

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

**ESTUDO DO MEIO DE CULTURA
PARA PRODUÇÃO DE LIPASE
POR *GEOTRICHUM* sp.**

Autora: Janaína Fernandes de Medeiros

Engenheira Química, UFRN, 1997

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Engenharia de Alimentos.

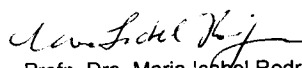
PARECER

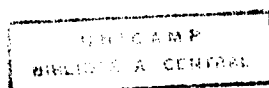
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Janaína Fernandes de Medeiros aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de fevereiro de 1999.

Campinas - SP

1999

Campinas, 08 de fevereiro de 1999


Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	
IMP.	37426
P.	229/99
C	[x]
P.R.	R\$ 11,00
DS	28/04/99
N.º C.F.O.	

CM-00122694-9

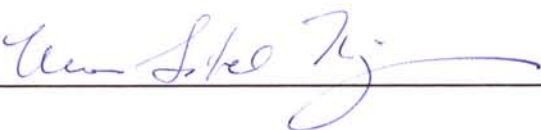
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M467e Medeiros, Janaína Fernandes de
Estudo do meio de cultura para produção de lipase
por *Geotrichum* sp. / Janaína Fernandes de Medeiros. --
Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

1. Fermentação. 2. Lipase. 3. *Geotrichum* sp. 4.
Planejamento experimental. 5. Superfície de resposta
(Estatística) I. Rodrigues, Maria Isabel. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

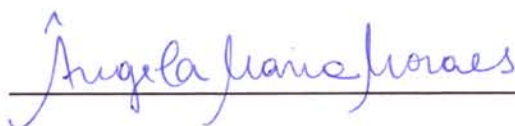
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Orientadora

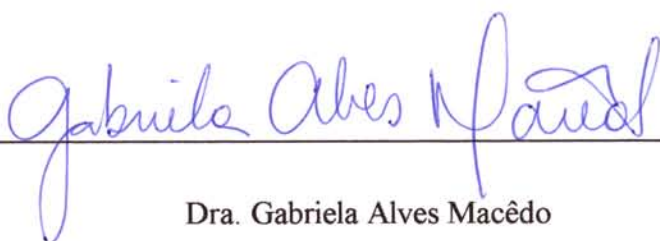
(FEA/DEA/UNICAMP)



Profa. Dra. Angela Maria Moraes

Membro

(FEQ/DPB/UNICAMP)



Dra. Gabriela Alves Macêdo

Membro

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Membro

(FEA/DEA/UNICAMP)

DEDICATÓRIA

Ao André, meu eterno amor.

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

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela energia presente em todos os momentos de minha vida.
- À Profª. Dra. Maria Isabel Rodrigues, pela orientação, amizade, ensinamentos e confiança demonstrados durante a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pelo apoio em muitos momentos de dúvidas, paciência e amizade que sempre foi possível contar.
- À Banca Examinadora, pela atenção, sugestões e correções.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro.
- Aos meus irmãos Kallen, Arildo Filho e Luanda, que mesmo de longe estavam torcendo por mim.
- A minha voinha Rita, pelo amor e carinho sempre demonstrados nos vários telefonemas.
- Ao meu avô Pedro, Chica preta, todos os tios, tias, primas e primos, pelo pensamento positivo sempre constante.
- Aos meus antigos irmãos de república: André, Cátia, Enilene, Gustavo, Jajá, Martinha, Rodolfinho e Osvaldinho, por todos os momentos compartilhados.
- À minha grande amiga Susana, pela amizade, sugestões e apoio demonstrados em muitas oportunidades.
- Aos amigos Alessandra, Aline, Álvaro, Cris, Eliana, Fábiana, Flávio, Freiria, Graziela, Kity, Lu, Luciana, Lucy, Marcelo, Mauro, Marió, Priscila e Rosi, pela amizade e por todos os momentos compartilhados.
- Aos amigos do laboratório de Bioengenharia, em especial Fifa, Lia, Eliana, Oscar, Belzinha e Yemiko, pela amizade, auxílio e sugestões no decorrer do trabalho.
- Aos colegas, funcionários e professores da FEA/UNICAMP.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	xii
Resumo.....	xiv
Summary.....	xv
1 - Introdução.....	1
2 - Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 - Considerações Gerais.....	3
2.2 - Aplicações de Lipases.....	4
2.3 - Produção da Enzima.....	7
2.3.1 - Microrganismos.....	7
2.3.2 - Fermentação em Superfície.....	10
2.3.3 - Fermentação Submersa.....	10
2.3.3.1 - Meio de Cultura.....	10
a) Fonte de Carbono.....	11
b) Fonte de Nitrogênio.....	12
2.3.3.2 - Condições Operacionais Para Produção de Lipase.....	13
2.3.3.3 - Outros Componentes do Meio de Cultura.....	14

2.4 - Indução na Produção de Lipase.....	15
2.5 - Especificidade de Lipase.....	16
2.6 - Purificação e Caracterização de Lipases Microbianas.....	18
2.7 - Estudos com Lipase Imobilizada.....	19
2.8 - Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta na Produção de Lipase e Suas Aplicações.....	20
2.9 - Comentários.....	23
3 - Materiais e Métodos.....	25
3.1 - Condução da Fermentação.....	25
3.1.1 - Microrganismo.....	25
3.1.2 - Meio do Inóculo	25
3.1.3 - Fermentação.....	25
3.2 - Métodos Analíticos.....	27
3.2.1 - Determinação da Atividade Lipolítica	27
3.2.1.1 - Preparo da Curva Padrão de Ácido Oléico.....	28
3.2.2 - Determinação da Concentração de Glicose Residual.....	28
3.2.2.1 - Preparo do reagente.....	29
3.2.2.2 - Preparo da Curva Padrão.....	29
3.2.2.3 - Preparo das amostras.....	29
3.2.2.4 - Interferentes.....	30

3.2.3 - Determinação da Massa Seca.....	30
3.3 - Planejamento Experimental.....	30
4 - Análise dos Resultados dos Planejamentos Experimentais para Otimização das Condições de Meio de Cultura na Produção de Lipase Utilizando Óleo de Oliva e Óleo de Soja em Frascos Agitados.....	33
4.1 - Primeiro Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Glicose, Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 , e Tipo de Óleo sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	33
4.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática de Lipase em Função do Tempo de Fermentação.....	35
4.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação.....	36
4.1.3 - Glicose Residual.....	38
4.1.4 - Massa Seca.....	38
4.1.5 - Análise dos Efeitos de Cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	39
4.2 - Estudo do Meio de Cultura Utilizando o Óleo de Oliva como Indutor na Produção de Lipase.....	41
4.2.1 - Segundo Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Oliva sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	41
4.2.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática de Lipase em Função do Tempo de Fermentação.....	43
4.2.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação..	44

4.2.1.3 - Massa Seca.....	45
4.2.1.4 - Produtividade.....	46
4.2.1.5 - Análise dos Efeitos de Cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	47
4.2.1.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta.....	48
4.2.2 - Terceiro Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Oliva sobre a Atividade Enzimática de Lipase (Níveis Modificados).....	53
4.2.2.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática de Lipase em Função do Tempo de Fermentação.....	55
4.2.2.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação..	56
4.2.2.3 - Massa Seca.....	58
4.2.2.4 - Produtividade.....	58
4.2.2.5 - Análise dos Efeitos de Cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	60
4.2.2.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta.....	61
4.3 - Estudo do Meio de Cultura Utilizando o Óleo de Soja como Indutor na Produção de Lipase.....	66
4.3.1 - Quarto Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Soja sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	66

4.3.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática de Lipase em Função do Tempo de Fermentação.....	68
4.3.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação..	69
4.3.1.3 - Massa Seca.....	71
4.3.1.4 - Produtividade.....	71
4.3.1.5 - Análise dos Efeitos de Cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	73
4.3.1.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta.....	74
4.3.2 - Quinto Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Soja sobre a Atividade Enzimática de Lipase (Níveis Modificados).....	79
4.3.2.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática de Lipase em Função do Tempo de Fermentação.....	81
4.3.2.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação..	82
4.3.2.3 - Massa Seca.....	84
4.3.2.4 - Produtividade.....	84
4.3.2.5 - Análise dos Efeitos de Cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase.....	86
4.3.2.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta.....	87
4.4 - Discussão e Comparação dos Resultados Obtidos para os Planejamentos Experimentais Realizados.....	92

4.4.1 - Comparação entre o Segundo Planejamento Experimental e o Quarto Planejamento Experimental.....	92
4.4.2 - Comparação Entre o Terceiro Planejamento Experimental e o Quinto Planejamento Experimental.....	93
5 - Conclusões.....	95
6 - Sugestões para Trabalhos Futuros.....	97
7 - Referências Bibliográficas.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases não específicas.....	17
Figura 2.2: Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases 1,3 específicas.....	18
Figura 4.1 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 11).....	35
Figura 4.1 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 12 ao 22).....	36
Figura 4.2 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 11).....	37
Figura 4.2 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 12 ao 22).....	37
Figura 4.3: Efeitos principais das variáveis do primeiro planejamento experimental.....	39
Figura 4.4 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	43
Figura 4.4 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	44
Figura 4.5 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	45
Figura 4.5 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	45
Figura 4.6 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	46

Figura 4.6 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	47
Figura 4.7: Efeitos principais das variáveis do segundo planejamento experimental.....	48
Figura 4.8: Valores observados <i>versus</i> valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o segundo planejamento experimental.....	50
Figura 4.9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática de lipase obtida no segundo planejamento experimental. (a) e (b) água de maceração de milho <i>versus</i> NH_4NO_3 com óleo de oliva a 1% (nível 0); (c) e (d) óleo de oliva <i>versus</i> NH_4NO_3 com água de maceração de milho a 4,5% (nível 0); (e) e (f) óleo de oliva <i>versus</i> água de maceração de milho com NH_4NO_3 a 0,5% (nível 0).....	52
Figura 4.10 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	55
Figura 4.10 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	56
Figura 4.11 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	57
Figura 4.11 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	57
Figura 4.12 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	59
Figura 4.12 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	59
Figura 4.13: Efeitos principais das variáveis do terceiro planejamento experimental.....	61

Figura 4.14: Valores observados <i>versus</i> valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o terceiro planejamento experimental.....	63
Figura 4.15: Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade enzimática de lipase obtidas no terceiro planejamento experimental. (a) e (b) água de maceração de milho <i>versus</i> NH_4NO_3 com óleo de oliva a 0,6% (nível 0); (c) e (d) óleo de oliva <i>versus</i> NH_4NO_3 com água de maceração de milho a 10% (nível 0); (e) e (f) óleo de oliva <i>versus</i> água de maceração de milho com NH_4NO_3 a 0,5% (nível 0).....	65
Figura 4.16 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	68
Figura 4.16 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	69
Figura 4.17 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	70
Figura 4.17 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	70
Figura 4.18 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	72
Figura 4.18 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	72
Figura 4.19: Efeitos principais das variáveis do quarto planejamento experimental.....	74
Figura 4.20: Valores observados <i>versus</i> valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o quarto planejamento experimental.....	76

Figura 4.21 (a): Superfície de resposta para atividade enzimática de lipase em função da concentração de água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 1%) para o quarto planejamento experimental.....	77
Figura 4.21 (b): Curva de contorno para atividade enzimática de lipase em função da concentração de água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 1%) para o quarto planejamento experimental.....	78
Figura 4.22 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	81
Figura 4.22 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	82
Figura 4.23 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	83
Figura 4.23 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	83
Figura 4.24 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).....	85
Figura 4.24 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).....	85
Figura 4.25: Efeitos principais das variáveis do quinto planejamento experimental.....	87
Figura 4.26: Valores observados <i>versus</i> valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o quinto planejamento experimental.....	90
Figura 4.27 (a): Superfície de resposta para atividade enzimática de lipase em função da concentração de água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 0,6%) para o quinto planejamento experimental.....	91

Figura 4.27 (b): Curva de contorno para atividade enzimática de lipase em função da concentração de água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 0,6%) para o quinto planejamento experimental.....	91
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Aplicações industriais da lipase.....	6
Tabela 2.2: Microrganismos produtores da lipase.....	9
Tabela 3.1: Composição do meio YM para manutenção do microrganismo.....	25
Tabela 3.2: Composição do meio de inóculo utilizando óleo de oliva.....	26
Tabela 3.3: Composição do meio de inóculo utilizando óleo de soja.....	26
Tabela 4.1: Tabela de níveis para as variáveis do primeiro planejamento experimental.....	33
Tabela 4.2: Primeiro planejamento experimental codificado.....	34
Tabela 4.3: Efeitos principais e de interações das variáveis do primeiro planejamento experimental em 9,67 horas de fermentação.....	40
Tabela 4.4: Tabela de níveis para as variáveis do segundo planejamento experimental.....	41
Tabela 4.5: Segundo planejamento experimental codificado.....	42
Tabela 4.6: Efeitos principais e de interações das variáveis do segundo planejamento experimental em 8 horas de fermentação.....	48
Tabela 4.7: Coeficiente de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 8 horas para o segundo planejamento experimental.....	49
Tabela 4.8: Tabela ANOVA para o segundo planejamento experimental.....	50
Tabela 4.9: Tabela de níveis para as variáveis do terceiro planejamento experimental.....	53
Tabela 4.10: Terceiro planejamento experimental codificado.....	54

Tabela 4.11: Efeitos principais e de interações das variáveis do terceiro planejamento experimental em 8 horas de fermentação.....	60
Tabela 4.12: Coeficiente de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase as 8 horas para o terceiro planejamento experimental.....	61
Tabela 4.13: Tabela ANOVA para o terceiro planejamento experimental.....	62
Tabela 4.14: Tabela de níveis para as variáveis do quarto planejamento experimental.....	66
Tabela 4.15: Quarto planejamento experimental codificado.....	67
Tabela 4.16: Efeitos principais e de interações das variáveis do quarto planejamento experimental em 7,5 horas de fermentação.....	73
Tabela 4.17: Coeficiente de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 8 horas para o quarto planejamento experimental.....	75
Tabela 4.18: Tabela ANOVA para o quarto planejamento experimental.....	76
Tabela 4.19: Tabela de níveis para as variáveis do quinto planejamento experimental.....	79
Tabela 4.20: Quinto planejamento experimental codificado.....	80
Tabela 4.21: Efeitos principais e de interações das variáveis do quinto planejamento experimental em 8,25 horas de fermentação.....	86
Tabela 4.22: Coeficiente de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 8 horas para o quinto planejamento experimental.....	88
Tabela 4.23: Tabela ANOVA para o quinto planejamento experimental.....	89

RESUMO

Enzimas lipolíticas como as lipases, presentes nos reinos animal e vegetal, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo e com a degradação de lipídios. A aplicação biotecnológica de microrganismos, enzimas livres ou imobilizadas, apresenta vantagens sobre as reações químicas tradicionais. Uma das principais vantagens destes processos é não requerer condições elevadas de temperatura e pressão. Dentre os processos utilizados nessas biotransformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese.

O interesse na produção de lipases microbianas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, devido ao seu amplo potencial de aplicações industriais como: aditivos em alimentos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), cosméticos (remoção de lipídios), farmacêutica (digestão de óleos e gorduras em alimentos), couro (remoção de lipídios da pele de animais) e médica (determinação de triglicerídeos no sangue).

Neste trabalho foi realizado um estudo para verificação da influência da fonte de carbono (glicose, óleo de oliva e óleo de soja) e da fonte de nitrogênio (nitrato de amônio e água de maceração de milho) na produção de lipase obtida da linhagem de *Geotrichum* sp. As fermentações foram conduzidas em frascos agitados a 30 °C e 120 rpm, retirando-se amostras ao longo do tempo para determinação da atividade lipolítica. Utilizou-se a metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para verificar os efeitos das variáveis em estudo e as condições que levavam a melhor atividade enzimática para o microrganismo estudado. Verificou-se que a glicose não apresentou nenhum efeito sobre a atividade de lipase, não sendo uma fonte de carbono que induza sua produção. No entanto, o óleo de soja mostrou-se um indutor tão eficiente quanto o óleo de oliva. As melhores condições encontradas utilizando o óleo de oliva foram: nitrato de amônio na faixa de 0,8% a 1%, água de maceração de milho na faixa de 13% a 15% e óleo de oliva a 0,6% atingindo aproximadamente 12 U/mL; e com o óleo de soja foram: nitrato de amônio na faixa de 2,1% a 2,5%, água de maceração de milho na faixa de 13% a 15% e óleo de soja a 0,6% alcançando valores em torno de 18 U/mL.

SUMMARY

Lypolytic enzymes, as lipases, can be found in animals, plants and microorganisms. They consist of an important group of enzymes related with lipid metabolism and degradation. Biotechnology applications of microorganisms, free and immobilized enzymes have some advantages in relation to chemical reactions. The main advantages of these processes are the mild temperature and pressure conditions.

The interest in microbial lipase production increased in the last decades, because of the large potencial in industrials applications as: aditives in foods (flavor modification), fine chemicals (synthesis of esters), detergents (hydrolysis of fats), waste water treatment (decomposition and removal of oily substances), cosmetics (removal of lipids), pharmaceuticals (digestion of oil and fats in foods), leather (removal of lipids of animal skins) and medicals (blood triglyceride assay).

In these work a study was carried out to verify the effect of the carbon source (glucose, olive oil and soy oil) and nitrogen source (ammonium nitrate and corn steep liquor) in lipase production obtained by *Geotrichum* sp. strain. The fermentations were realized in shaken-flasks at 30⁰ C and 120 rpm, with determination of lypolytic activity with the time. The experimental design and response surface analysis were employed to verify the effect of the variables and the conditions for the higher enzymatic activity. Glucose did not show any effect of induction in the lipase activity and was discarded as carbon source. However, both soy oil and olive oil were efficient inducers showing a similar effect. The best conditions for olive oil were: ammonium nitrate in the range of 0,8 - 1%, corn steep liquor in the range of 13 - 15% and olive oil 0,6% giving an activity of about 12 U/mL; and for soy oil were: ammonium nitrate in the range of 2,1 - 2,5%, corn steep liquor in the range 13 - 15% and soy oil 0,6% with an activity of about 18 U/mL.

1. - INTRODUÇÃO

A biotecnologia constitui um novo campo de atividade, impulsionado a partir da Segunda Guerra Mundial, pela indústria de antibióticos, tendo atualmente vasto potencial de aplicação (biofarmácia, agroalimentação, química, energia e meio ambiente).

Dentre os produtos biotecnológicos destacam-se as enzimas, que são biocatalisadores altamente específicos utilizados em biotransformações de substratos.

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.

As lipases são hoje intensamente estudadas pela possibilidade de serem produzidas em larga escala, pelo crescimento 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.

Foi realizada uma extensa revisão na literatura, verificando-se que não há nenhum estudo sistemático usando a técnica de Planejamento Experimental para otimização da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp.

A utilização do microrganismo *Geotrichum* sp. isolado por MACÊDO (1995) faz parte de um projeto de pesquisa PADCT. Sua importância reside no fato de estudar um microrganismo isolado pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos, que não se encontra disponível comercialmente, e que tem apresentado aplicações na produção de bioaromas conforme estudos apresentados por MACÊDO (1997).

Assim os objetivos deste trabalho foram: verificar a influência da glicose como fonte de carbono na produção da enzima; utilizar o óleo de soja como indutor para a produção da lipase comparando paralelamente ao óleo de oliva, por ser uma matéria prima economicamente mais viável; e estudar o nitrato de amônio e a água de maceração de milho (um subproduto da indústria de processamento de glicose de milho) como fontes de nitrogênio, em substituição as comumente utilizadas em meios sintéticos. Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados a 30 °C e 120 rpm.

Portanto, neste trabalho foram realizados os seguintes planejamentos experimentais, tendo como resposta a atividade enzimática de lipase ao longo da fermentação:

Primeiro Planejamento Experimental: $2^4 + 6$ pontos centrais totalizando 22 ensaios com as variáveis independentes glicose (0 a 1%), água de maceração de milho (2 a 6%), nitrato de amônia (0 a 0,75%) e tipo de óleo (1% de óleo de oliva ou 1% de óleo de soja).

Segundo Planejamento Experimental: $2^3 + 3$ pontos centrais totalizando 17 ensaios com as variáveis independentes água de maceração de milho (1 a 8%), nitrato de amônia (0 a 1%) e óleo de oliva (0,5 a 1,5%).

Terceiro Planejamento Experimental: $2^3 + 3$ pontos centrais totalizando 17 ensaios com as variáveis independentes água de maceração de milho (5 a 15%), nitrato de amônia (0 a 1%) e óleo de oliva (0,2 a 1%).

Quarto Planejamento Experimental: $2^3 + 3$ pontos centrais totalizando 17 ensaios com as variáveis independentes água de maceração de milho (1 a 8%), nitrato de amônia (0 a 1%) e óleo de soja (0,5 a 1,5%).

Quinto planejamento Experimental: $2^3 + 3$ pontos centrais totalizando 17 ensaios com as variáveis independentes água de maceração de milho (5 a 15%), nitrato de amônia (0,5 a 2,5%) e óleo de soja (0,2 a 1%).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

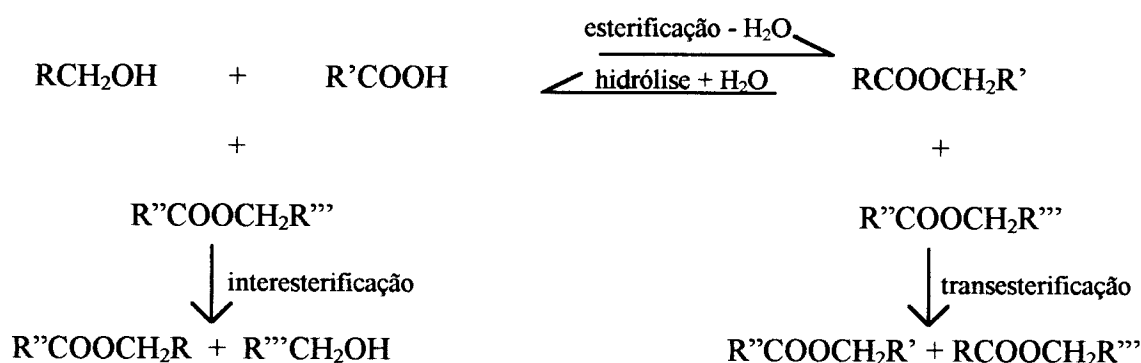
2.1 - Considerações Gerais

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. Essa 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 alii*, 1996).

Lipases microbianas têm sido ultimamente muito estudadas devido ao seu grande potencial nas aplicações industriais (detergentes, óleos e gorduras, laticínios e indústrias farmacêuticas) e à sua utilização como biocatalisadores em condições de baixa umidade, reações de esterificação e transesterificação (PIMENTEL *et alii*, 1994).

Segundo VULFSON (1993) as lipases agem sobre óleos e gorduras através da clivagem das ligações ésteres de glicerídeos, liberando ácidos graxos, monoglicerídeos ou diglicerídeos, ou ainda através das 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:



BORGSTON & BROCKMAN (1984), citados por CASTRO & ANDERSON (1995), relataram que, dependendo do microrganismo produtor de lipase, a massa molecular desta enzima pode variar na faixa de 20000 a 200000 Daltons, apresentando atividade enzimática numa ampla faixa de pH (4 - 9) e temperatura (25 - 70 °C).

2.2 - Aplicações de Lipases

SEITZ (1974) descreveu o uso comercial de lipases microbianas (*Alcaligenes viscolatis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Achromobacter lipolyticus*, *Propionia bacterium*, *Penicillium roquefort*) nas indústrias alimentícias, em especial na indústria de laticínios e na maturação de queijos, onde há o desenvolvimento de aromas.

A utilização de lipases microbianas em sistemas de detergentes foi relatada por SEITZ (1974). 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 para incorporação em sistemas detergentes e à estabilidade com surfactantes iônicos.

MACRAE (1983) relatou a obtenção de glicerídeos por via enzimática considerando a especificidade da lipase usada. Quando lipase não específica catalisa a interesterificação de uma mistura de triglicerídeos, o produto obtido será composto de triglicerídeos similares aos obtidos via reação química. No entanto, se lipase 1,3 específica for empregada, a migração acila será confinada às posições 1,3 do triglicerídeo. A interesterificação catalisada por lipase 1,3 específica do triglicerídeo 1,3-palmitol-2-monoleína (POP), que é a fração preponderante do óleo de dendê, com ácido esteárico, produz 1,3-palmitol-3,1-estearil-2-monoleína (POS) e 1,3-diestearil-2-monoleína (SOS), que são os dois principais componentes da manteiga de cacau. Conforme o autor, através da interesterificação enzimática é possível produzir um análogo da manteiga de cacau com matéria-prima de baixo custo.

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 em termos de energia e equipamentos utilizados e a diminuição dos custos relacionados ao tratamento de resíduos.

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 alii* (1992). A enzima G esterifica satisfatoriamente com 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.

A lipase produzida por *Penicillium citrinum* apresentou uma alta estabilidade à temperatura ambiente. Devido a esta característica, PIMENTEL *et alii* (1994) sugeriram a aplicação desta enzima na indústria de detergentes ou produtos que tenham alta estabilidade à temperatura ambiente.

A esterificação enzimática de ácido oléico em glicerol catalisada por lipase de *Geotrichum* sp. resultou na incorporação de 63% de ácido oléico após 2 horas de reação a 40 °C (MACÊDO, 1995).

Na tabela 2.1 pode ser verificada a aplicação industrial das lipases nas indústrias de alimentos, química, cosméticos, bebidas, papel, farmacêutica, couro, médica, de detergentes e tratamento de efluentes (CASTRO & ANDERSON, 1995).

Conforme PABAI *et alii* (1995) o uso de lipases microbiológicas para catalisar as reações de interesterificação tem despertado considerável interesse devido a certas vantagens sobre as catálises químicas.

