



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS AMBIENTAIS

LADIEL LUIZ PEDROZO TAVARES

***Produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014)
a partir de meios a base de resíduo da indústria de
sorvete***

Recife, 2011

LADIEL LUIZ PEDROZO TAVARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: Prof^a. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientador : Prof. Dr^a. Kaoru Okada

Recife

2011

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Bacillus licheniformis*
(UCP 1014) A PARTIR DE MEIOS A BASE DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO SORVETE**

Ladiel Luiz Pedrozo Tavares

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP/PE

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE/PE

Dedico

Aos meus filhos Ariely e Vinicius, benções do Grande Arquiteto para um espírito em necessidade de evolução.

“É preciso ter coragem, para que tudo na vida se faça por amor a Deus”.

Ândrocles Karamchandas Lima

Agradecimentos

A Deus, fonte infinita de luz, perfeição e amor pela oportunidade dada;

À minha família, pais, Luiz Leopoldino e Mary Mariza, pela confiança e apoio, minha irmã Fátima e meu cunhado Neto, pela torcida e incentivo, a Isly minha sobrinha pelo carinho acolhedor.

Aos meus filhos, Ariely e Vinicíus, motivos maior do meu esforço.

A Ana Paula, companheira em todos os momentos.

A família Mahatma Ghandi, mentores e trabalhadores pelo acolhimento e aprendizado espiritual.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva e Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada, pela oportunidade e por contribuírem para o meu crescimento.

Aos meus companheiros e amigos José Carlos e Marcelo Andrade (Negão), cuja amizade contribuiu para realização deste trabalho.

Aos professores, Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, coordenadora do NPCIAMB/UNICAP, Prof^a. Dr^a. Clarissa Daisy , pelo auxílio com as análises estatísticas, Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim, ao Prof. Dr. Valdemir Alexandre a Prof^a. Dr^a. Eliane Vasconcelos, ao prof. Dr. Marcos e a prof. Dr^a Aline Eslebão, pela contribuição prestada. À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa.

Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Alex Silva, Amanda Alencar, Ana Claudia, Carolina Arruda, Gustavo Macedo, João Vitaliano, Jaceline Maria, Mirthys Marinho, Maria das Graças, e Romualdo Paraizo, por compartilharem os bons momentos e dificuldades desta jornada;

À todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, pela atenção e apóio;

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e PROCAD-CAPES pela bolsa sanduíche no programa de pós-graduação em engenharia química da UNICAMP

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais: Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Capítulo I.....	1
1.Introdução	2
2.Objetivos	4
2.1.Objetivo geral	4
2.2.Objetivos específicos.....	4
3.Revisão da Literatura.....	5
3.1.Microrganismos como fonte de produção de enzimas.....	5
3.2. Enzimas.....	7
3.2.1. Lipase	8
3.2.2. <i>Atividade lipolítica dos micro-organismos</i>	11
3.3. Gênero <i>Bacillus</i>	12
3.3.1 Características gerais	12
3.3.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	15
3.4. Sorvete.....	16
3.4.1. Características de qualidade de sorvete	17
3.4.2. Processamento	19
3.4.3. Composição nutricional	21
3.4.4. Classificação quanto a composição básica	22
3.4.5 Composição residual em sorvetes de chocolate	23
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO II	37
ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>BACILLUS LICHENIFORMIS</i> (UCP 1014).....	39
CAPÍTULO III	
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL	55
CONCLUSÕES GERAIS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Micrografia eletrônica de *B. licheniformis*..... 16

Capítulo II

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *BACILLUS LICHENIFORMES* (UCP 1014)

Figura 1 – Cinética de Crescimento do *Bacillus licheniformis* em diferentes meios de produção, 150 rpm, 37 °C, 96 horas52

Figura 2 – Determinação do pH em diferentes meios de produção de lipase utilizando o *B. licheniformis*, 150 rpm, 37 °C, 96 horas 52

Figura 3 – Determinação da atividade lipolítica em diferentes meios de produção de lipase utilizando o *B. licheniformis*, 150 rpm, 37 °C, 96 horas..... 53

Capítulo III

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL

Figura 1 - Gráfico mostrando o crescimento do microorganismo em função do tempo após 96 horas a 37°C, 200 rpm e pH 3,0 66

Figura 2 - Gráfico mostrando a atividade da enzima lipase produzida por *Bacillus licheniformis* UCP 1014 após 96 horas a 37°C, 200 rpm e pH 3,0..... 67

Figura 3 - Variação do pH (ensaio 11) durante 96 horas a 37°C e 200rpm 67

Figura 4 - Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e interações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por *Bacillus licheniformis* 68

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1 -Espécies de <i>Bacillus</i> descritas atualmente.....	15
Tabela 2 – Composição mínima e densidade aparente em sorvetes.....	22

Capítulo II

Tabela 1 - Média da atividade lipolítica dos meios A, B e C durante 96 horas a 37 ^o C e 150 rpm, por <i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1014)	53
--	----

Capítulo III

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2 ⁴	61
Tabela 2 – Planejamento fatorial com suas respectivas variáveis.....	61
Tabela 3 - Máxima atividade lipolítica no respectivo tempo de fermentação por <i>Bacillus licheniformis</i> (UCP 1014) a 37 ^o C	66

Resumo

O *Bacillus licheniformis* é uma bactéria versátil, e tem sido utilizada atualmente na produção de diversos produtos biotecnológicos. As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas encontradas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo essas últimas bastante utilizadas devido a série de vantagens apresentadas frente as demais. A utilização de rejeitos industriais para produção e formulação de meios de produção de diversos bioprodutos, tem surgido como uma alternativa de minimizar o descarte de rejeitos das diversas indústrias de produção, principalmente as de origem alimentícia. Sorvetes são produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem a adição de outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, a sua produção em larga escala gera resíduos sólido-líquidos com uma grande quantidade de gorduras e outros resíduos orgânicos. Neste trabalho, inicialmente foram realizados estudos para selecionar meio alternativo para produção de lipase por *B. licheniformis* (UCP 1014). E a seguir a formulação de um meio alternativo de produção, utilizando um resíduo da indústria de sorvete através de um planejamento fatorial de 2^4 . Os ensaios ocorreram durante 96h, a 37°C Os resultados obtidos indicaram que o meio denominado de C (glicose 1,0%, peptona, 2,0%, extrato de levedura 0,5%, óleo de oliva, 1,0%, NaNO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%), apresentando uma atividade lipolítica de 256 (U/ml)/min. Os ensaios referentes ao planejamento fatorial, indicaram que o ensaio 11 apresentou a maior atividade de 480 U/mL, para a lipase produzida. Os resultados obtidos sugerem o reaproveitamento de resíduos oleosos provenientes da indústria de sorvete para formulação e produção de lipase microbiana.

Palavras chave: Lipase, *Bacillus licheniformis*, resíduos orgânicos

Abstract

The bacterium *Bacillus licheniformis* is a versatile, and has been used currently in production of various biotecnológicos. Lipases (E.C.3.1.1.3) are enzymes found in nature and may be obtained from animal sources, plants and microbes, the latter being widely used due to several advantages presented against the other. The use of industrial wastes for production and formulation of means of production of various bioproducts, has emerged as an alternative to minimize the disposal of tailings from various manufacturing industries, especially those from food. Ice creams are food products obtained from an emulsion of fats and proteins, with or without the addition of other ingredients and substances which have been subjected to freezing their production generates large-scale solid-liquid waste with a large amount of fat and other organic wastes. In this work I study was conducted to select an alternative means for lipase production by *B. licheniformis* (UCP 1014). And then the formulation of an alternative means of production, using waste from ice cream industry through a factorial design, 24. The tests occurred during 96h at 37°C The results indicated that the middle called C (glucose 1.0%, peptone 2.0%, 0.5% yeast extract, olive oil, 1.0%, NaNO₃ 0.1%, 0.1% KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%), indicating a lipase activity of 256 (U / ml) / min. Tests of the factorial design, the test indicated that 11 had the highest activity of 480 U / mL for lipase production. The results suggest the reuse of waste oil from the ice cream industry for the development and production of microbial lipase.

Keywords: Lipase, *Bacillus licheniformis*, organic waste

Capítulo I

1.INTRODUÇÃO

O aumento da utilização industrial de enzimas nas últimas décadas, ganhou bastante espaço em virtude da crescente preocupação com os problemas ambientais causados pelas indústrias, através da geração, acúmulo de rejeitos e descarte de produtos tóxicos gerados nas diversas etapas de produção, bem como através da qualidade do produto gerado (SOETAERT e VANDAMME, 2006).

As vendas no mercado mundial de enzimas cresceram de US\$ 400 milhões/ano na década de 80 para mais de US\$ 1 bilhão/ano na década de 90. De acordo com o relatório do Business Communications Company Inc., o mercado mundial de enzimas industriais aumentou de US\$ 2,2 bilhões em 2006 para US\$ 2,3 bilhões em 2007, devendo chegar a US\$ 2,7 bilhões em 2012 (GOMES et al., 2007; THAKORE, 2008).

