvm e para os ensaios utilizando 300 rpm e 1,0 vvm a 30°C no reator com agitação convencional.

Resultados de melhores produtividades alcançadas em reatores “air-lift” quando comparados a outros designs de reatores também foram observados por Shinonaga et al. (1996) na produção de fosfolipase por *Streptomyces lydicus* e Kim et al. (1997) com a produção de celulase, xilanase e β -glucosidase por *Aspergillus niger*.

Portanto, os melhores resultados obtidos no reator “air-lift” provavelmente devem-se à ausência de partes móveis e impulsores no design deste reator, que acarretou em menor cisalhamento do micélio do *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 com uma melhor formação e manutenção de “pellets” do fungo, observado microscopicamente e no próprio equipamento e, ao longo da fermentação. Então, o reator “air-lift” mostrou-se uma alternativa promissora ao reator convencional, pois além da economia de energia demonstrou um ganho em torno de 40% na produtividade no processo de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL- Y 552.

No entanto, o tempo final de fermentação deve ser controlado com um número maior de amostragens porque o pico da atividade lipolítica cai drasticamente após atingir o máximo de produção, provavelmente devido a ação das proteases presentes no meio de cultura.

5 – CONCLUSÕES

Os estudos realizados durante este trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Apesar das diferentes composições de ácidos graxos dos indutores utilizados na produção da lipase, em frascos agitados a 250 rpm e 30°C, como o óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola, óleo de oliva e óleo de girassol, não foi observada diferença significativa na quantidade da lipase excretada por *Geotrichum candidum* NRRL- Y 552 sendo alcançadas aproximadamente 6 U/mL para os diferentes óleos testados. Assim, foi escolhido o óleo de soja como indutor por ser uma matéria-prima mais abundante e barata no Brasil, apresentando custo de 1/5 do valor comercial do óleo de oliva e 1/3 dos demais óleos estudados.
- Houve produção de lipase em frascos agitados, a 250 rpm e 30°C, com diferentes meios de cultura citados na literatura e verificou-se que a presença de Tween 80 praticamente não influenciou a quantidade de enzima excretada pelo microrganismo observando-se a produção da enzima utilizando fontes alternativas de substratos como a água de maceração de milho e o Prodex-lac.
- Com o primeiro planejamento experimental obteve-se atividades lipolíticas muito pequenas (1 a 3 U/mL), sendo necessário um estudo para a padronização do inóculo que possibilitasse o aumento de atividade lipolítica durante a fermentação e a diminuição de erros experimentais detectados através da realização dos pontos centrais do planejamento experimental. Com esse estudo foi possível padronizar o procedimento do inóculo como: após o crescimento do microrganismo durante 48 horas em placa de petri inoculou-se uma área circular de 0,78 cm² em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL do meio de cultivo contendo 5% de peptona, 1% de óleo de soja, 0,1% de nitrato de sódio e 0,1% de sulfato de magnésio nas condições de 250 rpm a 30°C por 15 horas, o que proporcionou um aumento de 5 vezes na atividade enzimática do meio de fermentação de 3 U/mL alcançado no primeiro planejamento experimental para 16 U/mL.
- A partir da análise de efeitos realizada no segundo planejamento experimental foi possível eliminar a presença dos sais minerais nitrato de sódio e sulfato de magnésio, visando a

otimização da atividade lipolítica, diminuindo o custo do meio de cultura para produção da lipase. A quantidade máxima de lipase obtida foi de cerca de 21 U/mL.

- Através dos resultados obtidos no terceiro planejamento experimental verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade lipolítica, cerca de 20 U/mL, obtidas nos ensaios experimentais que utilizaram 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja (nível -1 -1) e 6,42% de peptona e 1,36% de óleo de soja (nível +1 +1). Estes resultados foram validados pelo teste de Tukey, sendo escolhida nesta etapa a composição do meio ótimo de produção da lipase como 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja, praticamente 50% mais econômico.

- O microrganismo estudado foi bastante sensível às variáveis pH inicial do meio de cultura e temperatura de produção da enzima, que foram estudadas através do quarto planejamento experimental. As condições ótimas para produção da lipase após este planejamento experimental foram definidas como: 3,58% de peptona, 0,64% de óleo de soja com pH inicial de 7,0 e temperatura de produção de 30°C a 250 rpm em frascos agitados, alcançando em torno de 16 U/mL.