Lipase produzida por *Pseudomonas fragi* CRDA 323 foi purificada e a fração IV foi utilizada para interesterificação de gordura de manteiga em sistema de microemulsões, contendo os surfactantes span 60 (Sorbitol Monoesterato) e tween 80 (Polioxietileno Sorbitol Monoesterato) na proporção de 48:52 (v/v), que modificam a tensão superficial do meio. A interesterificação da gordura de manteiga resultou na diminuição de ácidos graxos de cadeia

longa e saturada (C_{12} , C_{14} e C_{16}); e ao mesmo tempo foi verificado um aumento de C_{18} : 0 e C_{18} : 1 na posição Sn-2 do triglicerídeo selecionado (PABAI *et alii*, 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
Miscelânea	
•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

2.3.1 - Microrganismos

Uma grande variedade de microrganismos tem a habilidade de produzir lipases, sendo função de alguns parâmetros reacionais. Através da tabela 2.2 é possível observar alguns microrganismos produtores de lipase relatados pela literatura.

Uma nova enzima que hidrolisa mono e diacilglicerol produzidos por *Penicillium camembertii* foi isolada e estudada em relação às suas características bioquímicas. A lipase extracelular foi separada em duas formas (A e B), com pesos moleculares de 37000 e 39000 Daltons, respectivamente. A composição e a sequência terminal de aminoácidos foram semelhantes. A maior fração encontrada da lipase B foi purificada aproximadamente 210 vezes com uma recuperação de 2,6% (YAMAGUCHI & MASE, 1991).

De acordo com BHUSHAN & HOODAL (1994) a lipase produzida por uma levedura alcalofílica identificada como *Candida* BG-55 apresentou temperatura e pH ótimos de 40 °C e 8,5, respectivamente, e demonstrou estabilidade térmica quando incubada a 45 °C por 4 horas.

Vários trabalhos sobre lipase microbiana vêm sendo publicados pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do DCA/FEA/UNICAMP, dentre os quais podemos ressaltar a tese de Doutorado de PASTORE (1992), que 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, selecionando o *Trichoderma* sp. 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 glicerídeos, 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. e foi observado que a enzima esterificou cerca de 71% de monoglicerídeo após 40 horas de reação.

Uma linhagem brasileira de *Penicillium citrinum* foi investigada como produtora de lipase por PIMENTEL *et alii* (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 409 IU/mL. A temperatura ótima para atividade enzimática foi na faixa de 34 - 37 °C e após tratamento a 60 °C por 30 minutos a enzima foi completamente inativada. A lipase mostrou um pH ótimo igual a 8.

PABAI *et alii* (1995) isolaram e caracterizaram a lipase parcialmente purificada de *Pseudomonas fragi* CRDA 323. Esta linhagem foi isolada utilizando-se placas de ágar contendo rodamina B como indicador de atividade lipolítica. A produção de lipase ocorreu por fermentação em meio líquido. A maior atividade lipolítica (42%) foi obtida na fração IV, precipitada com 20 a 40% de saturação, obtendo uma purificação de 19 vezes.

Segundo MACÊDO (1995) a lipase produzida por *Geotrichum* sp. apresentou atividade ótima na faixa de pH entre 5 e 8, e foi estável entre 5 e 9. A temperatura ótima de atividade foi de 45 °C e após incubação a 50 °C por 1 hora reteve 95% de sua atividade.

Tabela 2.2 Microrganismos produtores de lipase

Microrganismo	Referência
<i>Alcaligenes sp.</i>	SOUSA (1996)
<i>Aspergillus niger</i>	HATZINIKOLAOU <i>et alii</i> (1996)
<i>Candida cylindracea</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Candida rugosa</i>	GELUK <i>et alii</i> (1992), GORDILLO <i>et alii</i> (1995), PASTORE (1992), RAO <i>et alii</i> (1993), SHIEH <i>et alii</i> (1995)
<i>Galactomyces geotrichum</i>	PHILIPS & PRETORIUS (1991)
<i>Geotrichum candidum</i>	BAILLARGEON <i>et alii</i> (1989 e 1990), JACOBSEN <i>et alii</i> (1989), SHIMADA <i>et alii</i> (1992), SIDEBOTTOM <i>et alii</i> (1991), TSUJISAKA <i>et alii</i> (1973), VEERARAGAVAN <i>et alii</i> (1990)
<i>Geotrichum sp.</i>	MACÊDO <i>et alii</i> (1997), MENDIETTA <i>et alii</i> (1997)
<i>Mucor miehei</i>	JENSEN <i>et alii</i> (1987)
<i>Penicillium camembertii</i>	YAMAGUCHI & MASE (1991)
<i>Penicillium citrinum</i>	MALISZEWSKA & MASTALERZ (1992), PIMENTEL <i>et alii</i> (1994)
<i>Penicillium restrictum</i>	FREIRE <i>et alii</i> (1997)
<i>Pseudomonas fragi</i> CRDA 323	PABAI <i>et alii</i> (1995)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HARRIS <i>et alii</i> (1990)
<i>Propionibacterium acnes</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Rhizopus delemar</i>	PARK <i>et alii</i> (1988), CRUZ <i>et alii</i> (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)

2.3.2. - Fermentação em Superfície

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.

A produção de lipase por *Candida rugosa* em meio sólido usando farelo de arroz como substrato foi estudada por RAO *et alii* (1993). Os meios otimizados através da técnica de Análise de Superfície de Resposta para produção de biomassa e produção de lipase foram, respectivamente: 0,25% uréia, 4,5% maltose e 15% de óleo e 0,5% uréia, 1,5% maltose e 7,5% óleo.

2.3.3. - Fermentação Submersa

2.3.3.1 - Meio de Cultura

A produção de lipase extracelular e intracelular de *Geotrichum candidum* foi investigada por JACOBSEN *et alii* (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 observada. 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 alii* (1989 B). O meio de cultura tinha a seguinte composição, por litro de água destilada: uréia, 3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2g; ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$, 1g; óleo de oliva, 10 g; goma arábica, 1g. A produção máxima de lipase extracelular aproximadamente 60 U/mL foi encontrada com 27 horas de incubação. Foi demonstrado um alto grau de heterogeneidade das lipases de *G. candidum* por técnicas imunoeletroréticas, indicando várias formas da enzima.

MACÊDO *et alii* (1997) estudou a produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação de lipases de *Geotrichum* sp. em frascos agitados. A linhagem especificada como *Geotrichum* sp. apresentou alta produção de lipase, aproximadamente 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.

Em um trabalho recente com o mesmo microrganismo citado anteriormente, MENDIETA *et alii* (1997) testaram 5 meios de cultivo para a produção de lipase, em fermentadores de bancada, e 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.

SOUSA (1996) realizou um “screening” de microrganismos e isolou uma linhagem de bactéria identificada como *Alcaligenes* sp., que apresentou alta produção de lipase alcalina em meio de cultivo 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 atingindo 9 U/mL após 72 horas de fermentação a 30°C.

a) Fonte de Carbono

Para o estudo da indução na formação de lipase por *Geotrichum candidum*, TSUJISAKA *et alii* (1973) cultivaram o microrganismo em um meio que continha 5% de peptona, 0,1% de NaNO_3 , 0,1% de MgSO_4 e 1% de glicose como fonte de carbono para o crescimento. Para a produção de lipase foi utilizada 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.

CRUZ *et alii* (1993) verificaram o uso de algumas fontes de carbono utilizadas industrialmente. Glicose, dextrina amarela e amidex foram testados como fonte de carbono, visando a produção de lipase por *Rhizopus delemar*. Os resultados mostraram que a dextrina amarela e o amidex forneceram melhores rendimentos para o processo.

Estudos da estabilidade e o efeito da concentração inicial de ácido oléico na produção de lipase por *Candida rugosa* foram relatados por GORDILLO *et alii* (1995). A concentração inicial da fonte de carbono, ácido oléico, teve 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 alii* (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%, que resultou numa atividade enzimática igual a 40,5 U/mL.

FREIRE *et alii* (1997) 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.

b) Fonte de Nitrogênio

Com a finalidade de estudarem a indução dos triglicerídeos e ácidos graxos na produção da lipase por *Geotrichum candidum* ATCC34614, SHIMADA *et alii* (1992) cultivaram a linhagem a 27 °C em meio que continha 5% de água de maceração de milho e 0,5% de NH_4NO_3 como fontes de nitrogênio, obtendo cerca de 80 U/mL de atividade enzimática de lipase.

Fontes de nitrogênio como o caseinato de sódio, pasta de soja, farinha de soja, extrato de levedura e casaminoácidos para a produção de lipase extracelular por *Rhizopus delemar* foram investigadas por CRUZ *et alii* (1993). Os resultados revelaram que 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 3,004 U/mL e 5,6 vezes com pasta de soja alcançando 3,675 U/mL.

Três fontes de nitrogênio para a produção de lipases por *Aspergillus niger* foram testadas. Fosfato de amônia, sulfato de amônia e peptona na concentração de 1% foram experimentadas. A melhor atividade lipolítica equivalente a 40,5 U/mL foi encontrada quando utilizou-se peptona como fonte de nitrogênio (HATZINIKOLAOU *et alii*, 1996).

Diferentes fontes de nitrogênio foram investigadas para a produção de lipases de *Penicillium restrictum* por FREIRE *et alii* (1997). Peptonas de carne, soja e caseína a 2% 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.

2.3.3.2 - Condições Operacionais Para Produção de Lipase

BAILLARGEON *et alii* (1989) investigaram 3 linhagens de *Geotrichum candidum* (ATCC 34614, NRRLY-552 e NRRLY-553) para produção de lipase. Variáveis como 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 lipases 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 alii* (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. A concentração celular máxima, 5,9 g.L⁻¹, foi obtida 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.

MACÊDO (1995) estudou a produção de lipase por *Geotrichum* sp., em frascos agitados, nas condições operacionais de 30 °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 °C. A atividade enzimática foi acrescida em 45% na presença de 1 mM de MgSO₄ no sistema de reação.

Para a produção de lipases por *Penicillium restrictum* FREIRE *et alii* (1997) pesquisaram as condições de aeração e agitação, em fermentadores de bancada com capacidade de 5 litros, a uma temperatura de 30° 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 uma atividade enzimática de 13 U/mL.

2.3.3.3 - Outros Componentes do Meio de Cultura

Estudando lipases extracelulares de *Geotrichum candidum*, VEERARAGAVAN *et alii* (1990) relataram que a presença de íons monovalentes (Na⁺ e K⁺) tiveram um pequeno efeito na atividade enzimática, enquanto que íons divalentes (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ e SO₄⁻) 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.

A presença de íons Fe⁺⁺⁺ e Hg⁺⁺ inibiu significativamente a lipase produzida por *Penicillium camembertii* U-150, segundo YAMAGUCHI & MASE (1991).

MALISZEWSKA & MASTALERZ (1992), estudando a produção de lipase por *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 SDS inibiram completamente a atividade da enzima.

Alguns agentes excretores foram testados por CRUZ *et alii* (1993). 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.

Conforme BHUSHAN & HOODAL (1994) a atividade de lipase produzida por *Candida* BG-55 foi fortemente ativada na presença de íons Ni^{++} e Ca^{++} na concentração de 10 mM. Por outro lado, os íons Fe^{++} e Fe^{+++} na mesma concentração inibiram significativamente a atividade lipolítica da enzima.

2.4 - Indução na Produção de Lipase

A indução da formação de lipase de *Geotrichum candidum* foi estudada por TSUJISAKA *et alii* (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 alii* (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 cáprico. 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 base. 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

Segundo MACRAE (1983) a habilidade para produzir novas misturas de triglicerídeos usando lipases específicas é de interesse da indústria de óleos e gorduras, porque alguns compostos assim produzidos têm propriedades adequadas para determinadas finalidades.

PARK *et alii* (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 nas seguintes porcentagens: 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 alii* (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. Denominaram lipase I e II (ATCC 34614) e lipase A e B (CMICC 335426), que são enzimas 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 alii*, 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 alii* (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 significa 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 NH_2 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 PABAI *et alii* (1995) as lipases podem ser divididas em 3 grupos: não específicas, 1,3 específicas e ácido graxo específicas.

As lipases não específicas catalisam a hidrólise completa de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol em qualquer posição da estrutura do grupo acil. Como exemplos de enzimas desta classe são as produzidas por *Candida cylindracea* e *Staphylococcus curveus*.

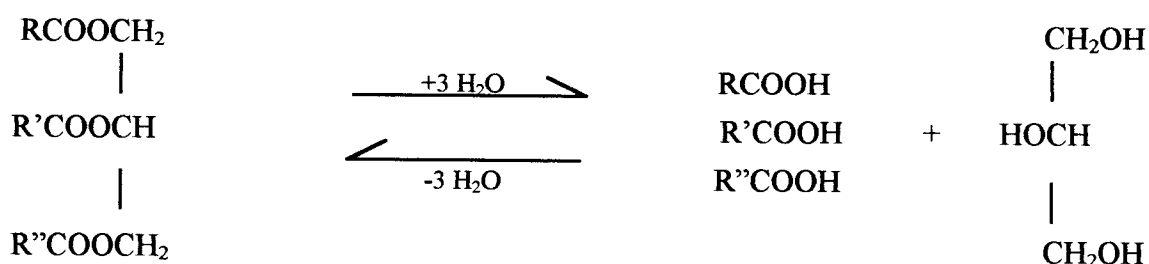


Figura 2.1: Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases não específicas.

As lipases 1,3 específicas catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados na posição 1,3 do triacilglicerol resultando na formação de ácidos graxos livres, 1,2 (2,3)-diacilglicerol e 2-monoacilglicerol. Neste grupo estão as lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas fragi* e *Mucor miehei*.

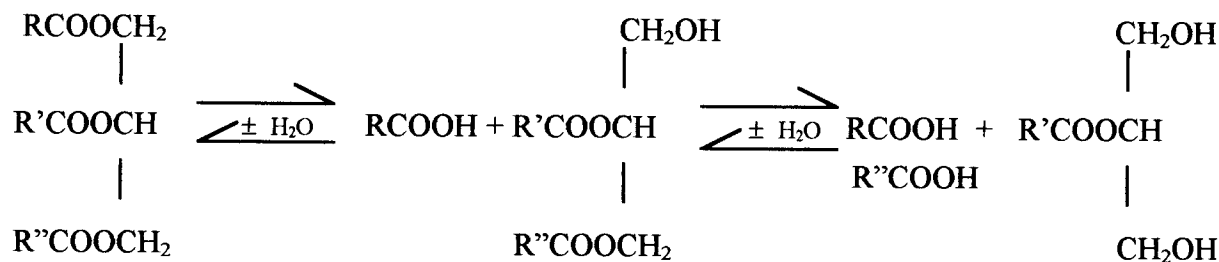


Figura 2.2: Reação de hidrólise de triglicerídeo com lipases 1,3 específicas.

As lipases ácido graxo específicas são específicas para hidrólise de ésteres com ácidos graxos. Como exemplo, a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturada com dupla ligação *cis* no C₉.

2.6 - Purificação e Caracterização de Lipases Microbianas

A purificação de lipase extracelular e intracelular de *Geotrichum candidum* foi investigada por JACOBSEN *et alii* (1989) utilizando técnicas de eletroforese, e concluíram que a lipase intracelular era idêntica à lipase extracelular purificada.

De acordo com BAILLARGEON *et alii* (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 alii* (1990). A purificação incluiu a precipitação com etanol e sucessivas cromatografias com Sephacryl-200 HR, resina aniônica (mono Q) e PBE 94. 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 tiveram valores de pH ótimo de 6 e 6,8 e pontos isoeletrícos de 4,56 e 4,46. As enzimas foram 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. O processo de purificação incluiu uma ultrafiltração e cromatografias em colunas de Phenyl-Sepharose e DEAE-Sepharcel. 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 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 amônio e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50. A enzima apresentou atividade ótima na faixa de pH 5-8 a 45 °C (MACÊDO, 1995).

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 foram realizadas. 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 - Estudos com Lipase Imobilizada

JENSEN *et alii* (1987) estudaram lipases livres e imobilizadas produzidas por *Mucor miehei*. O processo de imobilização utilizado foi a adsorção e os estudos revelaram que a imobilização alterou a especificidade da enzima.

Lipase bruta e purificada de *Candida rugosa* foi imobilizada em celulose microcristalina. A quantidade máxima de enzima adsorvida foi de 0,2 mg/m², sendo obtida em um pH próximo ao ponto isoeletrico (4,2). A pequena quantidade de enzima adsorvida foi devido ou à superfície heterogênea ou à superestimação da área superficial. Melhor adsorção foi obtida com suportes mais hidrofóbicos que a celulose, pois a lipase mostrou ser uma proteína hidrofóbica. A atividade da lipase bruta adsorvida foi similar à lipase pura adsorvida (GELUK *et alii*, 1992).

A aplicação de lipases imobilizadas para a hidrólise de fosfatidilcolina foi relatada por HASS *et alii* (1993).

Segundo SHIEH *et alii* (1995), lipases imobilizadas foram utilizadas para modificarem a composição de ácidos graxos, produzindo lipídios estruturados.

2.8 - 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 alii*, 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).

HARRIS *et alii* (1990), utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), estudaram as variáveis independentes temperatura do meio (8 a 41°C), 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 de leite desnatado (NFDM: 10%, Fleming Co.). As condições ótimas deste estudo foram determinadas como: temperatura de 25 °C, 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 na produção da enzima.

A produção de lipase por *Candida rugosa* na fermentação em meio sólido, usando farelo de arroz como substrato, foi investigada por RAO *et alii* (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 condições ótimas do meio, através da Análise de Superfície de Resposta, cujos valores encontrados 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.

CRUZ *et alii* (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 2^{7-4} possibilitou o estudo das seguintes variáveis: dextrina amarela (5 a 15 g/L), pasta de soja (5 a 15 g/L), KNO_3 (1 a 3 g/L), MgSO_4 (0,25 a 0,75 g/L), K_2HPO_4 (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) e permitiu a determinação dos componentes que tinham efeito na produção de lipase, bem como o ajuste de suas concentrações. Um planejamento experimental 2^{6-3} foi usado para um teste da presença de um outro ingrediente, o tween 80. A composição do meio otimizado foi, em g/L: Dextrina amarela, 6; pasta de soja, 11; KNO_3 , 2,5; MgSO_4 , 0,5; K_2HPO_4 , 1; óleo de oliva 10 mL/L; traços de elementos, 1 mL/L e tween 80 2,3 mL/L. A otimização do meio possibilitou um incremento de 12 vezes na atividade enzimática após 2 dias de cultivo, em frascos agitados, a 150 rpm em uma temperatura de 29 °C, alcançando 15 U/mL.

A habilidade de lipases imobilizadas modificarem a composição de ácidos graxos com a finalidade de produzir lipídios estruturados foi relatada por SHIEH *et alii* (1995). Através de um planejamento experimental fracionário 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 alii* (1996) determinaram a atividade ótima 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 alii* (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.

2.9 - Comentários

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) até as condições operacionais como pH, temperatura, agitação e aeração. Portanto, é de grande valia estudos sistemáticos, como é o caso da metodologia do Planejamento Experimental, para a definição de variáveis importantes para obter as condições ótimas de produção da lipase, bem como o estudo da utilização de outras fontes de nitrogênio, carbono e outros indutores.

No planejamento experimental inicial foram testadas concentrações dos componentes do meio de cultura com base nos dados apresentados por MENDIETA *et alii* (1997), que observaram para o microrganismo em estudo uma melhor atividade enzimática de lipase em um meio de cultura contendo água de maceração de milho, nitrato de amônia e óleo de oliva, quando comparado a resultados obtidos por MACÊDO *et alii* (1997), que produziu a enzima lipase utilizando o mesmo microrganismo na presença de farinha de soja desengordurada, farinha de trigo, extrato de levedura e nitrato de amônia.

A glicose foi utilizada como fonte de carbono para o crescimento celular do *Geotrichum* sp., baseado em TSUJISAKA *et alii* (1973), que pesquisaram um microrganismo do mesmo gênero e verificaram um bom crescimento celular na presença de 1% de glicose. O uso do óleo de oliva mostrou-se um eficiente indutor na produção de lipase aumentando significativamente a atividade enzimática, conforme TSUJISAKA *et alii* (1973) e FREIRE *et alii* (1997). Portanto, foram testados níveis de concentração de óleo de oliva em faixas que englobavam as concentrações indicadas. Como alternativa, mais viável economicamente, também foi testado como indutor na produção da enzima o óleo de soja.

Diferentes fontes de nitrogênio são descritas na literatura, como pode-se observar nos trabalhos de MACÊDO *et alii* (1997), que utilizaram extrato de levedura e nitrato de amônia, e HATZINIKOLAOU *et alii* (1996), que testaram fosfato de amônia, sulfato de amônia e peptona. No entanto, SHIMADA *et alii* (1992) usando a água de maceração de milho e o nitrato de amônia como fontes de nitrogênio para o *Geotrichum candidum* alcançaram níveis de produção de lipase superiores aos anteriormente citados. Portanto, no meio de cultura testado durante este trabalho utilizou-se nitrato de amônia e a água de maceração de milho, subproduto da indústria de processamento de glicose de milho, que, além de ser fonte de nitrogênio, em sua composição encontra-se vitaminas, sais minerais e aminoácidos necessários aos microrganismos.

As condições operacionais escolhidas para a produção de lipase por *Geotrichum* sp., em frascos agitados, foram 120 rpm e 30 °C, que estão de acordo com as recomendadas por MACÊDO (1995).

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais utilizados para o estudo da otimização do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp.

3.1 - Condução da Fermentação

3.1.1 - Microrganismo

Utilizou-se uma linhagem da levedura *Geotrichum* sp., isolada por MACÊDO (1995) no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Esta linhagem foi escolhida por ter sido considerada uma boa produtora de lipase e por este microrganismo ser usado em um projeto PADCT (Produção e Purificação de lipase), envolvendo os laboratórios de Bioquímica de Alimentos/DCA/FEA, Bioengenharia/DEA/FEA e Otimização, Projeto e Controle Avançado/FEQ da UNICAMP. Portanto, é relevante citar que o trabalho realizado foi uma das etapas deste projeto.

As linhagens das culturas foram mantidas em tubos de ensaios inclinados contendo meio YM (yeast malt agar) a 4⁰C, imersas em óleo mineral. A composição do meio YM está descrita na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição do meio YM para manutenção do microrganismo.

Componentes	gL ⁻¹
Glicose	10
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5

3.1.2 - Meio do Inóculo

O preparo do inóculo foi padronizado através da transferência asséptica da cultura em YM para 20 mL de água destilada estéril, sendo um volume de 5 mL desta suspensão de células distribuído em 3 *erlenmeyers* aletados de 1000 mL com um volume ocupado de 200 mL de meio de cultura. De acordo com o planejamento experimental adotado, foram utilizados

dois tipos de meios para inóculo diferentes, cujas composições estão descritas nas tabelas 3.2 e 3.3 (MENDIETA *et alii*, 1997).

Tabela 3.2: Composição do meio de inóculo utilizando óleo de oliva.

Componentes	Composição Percentual (% p/v)
Água de maceração de milho	5
Nitrato de amônio	0,5
Óleo de oliva	1

Tabela 3.3: Composição do meio de inóculo utilizando óleo de soja.

Componentes	Composição Percentual (% p/v)
Água de maceração de milho	5
Nitrato de amônio	0,5
Óleo de soja	1

Os componentes dos meios de cultura foram diluídos com água destilada e esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

Os *erlenmeyers* foram incubados na temperatura de 30°C em *shaker* a 120 rpm. Após 24 horas os meios fermentados foram transferidos para um frasco estéril e homogeneizados, utilizando-se como inóculo na fermentação.

Para os óleos de oliva e soja foram utilizadas marcas comerciais (Galo e Liza, respectivamente), a água de maceração de milho foi obtida através de doação da empresa Refinações de Milho Brasil LTDA, situada em Mogi Guaçu - SP, e os demais reagentes usados foram de grau analítico.

3.1.3 - Fermentação

Nas fermentações realizadas, como fontes de carbono foram utilizados a glicose (para o crescimento do microrganismo), o óleo de oliva ou o óleo de soja (para produção da enzima).

A água de maceração de milho foi usada como fonte de nitrogênio orgânico e o NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio inorgânico.

As composições dos meios de cultura para produção de lipase foram estabelecidas segundo os planejamentos experimentais apresentados nos itens 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.6 e 4.1.7. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Aos meios de cultura foram adicionados 10% de inóculo (v/v), preparado conforme descrito no item 3.1.2, e as fermentações foram acompanhadas durante aproximadamente 54 horas a 30°C . Os ensaios foram conduzidos em frascos agitados aletados de 500 mL com um volume de trabalho de 200 mL.

As amostras foram coletadas próximo às 8, 24, 32, 48 e 54 horas de fermentação para o acompanhamento de pH, a determinação da atividade enzimática de lipase, a determinação de glicose residual e massa seca final.

3.2 - Métodos Analíticos

3.2.1 - Determinação da Atividade Lipolítica

Na determinação da atividade lipolítica foi adotado o método utilizando goma arábica segundo MACÊDO (1995). 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 2 mL de tampão fosfato 10 mM com pH 7,0 e 5 mL de emulsão preparada com 75% de goma arábica a 7% e 25% de óleo de oliva v/v. A este sistema foi acrescentado 1 mL do meio cultivado e incubado em banho-maria (Dubnoff Modelo 145) termostatizado a 37°C por 30 minutos, com agitação recíproca (MACÊDO, 1995).

Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

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.

O cálculo da atividade da enzima foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oleico.