Enzimas de diferentes classes, principalmente as microbianas, são comercializadas no mercado mundial, sendo que as hidrolases representam a maior fração das enzimas comercializadas, onde aproximadamente 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente as utilizam (BÖTTCHER,SCHMIDT, e BORNSCHEUER, 2010). No entanto, a tendência é a mudança nesse quadro de vendas, em função da crescente demanda por enzimas passíveis de aplicações em processos de biorremediação, tratamento de efluentes industriais, química fina e na hidrólise de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis (CARVALHO et al, 2005).

As lipases são enzimas extremamente versáteis que possuem atividade hidrolítica ou de acil-transferases sobre substratos de origem lipídica, apresentando classificação baseada no seu modo de ação, tipo de substrato sobre o qual atua ou na similaridade de seqüência de atuação quando comparadas às outras hidrolases (SHARMAA, CHISTIB, e BANERJEE, 2001;

HASAN, SHAH, e HAMEED, 2009). Essas enzimas têm sido utilizadas em uma grande variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno e ibuprofeno), agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) (JAEGER et al, 1994, VULFSON, 1994; CABRAL et al, 1998; KRIEGER et al, 1999, PANDEY et al, 1999, SAXENA et al, 1999, , TREICHEL et al., 2010).

A utilização de rejeitos das indústrias alimentícias e agroindustriais para elaboração de meios de produção considerados econômicos, tem surgido como uma alternativa nas últimas décadas, contribuindo assim para uma diminuição do lançamento de resíduos sólidos no meio ambiente sem nenhum tratamento prévio (BARBOSA e FERNÁNDEZ, 2009; LADEIRA et al., 2010).

O sorvete é um sistema coloidal complexo composto por uma emulsão constituída de gotículas de gordura, de proteínas, de bolhas de ar e de cristais de gelo dispersos numa fase aquosa, representada por uma solução concentrada de sacarose. Além disso pode conter outros ingredientes como emulsificantes e estabilizantes (CLARKE, 2005; GILLES, GREENLEY e SUTCLIFFE, 2006; SANTOS, 2009).

As fórmulas convencionais de sorvete apresentam uma alta concentração de sacarose e gorduras, os quais estão relacionados diretamente com a textura, consistência e sabor do produto.(SANTOS, 2009).

O objetivo desse trabalho foi a utilização de um resíduo de sorvete para elaboração de meios de produção de lipase utilizando o *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) através da seleção de meios e da utilização de um planejamento fatorial.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A presente proposta visa a produção de lipase (E.C.3.1.1.3) pelo *Bacillus licheniformis* utilizando meios convencionais de produção e meios alternativos contendo resíduo de indústria de sorvete.

2.1.2. Específicos

- ✓ Selecionar meios de produção de lipase através de protocolos e substratos convencionais utilizando o *Bacillus licheniformis* (UCP 1014);
- ✓ Estudar a influência do pH e da produção enzimática nos ensaios realizados ;
- ✓ Selecionar um meio de produção de lipase para utilizar um planejamento fatorial e selecionar a melhor condição de produção da enzima bacteriana utilizando resíduo de sorvete;
- ✓ Investigar a influência das fontes de carbono e de nitrogênio, na composição dos meios alternativos na produção de lipase;
- ✓ Comparar o desempenho de produção enzimática da lipase dos meios utilizados

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Micro-organismos como fonte de produção de enzimas

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de substâncias de alto valor agregado. A tecnologia de produção e de aplicação das enzimas em nível industrial está atualmente em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisa no Brasil. A indústria química brasileira importa a maior parte das enzimas biocatalizadoras de matérias auto-sustentáveis (TREICHEL et al, 2010)

A crescente necessidade de abordagens mais seletivas e menos imediatas do uso dos recursos naturais do planeta tem impulsionado diretamente no avanço dos diversos processos biotecnológicos existentes, pois na base de todos os processos biotecnológicos, encontra-se a biodiversidade genética. Estima-se que o Brasil detenha cerca de 20% da biodiversidade mundial (ZANOTTO et al., 2007). No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras é uma técnica de grande importância, principalmente em países que possuem uma grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE e CASTILHO, 2000).

Os micro-organismos são encontrados em diferentes tipos de habitats, adaptados a diferentes condições climáticas, de temperatura, salinidade e também pressão biótica, que influenciam em sua atividade e distribuição geográfica. Em função dessa diversidade metabólica, da maior facilidade de obtenção de material e das propriedades cinéticas de produção de grande diversidade enzimática, por micro-organismos, mais adequadas a processos industriais, esses organismos nas últimas décadas são explorados como fonte de enzimas industriais (SHARMA, et al., 2001; STEELE, et al., 2008).

Estima-se que menos de 5% dos micro-organismos existentes na Terra, tenham sido descritos. Isso porque os esforços dos centros de pesquisa estão focados principalmente nos macro-organismos (mamíferos, répteis, anfíbios, aves, peixes e plantas), resultando no conhecimento de 80 a 90% destes seres. No entanto, os micro-organismos, mesmo exercendo funções vitais nos ecossistemas e na biosfera tem sido pouco estudados, tanto devido à falta de interesse quanto à dificuldade na pesquisa destes seres invisíveis a olho nu (HERNALSTEENS, 2006).

O Brasil com cerca de 8,5 milhões de quilômetros quadrados, possui diversas zonas climáticas que incluem o clima úmido, o semi-árido e temperado. Essas diferenças climáticas contribuem para a formação de Biomas. A quantidade de biomas reflete numa riqueza tanto de flora quanto de fauna, tornando o Brasil como um país de maior diversidade de espécies no mundo. Diversidade biológica, ou biodiversidade inclui uma variedade genética nas espécies de vegetais, animais e de micro-organismos, cada um desempenhando seu papel dentro de um ecossistema. A grande diversidade de micro-organismos no Brasil, justifica a busca por novos produtos enzimáticos com características especiais que podem ser aplicados nas diversas áreas da biotecnologia (HERNALSTEENS, 2006; RIBEIRO et al., 2010).

O crescente aumento das pesquisas na área da enzimologia, tem estimulado a descoberta de novos micro-organismos com elevada capacidade de produção de enzimas, através de estudos realizados em laboratórios e com isso podem provocar um aumento na capacidade de produtividade, especificidade e estabilidade das enzimas futuramente produzidas (GEOK et al., 2003; HAKI e RAKSHI, 2003).

Vários micro-organismos produtores de enzimas são encontrados em diversos *habitats*, como em rejeitos de indústrias de processo de óleos vegetais e de laticínios, solos, sementes, frutos e alimentos apodrecidos (SHARMA et al., 2001). O solo possui uma grande diversidade de populações microbianas de onde se podem isolar estes microrganismos e avaliar a sua capacidade para a produção de enzimas (DELONG, 2002; KO, WANG e ANN, 2005; OREN, 2010).

Essas populações são capazes de sintetizar uma grande quantidade de enzimas. Usualmente, mais de um tipo de enzima hidrolítica é sintetizado, garantindo deste modo, o consumo de vários tipos de substratos e a subsistência do micro-organismo. Entretanto, estudos envolvendo a descoberta de novos micro-organismos produtores de enzimas é de grande importância para a descoberta de novas enzimas, mais estáveis e seletivas, que poderão serem utilizadas para biocatálise e sínteses orgânicas (SMITH et al., 2000; CARDERNAS et al., 2001; SANDOVAL e MARTY, 2007; MULLER, HARMS, e BLEY, 2010).

3.2 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores de estrutura protéica globular terciária ou quaternária, termolábeis e não dialisáveis, que aceleram a velocidade de uma reação química, isto é, atuam reduzindo a barreira energética destas reações. As enzimas ocorrem em todos os organismos vivos, desde os mais simples, unicelulares, até plantas e animais. Elas efetuam processos metabólicos em células vivas (HARGER *et al.*, 1982; KIELING, 2002).

Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica consiste na produção e utilização de enzimas de origem microbiana. Embora alguns biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, micro-organismos, em particular, são requisitados como fontes produtoras de enzimas (NEIDLEMAN, 1991; SHIMIZU et al., 1997; BON et al., 2008).

Segundo FELLOWS (1994) a atividade enzimática considerada ótima das enzimas microbianas, ocorre nas mesmas condições em que se produz o crescimento máximo dos micro-organismos. As enzimas microbianas podem ser extracelulares (enzimas eliminadas ao meio) ou intracelulares (enzimas retidas no interior das células microbianas). A produção de enzimas extracelulares é obtida na fase logarítmica de crescimento ou na fase estacionária, enquanto as enzimas intracelulares são produzidas durante o crescimento na fase estacionária e somente são liberadas ao meio pela lise celular que ocorre na fase estacionária ou na fase de declínio. Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias são enzimas extracelulares de origem microbiana.

O custo de produção das enzimas microbianas de uma maneira geral é bem menor do que os utilizados para produzir enzimas vegetais e animais. Devido a independência de injunções sazonais e geográficas, o tempo de produção é muito mais curto para sua obtenção, permitindo assim a utilização de diversos substratos mais baratos e conseqüentemente de um maior rendimento da produção através da otimização das condições utilizadas nos diversos processos fermentativos (SAID e PIETRO, 2002; HARI e RAKSHIT, 2003).