- A enzima após congelamento mostrou uma perda de 30% de atividade enzimática ao longo de 08 meses de estocagem. A lipase apresentou um pH ótimo de 7,0 no tampão citrato-fosfato 100mM, 5,6 no tampão acetato de sódio 100mM, 7,6 no tampão tris-HCl 100mM e 7,0 no tampão fosfato de sódio 100mM, sendo neste tampão alcançado o melhor resultado de atividade enzimática. A temperatura ótima encontrada para a lipase foi de 37°C. O estudo da temperatura de estabilidade da enzima mostrou que o tempo de meia vida encontrado para a lipase do microrganismo em estudo foi relativamente baixo, de cerca de 38,51 horas a 30°C e pH 7,0 e $t_{1/2}=3,61$ horas para 37°C a pH 7,0.

- A energia de ativação (E_a) calculada para a lipase foi de 4,46 Kcal/mol enquanto que a energia de ativação da reação de desativação (E_d) foi de 78,90 Kcal/mol.

- A lipase de *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552 não sofreu forte ativação pela presença da maioria dos sais minerais testados na concentração de 1mM. No entanto, foi fortemente

inibida pela presença de CuSO_4 e AgNO_3 , e foi inibida em 12%, 13% e 14% na presença de ZnSO_4 , Li SO_4 e FeSO_4 , respectivamente.

- Os valores obtidos para as constantes cinéticas da lipase, nas condições estudadas, foram $K_M = 28,73 \text{ mg/mL}$ e $V_{\text{máx}} = 22,57 \text{ U/mL}$.
- O tipo de agitador influenciou a produção da lipase e o $K_{L,a}$ em reator de mistura, onde verificou-se que com o agitador de pás inclinadas houve uma maior produção da enzima.
- Através da análise de superfície de resposta foi possível obter condições ótimas para a produção de lipase em reator de mistura, com 2 litros de volume utilizando o meio de cultura com 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja com pH inicial 7,0 a 30 °C, como sendo 300 rpm de agitação e 1 vvm de aeração alcançando 20 U/mL em 54 horas de fermentação.
- Para a produtividade também foi possível através de análise de superfície de resposta obter condições ótimas com agitação de 300 rpm e aeração de 1 vvm, alcançando cerca de 0,39 U/(mL.h).
- Através da análise de superfície de resposta a produtividade específica na região de interesse (300 rpm e 1 vvm) apresentou valores na ordem de 0,018 U/mg.h.
- Através da análise de superfície de resposta, como era de se esperar obteve-se valores maiores de $K_{L,a}$ em torno de 90 h^{-1} com níveis mais altos de agitação em torno de 500 rpm para o reator convencional.
- Das diferentes taxas de aeração testadas no reator air-lift, os melhores resultados foram obtidos com 2,0 vvm alcançando 19,72 U/mL em 34 horas e 2,5 vvm com 19,27 U/mL em 30 horas.
- O $K_{L,a}$ determinado no reator “air-lift” foi menor que no reator convencional e o valor máximo ficou em aproximadamente 30 h^{-1} .
- A produtividade alcançada no reator “air-lift” foi superior ao reator convencional. Com 2,0 vvm a produtividade foi 0,57 U/(mL.h) e com 2,5 vvm foi 0,64 U/(mL.h).

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados e conclusões obtidos neste trabalho sugere-se como trabalhos futuros:

- Otimização do meio de cultura para produção da lipase utilizando fontes de carbono e nitrogênio alternativas, comercialmente mais viáveis como a água de maceração de milho e o prodex-lac e a caracterização da enzima nestas condições.
- Estudos de purificação da lipase e caracterização da lipase purificada
- Estudos de aplicação da enzima
- Acompanhamento da influência da morfologia do fungo durante a fermentação em reator com agitação convencional e reator “air-lift” através de programas de análise de imagem.
- Estudos hidrodinâmicos no reator “air-lift”