3.2.1.1 - Preparo da Curva Padrão de Ácido Oléico

Para determinação da curva padrão de ácido oléico foi utilizado 1 mL de amostras contendo concentrações de 0,04 a 0,7 g de ácido oléico; 2 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7; 5 mL de emulsão preparada com 75% de goma arábica a 7% e 25% de óleo de oliva v/v, as quais foram colocadas em *erlenmeyers* aletados de 250 mL, com pérolas de vidro, para melhor homogeneização, e foram incubadas a 30 °C em *shaker* por 15 minutos. A mistura foi dissolvida com 15 mL de solução de acetona:etanol 1:1 v/v e titulada com solução de NaOH 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Obteve-se uma curva padrão para cada lote de NaOH 0,05 N preparado. As equações 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 correlacionam a concentração de ácido oléico e o volume de NaOH 0,05 N gasto na titulação:

$$\mu\text{mol de ácido oleico} = 33,373 + 50,530 * \text{Volume de NaOH 0,05 N (mL)} \quad R = 0,99 \quad (3.1)$$

$$\mu\text{mol de ácido oleico} = -38,119 + 46,569 * \text{Volume de NaOH 0,05 N (mL)} \quad R = 0,99 \quad (3.2)$$

$$\mu\text{mol de ácido oleico} = -56,067 + 49,723 * \text{Volume de NaOH 0,05 N (mL)} \quad R = 0,98 \quad (3.3)$$

$$\mu\text{mol de ácido oleico} = -51,968 - 63,512 * \text{Volume de NaOH 0,05 N (mL)} \quad R = 0,99 \quad (3.4)$$

Onde R é o coeficiente de correlação.

3.2.2 - Determinação da Concentração de Glicose Residual

Para determinação da glicose residual na fermentação utilizou-se o método enzimático glicose-oxidase (Kit de glicose da marca Laborlab S/A).

3.2.2.1 - Preparo do Reagente

O reagente foi obtido pela diluição em água deionizada de três soluções - reativo enzimático (enzimas glicose-oxidase e peroxidase), reativo de cor 1 (4 aminofenazona e tampão tris) e reativo de cor 2 (fenol) - nas proporções indicadas no catálogo. Este reagente é estável por 1 mês, quando refrigerado e acondicionado em frasco âmbar.

3.2.2.2 - Preparo da Curva Padrão

A relação entre a concentração de glicose e a densidade ótica é linear até a concentração de $4,5 \text{ gL}^{-1}$, portanto as concentrações de glicose para preparo da curva padrão foram inferiores a esses valores.

Adicionou-se 5 mL de reativo de trabalho a tubos de ensaio contendo 50 μL de soluções de glicose em concentrações de 0,6 a $2,0 \text{ gL}^{-1}$. Preparou-se ainda um branco com 5 mL do reagente de trabalho sem adição de glicose para zerar a absorbância. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-maria a 37°C , e em seguida fez-se leitura em espectrofotômetro (Micronal digital B34211) a 505 nm. A cor é estável por 60 minutos.

Obteve-se uma curva padrão que correlacionou a concentração de glicose (gL^{-1}) e a densidade ótica utilizada para determinar a glicose residual nas fermentações.

$$\text{Concentração de glicose} = - 0,0492 + 3,4837 * \text{DO} \quad (3.5)$$

$$\text{Coeficiente de correlação } R = 0,9971$$

3.2.2.3 - Preparo das amostras

Após realizada as diluições necessárias, de modo que a concentração final estivesse dentro da faixa utilizada na construção da curva padrão, colocou-se em um tubo de ensaio 50 μL de amostra adicionando-se 5 mL de reativo padrão. Para cada amostra foi feito um branco com 5 mL do reagente de trabalho para zerar a absorbância. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-maria a 37°C , e em seguida foi feita a leitura a 505 nm.

A concentração de glicose em cada amostra foi determinada a partir da equação 3.5.

3.2.2.4 - Interferentes

Os detergentes, metais pesados e cianetos são inibidores enzimáticos, sendo necessária uma eficiente limpeza da vidraria utilizada. A preparação do reativo de trabalho requer água deionizada ou destilada recentemente. O nível de água no banho-maria deve ser superior aos dos tubos de ensaio que contêm as reações, sendo que a temperatura e o tempo de reação não são críticos, podendo variar entre $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 10 a 12 minutos (GUIDOLIN, 1998).

3.2.3 - Determinação da Massa Seca

Para determinação da massa seca foi utilizado o método de peso constante.

Pesou-se um volume conhecido do caldo fermentado, centrifugou-se a 12000 rpm durante 20 minutos em centrífuga SORVALL modelo RC 26 PLUS. O centrifugado foi lavado uma vez com água destilada e depois ressuspenso em um volume pequeno de água destilada e seco em estufa a 100°C numa placa de Petri previamente tarada, até atingir peso constante (HENRIETTE *et alii*, 1993).

3.3 - Planejamento Experimental

Neste trabalho os ensaios foram realizados segundo planejamentos experimentais fatoriais para análise dos efeitos das variáveis independentes (glicose, água de maceração de milho, nitrato de amônio, óleo de oliva e óleo de soja) na atividade lipolítica em função do tempo de fermentação.

Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada, executando-se experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n (BOX *et alii*, 1978).

Com os resultados obtidos do planejamento é possível avaliar os efeitos principais e de interações das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1ª ordem, correlacionando as variáveis respostas.

Se o modelo de 1ª ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais, é possível completar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais 2n ensaios segundo configuração “estrela”, para obter um modelo quadrático ou de 2ª ordem.

A condição correspondente à intermediária entre os 2 níveis (+1 e -1) atribuídos a cada variável é denominada nível zero ou ponto central. A realização de experimentos nestas condições permite a estimativa do erro experimental associado aos ensaios, muito importante para verificar o quão reprodutivo é o processo estudado.

Esta metodologia é útil para uma redução no número de experimentos práticos a serem realizados, minimizando tempo e custos operacionais, além de se obter uma análise mais racional dos resultados baseada nas probabilidades estatísticas.

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental de 1ª ordem em 2 níveis (nível -1 e nível +1) mais os pontos centrais, totalizando 22 ensaios distintos ($2^4 + 6$ pontos centrais), com o objetivo de verificar a influência da concentração de glicose na faixa de 0 a 1% (fonte de carbono para o crescimento do microrganismo), concentração de água de maceração de milho na faixa de 2 a 6% (fonte de nitrogênio orgânico e outros nutrientes), concentração de NH_4NO_3 na faixa de 0 a 0,75% (fonte de nitrogênio inorgânico) e o tipo de óleo (fonte de carbono e indutor para a produção da enzima), onde foi testado 1% de óleo de oliva ou 1% de óleo de soja.

Com a análise dos resultados do primeiro planejamento foi possível elaborar mais 4 planejamentos experimentais completos (5 níveis), com três variáveis independentes. Dois planejamentos experimentais tiveram por objetivo o estudo do efeito da concentração de óleo de oliva, nitrato de amônia e água de maceração de milho e os demais concentração de óleo de soja, nitrato de amônia e água de maceração de milho, realizando-se 17 ensaios em cada planejamento.

No segundo e terceiro planejamento experimental foram estudadas, respectivamente, as concentrações da água de maceração de milho na faixa de 1 a 8% e 5 a 15%, nitrato de amônia de 0 a 1% e óleo de oliva de 0,5 a 1,5% e 0,2 a 1%.

No quarto e quinto planejamento experimental foram estudadas, respectivamente, as concentrações de água de maceração de milho de 1 a 8% e 5 a 15%, nitrato de amônia de 0 a 1% e 0,5 a 2,5% e óleo de soja de 0,5 a 1,5% e 0,2 a 1%.

Todos os planejamentos tiveram como resposta a atividade enzimática de lipase em função do tempo de fermentação, sendo que as análises foram feitas em duplicata segundo o procedimento descrito no item 3.2.1. Ainda foram realizadas, em duplicatas, a análise de glicose residual utilizando o método estabelecido no item 3.2.2., a análise de massa seca conforme o item 3.2.3 e o acompanhamento do pH (Mettler Toledo 320 pHmeter).

4. - ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO ÓLEO DE OLIVA E ÓLEO DE SOJA EM FRASCOS AGITADOS

Neste item serão discutidos os resultados obtidos com os planejamentos experimentais fatoriais visando a otimização do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum* sp. em frascos agitados.

4.1 - Primeiro Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Glicose, Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Tipo de Óleo sobre a Atividade Enzimática de Lipase

Neste planejamento experimental as variáveis independentes estudadas foram: concentração de glicose, concentração de água de maceração de milho, concentração de NH_4NO_3 e tipo de óleo, para verificar se havia diferença significativa entre o uso do óleo de oliva e o óleo de soja, visando diminuir os custos do meio de cultura. A resposta avaliada foi a atividade enzimática de lipase no decorrer da fermentação, sendo também realizado o acompanhamento do pH e a determinação da massa seca final.

Os valores reais (descodificados) utilizados nos ensaios deste planejamento estão apresentados na tabela 4.1 com os seus respectivos níveis codificados, e o planejamento experimental está apresentado na tabela 4.2.

Tabela 4.1: Tabela de níveis para as variáveis do primeiro planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
% Glicose	0	0,5	1
% Água de maceração de milho	2	4	6
% NH_4NO_3	0	0,375	0,75
Tipo de óleo	1% óleo de soja	tipo	1% óleo de oliva

O nível 0 para a variável tipo de óleo significa 1% de óleo de oliva ou 1% de óleo de soja, ou seja, foram realizados três pontos centrais com 1% de óleo de oliva e mais três pontos centrais com 1% de óleo de soja.

4.2: Primeiro planejamento experimental codificado.

Ensaio	Glicose	AMM*	NH ₄ NO ₃	Tipo de óleo	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	pH	pH	pH	pH	Glicose Residual (g/L)	Massa Seca (g/100g)
					(U/mL) T=9,67 h	(U/mL) T=24,25 h	(U/mL) T=33,5 h	(U/mL) T=48,5 h	T=9,67 h	T=24,25 h	T=33,5 h	T=48,5 h		
1	-1	-1	-1	-1	7,96	9,77	8,69	9,53	3,94	4,21	4,22	4,16	0,00	0,84
2	+1	-1	-1	-1	2,71	2,30	2,06	2,36	3,37	3,30	3,16	3,40	0,00	0,85
3	-1	+1	-1	-1	6,67	7,37	6,47	8,15	3,80	3,88	3,96	4,14	0,00	0,66
4	+1	+1	-1	-1	4,29	4,05	3,76	4,94	3,48	3,38	3,30	3,45	0,00	1,11
5	-1	-1	+1	-1	8,60	9,86	8,38	5,49	3,83	3,80	3,75	3,39	0,00	0,84
6	+1	-1	+1	-1	4,87	5,12	6,05	4,74	3,48	3,17	3,13	2,58	1,80	0,71
7	-1	+1	+1	-1	6,96	8,69	8,46	11,18	3,78	3,78	3,72	4,06	0,00	1,26
8	+1	+1	+1	-1	7,26	6,77	6,54	6,50	3,46	3,10	2,98	2,97	0,00	0,96
9	-1	-1	-1	+1	8,51	8,84	7,68	8,66	3,96	4,07	4,31	4,36	0,00	0,64
10	+1	-1	-1	+1	3,29	1,75	2,33	2,36	3,32	3,33	3,17	3,53	0,00	0,84
11	-1	+1	-1	+1	7,45	8,88	9,19	12,77	3,83	4,11	4,43	5,00	0,00	1,27
12	+1	+1	-1	+1	4,53	3,90	4,45	8,20	3,42	3,40	3,37	3,96	0,00	1,30
13	-1	-1	+1	+1	9,13	8,79	9,44	10,31	3,86	4,03	4,26	4,22	0,00	2,26
14	+1	-1	+1	+1	5,87	5,01	4,35	4,09	3,41	3,25	2,94	2,63	0,70	0,80
15	-1	+1	+1	+1	8,45	8,60	8,13	9,44	3,75	3,83	3,92	4,20	0,00	0,68
16	+1	+1	+1	+1	7,26	6,88	6,22	6,53	3,50	3,29	3,14	3,25	0,00	0,80
17(C)	0	0	0	0	7,09	6,34	5,79	5,82	3,67	3,62	3,58	3,62	5,00	0,88
18(C)	0	0	0	0	6,95	6,29	5,79	5,72	3,70	3,66	3,60	3,63	5,00	0,92
19(C)	0	0	0	0	6,81	6,26	5,70	5,56	3,67	3,65	3,57	3,62	5,00	0,77
20(C)	0	0	0	0	4,77	6,18	6,12	6,55	3,74	3,70	3,62	3,66	5,00	0,75
21(C)	0	0	0	0	6,18	5,62	5,62	6,96	3,59	3,65	3,60	3,79	5,00	1,18
22(C)	0	0	0	0	6,05	5,53	6,01	6,14	3,68	3,69	3,60	3,68	5,00	1,00

* AMM - Água de maceração de milho

4.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

A produção de lipase foi observada através do acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação, como mostrado nas figuras 4.1 (a), para os ensaios 1 ao 11, e 4.1 (b) para os ensaios 12 ao 22. Durante as 8 primeiras horas de fermentação os diferentes ensaios apresentaram um incremento significativo na atividade enzimática, praticamente cerca de 80% da máxima atividade enzimática alcançada para a maioria dos ensaios experimentais.

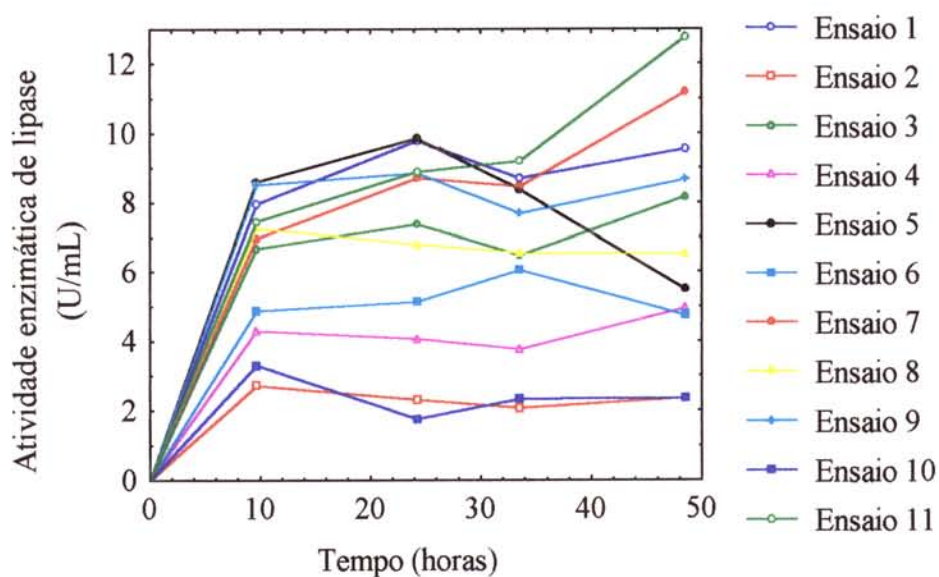


Figura 4.1 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 11).

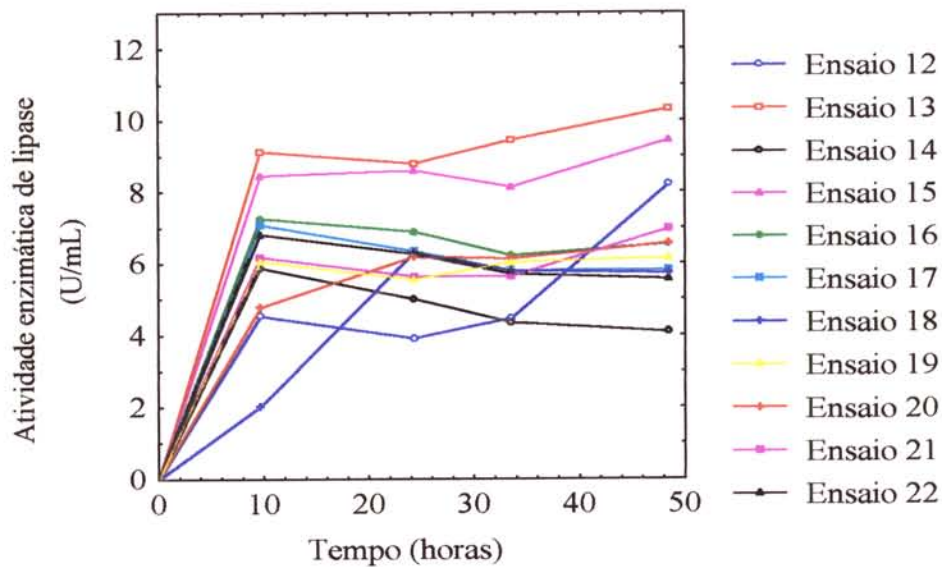


Figura 4.1 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 12 ao 22).

Através do acompanhamento da atividade enzimática, foi verificado que todos os ensaios que continham a glicose apresentaram atividade enzimática inferior quando comparados com os ensaios de composição similares sem a presença da glicose.

4.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação

A evolução do pH está apresentada nas figuras 4.2 (a), para os ensaios 1 ao 11, e 4.2 (b) para os ensaios 12 ao 22. O pH apresentou uma tendência de aumento no decorrer do tempo para os ensaios que não têm a glicose em sua composição, e uma tendência de decréscimo para os ensaios com a presença da glicose, comportamento esse que pode estar associado ao decréscimo da atividade enzimática.

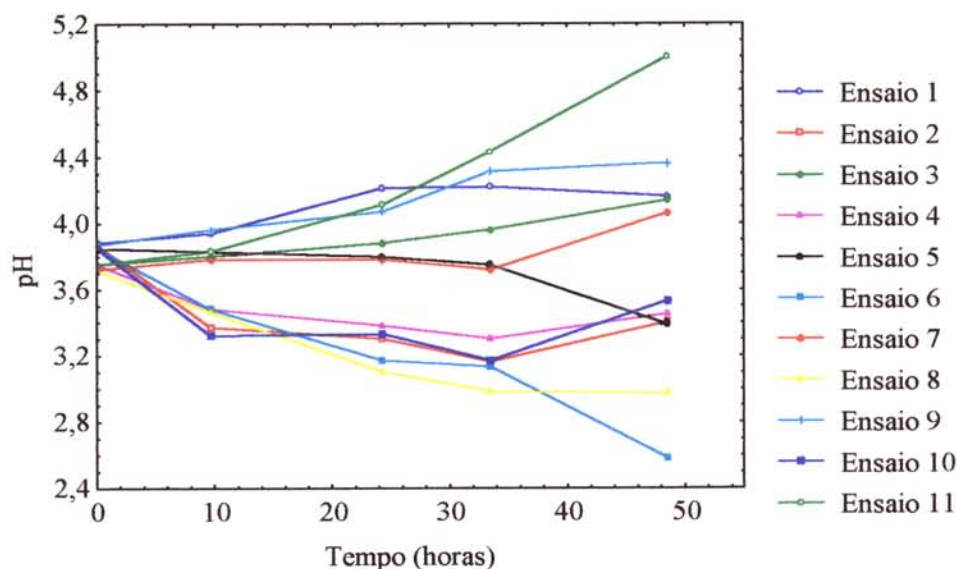


Figura 4.2 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 1 a 11).

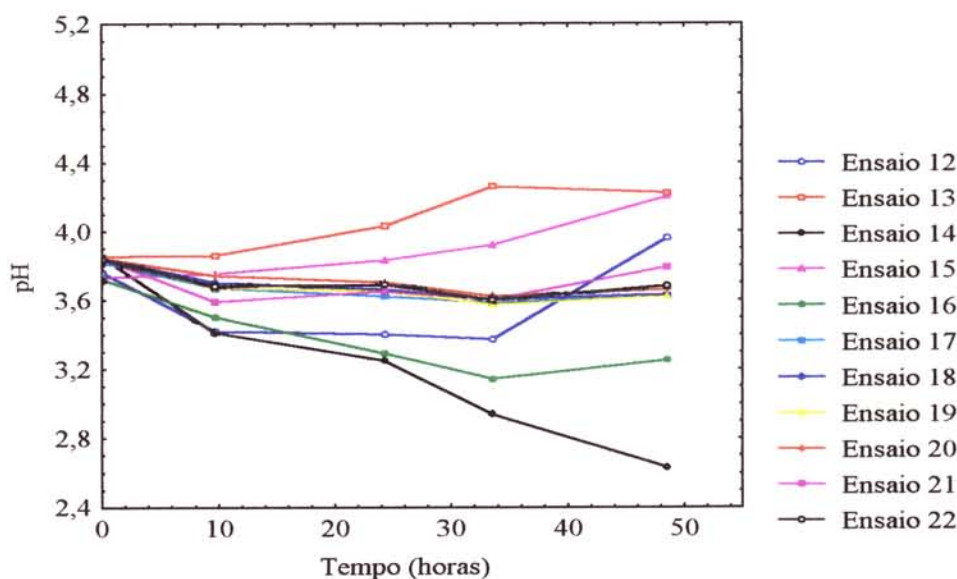


Figura 4.2 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o primeiro planejamento experimental (Ensaio 12 a 22).

4.1.3 - Glicose Residual

A concentração inicial de glicose nos ensaios de nível +1 (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) foi 10 g/L e nos pontos centrais (nível 0) 5 g/L (ensaios 17 ao 22). A análise de glicose residual foi feita em 48,5 horas de fermentação, detectando-se a presença de glicose nos ensaios 6 (1% de glicose, 2% água de maceração de milho, 0,75% NH_4NO_3 e 1% de óleo de soja) e 14 (1% de glicose, 2% água de maceração de milho, 0,75% NH_4NO_3 e 1% de óleo de oliva) na concentração de 1,8 e 0,7 g/L, respectivamente, como pode ser observado através da tabela 4.2. Os demais ensaios não apresentaram glicose residual, com exceção dos pontos centrais, em que foi detectada a mesma concentração de glicose do início da fermentação. Ocorreu um consumo de glicose nas amostras de nível +1 e não houve consumo de glicose nos ensaios referentes aos pontos centrais do planejamento experimental. Nos ensaios onde aconteceu um consumo de glicose verificou-se um bom crescimento celular, porém a atividade enzimática de lipase diminuiu. O mesmo já havia sido observado para o microrganismo *Penicillium restrictum* (FREIRE *et alii*, 1997), indicando que a produção da enzima lipase parece ser regulada pela concentração de glicose.

4.1.4 - Massa Seca

A determinação da massa seca foi feita em 48,5 horas de fermentação. Observando-se a tabela 4.2 verifica-se que nos ensaios 1 (0% de glicose, 2% água de maceração de milho, 0% NH_4NO_3 e 1% de óleo de soja) e 2 (1% de glicose, 2% água de maceração de milho, 0% NH_4NO_3 e 1% de óleo de soja) foi obtido massa seca semelhantes ao final da fermentação, porém a atividade enzimática do ensaio 1 foi cerca de 4 vezes superior à atividade enzimática alcançada no ensaio 2. Já o ensaio 13 (0% de glicose, 2% água de maceração de milho, 0,75% NH_4NO_3 e 1% de óleo de oliva) apresentou uma massa celular de 2,26 g/100g de amostra e o ensaio 15 (0% de glicose, 6% água de maceração de milho, 0,75% NH_4NO_3 e 1% de óleo de oliva) 0,68 g/100g de amostra, e as respostas de atividade enzimática foram bem próximas ao longo da fermentação. Portanto, a massa seca não influenciou na atividade enzimática. Esse fato foi devido a produção da enzima ser induzida pela presença de óleo e não estar associada ao crescimento celular (FREIRE *et alii*, 1997). Por isso, alguns ensaios apresentaram um bom crescimento celular, possivelmente devido ao favorecimento das condições do meio de cultura, no entanto a produção da enzima não foi expressiva.

4.1.5 - Análise dos Efeitos de cada Variável sobre a Atividade Enzimática de Lipase

Os efeitos principais das variáveis ao longo do tempo podem ser observados através da figura 4.3 e a tabela 4.3 apresenta os resultados dos efeitos das variáveis estudadas e suas interações em 9,67 horas de fermentação. Verifica-se que quando a glicose passa de 0% (nível -1) para 1% (nível +1) produz-se um efeito significativo estatisticamente negativo sobre a atividade enzimática, ou seja, ocorre uma diminuição da atividade enzimática com a presença da glicose. Para a água de maceração de milho a mudança de 2% para 6% representa um efeito positivo na atividade enzimática. Portanto, aumentando-se a concentração da água de maceração de milho aumenta-se também a atividade enzimática. O aumento da concentração do NH_4NO_3 aumenta a atividade enzimática até as 33 horas de fermentação, sendo este efeito diminuído ao final da fermentação. O tipo de óleo utilizado na fermentação para produção da enzima não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática, ou seja, pode-se utilizar o óleo de soja ou o óleo de oliva para produção da enzima sem perdas na atividade enzimática.

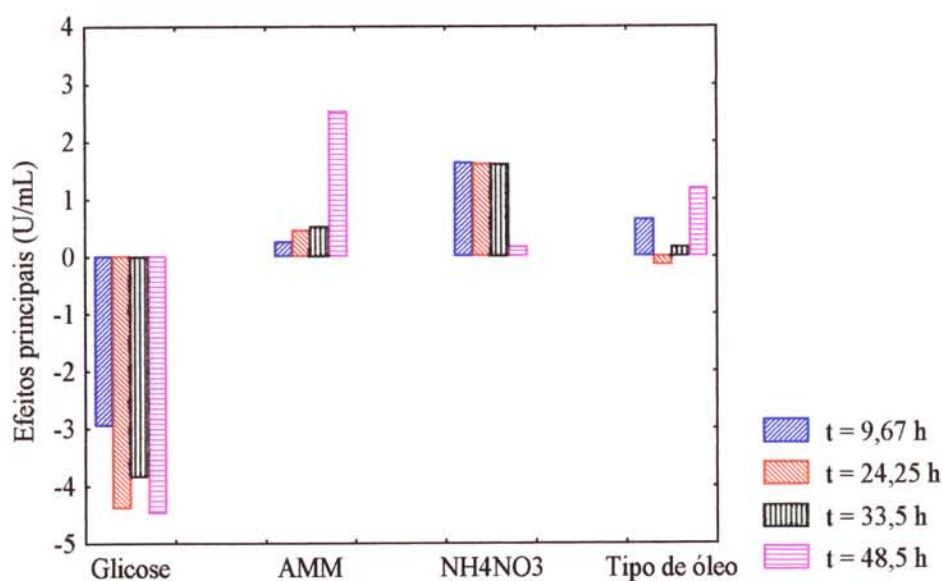


Figura 4.3: Efeitos principais das variáveis do primeiro planejamento experimental.