3.2.1. Lipases

Esse grupo de enzimas são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG et al., 2005). As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e pela facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (HASSAN et al., 2006; FEITOSA et al., 2010).

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalizam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Essas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolizam outros lipídeos (acilhidrolases, colesteroesterase, tioesterases e outras) (CARVALHO et al., 2003).

Dentre os processos bioquímicos descritos na literatura, as lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas. Depois das proteases e amilases, esse grupo enzimático é considerado o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. No entanto, mesmo com uma variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, pelos elevados custos de produção (PAQUES e MACEDO, 2006).

O crescente mercado enzimático das lipases exige a seleção de novos micro-organismos produtores com maiores taxas de produção a fim de reduzir os custos, visando aumentar a produtividade e obter enzimas com diferentes propriedades. À procura por fontes de novos micro-organismos produtores de lipases avaliando as aplicações futuras que requerem não somente a especificidade da enzima-substrato, mas também a estabilidade do processo, tal como a tolerância do pH e a estabilidade térmica elevada, vem ganhando cada vez mais destaque nos estudos científicos (SHU, XU e LIN, 2006).

Para a seleção dos micro-organismos produtores de enzimas, empregam-se métodos de detecção qualitativos ou quantitativos (GUPTA et al., 2004). Um dos métodos qualitativos para a produção de lipase consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia, devido às substâncias adicionadas

ao meio, que podem ser baseados em Tween 20, Tween 80, tributirina e óleo de oliva (GUPTA et al., 2004; FREIRE, 1996).

Dentre os métodos quantitativos para a verificação da atividade lipolítica, freqüentemente se utiliza a reação de hidrólise de ésteres de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia, como por exemplo de p-nitrofenilpalmitato, que ocasiona a liberação de p-nitrofenol, de coloração amarela, que absorve na região do visível a 410 nm. A limitação desse método é relativa ao pH e só permite utilização em pH neutro ou alcalino, pois o p-nitrofenol não absorve na região de visível (amarelo) em pHs ácidos (GUPTA et al., 2004). Outro método quantitativo bastante utilizado é o método titulométrico que se baseia na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997; CARDENAS et al., 2001).

Lipases microbianas podem ser divididas em três categorias baseadas na especificidade ao substrato: lipases não específicas (atuam aleatoriamente na molécula do triglicerídeo resultando na sua hidrólise completa em glicerol e ácido graxo), lipases sítio-específicas (hidrolisam somente ligações éster primárias, ex. nos átomos C₁ e C₃ do glicerol), e lipases com especificidade por ácidos-graxos (com preferência a determinados tipos de ácidos graxos) (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

Ao terceiro grupo de lipases encontramos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* (DARTOIS et al., 1992; ANGUITA; RODRIGUEZ APARICIO; NAHARRO, 1993; SCHMIDT-DANNERT; RUA; SCHMID, 1997; REETZ; JAEGER, 1998; EGGERT et al., 2001; NTHANGENI et al., 2001; MA et al., 2006)

3.2.2 Atividade lipolítica dos micro-organismos

As lipases são amplamente distribuídas na natureza. Embora sejam encontradas em várias espécies de animais, vegetais e micro-organismos, as enzimas de fontes microbianas recebem uma particular atenção devido ao seu potencial aplicação na indústria, principalmente na de detergentes, óleos e gorduras, fábrica de laticínios e indústria farmacêutica (SHIRAZI et al., 1998; DRIKS, 2002; SAXENA et al., 2003; DAMASO et al., 2008).

Uma grande variedade de micro-organismos apresenta a habilidade de produzir lipases, dependendo dos parâmetros reacionais e apresentando diferentes especificidades, peso molecular, sensibilidade a pH e temperatura. As lipases microbianas, de modo geral, apresentam um grande potencial para aplicações comerciais devido sua estabilidade, seletividade e larga especificidade por substratos, podendo atingir uma atividade máxima em pH entre 6 e 8. Com relação à estabilidade ao pH, os protocolos experimentais variam com o tempo e condições de incubação adotados (CARDENAS et al., 2001; CIAFARDINI et al., 2006; FERNANDES, 2007).

Vários métodos podem ser usados para seleção de micro-organismos produtores de lipases extracelulares. Dentre estas, inclui-se a utilização de meio sólido com presença de substratos indutores como óleos vegetais, triglicerídeos padrão (tributirina, trioleína, etc), Tween 80, e corantes que possibilitam a visualização da reação de hidrólise (WANG et al., 1995; CARDENAS et al., 2001; KO et al., 2005; DAMASO et al., 2008). No entanto, alguns destes substratos podem não ser adequados para detecção de lipases, tornando-se importante a verificação da especificidade de hidrólise ou síntese por lipases e esterases (KOUKER e JAEGER, 1987). Alguns autores citam o uso de Rodamina B o qual resulta na produção de um complexo fluorescente

pela produção de lipases nas placas, facilitando a visualização das colônias produtoras de enzima (KOUKER e JAEGER, 1987; WANG et al., 1995;), e corante azul de bromofenol (DAMASO et al., 2008).

Entre os micro-organismos descritos como produtores de lipases pela literatura, pode-se citar *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Burkholderia cepacia* (JAEGER e REETZ, 1998). Além disso, outras pesquisas demonstram que *Geotrichum* sp. (BURKERT et al., 2004), *Geotrichum candidum* (ZAREVÚCKA et al., 2005), *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus stearothermophilus*, *Burkholderia cepacia* (BRADDOO et al., 2002), *Candida lipolytica* (TAN et al., 2003), *Bacillus coagulans* (ALKAN et al., 2007), *Bacillus coagulans* BTS-3 (KUMAR et al., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* PseA (MAHANTA et al., 2008), *Clostridium thermocellum* (CHINN et al., 2008), *Yarrowia lipolytica* (KIM et al., 2007), *Penicillium verrucosum* (KEMPKA et al., 2008), *Penicillium simplicissimum* (DI LUCCIO et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2005; GUTARRA et al., 2007; VARGAS et al., 2008;).

3.3 Gênero *Bacillus*

3.3.1 Características Gerais

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é considerado extremamente heterogêneo (a % G + C das diversas espécies variam de 32 a 69) fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo de açúcares, composição de parede, etc). Os estudos do ARNr 16S e 23S confirmaram a heterogeneidade e mostraram que esse gênero pode ser dividido em muitos gêneros (ASH et al., 1991; DE BOER et al., 1994).

As espécies desse gênero são bacilos com extremidades retas arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 X 10 µm), esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis (na maioria das vezes, a coloração de Gram não é positiva nos cultivos jovens), geralmente móveis graças aos cílios peritríquios e algumas espécies são capsuladas (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis* podem elaborar uma cápsula formada de polímeros de ácido glutâmico), aeróbicos ou anaeróbicos, frequentemente catalase positiva e variavelmente dependendo do estado da cultura, respondem ao teste da oxidase (FERGUS, PRIEST, e TODD, 1988; BURGESS, LINDSAY, e FLINT, 2010).

O gênero *Bacillus*, cujo habitat principal é o solo onde possuem um importante papel no ciclo do carbono e do nitrogênio. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam considerados ubíquos, podendo ser isolados do solo, da água do mar, de água doce e de diversos gêneros alimentícios (TRAVERS et al., 1987; CONNOR et al., 2010). O gênero tem se destacado como um excelente produtor de diversos produtos biotecnológicos no mercado mundial, (KUTA et al, 2009). Crescem bem em meio simples e produzem enzimas hidrolíticas, como proteases, lipases, mananases e glucanases. (SAMANYA e YAMAUCHI, 2002; SHUMI, TOWHID-HOSSAIN; ANWAR, 2004)

Diversos estudos tem sido realizados sobre a patogenicidade dos micro-organismos deste gênero e poucos casos têm sido registrados, o que os leva a serem utilizados extensivamente na produção industrial de exoenzimas. (VEITH et al., 2004). Segundo Kenneth (2005) a espécie *Bacillus*, tem atraído interesse desde 1872, pela extraordinária resistência de seus endosporos à agentes químicos e físicos, pelo seu ciclo de crescimento para formar esses endósporos e pela produção de antibióticos. Atualmente existem 77 espécies reconhecidas do gênero *Bacillus* que se encontram descritas na Tabela 01.

Espécies de *Bacillus* geralmente crescem bem em meios definidos contendo várias fontes de carbono. Muitos desses micro-organismos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fontes de carbono, e se tornando doadores de elétrons. Vários *Bacillus* produzem antibióticos (bacitracina, poliximina, tirocidina, gramicidina e circulina). Na maioria dos casos, a produção de antibióticos está relacionada ao processo de esporulação. Existe ampla diversidade na fisiologia deste gênero, no qual as características coletivas incluem a degradação de muitos substratos derivados de plantas e animais como fontes de carbono, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas e hidrocarbonetos (GUPTA;GUPTA, e RATHI, 2004; SCHALLMEY, SINGH, e WARD, 2004; AL-JANABI, 2006; RAO, e NARASU, 2007; KAYALVIZHI e GUNASEKARAN, 2010).