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKOH, C.C.; COOPER, C.; NWOSU, C.V. Lipase g-catalysed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.69, n.3, p.257-260, Mar, 1992.
2. ALHIR, S.; MARKAKIS, P.; CHANDAN, R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Minneapolis, v.38, n.3, p.598-601, 1990.
3. ARBIGE, M.V.; PITCHER, W.H. Industrial enzymology: a look towards the future. **Trends in Biotechnology**, v.7,n. , p.330-335, 1989.
4. BAILLARGEON, M.W.; BISTLINE, R.G.; SONNET, P.E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.30, n.1, p.92-96, Jan, 1989.
5. BAILLARGEON, M.W. Purification and specificities of lipases from *Geotrichum candidum*. **Lipids**, v.25, n.12, p.841-848, 1990.
6. BARROS, B.N.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de Experimentos**. 02 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1996, 299 p.
7. BHUSHAN, B.; HOODAL, G.S. Characterization of lipase from an alkalophilic yeast sp. **Biothechnology Letters**, London, v.16, n.8, p.837-840, Aug, 1994.
8. BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G e HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley, 1978.
9. BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, E.; KIRK, O. The future impact of industrial lipases. **Trends in Biotechnology**, v.9, p.360-363, 1991.
10. CARVALHO, O.P. **Estudo da utilização de lipases no enriquecimento de óleos de sardinha e *Mucor* sp. em ácidos graxos poliinsaturados**. Campinas, 1998. 169p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

11. CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.6, p.544-554, Nov/Dec,1995.
12. CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L; FREIRE, D.M. Economics analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.4, p.239-247, 2000.
13. CHANDER, H.; KLOSTERMEYER, H. Production of lipase by *Geotrichum candidum* under various growth conditions. **Milchwissenschaft**, v.38, n.7, p.410-412, 1983.
14. CHARNEY J. & TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological chemistry**, Baltimore, v.171, n.2, p.501-505, Dec, 1947.
15. CHEN, J.Y.; WEN, C.M.; CHEN, T.L. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.62, n.3, p.311-316, 1999.
16. CHEVALIER, P.; NOUE, J. Enhancement α -amilase production by immobilized *Bacillus subtilis* in an air-lift fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.9, n., p.53-56, Jan, 1987.
17. CRUZ, P.M.; CHRISTEN, P.; FARRES, A. Medium optimization by fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.76 n.2, p.94-97, Oct, 1993.
18. DRUET, D.; ABBADI, N.E.; COMEAU, L.C. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.37, p.745-749, 1992.
19. ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p.325-329, 2000.

20. FOGLIA, T.A.; PETRUSO, K.; FEAIRHELLER, S.H. Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.70, p.281-285, 1993.
21. FREIRE, D.M.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA, G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.63-65, p.409-421, Sept, 1997 (a).
22. FREIRE, D.M.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.1, p.6-12, 1997 (b).
23. GITLESEN, T.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1345, p.188-196, 1997.
24. GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G.. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid -state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, p.85-90, oct, 1999.
25. GORDILLO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.43, n. 1, p.38-41, Apr, 1995.
26. HANG, Y.D.; WOODAMS, O.O. Lipase production by *Geotrichum candidum* from sauerkraut brine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.6, n.4, p.418-421, Dec, 1990.
27. HARALDSSON, G.G.; GUDMUNDSSON, B. Ö.; ALMARSON, O. **Tetrahedron**, v.51, p.941-952, 1995.

28. HARRIS, P.L.; CUPPET, S.L.; BULLERMAN, L.B. Optimization of lipase synthesis by *Pseudomonas fluorescens* by response surface methodology. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, n.6, p.481-483, June, 1990.
29. HATZINIKOLAOU, D.G.; MACRIS, J.B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; FOUNTOUKIDIS. Production and parcial charachterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biothechnology Letters**, London, v.18, n.5, p.547-552, May, 1996.
30. HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biothechnology Letters**, London, v.10, n.9, p.637-642, Sept, 1988.
31. IWAJ,M.; OKUMURO,S.; TSUJISAKA, Y. The comparison of the properties of two lipases from *Pencillium cyclopium* westring. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.39, n.5, p.1063-1070, 1974.
32. JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.32, n.3, p.256-261, Dec, 1989 (a).
33. JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.11, n.2, p.90-95, Feb, 1989 (b).
34. JAEGER, K.E.; STEINBUCHER, A.; JENDROSSEK, D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly (w-hydroxyalkanoates). **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.8, p.3113-3118, Aug, 1995.

35. JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SILVA Jr., J.G.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L.; FREIRE, D.M.G. Lipases de *Penicillium restrictum*: estudo comparativo e caracterização de enzimas com diferentes graus de pureza. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campinas, v.16, n.2, p.113-118, Jun,1999.
36. JIN, B.; LEEUWEN, H.J.V.; PATEL, B.; YU, Q. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amilase by *Aspergillus oryza*. **Bioresource Technology**, v.66, p.201-206, 1998.
37. JUSTEN, P.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v.59, n.6, p.762-775,Set, 1998.
38. KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 35,n.6, p.539-550, Jan, 2000.
39. KAMIMURA, E.S.; MENDIETA, O.; SATO, H.H.; PASTORE, G.; MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum* sp. and adsorption studies on affinity resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campinas, v.16, n.2, p.103-112, Jun, 1999.
40. KAMIMURA, E.S. **Modelagem e simulação do processo de purificação de lipase por cromatografia de afinidade**. Campinas, 2000. p. 221. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
41. KIM, S.W.; KANG, S.W.; LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.59, n., p.63-67, 1997.

42. KLOOSTERMAN, M.; ELFERINK, V.H.M.; LERSEL, J.V.; ROSKAM, J.H.; MEIJER, E.M.; HULSHOF, L.A.; SHELDON, R.A. Lipases in the preparation of β -blockers. **Trends in Biotechnology**, v.6, p.251-256, 1988.
43. LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI. Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v.13, n.2, p.163-166, Mar, 1997.
44. LOZANO, M.M.S. **Estudo da propriedade de esterificação enantioselectiva da lipase de *Rhizopus* sp.** Campinas, 2001. 112p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
45. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
46. MACÊDO, G.A.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.M. Partial purification and characterization of na extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.90-95, Abr/Jun, 1997.
47. MACÊDO, G.A. **Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico.** Campinas, 1997. 143p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
48. MACRAE, A.R. Lipase - catalysed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.60, n.2, p.291-294, Feb, 1983.
49. MALISZEWSKA, I. ; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.14, n.3, p.190-193, Mar, 1992.

50. MARGOLIN, A.L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.15, p.266-280, 1993.
51. MEDEIROS, J.F. **Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.*** Campinas, 1999. 109 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
52. MENASSA, A; LAMBERT, G. **Le Lait**, v.62, p.32-43, 1982.
53. MENDIETA, O.W. **Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica.** Campinas, 1999. 152 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
54. MOCHIZUKI, M.; HIRANO, M.; KANMURI, Y.; KUDO, K.; TOKIWA, Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.55, n.2, p.289-296, Jan.1995.
55. NAHAS, E. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. **Journal General Microbiologic**, v.134, p.227-233, 1995.
56. NOTHENBERG, M. Enzimas retornam aos detergentes. **Química e Derivados**, v.283, p.08-13, 1991.
57. PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.43, n.1, p.42-51, Apr, 1995.
58. PARK, Y.K.; PASTORE, G.M.; ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by lipase system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.65, n.2, p.252-254, Feb, 1988.

59. PASTORE, G.M. **Produção e caracterização bioquímica e aplicações de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática.** Campinas, 1992. 249p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
60. PETROVIC, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. **Biotechnology Letters**, London, v.12, n.4, p.299-304, Apr,1990.
61. PHILIPS, A.; PRETORIUS, G.H.J. Purification and characterization an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biothechnology Letters**, London, v.13, n.11, p.833-838, Nov, 1991.
61. PIMENTEL, M.C.B. **Produção de lipases por fungos filamentosos: Estudos cinéticos e síntese de ésteres.** Campinas, 1996. p. Tese (Doutor em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
62. PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.O.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA, J.L.F. Lipase from brazilliam strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.49, n.1, p.59-74, Feb, 1994.
63. POSORSKE, L.H. Industrial - scale application of enzymes to the fats and oils industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.61, n.11, p.1758-1760, Nov, 1984.
64. RAO, P.V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration. **Process Biochemistry**, Essex, v.28, n.6, p.391-395, oct, 1993.
65. RAPP, P; BACHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.14, p.938-943, 1992.