Tabela 4.3: Efeitos principais e de interações das variáveis do primeiro planejamento experimental em 9,67 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro Padrão
Média	6,215*	0,306*
% Glicose	-2,955*	0,717*
% AMM	0,246	0,717
% NH_4NO_3	1,624*	0,717*
Tipo de óleo	0,646	0,717
% Glicose x %AMM	1,409	0,717
%Glicose x % NH_4NO_3	0,986	0,717
%Glicose x Tipo de óleo	-0,190	0,717
% AMM x % NH_4NO_3	0,124	0,717
% AMM x Tipo de óleo	-0,019	0,717
% NH_4NO_3 x Tipo de óleo	0,108	0,717

* valores estatisticamente significativos

Através da análise dos efeitos das variáveis foi possível eliminar a glicose do meio de cultura e ampliar as faixas de concentração da água de maceração de milho e do NH_4NO_3 . O tipo de óleo utilizado foi investigado em planejamentos experimentais individuais, em diferentes concentrações. Portanto, o estudo do meio de cultivo utilizando óleo de oliva como indutor para a produção de lipase está apresentado no segundo e terceiro planejamento experimental, enquanto que a utilização do óleo de soja como indutor para a produção de lipase está apresentado no quarto e quinto planejamento experimental.

4.2 - Estudo do Meio de Cultura Utilizando o Óleo de Oliva como Indutor na Produção de Lipase

4.2.1 - Segundo Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Oliva sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Como já foi mencionado anteriormente, neste segundo planejamento a variável glicose foi eliminada e as faixas das demais variáveis foram ampliadas realizando-se um planejamento experimental completo. As variáveis independentes estudadas passaram a ser: concentração de água de maceração de milho, concentração de NH_4NO_3 e concentração de óleo de oliva. Os valores descodificados usados nos ensaios do planejamento experimental estão apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Tabela de níveis para as variáveis do segundo planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
% Óleo de oliva	0,5	0,7	1,0	1,3	1,5
% NH_4NO_3	0	0,2	0,5	0,8	1,0
% Água de maceração de milho	1	2,4	4,5	6,6	8

O planejamento experimental está descrito na tabela 4.5, tendo como respostas a atividade enzimática da lipase e o pH em função do tempo de fermentação, e a massa seca final.

Tabela 4.5: Segundo planejamento experimental codificado.

Ensaio	Óleo de oliva	NH ₄ NO ₃	AMM*	Ativ. (U/mL) T=8 h	Ativ. (U/mL) T=24 h	Ativ. (U/mL) T=33,7 h	Ativ. (U/mL) T=48 h	Ativ. (U/mL) T=56,25 h	pH T=8 h	pH T=24 h	pH T=33,7 h	pH T=48 h	pH T=56,25 h	Massa Seca (g/100 g)
1	-1	-1	-1	9,31	8,57	9,68	11,25	13,71	3,93	4,28	4,47	4,47	4,46	0,84
2	+1	-1	-1	9,04	8,58	9,91	9,19	9,45	3,87	4,13	4,33	4,41	4,38	1,26
3	-1	+1	-1	10,67	9,38	10,94	11,26	12,85	3,87	4,14	4,37	4,47	4,47	1,06
4	+1	+1	-1	10,64	11,21	11,22	4,63	4,56	3,78	3,85	3,82	3,17	2,94	1,39
5	-1	-1	+1	13,27	12,11	14,44	18,38	18,16	3,86	4,21	4,56	5,23	5,46	1,62
6	+1	-1	+1	11,91	11,22	12,67	12,62	13,17	3,83	3,98	4,13	4,54	4,74	1,30
7	-1	+1	+1	12,51	12,65	12,90	13,81	14,12	3,80	3,94	4,09	4,51	4,73	1,59
8	+1	+1	+1	13,28	13,12	13,92	14,47	15,73	3,79	3,93	4,12	4,69	4,90	1,71
9	-1,68	0	0	11,01	9,61	10,84	12,95	13,79	3,82	4,03	4,25	4,80	4,98	1,02
10	+1,68	0	0	11,25	10,05	11,24	11,70	11,88	3,78	3,95	4,14	4,66	4,80	1,34
11	0	-1,68	0	10,56	9,88	11,20	12,03	13,66	3,90	4,13	4,37	4,98	5,17	1,58
12	0	+1,68	0	13,95	13,13	15,10	16,35	17,63	3,85	4,11	4,44	4,82	4,92	1,73
13	0	0	-1,68	7,68	6,33	5,95	3,09	2,69	3,82	3,69	3,46	2,81	2,58	0,69
14	0	0	+1,68	12,91	12,98	14,13	14,20	14,51	3,84	3,95	4,04	4,34	4,50	1,55
15(C)	0	0	0	10,96	10,48	12,10	11,88	13,17	3,80	4,01	4,22	4,69	4,82	1,48
16(C)	0	0	0	10,63	9,26	10,14	10,74	10,63	3,78	3,97	4,15	4,63	4,83	1,32
17(C)	0	0	0	10,77	10,15	11,19	11,94	12,71	3,78	3,99	4,22	4,66	4,76	1,36

* AMM - Água de maceração de milho

4.2.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

Através das figuras 4.4 (a), para os ensaios de 1 ao 9, e 4.4 (b) para os ensaios 10 ao 17 pode ser observada a atividade enzimática da lipase no decorrer da fermentação. Ao longo da fermentação observa-se que a partir de 8 horas os ensaios apresentaram uma atividade enzimática praticamente constante. Os ensaios 4 (1,3% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 2,4% de AMM) e 13 (1% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 1% de AMM) apresentaram uma queda na atividade ao longo do tempo, acompanhado também de uma queda significativa do pH. Os ensaios 5 (0,7% de óleo de oliva, 0,2% de NH_4NO_3 e 6,6% de AMM) e 12 (1% de óleo de oliva, 1% de NH_4NO_3 e 4,5% de AMM) apresentaram uma maior atividade enzimática com acréscimo do pH durante a fermentação, verificando-se maior estabilidade da enzima a pH acima de 3,8, não havendo queda brusca da atividade enzimática ao longo do tempo.

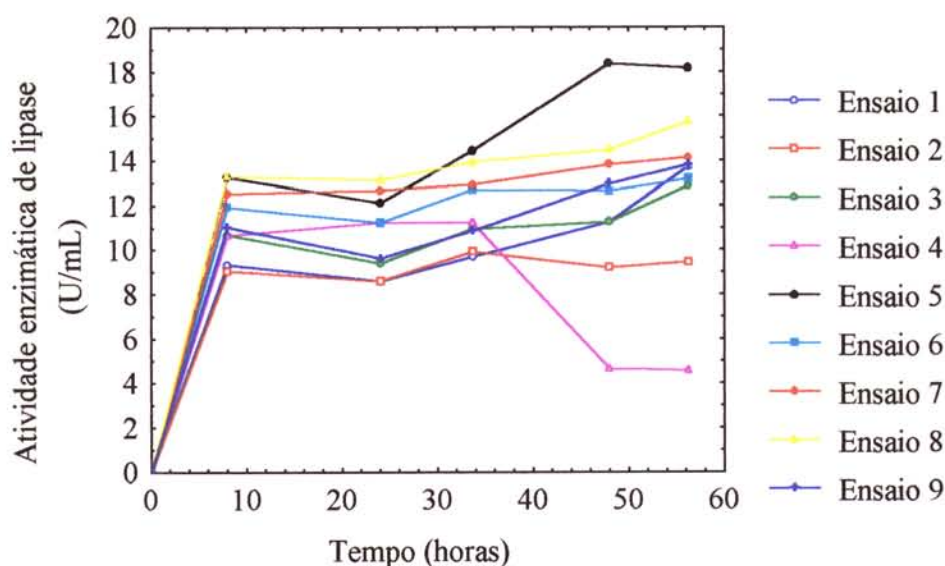


Figura 4.4 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

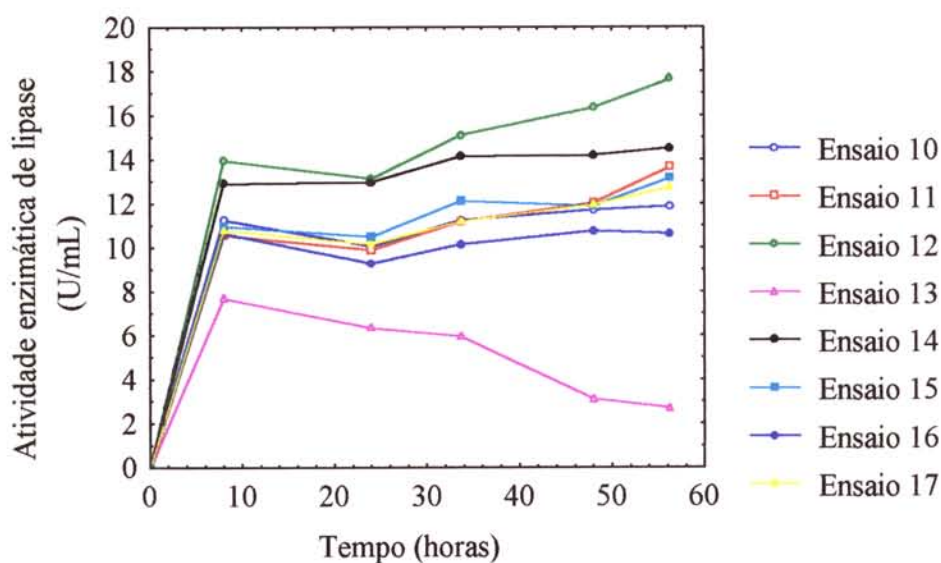


Figura 4.4 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.2.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação

O acompanhamento do pH pode ser verificado nas figuras 4.5 (a), para os ensaios 1 ao 9, e 4.5 (b) para os ensaios 10 ao 17. O pH apresentou um aumento no decorrer do tempo, com exceção dos ensaios 4 (1,3% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 2,4% de AMM) e 13 (1% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 1% de AMM), que apresentaram uma tendência de decréscimo de pH, podendo estar associada ao decréscimo da atividade enzimática. Este aumento de pH também foi observado por JACOBSEN *et alii* (1989 A).

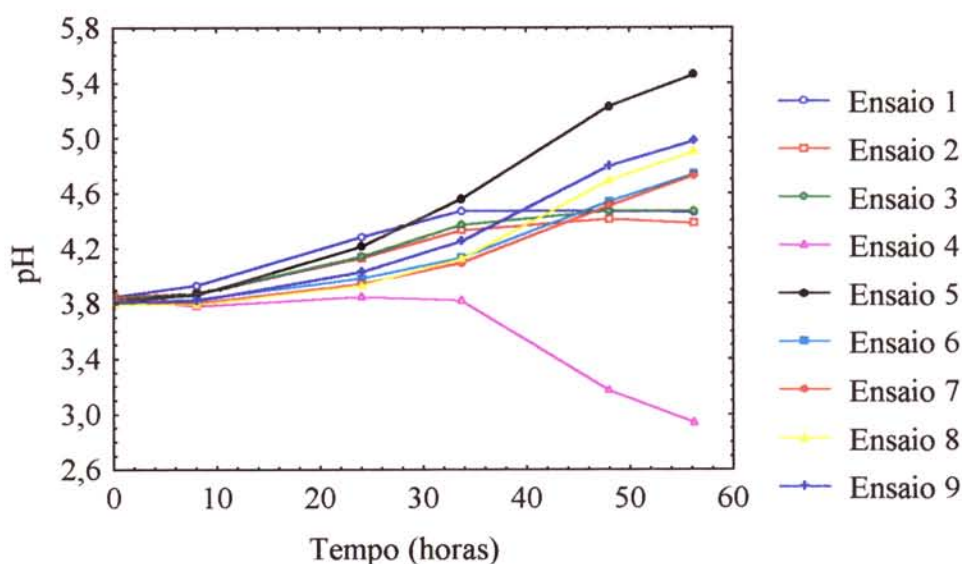


Figura 4.5 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

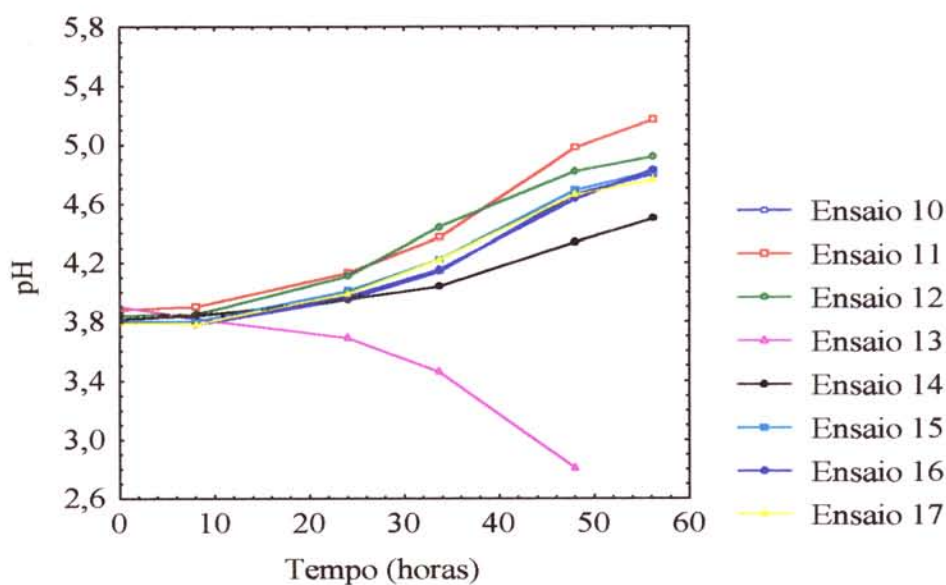


Figura 4.5 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.2.1.3 - Massa Seca

Pela tabela 4.5 pode ser observada a massa seca para os diferentes ensaios experimentais, sendo esta análise feita em 56,25 horas de fermentação. No ensaio 5 (0,7% de óleo de oliva, 0,2% de NH_4NO_3 e 6,6% de AMM) foi obtido uma massa seca de 1,62 g/100g

de amostra e uma maior atividade enzimática, enquanto que no ensaio 12 (1% de óleo de oliva, 1% de NH_4NO_3 e 4,5% de AMM) a massa seca foi de 1,73 g/100g de amostra e a atividade enzimática inferior ao ensaio 5. Portanto, a observação descrita anteriormente que a produção da enzima não está associada ao crescimento celular é mais uma vez confirmada através destes ensaios experimentais.

4.2.1.4 - Produtividade

A produtividade pode ser definida como sendo a razão da atividade enzimática pelo tempo de fermentação, tendo como unidade $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Através das figuras 4.6 (a) e 4.6 (b) pode-se verificar que a produtividade é bem superior nas primeiras 8 horas de fermentação, portanto a análise estatística do planeamento experimental para um ajuste de um modelo empírico foi realizada neste tempo de fermentação, pois não há acréscimo significativo na atividade enzimática com o tempo para a grande maioria dos ensaios.

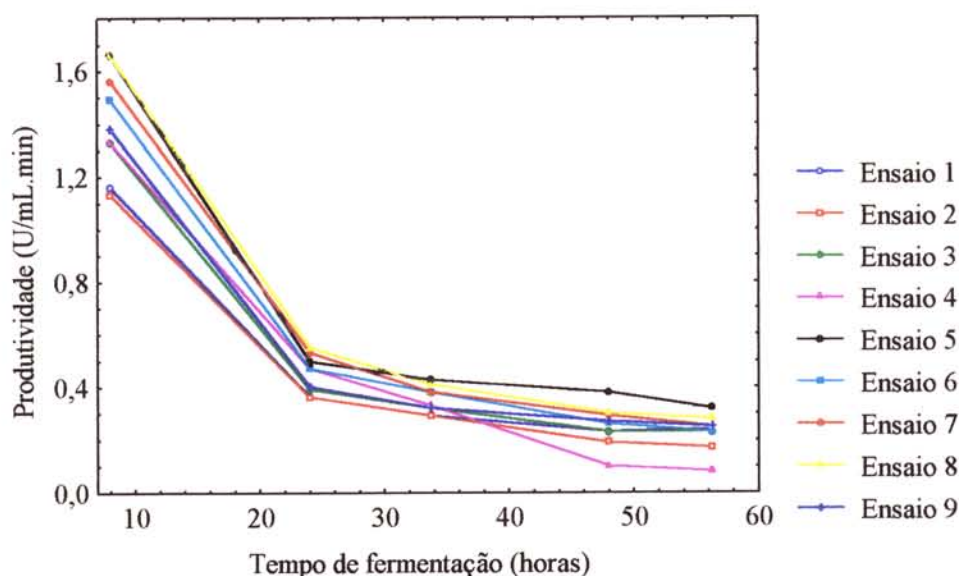


Figura 4.6 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planeamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

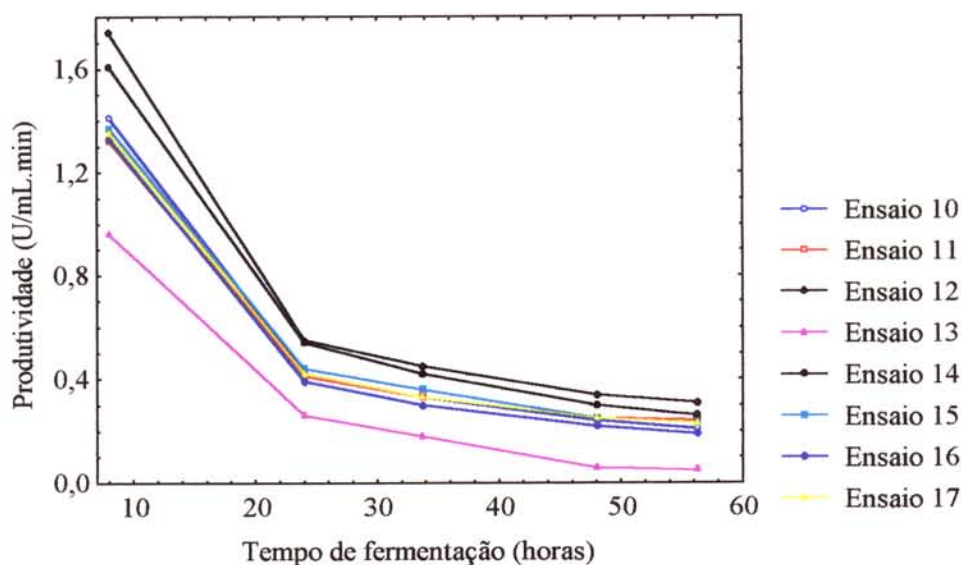


Figura 4.6 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o segundo planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.2.1.5 - Análise dos Efeitos de cada Variável Sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Os efeitos principais das variáveis óleo de oliva, NH_4NO_3 e água de maceração de milho podem ser observados pela tabela 4.6. Quando o óleo de oliva passa de 0,7% (nível -1) para 1,3% (nível +1) não resulta um efeito significativo até as 33 h e após esse tempo de fermentação apresenta um efeito negativo sobre a atividade enzimática. O aumento da concentração do NH_4NO_3 aumenta a atividade enzimática até as 33 horas de fermentação, sendo este efeito negativo ao final da fermentação. Para a água de maceração de milho a mudança de 2,4% para 6,6% representa um efeito positivo na atividade enzimática ao longo de toda fermentação, sendo este efeito mais pronunciado ao final do processo. Portanto, aumentando-se a concentração da água de maceração de milho aumenta-se também a atividade enzimática. Os efeitos principais das variáveis ao longo do tempo podem ser observados pela figura 4.7.

Tabela 4.6: Efeitos principais e de interações das variáveis do segundo planejamento experimental em 8 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro Padrão
Média	11,180*	0,050*
% Óleo de oliva	-0,223	0,118
% NH_4NO_3	0,894*	0,118*
%AMM	2,827*	0,118*
% óleo de oliva x % NH_4NO_3	0,592*	0,118*
% óleo de oliva x %AMM	-0,076	0,118
% NH_4NO_3 x %AMM	-0,588*	0,118*

*valores estatisticamente significativos

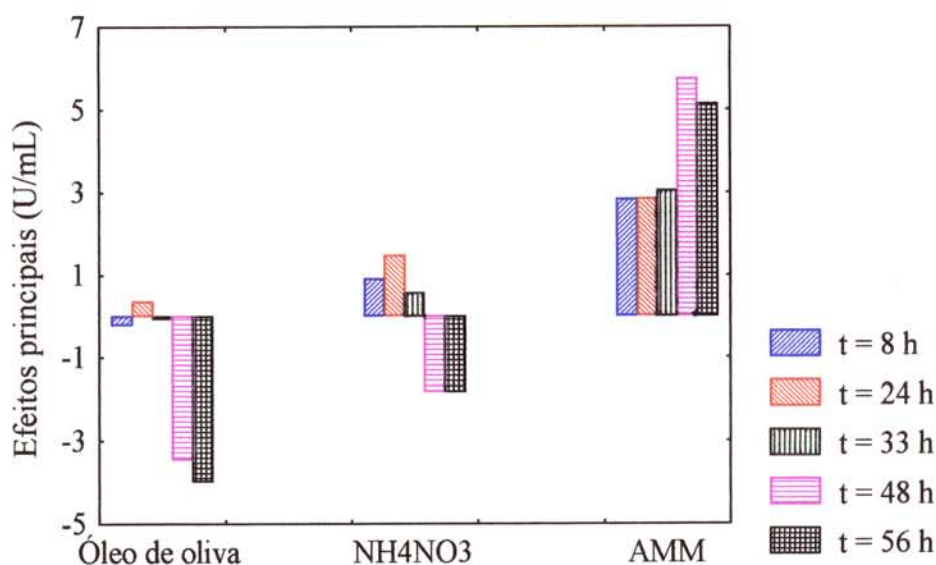


Figura 4.7: Efeitos principais das variáveis do segundo planejamento experimental.

4.2.1.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta

A tabela 4.7 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de 2ª ordem que represente a atividade enzimática em função das variáveis independentes estudadas (concentração de óleo de oliva, nitrato de amônio e água de maceração de milho) para as 8 horas de fermentação.

Tabela 4.7: Coeficiente de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 8 horas para o segundo planejamento experimental.

Fatores	Coeficiente de Regressão
Média	10,78070*
% óleo de oliva (L)	-0,06967
% óleo de oliva (Q)	0,27751
% NH ₄ NO ₃ (L)	1,35965*
% NH ₄ NO ₃ (Q)	1,07224*
% AMM (L)	2,94378*
% AMM (Q)	-0,31372
% óleo de oliva x % NH ₄ NO ₃	0,59181*
% óleo de oliva x % AMM	-0,07567
% NH ₄ NO ₃ x % AMM	-0,58792*

*valores estatisticamente significativos

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos foram desconsiderados no modelo sendo incorporados ao erro puro.

A equação 4.1 relaciona a atividade enzimática da lipase (AL) em função das variáveis codificadas:

$$AL = 10,76 + 0,68 * NH_4NO_3 + 0,54 * NH_4NO_3^2 + 1,47 * AMM + 0,29 * O.O * NH_4NO_3 - 0,29 * NH_4NO_3 * AMM \quad (4.1)$$

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na tabela 4.8.

Tabela 4.8: Tabela ANOVA para o segundo planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	41,047	5	8,209	36,5	3,2
Resíduos	2,477	11	0,225		
Falta de ajuste	2,421	9	0,269		
Erro puro	0,056	2	0,028		
Total	43,524	16	2,720		

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 94,31$

% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,87$

Coefficiente de correlação: $R = 0,971$

O coeficiente de correlação obtido foi igual a 0,97 e o valor do teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a distribuição F a 95% de confiança com os respectivos graus de liberdade (BARROS *et alli.*, 1996). Verificou-se para a atividade enzimática de lipase que F (regressão/resíduos) = 36,5 é 11,4 vezes maior que o $F_{0,95;5;11} = 3,2$, indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo.

A figura 4.8 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos (modelo). Pode-se concluir que o modelo de 2ª ordem prevê satisfatoriamente o comportamento da resposta frente à variação das variáveis nas faixas estudadas.

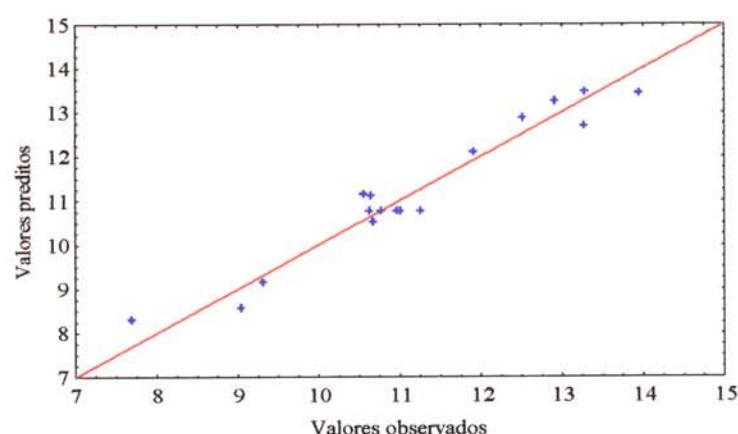


Figura 4.8: Valores observados *versus* valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o segundo planejamento experimental.

A partir do modelo foi possível então obter as superfícies de respostas para analisar as melhores condições de meio de cultura que levem a maiores atividades enzimáticas. Pelas figuras 4.9 (a) e 4.9 (b) verifica-se que, a baixos níveis de água de maceração de milho, um aumento da concentração de NH_4NO_3 aumentou a atividade enzimática de lipase, enquanto que, a altos níveis de concentração de água de maceração de milho, a variação do NH_4NO_3 praticamente não afetou a resposta. A baixos níveis de NH_4NO_3 um aumento da concentração de água de maceração de milho aumentou significativamente a atividade enzimática, e a altos níveis de NH_4NO_3 esta variação também levou a um aumento da resposta.

Nas figuras 4.9 (c) e 4.9 (d) observa-se que a baixos níveis de NH_4NO_3 um aumento na concentração de óleo de oliva diminuiu a atividade enzimática, entretanto um efeito contrário pode ser observado quando o NH_4NO_3 se encontra a altos níveis de concentração. A baixos níveis de óleo de oliva um aumento do NH_4NO_3 aumentou a atividade enzimática enquanto que, a altos níveis de óleo de oliva, esta variação provocou um aumento mais significativo na atividade enzimática.