Muitas espécies de *Bacillus* são descritas na literatura como versáteis, capazes de utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade tais como os subprodutos da agroindústria: torta de soja, bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de trigo como substratos respiratórios, em muitos casos, fermentam carboidratos e produzem glicerol e butanodiol (SOCCOL e VANDENBERGH, 2003). A maioria é mesófilo com temperaturas ótimas entre 30 e 45 °C, porém o gênero contém um número de termofílicos representativos que crescem à temperatura de 65°C ou mais altas. O gênero *Bacillus* é amplamente utilizado na indústria, na manufatura de enzimas comerciais, principalmente amilases e proteases e também em bioinseticidas e no tratamento de água. (STAINER et al., 1986; REIS, 2004).

Tabela 01. Espécies de *Bacillus* descritas atualmente

<i>B. agaradhaerens</i>	<i>B. alcalophilus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. anthracis</i>
<i>B. atropheus</i>	<i>B. azotoformans</i>	<i>B. badius</i>	<i>B. benzoevorans</i>
<i>B. carboniphilus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. chitinolyticus</i>	<i>B. circulans</i>
<i>B. clarkii</i>	<i>B. clausii</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cohnii</i>
<i>B. edaphicus</i>	<i>B. ehimensis</i>	<i>B. fastidiosus</i>	<i>B. firmus</i>
<i>B. flexus</i>	<i>B. fumarioli</i>	<i>B. fusiformis</i>	<i>B. gibsonii</i>
<i>B. globisporus</i>	<i>B. halmapalus</i>	<i>B. haloalkaliphilus</i>	<i>B. halodenitrificans</i>
<i>B. halodurans</i>	<i>B. halophilus</i>	<i>B. horikoshii</i>	<i>B. horti</i>
<i>B. infernos</i>	<i>B. insolitus</i>	<i>B. kaustophilus</i>	<i>B. laevolavtus</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>B. methanolicus</i>	<i>B. mucilaginosus</i>	<i>B. mycoides</i>
<i>B. mojavensis</i>	<i>B. mucilaginosus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. naganoensis</i>
<i>B. niacini</i>	<i>B. oleronius</i>	<i>B. pallidus</i>	<i>B. pasteurii</i>
<i>B. pseudalcaliphilus</i>	<i>B. pseudofirmus</i>	<i>B. pseudomycoides</i>	<i>B. psychrophilus</i>
<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. schlegelii</i>	<i>B. silvestris</i>
<i>B. simplex</i>	<i>B. soralis</i>	<i>B. smithii</i>	<i>B. sphaericus</i>
<i>B. sporothermodurans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thermoamylovorans</i>
<i>B. thermocatenulatus</i>	<i>B. thermocloaceae</i>	<i>B. thermodenitrificans</i>	<i>B. thermoglucosidasius</i>
<i>B. thermoleovorans</i>	<i>B. thermosphaericus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. tusciae</i>
<i>B. vallismortis</i>	<i>B. vulcani</i>	<i>B. Weihenstephanensis</i>	<i>B. vedderi</i>

Fonte: : www.bacterio.cict.fr, atualizada em Janeiro de 2007.

3.3.2 *Bacillus licheniformis*

O *Bacillus licheniformis*, micro-organismo de interesse pelo caráter não patogênico (Figura 1), está amplamente distribuído na natureza, sendo uma bactéria do solo, encontrada principalmente associada com plantas e materiais de plantas bem como próxima a este local, é descrito na literatura pela alta resistência de seus endosporos que são disseminados com a poeira (VEITH et al., 2004)

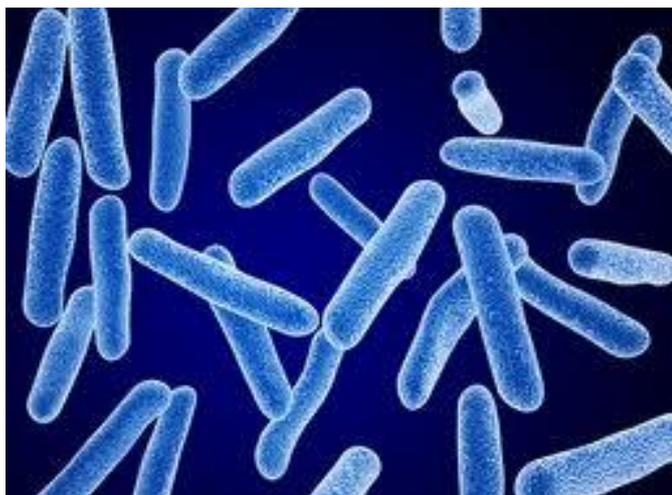


Figura 1 - Micrografia do *B. licheniformis* Fonte: Niu et. al., 2009.

Durante várias décadas o *B. licheniformis* vem sendo utilizado na produção industrial de enzimas como a alfa-amilase e de várias proteases (Bio-Technical Resources), sendo classificado como GRAS (Generally Reconized As Safe) pela U.S. Food and Drug Administration (FAD) na produção de alfa-amilase (BTR Bio-Technical Resources). Muitas das atividades são atribuídas a proteases extracelulares produzidas por *B. licheniformis* consistem em duas formas proteolíticas: proteases serina alcalina (SAP) e proteases naturais (NP) (ÇALIK, 1997; ÇALIK, 1998).

Dentre as várias espécie de *Bacillus* existentes e consideradas adequadas para a produção de endosporos e enzimas microbianas, destacam-se o *B. licheniformis*, *B. Subtilis*, *B. cereus* e *B. clausii*, sendo ainda utilizados como probióticos para animais e humanos (MAIORKA et al, 2001; CASULA, et al., 2002).

3.4 Sorvete

O sorvete é um produto que agrada aos mais variados paladares, de todas as faixas etárias e de qualquer classe social. São considerados alimentos refrescantes, que combinam muito bem com o clima tropical do

Brasil, onde existe uma variada gama de ingredientes que podem ser usados para enriquecer e diversificar ainda mais as receitas de sorvetes, que vão das frutas mais exóticas às sementes dos mais diversos tipos (MAIA *et al.*,2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define gelados comestíveis como produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou ainda como uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias. Esses componentes devem ser submetidos ao congelamento de maneira tal que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo (BRASIL, 1999).

De acordo com Mathias *et al.* (2005), os gelados comestíveis são alimentos obtidos pelo congelamento de uma mistura pasteurizada ou preparado de frutas, composta de ingredientes lácteos ou não, açúcares, corantes, estabilizantes e emulsificantes. Para Bolliger *et al.*, (2000) o sorvete pode ser considerado um colóide (sistema de partículas de 1nm a 1 m de tamanho) suspenso ao ar com gordura cristalizada e água, numa solução de açúcar altamente concentrada, contendo hidrocolóides, micelas de caseína e outras proteínas. O sorvete pode ou não conter gordura de leite, podendo ser classificado em *premium* (altamente gorduroso), *light* (baixa quantidade de gordura), e outros produtos correlatos (MATTHIAS *et al.*, 2005).

3.4.1. Características de qualidade do sorvete

A composição química do sorvete determina vários parâmetros estruturais e sensoriais importantes para obtenção de um produto final de qualidade, como firmeza, resistência ao derretimento e textura, entre outros

(GRANGER et al., 2005). Os ingredientes utilizados no mix (mistura dos ingredientes) têm extrema importância na qualidade do produto final. A gordura favorece o sabor, a textura e a consistência do sorvete. Por outro lado, a sacarose confere corpo aos produtos congelados e influencia a formação dos cristais de gelo por causa do abaixamento do ponto de congelamento da água (CHARLEY e WEAVER, 1998; FREELAND-GRAVES; PECKHAM, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

A gordura do leite representa o ingrediente mais importante na qualidade do sorvete e o primeiro a ser estimado no cálculo do mix, sendo os demais ingredientes estabelecidos com base na proporção em que se ligam à gordura. A gordura láctea é um composto complexo formado por triacilgliceróis, fosfolipídeos, colesterol e pequenas quantidades de ácidos graxos livres (KEENEY e KROGER, 1987; VARNAM e SUTHERLAND, 1994). A principal fonte de gordura não-láctea em sorvetes é a gordura vegetal hidrogenada, que representa atualmente o produto mais concentrado em gorduras do tipo trans, obtidas pela hidrogenação de ácidos graxos insaturados.

A sacarose tem como principal função conferir sabor doce, aumentar o teor de sólidos, contribuir com a textura e regular o ponto de congelamento do sorvete, sendo utilizada como padrão de referência do potencial de doçura de outros adoçantes (SOLER e VEIGA, 2001).

A fase contínua em sorvetes é representada por uma mistura densa de sacarose e a fase dispersa por bolhas de ar, glóbulos de gordura, micelas de caseína e hidrocolóides, permitindo a coexistência de três estados na mistura: gasoso, sólido e líquido. Porém, a homogeneização e a estabilização das fases imiscíveis em sorvetes, em geral, são feitas com a utilização de aditivos, como estabilizantes e emulsificantes (INNOCENTE, COMPARIN e CORRADINI, 2002).