66. RATLEDGE, C. Biodegradation and biotransformation of oils and fat- Introduction in mini-review: Compilation biodegradation and biotransformation of oils and fats. **Journal Chemistry Tecnology**, v.55, p.397-414, 1992.
67. RAZAFINDRALAMBO, H.; BLEKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; WATLELET, P.; SEVERIN, M. Improvement of enzymatic synthesis yield of flavour acetate: The example of isoamyl acetate. **Biotechnology Letters**, London, v.16, p.247-250, 1994.
68. RIVIERA-MUNHOZ, G.; TINOCO-VALENCIA, J.R.; SÁNCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, London, v.13, n.4, p.277-280, Apr,1991.
69. RODRIGUES, M.I. **Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas**. Campinas, 1993. 208p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
70. SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1388, p.337-348, 1998.
71. SANTOS, A.M.P. **Síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose por inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus***. Campinas, 2002. p. 230 Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
72. SCHMIDHALTER, D.R.; CANEVASCINI, G. Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.37, n.4, p.431-436, Jul, 1992.

73. SEITZ, E.W. Industrial application of microbial lipases: A Review. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, Champaign, v.51, n.2, p.12-16, Feb, 1974.
74. SHIEH, C.J.; AKOH, C.C.; KOEHLER, P.E. Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.6, p.619-623, June, 1995.
75. SHIEH, C.J.; AKOH, C.C.; YEE, L.N. Optimized enzymatic syntesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.51, n.3, p.371-374, Aug, 1996.
76. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long - chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.74, n.2, p.77-80, Nov, 1992.
77. SHINONAGA, M.A.; KAWAMURA, Y.; SHIMBO, K.; YAMANE, T. Continuous production of phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 immobilized with cross linked chitosan beads. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.81, n.4, p.310-314, Jan, 1996.
78. SIDEBOTTOM, C.M.; CHARTON, E.; DUNN, P.P.J.; MYCOCK, G.; DAVIES, C.; SUTTON, J.L.; MACRAE, A.R.; SLABAS, A.R. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. **European Journal of Biochemistry**, Zürich, v.202, n.2, p.485-491, Dec, 1991.
79. SIEDENBERG, D.; GERLACH, S.R.; WEIGEL, B.; SCHUGERL, K.; GIUSEPPIN, M.L.F.; HUNIK, J. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors: The influence of stirrer speed and phosphate concentration. **Journal of Biotechnology**, v.56, n.2, p.103-114, Aug, 1997.

80. SILVA-SANTISTEBAN, B.O.Y. **Efeito da agitação e aeração na produção de inulinase em processo de batelada simples por *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus***. Campinas, 2001. 90p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
81. SOUSA, R.N. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Alcaligenes* sp.** Campinas, 1996. 132p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
82. SOBERON-CHAVÉZ, G. & PALMEROS, B. Pseudomonas lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, n.2, p.95-105, 1994.
83. SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, London, v.11, n.12, p.895-898, Dec, 1989.
84. SZTAJER, H.; LUNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1124, n.3, p.253-261, Mar, 1992.
85. TAHOUN, M.K.; MOSTAFA, E.; MASHALEY, R.; ABOUDONIA, S. Lipase induction in *Geotrichum*. **Milchwissenschaft**, v.37, n.2, p.86-88, 1982.
86. TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKOMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.37, n.4, p.837-842, Apr, 1973.
87. VEERARAGAVAN, K.; COLPITTS, T.; GIBBS, B. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1044, n.1, p.26-33, May, 1990.

88. VORDERWÜLBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparasion of lipases by different assays. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, v.14, n.8, p.631-639, Aug, 1992.
89. VULFSON, E.N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low-water media. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.4, n.7, p.209-215, July, 1993.
90. WASE, D.J.; RAYMAHASAY,S.; WANG, C.W. Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091.**Enzyme Microbiology Technology**, New York, v.7, n.5, p.225-229, May, 1985.
91. WOOLEY, P.; PETERSON, S.B. **Lipases their structure production, Biochemistry and application**. Cap.12. Cambridge University Press, 1994.
92. YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of monoacylglycerol lipase and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.34, n.6, p.720-725, Mar, 1991.
93. YIN, P.; NISHINA, N.; KOSAKAI, Y.; YAHIRO, K.; PARK, Y.; OKABE, M. Enhanced production of L(+) – lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air lift bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.84, n.3, p.249-253, Jun, 1997.