Através das figuras 4.9 (e) e 4.9 (f) pode-se observar que a concentração de óleo de oliva, na faixa estudada, não influenciou na atividade enzimática de lipase nos diferentes níveis de concentração da água de maceração de milho. Entretanto, um aumento na concentração da água de maceração de milho acarreta um aumento na atividade enzimática independente da concentração de óleo de oliva utilizado.

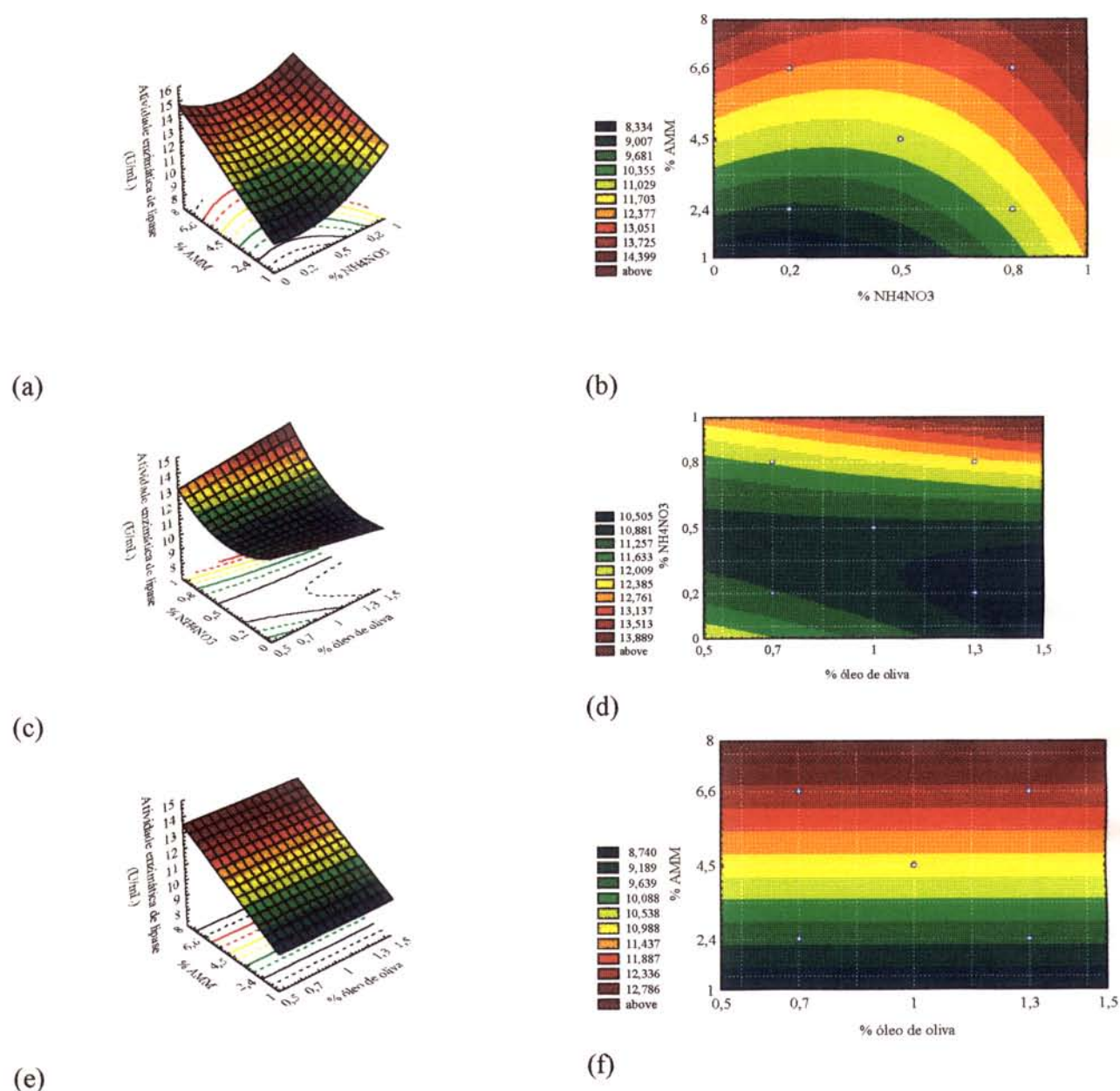


Figura 4.9: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática de lipase obtidas no segundo planejamento experimental. (a) e (b) AMM *versus* NH_4NO_3 com óleo de oliva a 1% (nível 0); (c) e (d) óleo de oliva *versus* NH_4NO_3 com AMM a 4,5% (nível 0); (e) e (f) óleo de oliva *versus* AMM com NH_4NO_3 a 0,5% (nível 0).

4.2.2 - Terceiro Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Oliva sobre a Atividade Enzimática da Lipase (Níveis Modificados)

No terceiro planejamento experimental foram estudadas as mesmas variáveis independentes do segundo planejamento experimental, com a faixa de concentração do óleo de oliva diminuída (0,2 a 1%) porque o efeito desta variável não foi significativo na faixa anteriormente estudada (0,5 a 1,5%). A concentração de NH_4NO_3 foi mantida igual à anterior e a da água de maceração de milho ampliada pois a atividade enzimática apresentou melhores resultados em maiores concentrações deste componente. Os valores reais usados nos ensaios do planejamento experimental estão apresentados na tabela 4.9, enquanto que a tabela 4.10 apresenta o planejamento experimental e suas respostas.

Tabela 4.9: Tabela de níveis para as variáveis do terceiro planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
% Óleo de oliva	0,2	0,36	0,6	0,84	1,0
% NH_4NO_3	0	0,2	0,5	0,8	1,0
% Água de maceração de milho	5,0	7,02	10,0	12,98	15,0

Tabela 4.10: Terceiro planejamento experimental codificado.

Ensaio	Óleo de oliva	NH ₄ NO ₃	AMM*	Ativ. (U/mL) T=8 h	Ativ. (U/mL) T=24,33 h	Ativ. (U/mL) T=32 h	Ativ. (U/mL) T=48,58 h	Ativ. (U/mL) T=54 h	pH T=8 h	pH T=24,33 h	pH T=32 h	pH T=48,58 h	pH T=54 h	Massa Seca (g/100 g)
1	-1	-1	-1	10,73	12,77	12,70	12,96	14,26	3,96	4,06	4,14	4,34	4,46	0,71
2	+1	-1	-1	12,63	13,85	13,04	12,75	13,90	3,96	4,09	4,20	4,51	4,68	1,18
3	-1	+1	-1	12,60	13,57	13,85	14,39	14,61	3,94	4,03	4,10	4,25	4,33	0,74
4	+1	+1	-1	14,41	15,23	15,22	14,82	15,65	3,92	4,04	4,15	4,43	4,56	1,35
5	-1	-1	+1	14,47	14,44	15,55	16,10	17,30	3,94	3,98	4,02	4,07	4,10	0,56
6	+1	-1	+1	14,26	14,06	15,09	15,65	15,35	3,93	4,00	4,05	4,14	4,19	0,95
7	-1	+1	+1	15,68	17,19	17,79	18,40	20,05	3,92	3,99	4,04	4,10	4,14	0,89
8	+1	+1	+1	15,23	16,24	16,94	16,30	16,67	3,91	3,96	4,00	4,04	4,07	0,77
9	-1,68	0	0	13,25	14,10	15,17	16,00	16,64	3,93	4,00	4,05	4,12	4,16	0,58
10	+1,68	0	0	12,93	13,32	14,30	14,67	14,74	3,93	3,96	4,00	4,06	4,09	0,92
11	0	-1,68	0	12,60	13,84	13,95	13,73	15,39	3,96	4,06	4,15	4,37	4,48	1,35
12	0	+1,68	0	14,32	14,47	14,54	14,49	15,64	3,92	3,97	4,01	4,08	4,11	0,80
13	0	0	-1,68	13,38	13,28	13,23	15,02	15,41	3,96	4,14	4,32	4,73	4,88	1,13
14	0	0	+1,68	16,33	17,15	17,71	18,36	18,75	3,93	3,99	4,03	4,10	4,14	0,87
15(C)	0	0	0	13,06	14,50	15,29	15,10	15,89	3,93	4,01	4,06	4,17	4,22	1,36
16(C)	0	0	0	12,89	13,33	14,15	14,31	14,73	3,92	3,99	4,03	4,10	4,14	0,71
17(C)	0	0	0	12,58	13,60	14,39	14,91	16,05	3,92	4,01	4,06	4,16	4,22	0,93

* AMM - Água de maceração de milho

4.2.2.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

Através das figuras 4.10 (a), para os ensaios de 1 ao 9, e 4.10 (b) para os ensaios 10 ao 17 pode ser verificada a atividade enzimática da lipase no decorrer da fermentação. Ao longo da fermentação observa-se que ao atingir um tempo de 8 horas os ensaios tiveram um aumento significativo na atividade enzimática, permanecendo a seguir praticamente constante. Os ensaios 7 (0,36% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) e 14 (0,6% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 15% de água de maceração de milho) apresentaram valores de maior atividade enzimática.

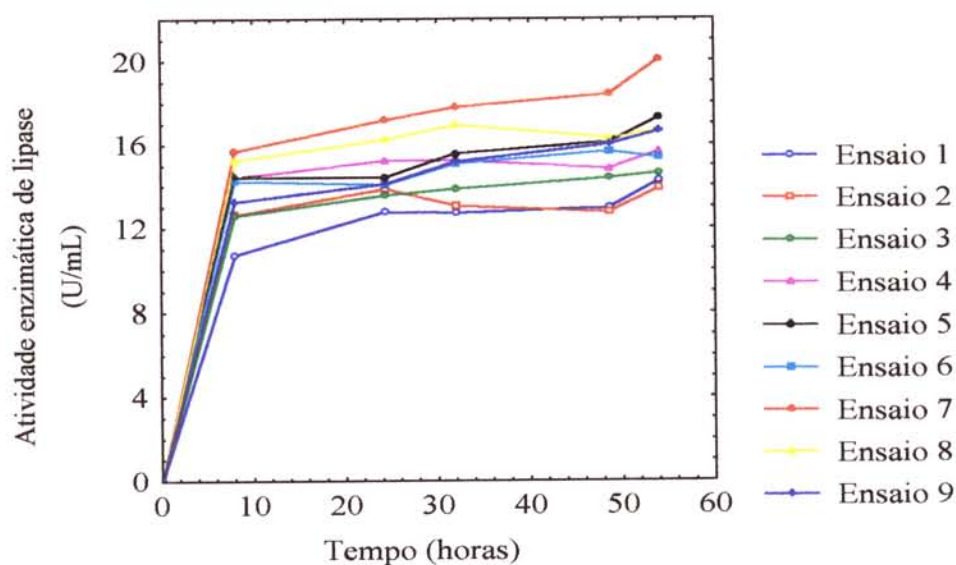


Figura 4.10 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

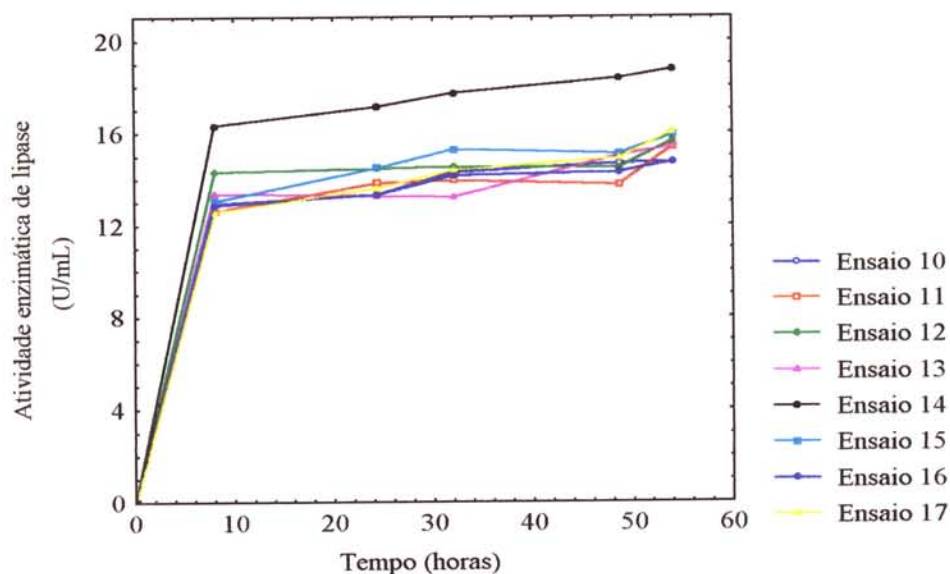


Figura 4.10 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.2.2.2. - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação

O acompanhamento do pH pode ser observado nas figuras 4.11 (a), para os ensaios 1 ao 9, e 4.11 (b) para os ensaios 10 ao 17. O pH de todos os ensaios apresentou um aumento no decorrer do tempo.

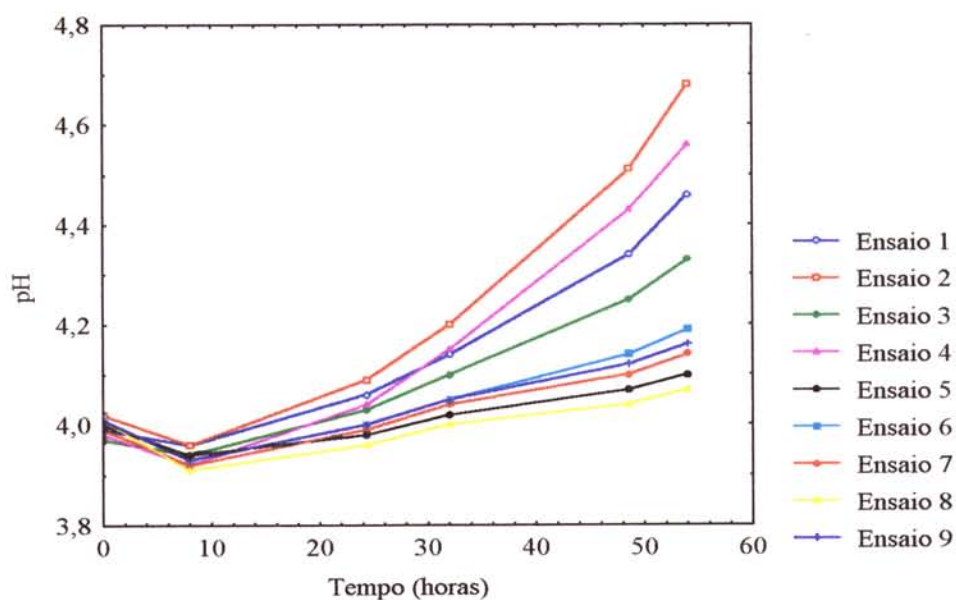


Figura 4.11 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 a 9).

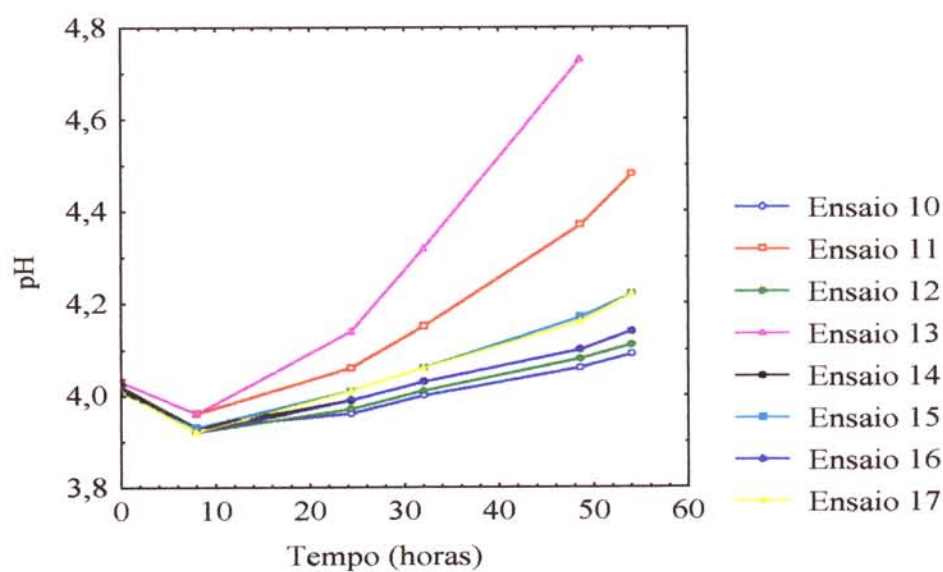


Figura 4.11 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 a 17).

4.2.2.3 - Massa Seca

A determinação da massa seca foi feita em 54 horas de fermentação e os valores podem ser observados na tabela 4.10. Os resultados da massa seca para os ensaios deste planejamento experimental seguiram o mesmo comportamento que os anteriores, ou seja, a atividade enzimática de lipase alcançada na fermentação não foi associada ao crescimento celular, como pode ser verificado através dos ensaios 4 (0,84% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 7,02% de água de maceração de milho), 11 (0,6% de óleo de oliva, 0% de NH_4NO_3 e 10% de água de maceração de milho) e 15 (0,6% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 10% de água de maceração de milho), que apresentaram uma massa seca de aproximadamente 1,35 g/100g de amostra, enquanto que os ensaios 7 (0,36% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) e 14 (0,6% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 15% de água de maceração de milho) alcançaram uma massa seca de 0,88 g/100 g de amostra e atingiram uma maior atividade enzimática de lipase que os ensaios anteriormente citados.

4.2.2.4 - Produtividade

A produtividade pode ser acompanhada pelas figuras 4.12 (a), para os ensaios 1 ao 9, e 4.12 (b) para os ensaios 10 ao 17. Como anteriormente verificado, a produtividade cai drasticamente com o tempo, já que o ganho em atividade é muito pequeno após as 8 horas de fermentação.

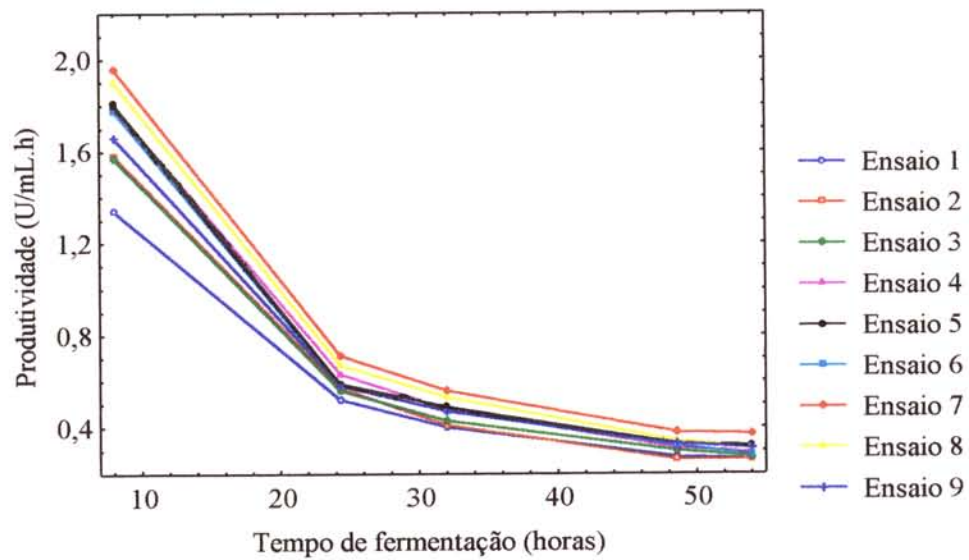


Figura 4.12 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

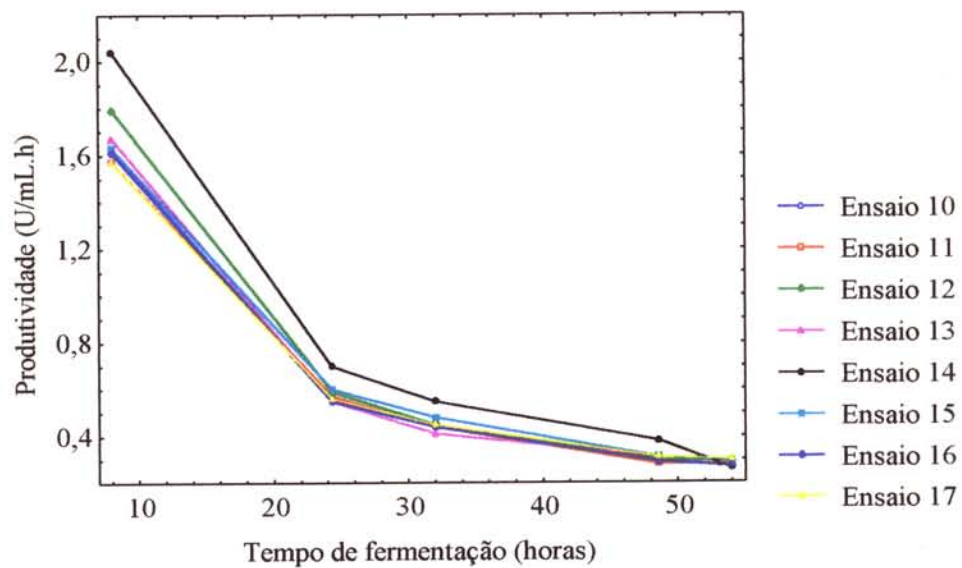


Figura 4.12 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o terceiro planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

Como a produtividade da enzima nas primeiras 8 horas de fermentação foi bem superior às demais, a análise estatística do planejamento experimental para um ajuste de modelo empírico foi realizada neste tempo.

4.2.2.5 - Análise dos Efeitos de cada Variável Sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Os efeitos principais e de interações das variáveis: concentração de óleo de oliva, NH_4NO_3 e água de maceração de milho podem ser verificados pela tabela 4.11, e também podem ser observados através da figura 4.13. Quando a concentração de óleo de oliva passa de 0,36% (nível -1) para 0,84% (nível +1) não se observou um efeito estatisticamente significativo sobre a atividade enzimática ao longo da fermentação. O aumento da concentração do NH_4NO_3 apresentou um efeito positivo aumentando a atividade enzimática durante a fermentação. Para a água de maceração de milho, a mudança de 7,02% (nível -1) para 12,98% (nível +1) representa um efeito positivo na atividade enzimática ao longo de toda fermentação, maior do que a água de maceração e o óleo de oliva.

Tabela 4.11: Efeitos principais e de interações das variáveis do terceiro planejamento experimental em 8 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro Padrão
Média	13,504*	0,734*
% Óleo de oliva	0,762*	0,172*
% NH_4NO_3	1,457*	0,172*
%AMM	2,317*	0,172*
% óleo de oliva x % NH_4NO_3	-0,825	0,172
% óleo de oliva x %AMM	-1,092*	0,172*
% NH_4NO_3 x %AMM	-0,367	0,172

*valores estatisticamente significativos

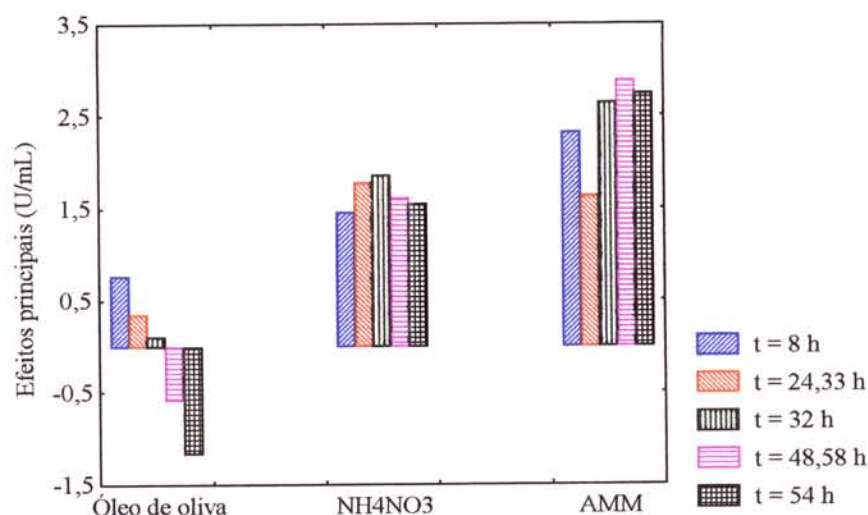


Figura 4.13: Efeitos principais das variáveis do terceiro planejamento experimental.

4.2.2.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta

A tabela 4.12 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de 2ª ordem que represente a atividade enzimática em função das variáveis independentes estudadas (concentração de óleo de oliva, nitrato de amônio e água de maceração de milho) para as 8 horas de fermentação.

Tabela 4.12: Coeficientes de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase as 8 horas para o terceiro planejamento experimental.

Fatores	Coeficiente de Regressão
Média	12,85251*
% óleo de oliva (L)	0,36864
% óleo de oliva (Q)	0,12371
% NH ₄ NO ₃ (L)	1,27840*
% NH ₄ NO ₃ (Q)	0,38503
% AMM (L)	2,08574*
% AMM (Q)	1,37747*
% óleo de oliva x % NH ₄ NO ₃	-0,08080
% óleo de oliva x % AMM	-1,09183*
% NH ₄ NO ₃ x % AMM	-0,36671

*valores estatisticamente significativos

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos foram desconsiderados no modelo sendo incorporados ao erro puro.

A equação 4.2 relaciona a atividade enzimática da lipase (AL) em função das variáveis codificadas:

$$AL = 13,10 + 0,64 \cdot NH_4NO_3 + 1,04 \cdot AMM + 0,63 \cdot AMM^2 - 0,54 \cdot O.O \cdot AMM \quad (4.2)$$

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na tabela 4.13.