Os emulsificantes são substâncias químicas que, adicionadas a determinadas preparações tais como o sorvete, têm por finalidade manter a estabilidade da dispersão de duas fases imiscíveis, ou seja, a emulsão óleo em água, além de deslocar as proteínas da interface das bolhas de ar. As emulsões são obtidas pela mistura vigorosa de dois ingredientes não-miscíveis com a finalidade de formar as gotículas da fase dispersa, no entanto, a ausência do estabilizante provoca a separação das fases (VICENTE, CENZANO e VICENTE, 1996; ARMONDES, 1998; COULTATE, 2004; GOFF, 2008;).

Os estabilizantes (goma guar, goma xantana, carragenanas e alginatos) comercializados com a denominação de liga neutra, não constituem agentes emulsificantes, mas têm grande afinidade pela água assegurando que soluções bastante diluídas permaneçam viscosas (COULTATE, 2004).

Tradicionalmente, a gema de ovo e a lecitina de soja são os agentes emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos. Entretanto, suas aplicações são limitadas a certos tipos de alimentos, sendo em geral substituídos por compostos sintéticos como os derivados de glicerol e ésteres de sorbitana. Os agentes emulsificantes mais utilizados em sorvetes são os derivados de glicerol. A maioria dos produtos emulsificantes é utilizada em associação a estabilizantes, que têm como função auxiliar na manutenção da estabilidade da emulsão, aumentando a viscosidade da fase aquosa, o que é desejável na formulação de sorvete (ARMONDES, 1998).

3.4.2 Processamento

As etapas que compõem a elaboração de sorvetes variam de acordo com a técnica escolhida sendo, em geral, agrupadas em três etapas fundamentais: (1) mistura dos ingredientes e seu aquecimento, seguida de pasteurização; (2) congelamento após a homogeneização com o propósito de

incorporar ar à mistura; (3) endurecimento, estágio onde a água não congelada do sorvete se deposita sobre os cristais de gelo, assim aumentando seu tamanho (NARAIN et al., 2006).

O preparo da mistura compreende a etapa na qual os ingredientes líquidos são colocados no equipamento de pasteurização para agitação e aquecimento, com o propósito de liquefazer a gordura, dissolver a sacarose e o estabilizante. Os ingredientes secos são misturados entre si previamente, para evitar a formação de grumos e adicionados em seguida à mistura no pasteurizador antes que a temperatura atinja 50°C.

A homogeneização deve ser iniciada imediatamente após o mix atingir a temperatura de pasteurização (MORETTI, 1977 *apud Santos*, 2009). Em geral, na indústria de sorvetes, a pasteurização pode ser feita de duas formas: em batelada ou contínua. O processo em batelada também conhecido como batch é realizado no equipamento homogeneizador temperatura de 69 C a 71°C por 30 min, com resfriamento rápido imediatamente após o aquecimento. A pasteurização contínua é feita por trocadores de calor em sistema de alta temperatura e curto tempo (HTST) a uma temperatura de 80°C por 25 seg. Na ausência de um equipamento pasteurizador, os sorvetes podem ser pasteurizados de forma artesanal, aquecendo-se a mistura a 70°C por 30 min e resfriando-a rapidamente (VICENTE; CENZANO; VICENTE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

A etapa seguinte é a maturação que tem por finalidade produzir mudanças desejáveis nos aspectos sensoriais do sorvete, tais como a solidificação da gordura, adsorção de água por proteínas e estabilizantes, resistência ao derretimento e melhora da textura e capacidade de incorporação de ar. O tempo de maturação é maior para mix com elevado teor de gordura (VICENTE; CENZANO; VICENTE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

Ao final dessa etapa, são adicionados ao mix a polpa de fruta (a uma temperatura de + 4°C) e o emulsificante, assim reduzindo o risco de precipitação das proteínas do leite por ácidos da polpa de fruta (MORETTI, 1977 *apud Santos*, 2009). O congelamento é considerado o estágio mais importante no processo de fabricação do sorvete, compreendendo o congelamento rápido com agitação do mix para incorporação de ar (*overrun*) e formação de pequenos cristais de gelo, além do endurecimento do produto sem agitação para remover o calor de forma rápida (VICENTE; CENZANO; VICENTE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001). Na etapa de congelamento é fundamental que o processo seja rápido, garantindo assim a formação de pequenos cristais de gelo que conferem o aspecto cremoso característico do sorvete (NARAIN et al., 2006).

O congelamento do mix para obtenção do sorvete é uma etapa simultânea ao batimento, permitindo a incorporação de ar à mistura enquanto é congelada. O mix sai do tanque de maturação a uma temperatura de +4°C a +5°C e o processo de congelamento reduz a temperatura de -4°C a -9°C. A partir dessa etapa se obtém o sorvete, que será transferido para câmara fria a uma temperatura de -25°C, onde o congelamento e o endurecimento serão completados (VICENTE; CENZANO; VICENTE, 1996; SOLER; VEIGA, 2001).

3.4.3 Composição nutricional

Do ponto de vista nutricional, o sorvete é considerado um alimento completo e de alto valor nutritivo, pois fornece proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas A, B₁, B₂, B₆, C, D, E e K, cálcio, fósforo e outros minerais. Independente da classificação, o sorvete é, devido às suas propriedades nutricionais, uma excelente fonte de energia, e por isto um alimento especialmente desejável para crianças em fase de crescimento e para pessoas que precisam recuperar peso. Pelo mesmo motivo, deve ter uma

ingestão controlada ou evitada na dieta de pessoas que necessitam reduzir peso ou mesmo as que não querem ganhá-lo (MAIA *et al.*, 2008).

De acordo com a Portaria nº379 da ANVISA (BRASIL, 1999) há exigências quanto à composição centesimal mínima de nutrientes nos sorvetes, conforme a Tabela 06, só podendo ser intitulado com sorvete o produto alimentício que conter o mínimo exigido.

Tabela 02- Composição mínima e densidade aparente em sorvetes

Componentes	% mínima
Sólidos Totais	28
Gordura láctea	3
Proteínas do leite	2,5
Densidade aparente (g/L)*	450

* densidade aparente é a medida do ar incorporado ao sorvete mediante batimento sendo expressa em gramas/litro. Fonte: BRASIL, 1999

Para a legislação brasileira, os sorvetes podem ser classificados segundo a composição básica.

3.4.4 Classificação quanto à composição básica:

Segundo a ANVISA (1999), os gelados comestíveis são classificados em:

-Sorvetes de creme: são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou gorduras comestíveis, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares:

- **Sorvetes de leite:** são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares.
- **Sorvetes:** são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias primas alimentares e nos quais os teores de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;
- **Sherbets:** são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias primas alimentares, e que contém apenas uma pequena proporção de gorduras e proteínas, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares.;
- **Gelados de frutas ou Sorbets:** são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares;
- **Gelados:** são os produtos elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos, pedaços de frutas e outras matérias primas, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares.

Goff (1997) descreve que a estrutura espumosa do sorvete pode ser classificada como um complexo coloidal de alta consistência, constituído de três fases distintas: os glóbulos de gordura, as bolhas de ar e os cristais de gelo, que são os principais responsáveis pela qualidade do produto final.

Do ponto de vista físico, o sorvete é um sistema multifásico complexo, no qual bolhas de ar, glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e cristais de gelo estão dispersos em uma solução viscosa (KOXHOLT et al., 2001). Esses elementos formam uma rede tridimensional responsável pela estrutura do sorvete (BOLLIGER et al., 2000).

3.4.5 Composição residual em sorvetes de chocolate

Os principais ácidos graxos encontrados em todos os chocolates e nos produtos contendo chocolate são o palmítico, esteárico, oléico e linoleico (SUZUKI, 2009).

Nos sorvetes de chocolate na forma normal e *light*, encontram-se ácidos graxos saturados, destacando-se os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), com concentrações maiores para a forma normal, 2190,00 mg e 810,00 (normal e light) mg/100g de sorvete, respectivamente (Suzuki, 2009).

Dos ácidos graxos monoinsaturados, destaca-se o ácido oléico (18:1n-9), com quantidades que variaram de 500,00 (*light*) a 2120,00 (normal) mg/100g de sorvete. As quantidades de ácidos graxos polinsaturados variaram de 40,00 mg (*light*) a 450,00 mg (normal), tendo como destaque para o ácido linoléico (18:2n-6), (Suzuki, 2009).

O ácido graxo trans presente é o ácido elaídico, e suas quantidades nas amostras variaram de 1,55mg (*light*) a 10mg (normal) por 100g de sorvete (Suzuki, 2009).

Alem do teor de gordura, após a produção do sorvete encontramos em seu descarte sólidos lácteos não gordurosos representados principalmente por proteínas, sais minerais e lactose, alginatos, carboximetilcelulose e carragenos como funcionaram como estabilizantes do produto. (retidado de: http://www.ufrgs.br/alimentus/laticinios/gelados/gelados_gelado_componentes_explic.htm#a9a)

Bibliografia

AÇIKEL, U.; ERAN, M.; AÇIKEL, Y.S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food Bioprod. Proc.**, v. 8, p. 31-39, 2010.

AÇIKEL, U.; ERAN, M.; AÇIKEL, Y.S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food Bioprod. Proc.**, v. 8, p. 31-39, 2010.

AL-JANABI, A.A.H.S. Identification of Bacitracin Produced by Local Isolate of *Bacillus licheniformis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 18, p. 1600-1601, 2006.

ALLOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDES, S.; VAN OOSTERHOUT, D. Exploring the specific features of interfacial enzymology base on lipase studies. Review. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 176, p. 995-1013, 2006.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.**, v. 10, p. 377- 383, 2000.

ANDRADE, R.F.S. **Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* isolada de solo do semi-árido em fermentação submersa utilizando rejeitos industriais (milhocina e soro de leite), como meio de baixo custo**, 2009 – Dissertação Mestrado – UNICAP

ANGUITA, J.; RODRIGUEZ APARICIO, L. B.; NAHARRO, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 2411-7, 1993.

ARMONDES, M.P.O. **Aspectos microbiológicos e higiênico-sanitários de sorvetes em suas etapas de elaboração, produzidos artesanalmente na cidade de Goiânia**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)- Instituto de Patologia e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.p.83, 1998.

ARPIGNY, J.K. and JAEGER, K.E. – Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, **343**, 177-183, 1999.

BANAT, I.M.; MAKKAR, M.R.S.; CAMEOTRA, S.S. – Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

- BARBOSA, L.S. e FERNÁNDEZ, M.X.V. Elaboração de sorvete com ingredientes orgânicos, **Estudos**. v.36, n. 5/6, p. 897-907, 2009.
- BECKER,P.; ABU-REESH, L.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANKIAN, G.; MÄRKL, H. – Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p.184-190, 1977.
- BEISSON, F., TISS, A., RIVIÉRE, C. And VERGER, R. – Methods for Lipase Detection and Assay: A Critical Review, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p. 133-153, 2000.
- BORNSCHEUER, U.T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R. and KRISHNA, S.H. – Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, **Trends in Biotechnology**, v. 20, n.10, p. 433-437, 2002.
- BRADDOO, S.; SAXENA, R.K. and GUPTA, R. – Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* , **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 87-91, 1999.
- BULL, A. T., WARD, A. C. & GOODFELLOW, M. – Search and Discovery strategies for biotechnology : the paradigm shift, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 573-606, 2000.
- BURGESS, S.A.; LINDSAY, D. e FLINT, S.H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, Is v. 144, n.2, p. 215-225, 2010.
- CADENA, R.S. - **Sorvete sabor creme tradicional e light perfil sensorial e instrumental**, 2008 Universidade Estadual de Campinas – Dissertação de mestrado
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; MARTINS DA SILVA, D. Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n. 1, p.75-80, 2003.
- CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GOMEZ, C. VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.
- CASTRO, H., F.; MENDES, A., A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHANTAWANNAKUL, P., ONCHAROEN, A., KLANBUT, K., CHUKEATIROTE, E. and LUMYONG, S. – Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **ScienceAsia**, v. 28, p. 241-245, 2002.

CHARLEY, H.; WEAVER, C. Fats and oils. In: **Foods: a scientific approach**. 3.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998a, cap. 15, p. 243-268.

CHIRUMAMILLA, R.R.; MURALIDHAR, R.M.; MARCHANT, R. and NIGAM, P. – Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 224, 159-168, 2001.

CLARKE, C. The science of ice cream. **Chemistry and Industry**, v.24, n.19, p. 22-23, 2005.

CLAUS, D. and BERKELEY, R.C.W.- Genus **Bacillus** Cohn 1872. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v 2, p. 1105-1139, 1999.

CONNOR, N.; SIKORSKI, J.; ROONEY, A.P.; KOPAC, S.; KOEPEL, A.F.; BURGER, A.; COLE, S.G.; PERRY, E.B.; KRIZAN, D.; FIELD, N.C.; SLATON, M. e COHAN, F.M. Ecology of Speciation in the Genus *Bacillus*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, n.5, p. 1349–1358, 2010.

CONTESINI, F.J.; SILVA, V.C.F.; MACIEL, R.F.; LIMA R.J.; BARROS, F.F.C.; CARVALHO, P.O. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspegillus niger* by solid-state fermentation. *The J. Microbiol.*, v. 47, p. 563-571, 2009.

COULTATE, T.P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 368p., 2004.

COUTO, G. H. Caracterização de uma nova lipase isolada de uma biblioteca metagenômica do solo de mangue do Pontal do Sul – Pr. Universidade Federal do Paraná, p. 97. 2009

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE., D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.

DARTOIS, V.; BAULARD, A.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim Biophys Acta*, v. 1131, p. 253-260, 1992.

- DE BOER, A. S; PRIEST, F. e DIDERICHSEN, B. (1994). On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 595–598, 1994.
- DELONG, E.F. Microbial population genomics and ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.520–524, 2002.
- DEMAIN, A.L e ADRIO, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p. 41–55, 2008.
- DEMAIN, A.L. – Small bugs, big business: the economic power of the microbe, **Biotechnology Advances**, v.18, p. 499-514, 2000.
- DESAI, J. D. and BANAT, I.M. – Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DICKINSON, D.N.; DUC, M.T.L; HASKINS, W.E; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J.D. and POWELL, D.H. – Species differentiation of suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry based protein profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 475-482, 2004.
- DI LUCCIO, MARCO; OLIVEIRA, D. AND TREICHEL, H. Study of the Extraction, Concentration, and Partial Characterization of Lipases Obtained from *Penicillium verrucosum* using Solid-State Fermentation of Soybean Bran. **FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY** v. 3, n. 4, p. 537-544 ,2008
- DRIKS, A. – Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*, **Cellular and Molecular Life Sciences**, **59**, 389-391, 2002.
- EGGERT, T.; BROCKMEIER, U.; DRÖGE, M.J.; QUAX, W.J.; JAEGER, K.E.- Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH, **FEMS Microbiology Letters**, **225**, 319-324, 2003.
- EGGERT, T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B. W.; JAEGER, K. E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. **FEBS Lett**, v. 502, p. 89-92, 2001.
- FALCONE, C. O. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento**. 70p. Trabalho de conclusão de curso em engenharia ambiental – Universidade Federal do Espírito Santo. 2009

FEITOSA, I.C.; BARBOSA, J.M.P.; ORELLANA, S.C.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum Technology**, v.32, n.1, p.27-31, 2010.

FEITOSA, I. G. 2009. **Produção de enzima lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 90p. Dissertação Mestrado – Universidade Tiradentes – UNIT. 2009

FENG, Y. Y., YANG, W. B., ONG, S. L., HU, J. Y. and NG, W. J. – Fermentation of Starch for Enhanced Alkaline Protease Production by Constructing an Alkalophilic *Bacillus pumilus* Strain, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **57**, 153-160, 2001.

FERGUS, G.; PRIEST, M. G. e TODD, C. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**, v.134, p.1847-1882, 1988.

FERNANDES, M.L.M – Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. 72p. Tese (Doutorado em química) - Curso de Pós-Graduação em Química – Área de Concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná. **2007**

FREELAND-GRAVES, J.H.; PECKHAM, G.C. **Foundations of food preparation**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. 750p.

FREIRE, D. M. G. *Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum**. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996.

FREIRE, D.M.A; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia* produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.

GEISSELER, D.; HORWAT, W.R.; JOERGENSEN, R.G.; LUDWING, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms – A review, **Soil Biology and Biochemistry**, v.42 (12), p. 2058-2067, 2010

GILLES, D.C.; GREENLEY, K.R.; SUTCLIFFE, L.H. ESR/spin probe study of ice cream. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.14, p. 4943-4947, 2006.

GOFF, H.D. 65 years of ice cream science, **International Dairy Journal**, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.006>>. Acesso em: 14 fev. 2008.

GOMES, E.; UMSZA GUEZ, M.A.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quimica. Nova**, vol. 30, n. 1, p.136-145, 2007

GRANGER, C.; LEGER, A.; BAREY, P.; LANGENDORFF, V.; CANSELL, M. Influence of formulation on the structural networks in ice cream. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n.3, p. 255-262, 2005.

GUPTA, R.; GUPTA, N. and RATHI, P. – Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, 763-781, 2004.

HAKI,G.D. and RAKSHIT, S.K. – Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, **Biosource Technology**, v.89, 17-34, 2003

HASAN, F.; SHAH, A.A. e HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review, **Biotechnology Advances**, v. 27, p.782–798, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enz. Microb. Technol.**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.

HONDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D. – Lipases and their applications: an overview. **Applied Biochemical and Biotechnology**, **118**, (1-3), 155-170, 2004.

HUNTER-CEVERA, J. C.- The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 278-285, 1998.

IMAMURA, S., KITaura, S. Purification and Characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.**, v. 127, p. 419-425, 2000.

INNOCENTE, N.; COMPARIN, D.; CORRADINI, C. Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 1, p. 69-74, 2002.

JAEGER, K.E. and EGGERT, T. – Lipases for biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. and MISSET, O. – Bacterial Lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 53, p.315-351, 1999.

JAEGER, K.L. and REETZ, M. T. – Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **TIBTECH**, **16**, 396-403, 1998.

JORGENSEN, P.L., TANGNEY, M., PEDERSEN, P.E., HASTRUP, S., DIDERICHSEN, B. and JORGENSEN, S. – Cloning and Sequencing of an Alkaline Protease Gene from *Bacillus lentus* and Amplification of the Gene on the *B. lentus* Chromosome by an Improved Technique, **Applied and Environmental Microbiology**, **66**, 825-827, 2000.