Tabela 4.13: Tabela ANOVA para o terceiro planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	27,966	4	6,992	33,61	3,26
Resíduos	2,496	12	0,208		
Falta de ajuste	2,377	10	0,238		
Erro puro	0,119	2	0,060		
Total	30,462	16	1,904		

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 91,81$

% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,61$

Coefficiente de correlação: $R = 0,958$

O valor do teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a distribuição F a 95% de confiança com os respectivos graus de liberdade. Verificou-se para a atividade enzimática de lipase que F (regressão/resíduos) = 33,61 foi 10,31 vezes maior que o $F_{0,95;5;11} = 3,26$, indicando que o modelo de 2ª ordem é estatisticamente significativo e preditivo, sendo o coeficiente de correlação obtido de 0,958. Através do erro puro verifica-se que as análises experimentais apresentaram uma boa reprodutibilidade.

A figura 4.14 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos (modelo). Pode-se concluir que o modelo de 2ª ordem pode prever razoavelmente o comportamento da resposta frente à variação das variáveis na faixa estudada.

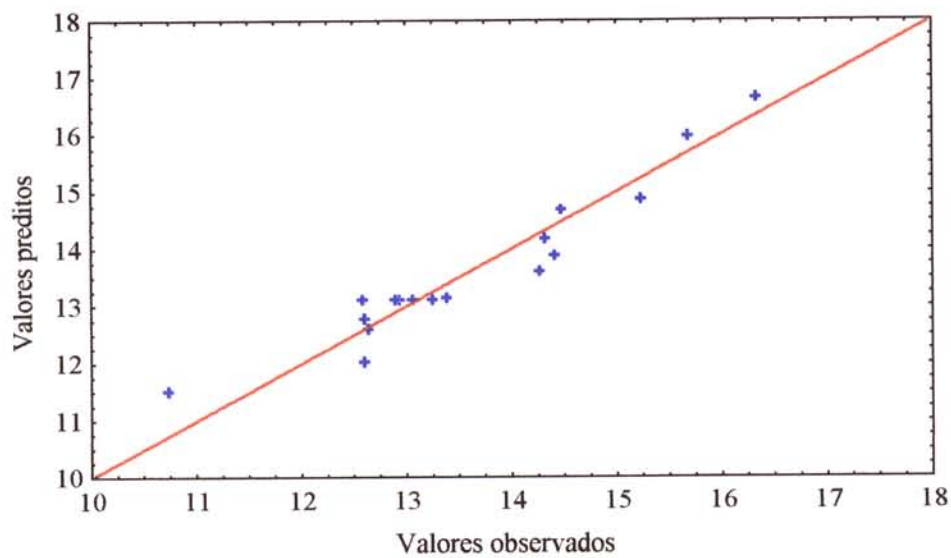


Figura 4.14: Valores observados *versus* valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o terceiro planejamento experimental.

A partir do modelo foi possível obter as superfícies de resposta para análise das melhores condições do meio de cultura que levam a maiores atividades enzimáticas. Pelas figuras 4.15 (a) e 4.15 (b) pode-se verificar que, em diferentes concentrações da água de maceração de milho, um aumento na concentração de NH_4NO_3 levou a um pequeno incremento na atividade enzimática de lipase. No entanto, o aumento da água de maceração de milho aumenta a atividade enzimática significativamente.

Nas figuras 4.15 (c) e 4.15 (d) observa-se que a variação na concentração do óleo de oliva não influenciou a resposta nos diferentes níveis de concentrações de NH_4NO_3 estudados. No entanto, um aumento na concentração de NH_4NO_3 , nos diferentes níveis de óleo de oliva, levou a um aumento significativo da atividade enzimática.

Através das figuras 4.15 (e) e 4.15 (f), a baixas concentrações de óleo de oliva um aumento na concentração da água de maceração de milho aumentou significativamente a atividade enzimática, enquanto que, a altas concentrações de óleo, esse efeito praticamente não influenciou na resposta. A baixos níveis de água de maceração de milho um aumento na concentração de óleo de oliva levou a um pequeno aumento da atividade enzimática, porém quando a água de maceração de milho se encontrava em altas concentrações o aumento da concentração do óleo de oliva provocou uma diminuição da atividade enzimática.

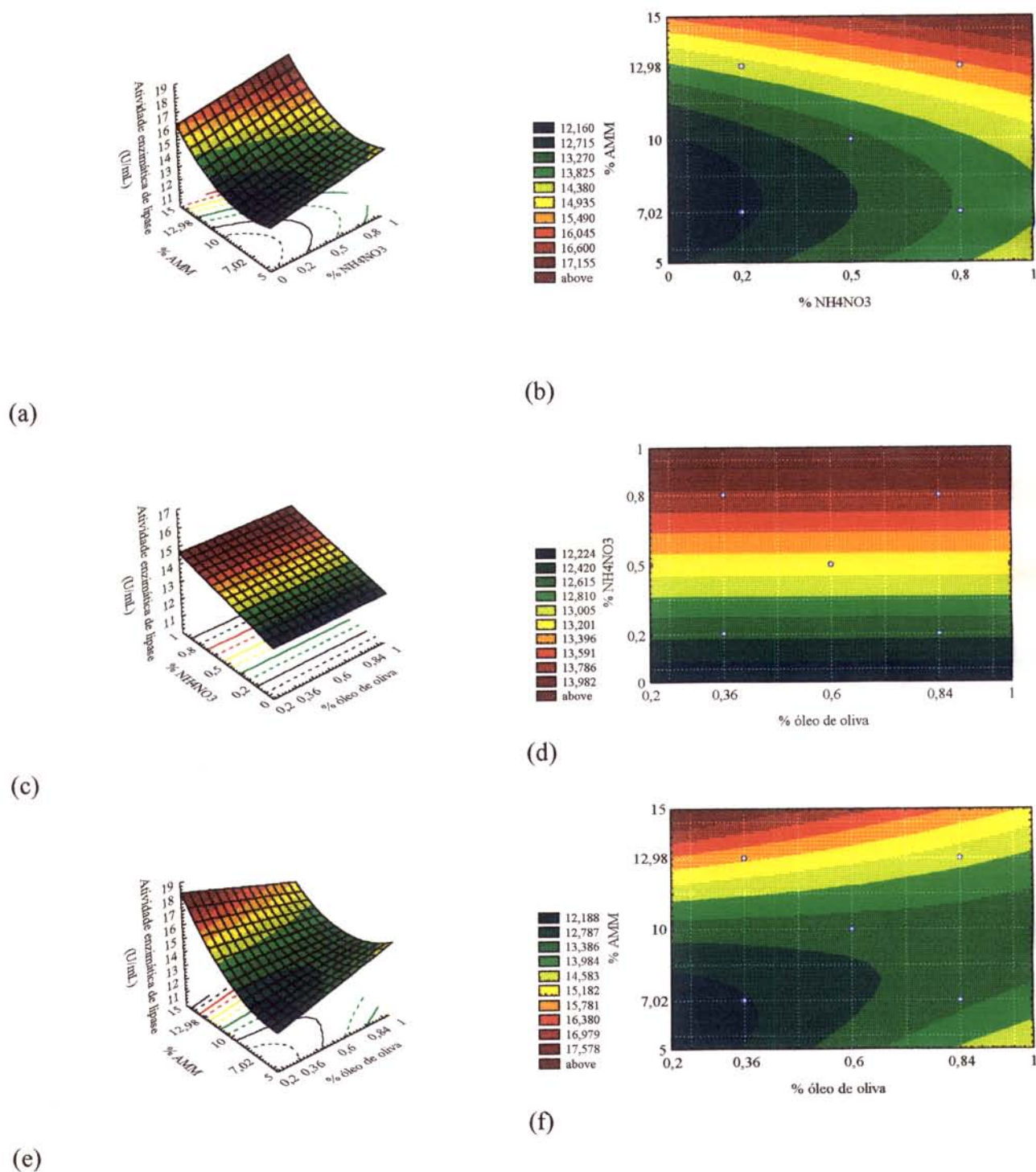


Figura 4.15: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática de lipase obtidas no 3^o planejamento experimental. (a) e (b) AMM *versus* NH₄NO₃ com óleo de oliva a 0,6% (nível 0); (c) e (d) óleo de oliva *versus* NH₄NO₃ com AMM a 10% (nível 0); (e) e (f) óleo de oliva *versus* AMM com NH₄NO₃ a 0,5% (nível 0).

4.3 - Estudo do Meio de Cultura Utilizando o Óleo de Soja como Indutor na Produção de Lipase

4.3.1 - Quarto Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Soja sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Neste planejamento experimental foram estudadas as seguintes variáveis independentes: concentração de água de maceração de milho, concentração de NH_4NO_3 e concentração de óleo de soja, nas faixas de concentrações apresentadas na tabela 4.14 tendo-se como base os resultados do primeiro planejamento experimental. O planejamento experimental está apresentado na tabela 4.15, onde as respostas foram a atividade enzimática da lipase e o pH ao longo do tempo e a massa seca final.

Os valores reais usados nos ensaios do planejamento experimental estão apresentados na tabela 4.14.

Tabela 4.14: Tabela de níveis para as variáveis do quarto planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
% Óleo de soja	0,5	0,7	1,0	1,3	1,5
% NH_4NO_3	0	0,2	0,5	0,8	1,0
% Água de maceração de milho	1	2,4	4,5	6,6	8

Tabela 4.15: Quarto planejamento experimental codificado.

Ensaio	Óleo de soja	NH ₄ NO ₃	AMM*	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	Ativ.	pH T=7,5 h	pH T=24 h	pH T=31,5 h	pH T=48 h	pH T=54,17 h	Massa Seca (g/100g)
				(U/mL) T=7,5 h	(U/mL) T=24 h	(U/mL) T=31,5 h	(U/mL) T=48 h	(U/mL) T=54,17 h						
1	-1	-1	-1	9,12	8,12	7,95	8,48	8,40	3,92	4,16	4,23	4,57	4,64	0,58
2	+1	-1	-1	8,45	8,35	8,34	8,02	7,34	3,85	4,04	4,11	4,34	4,41	0,72
3	-1	+1	-1	10,91	10,18	9,96	7,82	10,11	3,88	4,09	4,23	4,40	4,40	0,76
4	+1	+1	-1	10,71	10,67	9,90	9,91	9,00	3,82	4,00	4,14	4,27	4,25	0,97
5	-1	-1	+1	11,78	11,90	11,20	10,32	10,91	3,85	3,98	4,10	4,44	4,48	0,95
6	+1	-1	+1	11,24	11,70	11,47	11,11	9,89	3,83	3,87	3,92	4,07	4,14	0,72
7	-1	+1	+1	11,94	12,07	11,84	11,41	10,19	3,80	3,88	3,94	4,10	4,17	0,70
8	+1	+1	+1	11,82	11,32	11,70	11,53	10,04	3,79	3,84	3,90	4,04	4,10	0,81
9	-1,68	0	0	10,34	10,18	9,55	13,24	12,71	3,85	4,04	4,20	4,62	4,78	0,78
10	+1,68	0	0	10,28	10,42	9,92	10,04	8,91	3,77	3,92	4,06	4,39	4,47	1,08
11	0	-1,68	0	9,53	10,33	9,07	10,01	8,38	3,86	3,95	4,05	4,31	4,40	0,73
12	0	+1,68	0	11,30	10,73	10,88	11,35	9,66	3,79	3,88	4,02	4,36	4,44	1,05
13	0	0	-1,68	7,62	5,36	3,56	2,93	1,67	3,74	3,40	3,21	2,74	2,59	0,71
14	0	0	+1,68	12,87	14,47	14,04	13,47	12,33	3,87	3,96	4,04	4,28	4,39	1,08
15(C)	0	0	0	11,75	10,90	11,02	10,84	9,92	3,82	3,96	4,10	4,44	4,54	1,09
16(C)	0	0	0	11,72	10,48	10,26	10,83	9,50	3,81	3,97	4,11	4,44	4,55	0,99
17(C)	0	0	0	10,31	9,57	9,19	10,32	8,92	3,81	3,97	4,09	4,43	4,56	0,94

* AMM - Água de maceração de milho

4.3.1.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

O acompanhamento da atividade enzimática da lipase pode ser observado através das figuras 4.16 (a), para os ensaios de 1 ao 9, e 4.16 (b) para os ensaios 10 ao 17. Durante estes ensaios observou-se um comportamento semelhante aos ensaios dos planejamentos experimentais para o óleo de oliva, ou seja, ao atingirem 8 horas de fermentação os ensaios tiveram um aumento significativo na atividade enzimática, permanecendo este perfil praticamente constante ou com um pequeno aumento até o final da fermentação, com exceção do ensaio 13 (1% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 1% de água de maceração de milho), que apresentou uma queda na atividade após as 7,5 horas de fermentação. Tudo indica que a queda da atividade enzimática neste ensaio está associada com a queda do pH, fenômeno já observado anteriormente nos outros planejamentos. O ensaio 14 (1% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 8% de água de maceração de milho) apresentou uma maior atividade enzimática ao longo do tempo.

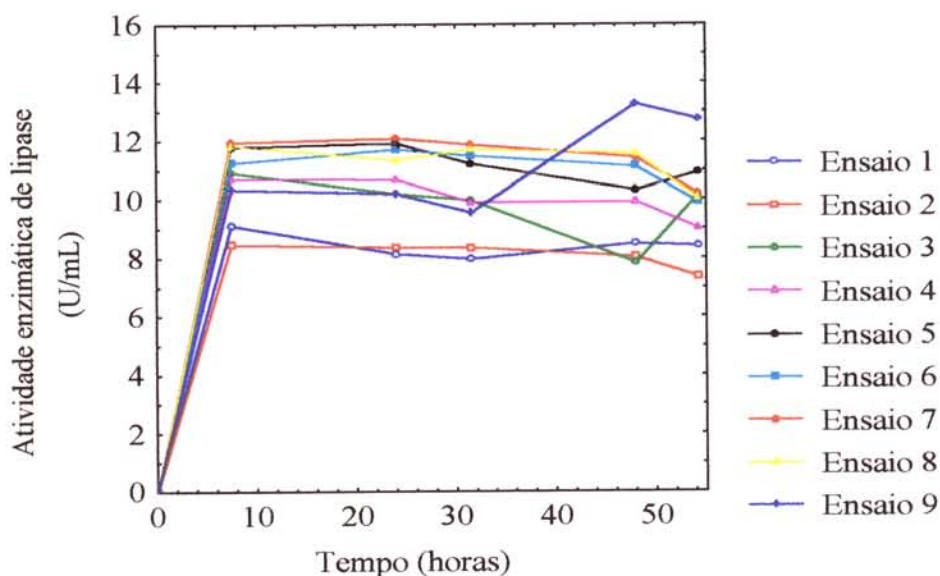


Figura 4.16 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

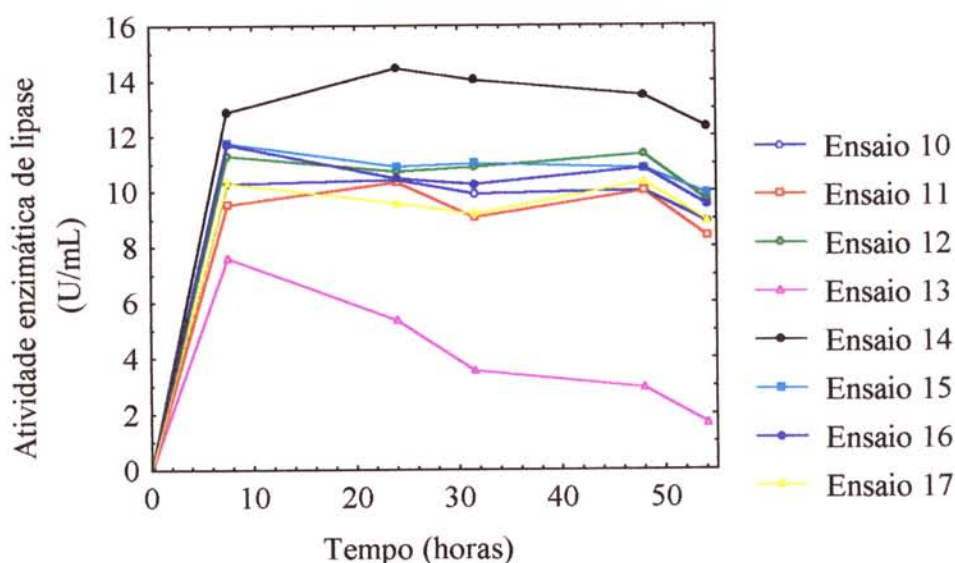


Figura 4.16 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.1.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação

O pH apresentou uma tendência de aumento no decorrer do tempo de fermentação com exceção do ensaio 13 (1% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 1% de água de maceração de milho), que apresentou uma diminuição do pH associada ao decréscimo da atividade enzimática. Este acompanhamento do pH pode ser observado pelas figuras 4.17 (a) e 4.17 (b) para os ensaios 1 ao 9 e 10 ao 17, respectivamente.

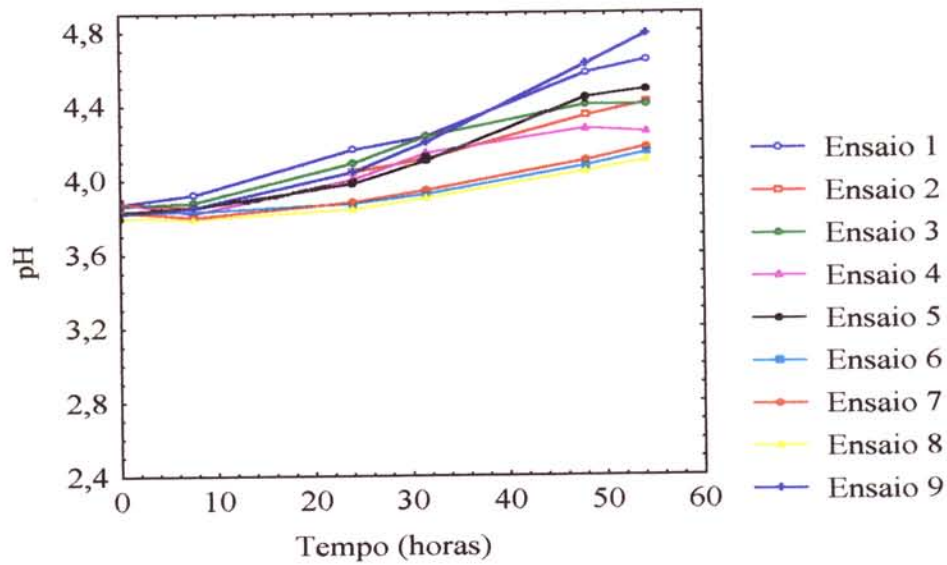


Figura 4.17 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

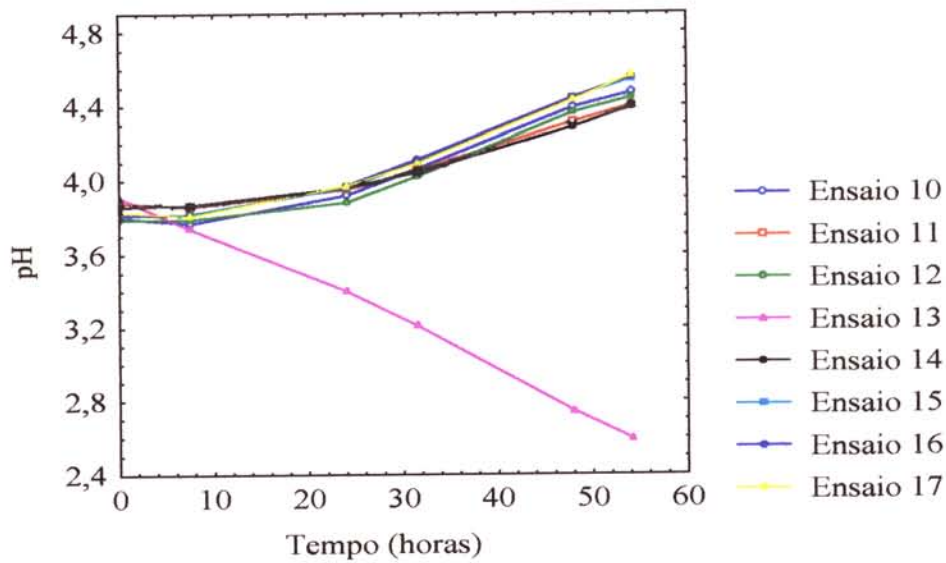


Figura 4.17 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.1.3 - Massa Seca

A massa seca foi determinada em 54,17 horas de fermentação. O resultado está apresentado na tabela 4.15, onde pode ser observado que os ensaios 10 (1,5% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 4,5% de água de maceração de milho), 12 (1% de óleo de soja, 1% de NH_4NO_3 e 4,5% de água de maceração de milho), 14 (1% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 8% de água de maceração de milho) e 15 (1% de óleo de soja, 0,5% de NH_4NO_3 e 4,5% de água de maceração de milho) apresentaram massa seca similar, no entanto a atividade enzimática do ensaio 14 foi superior aos demais. Este resultado vem confirmar os resultados obtidos para o óleo de oliva, onde não se observou correlação entre o crescimento celular e a atividade enzimática de lipase.

4.3.1.4 - Produtividade

A produtividade apresentada nas figuras 4.18 (a), para os ensaios 1 ao 9, e 4.18 (b), para os ensaios 10 ao 17, tem o mesmo comportamento do óleo de oliva, indicando que após 8 horas de fermentação o aumento da atividade enzimática é muito pequeno.

Pode-se observar que a produtividade foi maior nas primeiras 8 horas de fermentação, consequentemente a análise estatística do planejamento experimental para um ajuste de modelo empírico foi realizada neste tempo de fermentação.

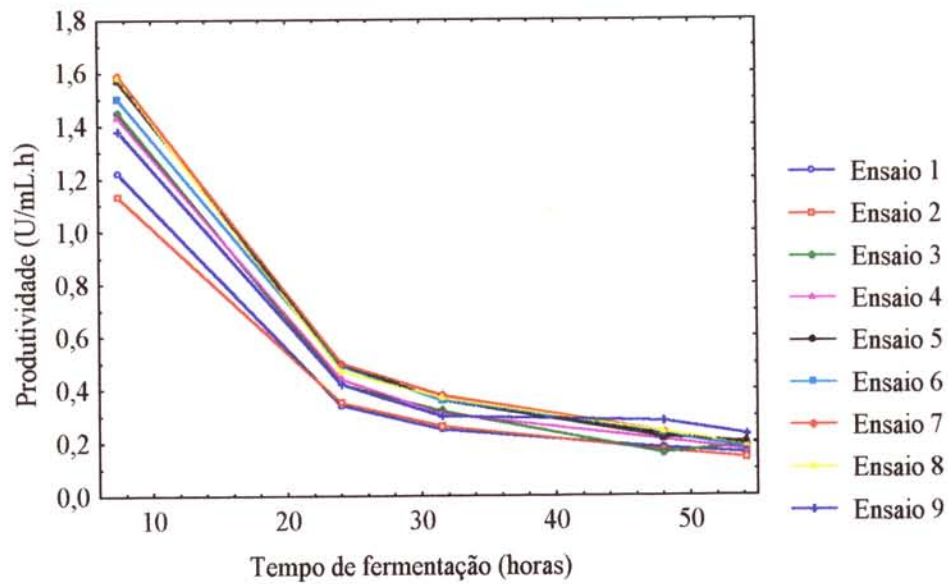


Figura 4.18 (a): Produtividade ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

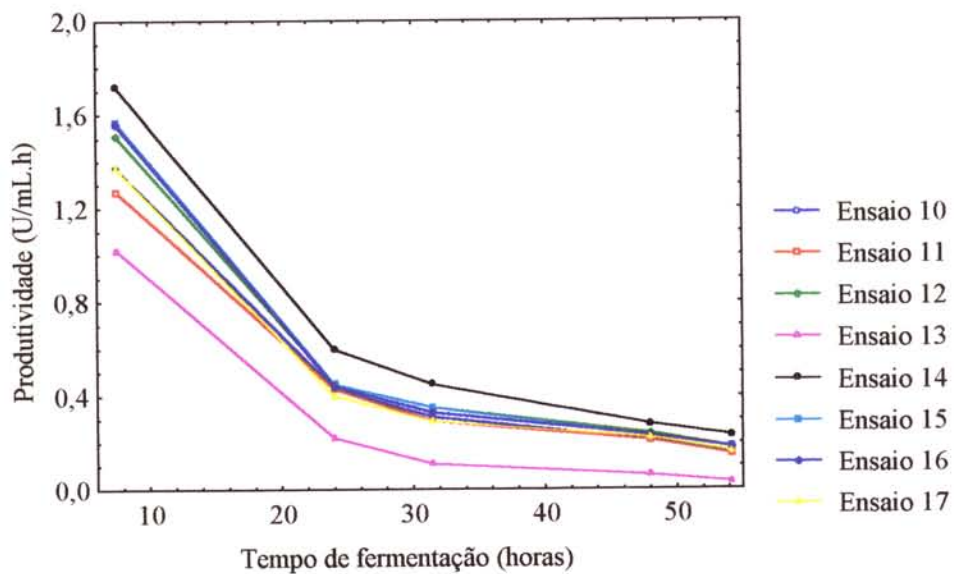


Figura 4.18 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o quarto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.1.5 - Análise dos Efeitos de cada Variável Sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Os efeitos principais e de interações das variáveis concentração de óleo de soja, NH_4NO_3 e água de maceração de milho podem ser observados pela tabela 4.16. Quando a concentração do óleo de soja passou de 0,7% para 1,3% não produziu um efeito significativo sobre a atividade enzimática no decorrer da fermentação. O aumento da concentração do NH_4NO_3 apresentou um efeito significativo aumentando a atividade enzimática. No entanto, a água de maceração de milho é a variável com maior efeito sobre a atividade enzimática da lipase ao longo de toda fermentação, aumentando a resposta desejada. Os efeitos principais ao longo do tempo das variáveis estudadas podem ser verificados através da figura 4.19.

Tabela 4.16: Efeitos principais e de interações das variáveis do quarto planejamento experimental em 7,5 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro Padrão
Média	10,887*	0,209*
% Óleo de soja	-0,384	0,491
% NH_4NO_3	1,199	0,491
%AMM	1,898*	0,491*
% óleo de soja x % NH_4NO_3	0,221	0,491
% óleo de soja x %AMM	0,050	0,491
% NH_4NO_3 x %AMM	-0,826	0,491

*valores estatisticamente significativos

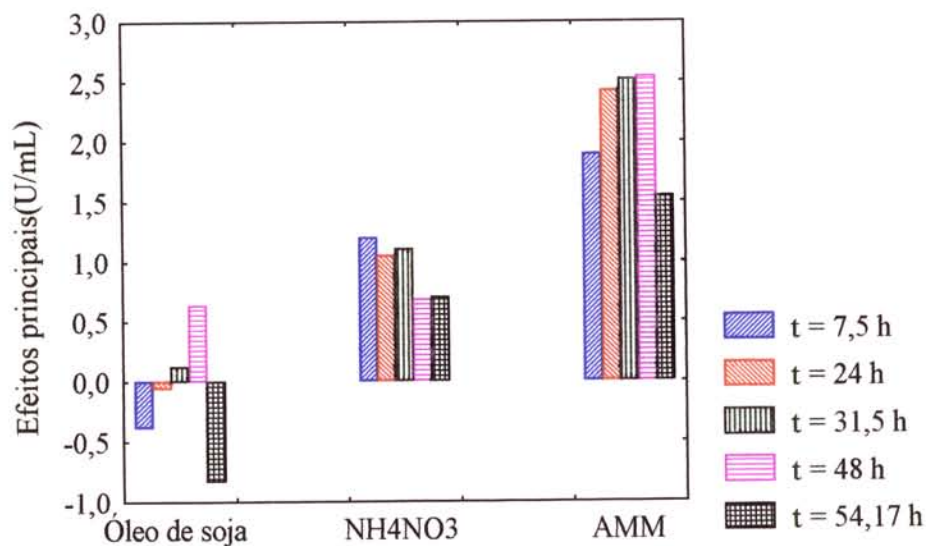


Figura 4.19: Efeitos principais das variáveis do quarto planejamento experimental.

4.3.1.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental é possível estabelecer um modelo de 1ª ordem que descreva a tendência do processo.

A tabela 4.17 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de 1ª ordem que represente a atividade enzimática em função das variáveis independentes estudadas (concentração de óleo de soja, nitrato de amônio e água de maceração de milho) para as 7,5 horas de fermentação.

Tabela 4.17: Coeficientes de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 7,5 horas para o quarto planejamento experimental.

Fatores	Coefficiente de Regressão
Média	11,22697*
% óleo de soja (L)	-0,24003
% óleo de soja (Q)	-0,45701
% NH ₄ NO ₃ (L)	1,13892*
% NH ₄ NO ₃ (Q)	-0,38261
% AMM (L)	2,40540*
% AMM (Q)	-0,50307
% óleo de soja x % NH ₄ NO ₃	0,22120
% óleo de soja x % AMM	0,05045
% NH ₄ NO ₃ x % AMM	-0,82659

*valores estatisticamente significativos

Os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente não significativos foram desconsiderados no modelo e consequentemente foram adicionados aos resíduos referentes a falta de ajuste.

A equação 4.3 relaciona a atividade enzimática da lipase (AL) em função das variáveis codificadas:

$$AL = 10,69 + 1,14 * NH_4NO_3 + 2,40 * AMM \quad (4.3)$$

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na tabela 4.18. Verifica-se que nenhum termo quadrático e de interação entre as variáveis é estatisticamente significativo.

Tabela 4.18: Tabela ANOVA para o quarto planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	24,148	2	12,074	27,13	3,74
Resíduos	6,225	14	0,445		
Total	30,373	16	1,898		

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 79,50$

Coefficiente de correlação: $R = 0,892$

O valor do teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a distribuição a 95% de confiança e verificou-se para a atividade enzimática de lipase que F (regressão/resíduos) = 27,13 foi 7,25 vezes maior que o $F_{0,95;5;11} = 3,74$, indicando que o modelo de 1ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para obtenção das superfícies de resposta. O valor do coeficiente de regressão foi igual a 0,892, bastante satisfatório para este tipo de experimentos.

A figura 4.20 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores preditos (modelo). Observa-se uma boa concordância entre as respostas, podendo-se prever o comportamento da resposta frente a variação das variáveis estudadas.

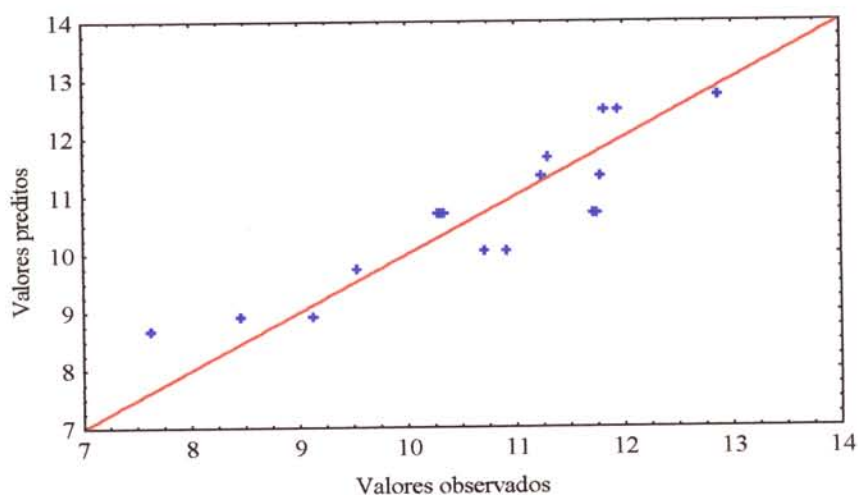


Figura 4.20: Valores observados *versus* valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o quarto planejamento experimental.

Com o modelo foi possível obter as superfícies de resposta para análise das melhores condições do meio de cultura que levam a maiores atividades enzimáticas. Pelas figuras 4.21(a) e 4.21 (b) pode-se concluir que um aumento da concentração de NH_4NO_3 aumentou a atividade enzimática de lipase independente dos níveis de concentração da água de maceração de milho. A baixos níveis de NH_4NO_3 , um aumento da concentração de água de maceração de milho aumentou significativamente a atividade enzimática. A atividade enzimática máxima é obtida para altas concentrações de água de maceração de milho e NH_4NO_3 .

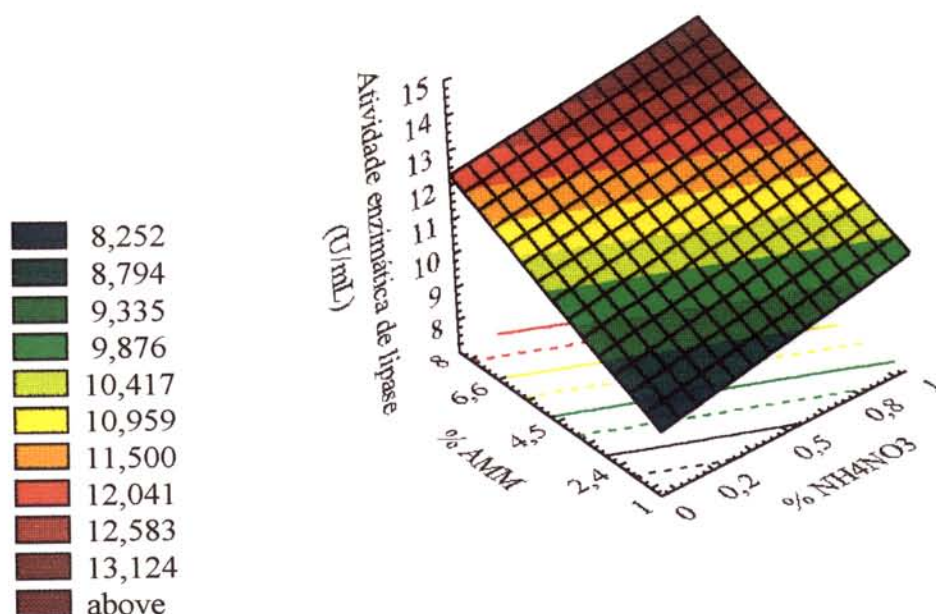


Figura 4.21 (a): Superfície de resposta para a atividade enzimática de lipase em função da concentração da água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 1%) para o quarto planejamento experimental.

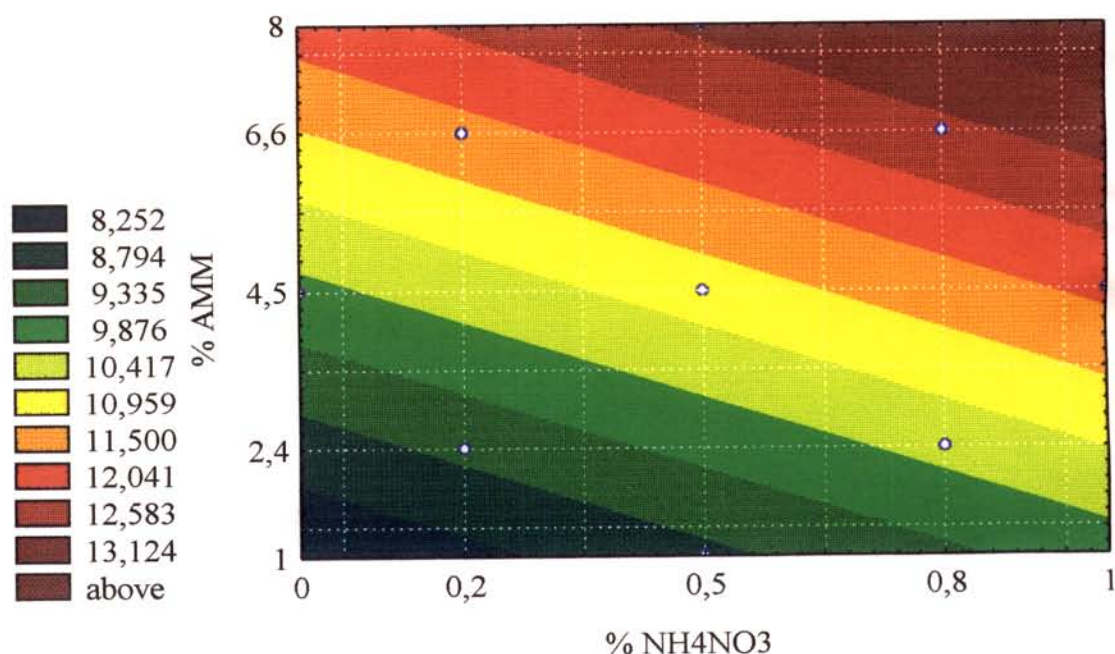


Figura 4.21 (b): Curva de contorno para a atividade enzimática de lipase em função da concentração da água de maceração de milho e NH₄NO₃ (óleo de soja a 1%) para o quarto planejamento experimental.

A variação da concentração de óleo de soja não apresentou nenhuma diferença significativa na atividade enzimática da lipase, nem a interação entre esta variável e as concentrações de NH₄NO₃ e água de maceração de milho, não entrando, portanto, no modelo proposto, consequentemente a superfície gerada para esta variável e a combinação entre as outras mostraria uma reta sem variação na resposta. Isto indica que a concentração mínima de 0,5% de óleo de soja como indutor é suficiente para obtenção das máximas atividades enzimáticas obtidas neste planejamento.

4.3.2 - Quinto Planejamento Fatorial: Estudo da Concentração de Água de Maceração de Milho, NH_4NO_3 e Óleo de Soja sobre a Atividade Enzimática da Lipase (Níveis Modificados)

Neste planejamento experimental foram estudadas as mesmas variáveis do quarto planejamento. No entanto, as faixas de concentrações da água de maceração de milho e do NH_4NO_3 foram ampliadas, pois mostravam um aumento na atividade enzimática de lipase com o aumento das suas concentrações, e a do óleo de soja diminuída, já que no planejamento anterior a sua variação de 0,5 a 1,5% não apresentou nenhuma alteração na resposta de atividade enzimática. Os valores reais utilizados neste planejamento estão apresentados na tabela 4.19 e os valores codificados e suas respectivas respostas apresentados na tabela 4.20.

Tabela 4.19: Tabela de níveis para as variáveis do quinto planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
% Óleo de soja	0,2	0,36	0,6	0,84	1,0
% NH_4NO_3	0,5	0,9	1,5	2,1	2,5
% Água de maceração de milho	5	7,02	10,0	12,98	15,0

Tabela 4.20: Quinto planejamento experimental codificado

Ensaio	Óleo de soja	NH ₄ NO ₃	AMM*	Ativ. (U/mL) T=8,25 h	Ativ. (U/mL) T=24,08 h	Ativ. (U/mL) T=32 h	Ativ. (U/mL) T=48,42 h	Ativ. (U/mL) T=53,5 h	pH T=8,25 h	pH T=24,08 h	pH T=32 h	pH T=48,42 h	pH T=53,5 h	Massa Seca (g/100g)
1	-1	-1	-1	11,61	12,41	13,79	13,38	14,20	3,87	3,94	3,99	4,13	4,17	0,46
2	+1	-1	-1	12,41	13,12	14,46	13,70	14,88	3,85	3,91	3,97	4,11	4,15	0,87
3	-1	+1	-1	14,72	14,91	15,60	15,60	15,98	3,86	3,92	3,94	4,02	4,05	0,53
4	+1	+1	-1	14,72	15,33	15,77	15,65	15,68	3,85	3,88	3,91	3,99	4,02	0,79
5	-1	-1	+1	15,65	17,92	19,09	19,86	20,48	3,86	3,92	3,97	4,07	4,09	0,80
6	+1	-1	+1	15,59	15,28	17,25	16,86	16,45	3,86	3,88	3,91	3,97	3,99	0,58
7	-1	+1	+1	17,86	17,02	17,78	17,07	16,94	3,85	3,87	3,88	3,93	3,94	0,38
8	+1	+1	+1	18,56	18,20	18,18	18,16	18,00	3,84	3,85	3,86	3,90	3,92	0,69
9	-1,68	0	0	14,67	16,46	18,22	17,60	17,66	3,85	3,94	3,98	4,10	4,12	0,68
10	+1,68	0	0	14,00	14,96	16,42	16,81	16,14	3,85	3,90	3,92	4,02	4,04	0,64
11	0	-1,68	0	13,43	15,45	16,15	17,97	18,70	3,86	3,94	3,99	4,18	4,22	0,82
12	0	+1,68	0	17,46	17,39	17,52	17,62	17,47	3,84	3,86	3,87	3,93	3,95	0,52
13	0	0	-1,68	12,46	13,77	15,64	16,13	16,00	3,85	3,92	4,00	4,19	4,23	0,79
14	0	0	+1,68	18,07	17,30	18,12	17,85	17,75	3,85	3,85	3,86	3,93	3,95	0,75
15(C)	0	0	0	14,09	15,07	15,86	16,90	16,68	3,84	3,89	3,93	4,03	4,04	0,60
16(C)	0	0	0	14,17	15,64	16,72	17,63	17,41	3,84	3,90	3,94	4,04	4,05	0,61
17(C)	0	0	0	13,79	17,11	17,68	17,95	17,73	3,85	3,91	3,94	4,05	4,07	0,72

* AMM - Água de maceração de milho

4.3.2.1 - Acompanhamento da Atividade Enzimática em Função do Tempo de Fermentação

O acompanhamento da atividade enzimática de lipase pode ser observado através das figuras 4.22 (a), para os ensaios de 1 ao 9, e 4.22 (b) para os ensaios 10 ao 17. Durante esta fermentação observou-se que ao atingir 8 horas de fermentação os ensaios tiveram um aumento significativo na atividade enzimática, permanecendo a seguir este perfil praticamente constante. O ensaio 5 (0,36% de óleo de soja, 0,9% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) apresentou uma maior atividade enzimática ao longo das 53,5 horas de fermentação.

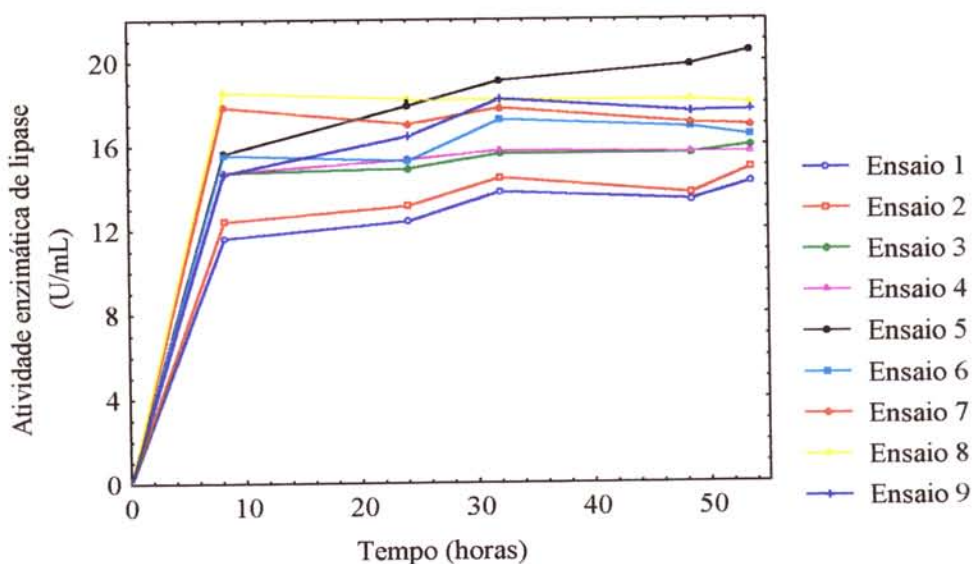


Figura 4.22 (a): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

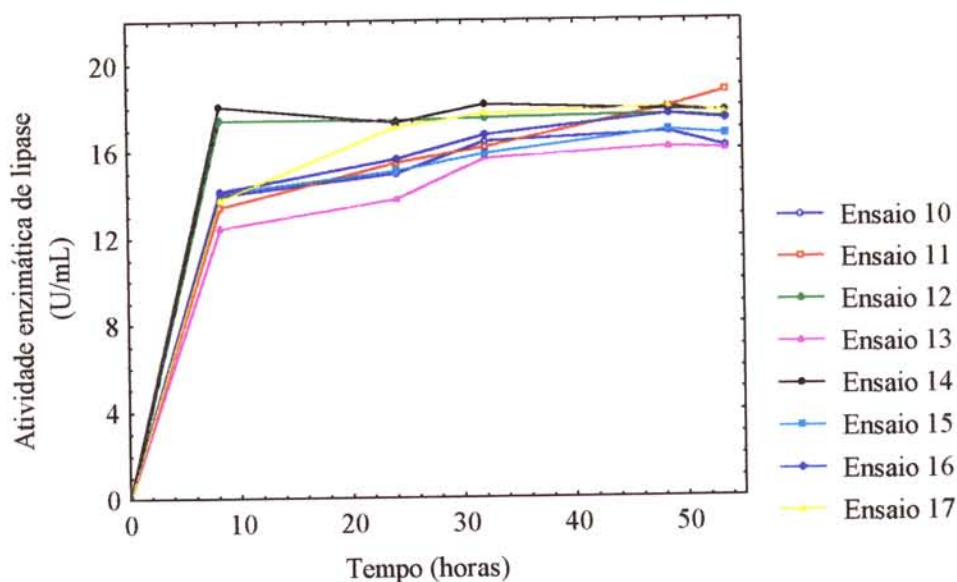


Figura 4.22 (b): Atividade enzimática observada ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.2.2 - Acompanhamento do pH ao Longo do Tempo de Fermentação

O pH apresentou uma tendência de aumento no decorrer do tempo de fermentação. O acompanhamento do pH pode ser observado pelas figuras 4.23 (a) e 4.23 (b), para os ensaios 1 ao 9 e 10 ao 17, respectivamente.

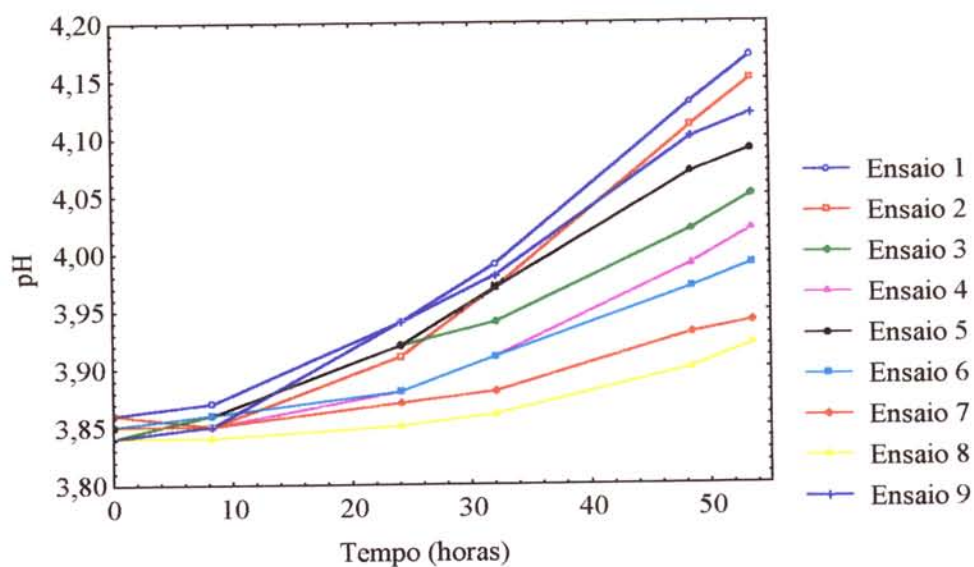


Figura 4.23 (a): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

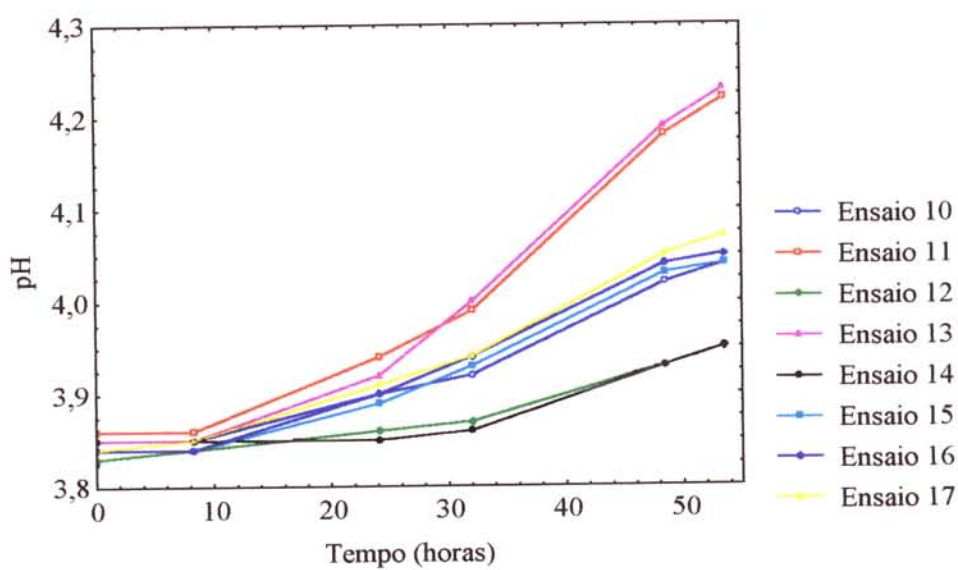


Figura 4.23 (b): Acompanhamento do pH ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.2.3 - Massa Seca

A massa seca foi determinada em 54,17 horas de fermentação. O resultado está apresentado na tabela 4.20, onde pode ser observado que o ensaio 2 (0,84% de óleo de soja, 0,9% de NH_4NO_3 e 7,02% de água de maceração de milho) apresentou uma maior massa seca, porém os ensaios 7 (0,36% de óleo de soja, 2,1% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) e 14 (0,6% de óleo de soja, 1,5% de NH_4NO_3 e 15% de água de maceração de milho), que atingiram uma massa seca inferior, apresentaram uma maior atividade enzimática, confirmando assim os resultados obtidos anteriormente, onde a atividade enzimática de lipase mais uma vez mostra-se não estar associada ao crescimento celular.

4.3.2.4 - Produtividade

A produtividade pode ser acompanhada pelas figuras 4.24 (a), para os ensaios 1 ao 9, e 4.24 (b) para os ensaios 10 ao 17, verificando-se o mesmo comportamento dos planejamentos anteriores.

Da mesma forma que anteriormente a produtividade foi bem maior nas primeiras 8 horas de fermentação, a análise estatística do planejamento experimental para um ajuste de modelo empírico também foi realizada neste tempo de fermentação.

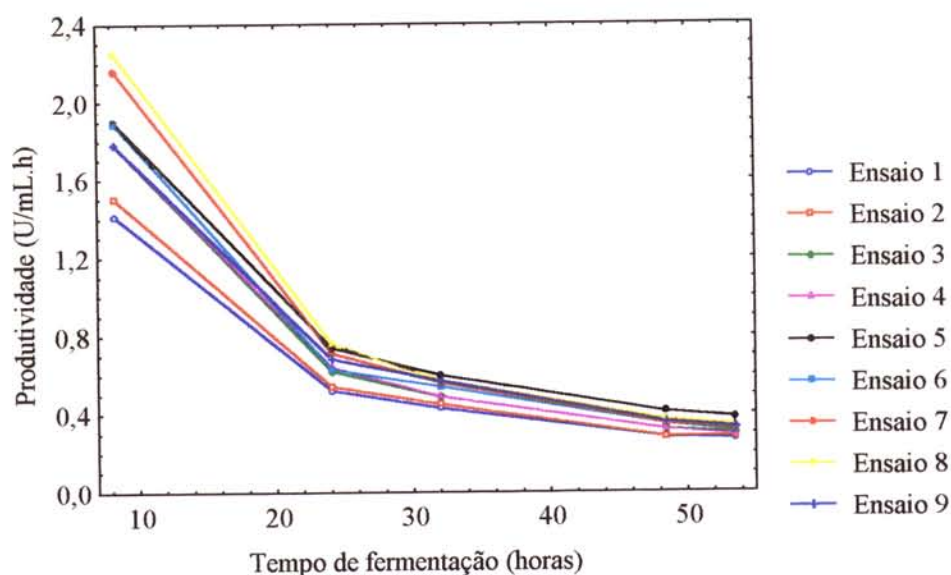


Figura 4.24 (a). Produtividade ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 1 ao 9).