KAYALVIZHI, N. e GUNASEKARAN, P. Purification and Characterization of a Novel Broad-spectrum Bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.15, p. 365-370,

KEENEY, P.G.; KROGER, M. Frozen dairy products. In: WEBB, B.H.; ALFORD, J.A. **Fundamentals of dairy chemistry**. 2. ed. Westport: Avi Books, 1987, cap. 14, p. 873-913.

KEMPKA, A. P. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 1, p. 119-125, 2008.

LADEIRA, S.A.; VIEIRA ANDRADE, M.V.; DELATORRE, A.B.; VICTOR PEREZ, H.; MARTINS, M.L.L. Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp in submerged fermentation: optimization of the culture medium using an experimental design approach fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v.33, n.2, p.324-328, 2010.

LLER, S.M.;HARMS, H. e BLEY, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21 (1), p. 100-113, 2010.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P. and FONTANA, J.D. – Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technology and Biotechnology**, v.41, v. 2, p. 105-110, 2003.

LOGAN, N. A. and DE VOUS, P. – *Bacillus* et Industrie, **Bulletin de la Societé Française de Microbiologie**, **13**, 130- 136, 1998.

LOPES, M.F.S.; CUNHA, A.E.; CLEMENTE, J.J.; TEIXEIRA CARRONDO, M.J. and CRESPO, M.T.B. – Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, **51**, 249-254, 1999.

MACRAE A.R. e HAMMOND, R.C .Present and future applications of lipases. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 3, p.193–217,1985
MA, J.; ZHANG, Z.; WANG, B.; KONG, X.; WANG, Y.; CAO, S.; FENG, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. **Protein Expr Purif**, v. 45, p. 22-29, 2006.

MAIA, M. C. A.; GALVÃO, A. P. G. L. K.; MODESTA, R. C. D.; JÚNIOR, N. P. - “Avaliação sensorial de sorvetes a base de *litol*”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 28(1): 146-151 jan.-mar. 2008

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. – An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p. 428-434, 2002.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. 131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2006.

MANZANO, M.; GIUSTO, C., IACUMIN, L.; CANTONI, C. and COMI, G. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiology*, v. 26, v.3, p. 259-264, 2009.

MENOCIN, SILVANA. 2007 – Concentração, Imobilização e Produção Parcial de Lipase produzida por *Penicillium Verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido, 2009. Dissertação de Mestrado

MULLER, S.; HARMS, H. e BLEY, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.100–113, 2010.

NAESSENS, M. and VANDAMME, E.J. – Multiple forms of microbial enzymes, **Biotechnology Letters**, v.25, p. 1119-1124, 2003.

NARAIN, N.; FERREIRA, D.S.; ARAGÃO, G.C.; ARAGÃO, W.M. Tecnologia do processamento do fruto. In: SILVA JÚNIOR, J. F.; LÉDO, A. S. **A cultura da mangaba**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, cap. 17, p. 221-232, 2006.

NTHANGENI, M. B.; PATTERTON, H.; VAN TONDER, A.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microb Technol**, v. 28, p. 705-712, 2001.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Quim. Nova**, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.

OREN, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, **Environmental Technology**, v.31, n.8-9, p. 825-834, 2010.

PALLADINO, FERNANDA. – **Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**, p. 74, 2008. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena , 2008.

PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 160-169, 2005.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R and NIGAM, P. – Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.33, p.1-20, 1999.

PANTATAZAKI, A.A.; PRITSA, A.A.; KYRIAKIDIS, D.A. – Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*, **Applied Microbiological and Biotechnology**, v.58, p. 1-12, 2002.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Plant lipases from látex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v.29, n.1, p.93-99, 2006.

RAO, K. e NARASU, M.L. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**. vol. 6, n.21, p. 2493-2496, 2007

REETZ, M. T.; JAEGER, K. E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chem Phys Lipids**, v. 93, p. 3-14, 1998.

RIBEIRO, D.S.; HENRIQUE, S.M.B.; OLIVEIRA, L.S.; MACEDO, G.A.; FLEURI, L.F. Enzymes in juice processing: a review, **International Journal of Food Science & Technology**, v.45, n.4, p.635-641, 2010.

RIGO, E.; NINOW, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V.; POLLONI, E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements LWT - *Food Sci. Technol.* (2010), doi: 10.1016/j.lwt.2010.03.002. Manuscrito aceito.

RIGO, ELISANDRA 2009 – Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por FES de farelo de soja, 2009. Tese de Doutorado p. 188, 2009

SAID, S e PIETRO, R. – Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico, **Eventos**, p.122, 2002

SANCHEZ, S. and DEMAIN, A.L. – Metabolic regulation of fermentation processes, **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 895-906, 2002.

SANTOS, G.G. Sorvete: processamento, tecnologia e substitutos da sacarose, **Ensaio e Ciência**, v. 13, n.2, 95-109, 2009.

SANTOS, G. G. - Sorvete *Processamento, tecnologia e substitutos de sacarose*, **Ensaio e Ciência Ciências Biológicas Agrárias e da Saúde** Vol. XIII, Nº. 2, Ano 2009, p. 95 – 109.

SARKAR, S.; SCREEKANTH, B.; KANT, S.; BENERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. – Production and optimization of microbial lipase, **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 29-32, 1998.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, S.W. Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods*, v. 52, p. 1-18, 2003.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, BHOOPANDER, G.; DAVIDSON, W.S. – Purification strategies for microbial lipases, **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, BHOOPANDER, G.; DAVIDSON, W.S. – Purification strategies for microbial lipases, **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O. P. – Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production, **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p. 1-17, 2004.

SCHMIDT-DANNERT, C. – Recombinant microbial lipases for biotechnological applications, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p. 2123-2130, 1999.

SCHMIDT-DANNERT, C.; RUA, M. L.; SCHMID, R. D. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenuatus*: screening, purification, cloning, overexpression, and properties. **Methods Enzymol**, v. 284, p. 194-220, 1997.

SMITH, J.M.; FEIL, E.J.; SMITH, N.H. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. **BioEssays**, v.22, n.12, p. 1115-1122, 2000.

SEMIONATO, S. - **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE – UFES**, Dissertação de Mestrado – UFES, p. 81, 2006

SHARMA, R.; CHISTI, Y. and BANERJEE, U.C. – Production, purification, characterization and applications of lipases, **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627-662, 2001.

SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R. and RAHMAN, M.M. – Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 595-597, 1998.

SOETAERT, W. e VANDAMME, E. The impact of industrial biotechnology, **Biotechnology Journal**, v.1, n.7-8, p.756-769, 2006.

SOLLER, M. P.; VEIGA, P. G. *Especial sorvete*. Série Publicações Técnicas do Centro de Informações em Alimentos. ITAL/CIAL. Campinas, p. 68, 2001.

STEELE, D.B. & STOWERS M. D. - Techniques for selection of industrially important microorganisms, **Annual Reviews Microbiology**, v. 45, p.89-106, 1991.

STEPHENSON, K. and HARWOOD, C. R. – Influence of a Cell-Wall-Associated Protease on Production of α -Amylase by *Bacillus subtilis*, **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 2875-2881, 1998.

STEWART, T.L. and FOGLER, H.S. – Biomass plug development and propagation in porous media. **Biotechnol. Bioeng.**, v 72, p. 353-363, 2001.

Suzuki, Rúbia Michele Composição química e quantificação de ácidos graxos em chocolates, achocolatados em pó, bebidas achocolatadas e sorvetes de chocolate. Universidade Estadual de Maringá, 140 p, 2009.

TAKAÇ, S. AND MARUL, B. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.9, p. 1019-1025, 2008.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TRAVERS, R.S.; MARTIN, P. A.W. e REICHELDERFER, C.F. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.6, p.1263-1266, 1987.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production, **Food Bioprocess Technology**, v.3, p.182-196, 2010.

THANGAM, E.B. and RAJKUMAR, G. S. – Purification and Characterization of Alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*, **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v.35, p.149-154, 2002.

VALENTE, A. M. - Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano, **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Vol.30 no.2** Campinas Abril/Junho de 2010

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Introducción. In: **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología** (Serie Alimentos Básicos 1). Zaragoza: Acribia, cap. 1, p.1-44, 1994.

VEITH, B, HERZBERG C.; STECKEL S.; FEESCHE J.; MAUER KH, EHRENREICH P, BAUMER S, HENNE A, LIESEGANG H, MARKL R, EHRENREICH A, GOTTSCHALKG.- The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* an organism with great industrial potential, **J. Mol. Microbiol. Biotechnology** v.7 ,n.4, p.204-211,2004

VICENTE, A.M.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 599p.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v.40, n.6, p. 2095-2103, 2005.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 481-486, 2005.

CAPÍTULO II

Utilização de diferentes meios para produção
de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014)

Artigo a ser submetido a revista, Exacta.

SELEÇÃO DE DIFERENTES MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Bacillus licheniformis* (UCP 1014)

Ladiel Luiz Pedrozo Tavares^{1,4} ; Kaoru Okada^{1,3,4} e Carlos Alberto Alves da Silva^{1,2,4}

1- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2 – Cursos de Engenharias Ambiental e Química; 3- Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas; 4- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife-PE, 50050-900.