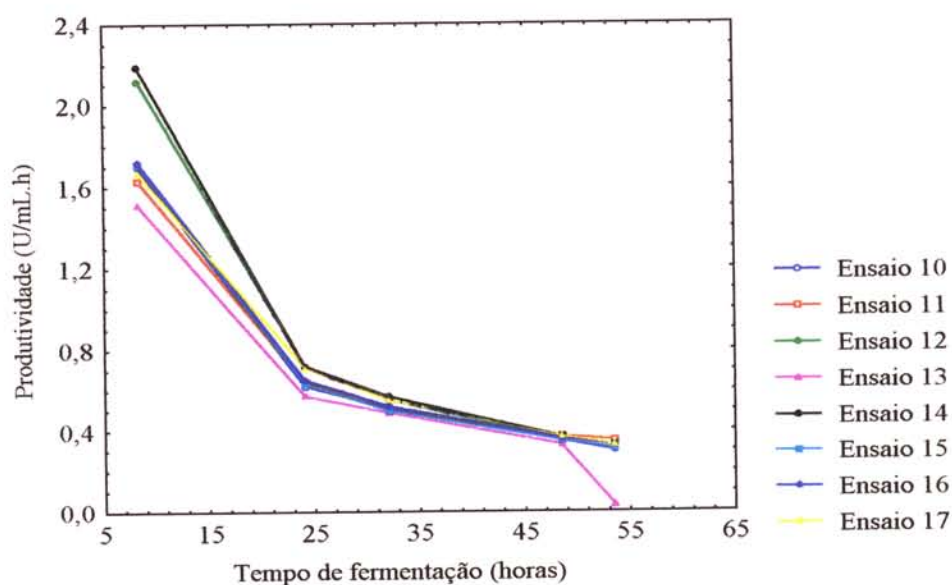


Figura 4.24 (b): Produtividade ao longo da fermentação para o quinto planejamento experimental (Ensaio 10 ao 17).

4.3.2.5 - Análise dos Efeitos de cada Variável Sobre a Atividade Enzimática da Lipase

Pela tabela 4.21 pode-se verificar os efeitos principais e de interações das variáveis concentração de óleo de soja, NH_4NO_3 e água de maceração de milho. A mudança da concentração de óleo de soja de 0,36% para 0,84% não mostrou efeito significativo sobre a atividade enzimática no decorrer da fermentação. O aumento da concentração do NH_4NO_3 de 0,9% para 2,1% apresentou um efeito estatisticamente significativo nas primeiras 8 horas de fermentação, sendo este comportamento diminuído ao longo do processo. Para a água de maceração de milho a variação de 7,02 para 12,98% apresentou efeitos significativos ao longo de toda fermentação, aumentando a atividade enzimática da lipase. Os efeitos principais ao longo do tempo de fermentação podem ser observados através da figura 4.25.

Tabela 4.21: Efeitos principais e de interações das variáveis do quinto planejamento experimental em 8,25 horas de fermentação.

Fatores	Efeito (U/mL)	Erro Padrão
Média	14,546*	0,076*
% Óleo de soja	-0,426	0,189
% NH_4NO_3	1,861*	0,189*
%AMM	2,759*	0,189*
% óleo de soja x % NH_4NO_3	-0,799	0,189
% óleo de soja x %AMM	-0,828*	0,189*
% NH_4NO_3 x %AMM	-0,845*	0,189*

*valores estatisticamente significativos

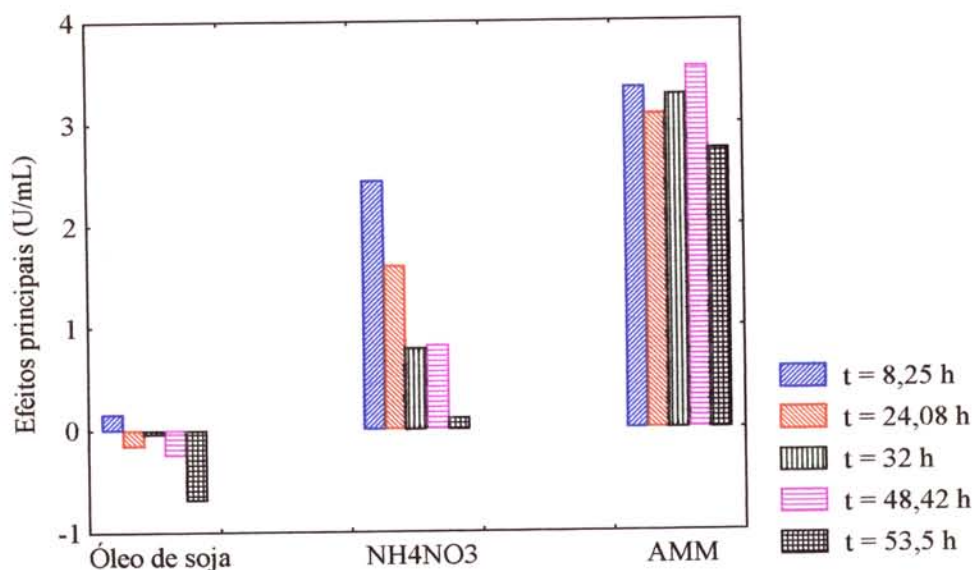


Figura 4.25: Efeitos principais de cada variável do quinto planejamento experimental.

4.3.2.6 - Verificação de um Modelo Empírico e Análise de Superfície de Resposta

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental foi possível estabelecer um modelo de 2ª ordem que descreve a tendência do processo de fermentação para produção de lipase.

A tabela 4.22 apresenta os valores dos coeficientes de regressão para um modelo de 2ª ordem que represente a atividade enzimática em função das variáveis independentes estudadas (concentração de óleo de soja, nitrato de amônio e água de maceração de milho) para as 8,25 horas de fermentação. Os termos relativos ao óleo de soja não entraram no modelo, mostrando que esta variação na faixa de concentração estudada não afeta a resposta de atividade enzimática, e que a água de maceração de milho é a variável mais importante na resposta desejada.

Tabela 4.22: Coeficientes de regressão estimados com a atividade enzimática de lipase em 8,25 horas para o quinto planejamento experimental.

Fatores	Coeficientes de Regressão
Média	14,01214*
% óleo de soja (L)	-0,04728
% óleo de soja (Q)	0,25237
% NH ₄ NO ₃ (L)	2,54742*
% NH ₄ NO ₃ (Q)	1,03928*
% AMM (L)	3,46029*
% AMM (Q)	0,91302*
% óleo de soja x % NH ₄ NO ₃	-0,01036
% óleo de soja x % AMM	-0,03936
% NH ₄ NO ₃ x % AMM	-0,05594

*valores estatisticamente significativos

Os coeficientes de regressão não estatisticamente significativos foram desconsiderados no modelo, e adicionados à falta de ajuste na análise de variância.

A equação 4.4 relaciona a atividade enzimática da lipase (AL) em função das variáveis codificadas:

$$AL = 14,17 + 1,27 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3 + 0,48 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3^2 + 1,73 \cdot \text{AMM} + 0,42 \cdot \text{AMM}^2 \quad (4.4)$$

A validade do modelo foi verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na tabela 4.23.

Tabela 4.23: Tabela ANOVA para o quinto planejamento experimental.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	67,09	4	16,77	167,70	3,26
Resíduos	1,170	12	0,10		
Falta de ajuste	1,085	10			
Erro puro	0,080	2			
Total	68,256	16			

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 98,29$

% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 99,88$

Coefficiente de correlação: $R = 0,991$

O valor do teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a distribuição a 95% de confiança, verificando-se que, para a atividade enzimática de lipase, F (regressão/resíduos) = 167,70 é mais de 50 vezes maior que o $F_{0,95;5;11} = 3,26$, indicando que o modelo foi altamente significativo e preditivo. Os resíduos e o erro puro foram muito baixos, indicando a boa reprodutibilidade analítica e o coeficiente de correlação 0,99 muito maior do que o usualmente esperado para planejamentos onde a resposta envolvida é a atividade enzimática.

A figura 4.26 mostra os valores observados (experimentais) em função dos valores previstos (modelo). Observa-se que o modelo de 2ª ordem pode prever muito bem o comportamento da atividade enzimática de lipase frente a variação das variáveis estudadas.

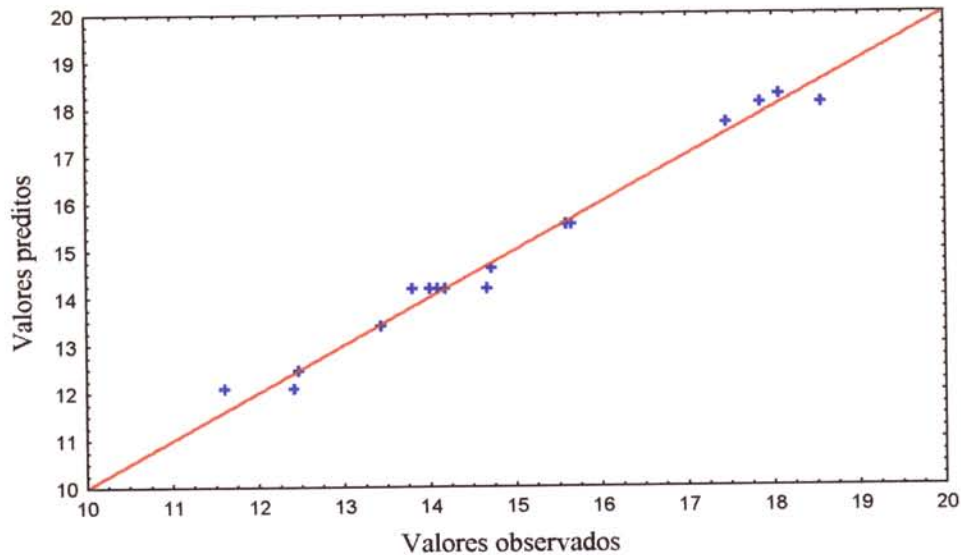


Figura 4.26: Valores observados *versus* valores preditos para a atividade enzimática de lipase para o quinto planejamento experimental.

Através do modelo foi possível construir as superfícies de respostas que estão apresentadas nas figuras 4.27 (a) e 4.27 (b). Pode-se concluir que um aumento da concentração de NH_4NO_3 aumentou a atividade enzimática de lipase independente dos níveis de concentração da água de maceração de milho. A baixos níveis de NH_4NO_3 um aumento da água de maceração de milho aumentou a atividade enzimática e para altos níveis de NH_4NO_3 essa variação provocou um aumento na resposta mais significativo. A análise de superfície de resposta indicou que o aumento de NH_4NO_3 e água de maceração de milho devem aumentar ainda mais a produção da enzima lipase.

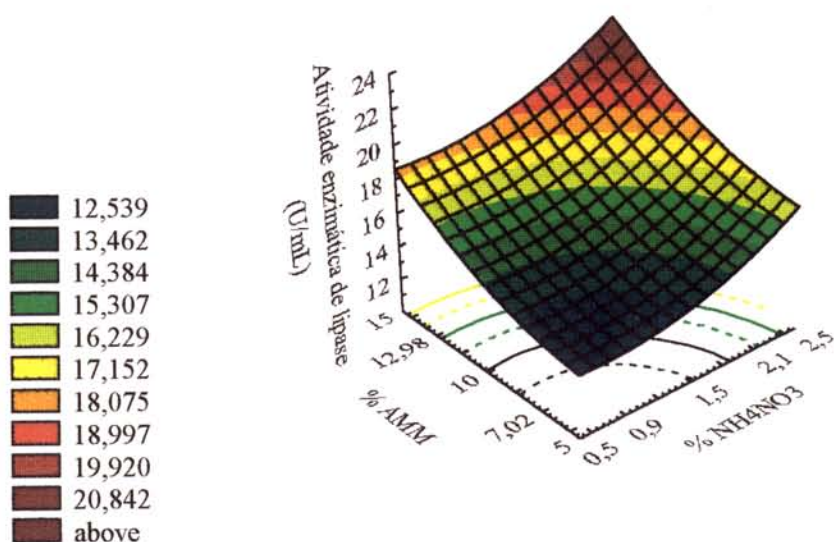


Figura 4.27 (a): Superfície de resposta para a atividade enzimática de lipase em função da concentração da água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 0,6%) para o quinto planejamento experimental.

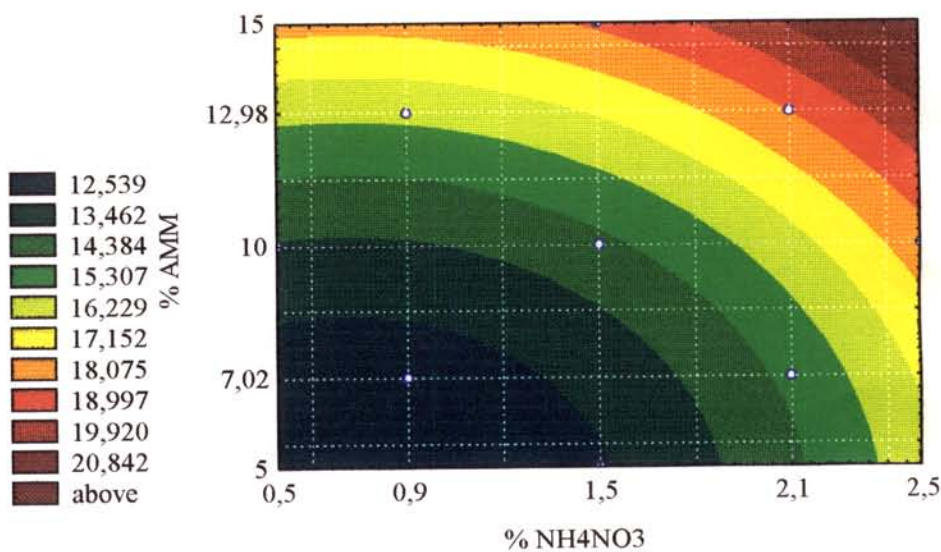


Figura 4.27 (b): Curva de contorno para a atividade enzimática de lipase em função da concentração da água de maceração de milho e NH_4NO_3 (óleo de soja a 0,6%) para o quinto planejamento experimental.

Da mesma forma que o planejamento experimental anterior, a variação de óleo de soja não apresentou nenhuma diferença significativa na atividade enzimática da lipase, nem a interação entre esta variável e as concentrações de NH_4NO_3 e água de maceração de milho, não entrando portanto no modelo proposto, consequentemente a superfície gerada para esta variável e a combinação entre as outras mostraria uma reta sem variação na resposta. Isto indica que a concentração mínima de 0,2% de óleo de soja como indutor é suficiente para obtenção das máximas atividades enzimáticas obtidas neste planejamento.

As maiores atividades enzimáticas alcançadas nos ensaios deste planejamento experimental foram de aproximadamente 18 U/mL, sendo três vezes superior à atividade enzimática alcançada por MACÊDO (1995).

4.4 - Discussão e Comparação dos Resultados Obtidos para os Planejamentos Experimentais Realizados

4.4.1 - Comparação entre o Segundo Planejamento Experimental e o Quarto Planejamento Experimental

Através de uma comparação entre o segundo planejamento experimental e o quarto planejamento experimental, que utilizaram as faixas de concentrações para o óleo de oliva e o óleo de soja (0,5 a 1,5%), a água de maceração de milho (1 a 8%) e o NH_4NO_3 (0 a 1%), pode-se observar pelas tabelas 4.5 e 4.15 que as atividades enzimáticas alcançadas ao longo das fermentações para os ensaios correspondentes apresentaram valores semelhantes, com exceção dos ensaios 5 (0,7% de óleo de oliva, 0,2% de NH_4NO_3 e 6,6% de água de maceração de milho) e 12 (1% de óleo de oliva, 1% de NH_4NO_3 e 4,5% de água de maceração de milho). Nestes dois experimentos obteve-se uma atividade enzimática superior aos respectivos ensaios com óleo de soja.

Analisando-se os efeitos principais das variáveis pelas figuras 4.6 para o segundo planejamento experimental e 4.18 para o quarto planejamento experimental, pode-se constatar que para ambos os planejamentos os comportamentos frente às variações nas concentrações das variáveis foram semelhantes. A variação na concentração de óleo de oliva e óleo de soja, na faixa

estudada, não apresentou influência significativa na resposta. Um aumento na concentração de nitrato de amônio e água de maceração de milho levou a um aumento na atividade enzimática de lipase.

Os modelos empíricos propostos para o cálculo da atividade enzimática de lipase utilizando óleo de oliva e óleo de soja, apresentados nos itens 4.2.1.6 e 4.3.1.6, mostraram-se capazes de prever muito bem a resposta desejada. Para os dois planejamentos a tabela ANOVA mostrou resultados de coeficiente de correlação e teste F acima dos resultados encontrados na literatura.

Analisando-se os resultados obtidos pode-se observar que a variação na concentração do óleo de oliva e no óleo de soja não influenciaram na atividade enzimática da lipase. Portanto, visando a uma minimização de custos com o meio cultura, decidiu-se diminuir a faixa de óleo de oliva e óleo de soja que estava sendo estudada. Como a variação da concentração da água de maceração de milho aumentou a atividade enzimática de lipase nos dois planejamentos experimentais, foi interessante um estudo desta variável com as faixas de concentrações ampliadas. Para o segundo planejamento experimental a faixa de concentração de NH_4NO_3 estudada mostrou-se adequada, conseqüentemente para a realização do terceiro planejamento experimental foi considerada a mesma faixa de concentração desta variável. Entretanto, quando utilizou-se o óleo de soja as superfícies de respostas mostraram que seria necessário uma ampliação na faixa de concentração do NH_4NO_3 .

4.4.2 - Comparação entre o Terceiro Planejamento Experimental e o Quinto Planejamento Experimental

Através de uma comparação entre o terceiro planejamento experimental e o quinto planejamento experimental que utilizaram as faixas de concentrações para o óleo de oliva e o óleo de soja (0,5 a 1,5%), a água de maceração de milho (1 a 8%) e para o NH_4NO_3 (0 a 1% e 0,5 a 2,5%) pode-se observar pelas tabelas 4.10 e 4.20 que as atividades enzimáticas alcançadas ao longo das fermentações, para os ensaios similares destes planejamentos, apresentaram valores ligeiramente superiores com o uso do óleo de soja. As maiores atividades enzimáticas foram atingidas para os ensaios 7 (0,36% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de

maceração de milho), 8 (0,84% de óleo de oliva, 0,8% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) e 14 (0,6% de óleo de oliva, 0,5% de NH_4NO_3 e 15% de água de maceração de milho) no terceiro planejamento experimental e ensaios 5 (0,36% de óleo de soja, 0,9% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho), 8 (0,84% de óleo de soja, 2,1% de NH_4NO_3 e 12,98% de água de maceração de milho) e 14 (0,6% de óleo de soja, 1,5% de NH_4NO_3 e 15% de água de maceração de milho) no quinto planejamento experimental.

Analisando-se os efeitos principais das variáveis pelas figuras 4.12 para o terceiro planejamento experimental e 4.24 para o quinto planejamento experimental, pode-se constatar que a variação na concentração do óleo de oliva e óleo de soja não apresentou efeito estatisticamente significativo. A concentração do NH_4NO_3 apresentou um efeito significativo maior no início da fermentação com o uso do óleo de soja. A água de maceração de milho influenciou na resposta para os dois planejamentos, levando a um aumento na atividade enzimática de lipase.

Os modelos empíricos propostos para o cálculo da atividade enzimática de lipase utilizando óleo de oliva e óleo de soja, apresentados nos itens 4.2.2.6 e 4.3.2.6, mostraram-se capazes de prever muito bem a resposta analisada.

Pelos resultados obtidos e análise das superfícies de respostas pode-se observar que as variações na concentração do óleo de oliva e o óleo de soja não influenciaram a atividade enzimática de lipase. Em níveis de concentrações elevadas para a água de maceração de milho e pontos centrais para o NH_4NO_3 constatou-se as melhores atividades enzimáticas com o uso do óleo de oliva. No entanto, para o óleo de soja um aumento na água de maceração de milho e NH_4NO_3 indica um aumento na atividade enzimática da lipase.

5 - Conclusões

Os estudos realizados, através dos planejamentos experimentais, com a finalidade de verificar a influência da composição do meio de cultura utilizando-se glicose, óleo de oliva, óleo de soja, água de maceração de milho e nitrato de amônia para produção de lipase por *Geotrichum* sp., levaram às seguintes conclusões:

- A atividade enzimática de lipase foi fortemente influenciada pela presença de glicose no meio de cultura. A glicose foi consumida pelo microrganismo, proporcionando um bom crescimento celular, porém a atividade enzimática diminuiu acentuadamente com a presença deste açúcar. Portanto, a produção da enzima lipase foi regulada pela concentração de glicose.
- Através do acompanhamento da fermentação observou-se que o decréscimo da atividade enzimática esteve associado a um decréscimo do pH.
- Um maior crescimento celular não implicou em um aumento na atividade enzimática, devido à produção da enzima ser induzida pela presença do óleo e não estar associada ao crescimento celular.
- Ocorreu produção da enzima lipase com o uso do óleo de oliva e óleo de soja, não resultando em diferenças significativas quanto à atividade enzimática.
- A concentração do nitrato de amônia e da água de maceração de milho no meio de cultura foram as variáveis que mais influenciaram a produção da enzima.
- A produtividade, para as diferentes combinações de composição do meio de cultura, foi bem superior para as 8 horas iniciais do processo fermentativo.
- Através das tabelas de análise de variância verificou-se que os modelos empíricos propostos podem prever adequadamente a atividade enzimática de lipase frente às variações nas variáveis estudadas.
- Pela análise da superfície de resposta as melhores condições para produção da enzima lipase utilizando o óleo de oliva foram encontradas em uma faixa de nitrato de amônio de 0,8% a 1%, água de maceração de milho 13% a 15% e óleo de oliva a 0,6% alcançando valores de atividade enzimática na faixa de 12 U/mL com aproximadamente 8 horas de fermentação.

- Pela análise da superfície de resposta as melhores condições para produção da enzima lipase, utilizando o óleo de soja, foram encontradas em uma faixa de nitrato de amônio de 2,1% a 2,5%, água de maceração de milho 13% a 15% e óleo de soja a 0,6% alcançando valores de atividade enzimática na faixa de 18 U/mL com aproximadamente 8 horas de fermentação.

6 - Sugestões para Trabalhos Futuros

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

- Estudar uma ampliação de escala, para o óleo de soja economicamente muito mais viável, através da técnica de planejamento experimental, verificando a influência das variáveis independentes: agitação, aeração, temperatura e pH na atividade enzimática de lipase.

- Realizar um estudo da razão carbono/nitrogênio nas diferentes composições dos meios de cultura, verificando a influência sobre a atividade enzimática.

- Pesquisar outras fontes de nitrogênio alternativas comercialmente viáveis que possibilitem um bom desempenho do processo quanto à atividade enzimática.

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. 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.
3. BAILLARGEON, M.W. Purification and specificity of lipases from *Geotrichum candidum*. **Lipids**, Champaign, v.25, n.12, p.841-848, Dec, 1990.
4. BARROS, B.N.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de Experimentos**. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1996, 299 p.
5. 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.
6. BORGSTON, B.; BROCKMAN, H.L.(Eds) **Lipases**, Elsevier, Amsterdam, Holland, 1984. *Apud: Química Nova*, São Paulo, v.18, n.6, p.544-554, Nov/Dec,1995.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. GELUK, M.A.; NORDE, H.K.; VANKALSBECK, H.K.A.I.; RIET, K.V. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.14, n.9, p.748-754, Sept, 1992.
12. 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.
13. GUIDOLIN, F.R. **Estudo da relação carbono/nitrogênio na produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095**. Campinas, 1998. 113p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
14. HAAS, M.J.; CICHOWICZ, D.J.; PHILIPS, J.; MOREAU, R. The hydrolysis of phosphatidylcholine by an immobilized lipase: Optimization of hydrolysis in organic solvents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.70, n.2, p.111-117, Feb, 1993.
15. 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.
16. HATZINIKOLAOU, D.G.; MACRIS, J.B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; FOUNTOUKIDIS. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biothechnology Letters**, London, v.18, n.5, p.547-552, May, 1996.
17. HENRIETTE, C. Protease and lipase by a strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.129-135, 1993.

18. 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.
19. 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.
20. JENSEN, B.H.; GALLUZO, D.R.; JENSEN, R.G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **Lipids**, Champaign, v.22, n.8, p.559-565, Aug, 1987.
21. MACÊDO, G.A. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum* sp.** Campinas, 1995. 121p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
22. MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.2, Apr/Jun, 1997.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. MENDIETA, O.; KAMIMURA, E. S.; COSTA, F. A.A.; SATO, H. H.; PASTORE, G.; MAUGERI, F. Produção em fermentador de tanque agitado e purificação parcial de lipase de *Geotrichum* sp. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2., 1997, Campinas. **Resumo**. Campinas, 1997, p.98.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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, p.59-74, 1994.
32. PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimun multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, p.305-325, 328-332, 1946.
33. POSORSKE, L.H. Industrial - scale application of enzymes to the fats and oils industry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, London, v.61, n.11, p.1758-1760, Champaign, Nov, 1984.

34. 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, 1993.
35. RODRIGUES, I.M. **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.
36. SEITZ, E.W. Industrial application of microbial lipases: A Review. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, Champaign, v.51, p.12-16, 1974.
37. 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.
38. SHIEH, C.J.; AKOH, C.C.; YEE, L.N. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.51, n.3, p.371-374, Aug, 1996.
39. 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.
40. 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.
41. SOUSA, R.N. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes* sp.** Campinas, 1996. 132p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

42. TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, crystallization and properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.37, n.6, p.1457-1464, June, 1973.
43. 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.
44. VEERARAGAVAN, K.; COLPITTS, T.; GIBBS, B. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1044, n.1, p.26-33, May, 1990.
45. VORDERWÜLBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparasion of lipases by different assays. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.14, n.8, p.631-639, Aug, 1992.
46. 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.
47. 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.