Mestrado em Desenvolvimento de Processos, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil.

Abstract

The *Bacillus* genus has emerged as an excellent producer of several biotechnological products on the world market, especially the enzymes. Microbial lipases, show great potential for commercial applications because of their stability, selectivity and wide substrate specificity. The use and development of means of production to the microbial enzymes have been widely used in recent decades. Three different compositions of different media: Medium A (5.0% peptone, 0.1% NaNO₃, MgSO₄ 0.1% and 1.0% soybean oil), Mode B (1% peptone, NaCl 0.5% CaCl₂.2H₂O 0.1% Tween 20 1%) and Middle C (glucose 1.0%, peptone 2.0%, 0.5% yeast extract, olive oil, 1.0 %, NaNO₃ 0.1%, 0.1% KH₂PO₄, MgSO₄. 7H₂O 0.05%). The results indicated that the *B. licheniformis* had a better growth in the medium C, demonstrated pH values ranging from 5.8 to 7.5, and lipolytic activity of 256 U / mL.

Keywords: Lipase, *Bacillus licheniformis*, Enzyme Production.

Autor para correspondência: calves@unicap.br

Introdução

As enzimas são versáteis e possuem propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores. Em geral, toda enzima, catalisa as transformações moleculares sem que ocorram reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Apresentam alta eficiência catalítica, elevando a velocidade das reações. Atuam em temperaturas brandas, ao contrário dos processos químicos em que se tornam necessários temperaturas mais elevadas e valores de pH distantes da neutralidade. A regulação da atividade enzimática com relativa facilidade, é outra vantagem, bastando, para isso, modificar a natureza do meio de reação, como por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efetor. Sendo assim, o emprego de enzimas em processos industriais é os torna relativamente simples, fácil de controlar, energeticamente eficiente, além dos produtos formados apresentarem melhor qualidade (PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003; CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2006).

As lipases (E.C.3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas que ocupam um lugar de destaque entre os biocatalisadores e têm muitas aplicações, motivo este que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais. As lipases, no futuro, terão importância industrial e comercial comparável às das peptidases, cuja venda entre as enzimas industriais, alcança 25 a 40% (SAXENA, et al., 2003; HASAN et al., 2006; FREIRE e CASTILHO, 2008; CAI et al., 2009).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se ao fato de catalisar não apenas a hidrólise, mas também reações de esterificação e transesterificação, e mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores, catalisam reações em baixa temperatura e pressão, possuem uma larga especificidade pelo substrato, e

exibem alta enantiosseletividade (ELIBOL e OZER, 2002; CARVALHO et al., 2003; SAXENA et al., 2003; BURKERT et al., 2004; CASTRO et al., 2004; TAN et al., 2004; CONTESINI et al., 2009; REIS et al., 2009; AÇIKEL, et al., 2010; RIGO et al., 2010).

As lipases podem ser comumente encontradas na natureza e são obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Numerosas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são produtoras de lipases. (CASTRO et al., 2004; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004; COLEN, 2006; HASAN et al., 2006; VARGAS et al., 2008; CONTESINI et al., 2009; AÇIKEL et al., 2010).

A utilização das lipases de origem microbiana, são mais úteis que as de origem vegetal e animal. Tal fato pode ser justificado, pela variedade de micro-organismos, pela possibilidade de manipulação genética, e pelo rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo (COLEN, 2006; HASAN et al., 2006).

O gênero *Bacillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de substâncias biotecnológicas, apresentando diversas espécies encontradas na natureza, e algumas como participantes da biota intestinal humana e animal (JAEGER et al., 1994; LOGAN; DE VOUS, 1998; JORGENSEN et al., 2000; FENG et al., 2001; CHANTAWANNAKUL et al., 2002; DEMAIN, e ADRIO, 2008).

Dentre as várias espécie de *Bacillus* adequadas para a produção de endósporos e enzimas destaca-se o *B. licheniformis*, uma bactéria não patogênica, amplamente distribuída na natureza, encontrada principalmente associada com plantas e materiais próximos a este local pela alta resistência de seus endósporos que são disseminados com a poeira (SLAPIKOFF, 1971; CASULA, et al., 2002 ; VEITH et al., 2004).

O presente estudo teve como objetivo verificar a produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) em diferentes meios de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Foi utilizado *Bacillus licheniformis* (UCP 1014), isolado de uma região contaminada por petróleo no porto da cidade do Recife, Pernambuco. A amostra foi identificada e catalogada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB). A cultura foi mantida em meio Ágar Nutritivo (AN), contendo (g.L⁻¹), Peptona 10g; Extrato de carne 3,0g; NaCl 5,0g; Agar 20,g; pH 7,0.

Seleção de meios de produção de lipase

Foram testados três meios de produção de lipase. Os meios estudados foram denominados meio de produção A (peptona 5,0%, NaNO₃ 0,1%, MgSO₄ 0,1%, óleo de soja* 1,0%, água destilada 1000 mL, pH 6,5) meio de produção B (peptona 1,0%g, NaCl 0,5%, CaCl₂. 2H₂O 0,01%, Tween* 20 1%, água destilada 1000 mL, pH 6,0 e meio de produção C (glicose 1,0%, extrato de levedura 0,5%, peptona 2,0%, NaNO₃ 0,1%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄. 7H₂O 0,05%, óleo de oliva* 1%, água destilada 1000 mL, pH 6,5).

*O óleo de soja, tween 20 e óleo de oliva foram esterilizados por vapor fluente.

Pré-inóculo

A amostra de *B. licheniformis* mantida no meio Ágar Nutritivo (AN), foi transferida para Erlenmeyers de 1000mL de capacidade, contendo 450 mL de meio Caldo Nutritivo, a 37°C em 150 rpm, durante aproximadamente 12 horas, até atingir uma densidade óptica de 1,0.

Curva de Crescimento

Após o período de crescimento do pré-inóculo 10% foram transferido para os meios de produção denominados de A, B e C para os ensaios de produção da lipase. O crescimento ocorreu em shaker orbital, em 150 rpm, a 37°C, durante

96 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras coletadas a cada 4 horas durante os ensaios de produção, foram submetidas à determinação do pH e da curva de crescimento do micro-organismos em diferentes meios de produção.

Detecção da Atividade Lipolítica

Ao término dos ensaios de produção, todas as amostras foram centrifugadas e nos sobrenadantes foi determinada a atividade lipolítica através da metodologia descrita por Soares et al. (1999). O substrato contendo óleo de oliva foi emulsionado com goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática foi realizada através de 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL de solução enzimática. A temperatura da reação foi mantida a 37°C em banho termostático, por 5 min., agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera em 1 mol de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1 U/mL = 1 moles/mL. min).

Cálculo da atividade enzimática

A atividade enzimática de lipase foi calculada através da equação segundo SOARES, et., al. (1999)

$$\text{Atividade lipolítica (U/mL)} = \frac{(\text{Va} - \text{Vb}) \times \text{N} \times 1000}{\text{t} \times \text{Vc}}$$

onde: AE é a atividade lipolítica (U/mL); Va é o volume da amostra titulada (mL); Vb é o volume do branco titulado (mL); Vc é o volume da amostra utilizada na reação (mL); N é a normalidade da solução de KOH (mol/L); t é o tempo de reação em minutos. (SOARES, et. al., 1999)

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo foram realizados ensaios para determinação do perfil de crescimento e produção de lipase por *B. licheniformis* (UCP 1014) em três diferentes meios, contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Na figura 1 estão descritos os resultados obtidos nos ensaios realizados.

Verifica-se um melhor crescimento de *B. licheniformis* no meio denominado C, que apresenta em sua composição glicose e óleo de oliva como indutor. Este meio apresentou valores de crescimento rápido até 24 horas de incubação, atingido seu auge numa fase estacionária entre 56 e 64 horas, posteriormente ocorreu uma fase de declínio marcante não observada nos outros meios. O meio B, apresentou um crescimento constante, atingido seu auge em 40 horas de incubação, a partir daí houve um decréscimo lento nos valores até o final da fermentação. Já o meio A, contendo óleo de soja, o crescimento ocorreu de forma lenta e tardia até 40 horas da incubação, atingindo seu auge a partir de 72 horas.

A determinação do pH das diferentes amostras coletadas esta descrita na figura 2. Verificou-se que durante as primeiras horas de produção enzimática, os valores do pH do meio A, aumentaram atingindo a neutralidade, apresentando pequenas variações até chegar a atingir no final valores acima de 8,0. Enquanto o meio C, apresentou decréscimo a partir das primeiras horas, chegando a atingir valores de pH na faixa de 5,8 e com 16 horas houve um aumento brusco dos valores atingindo a neutralidade. Os resultados mostram que os valores de pH do meio C (variando entre 5,8 – 7,5) sofreram maiores alterações se comparados com os meios A e B.

Variações bruscas dos valores de pH indicam consumo dos substratos no meio. Este fato foi evidenciado na curva de pH do meio C contendo glicose como principal fonte de Carbono. BANERJEE et al, (1985); MOHAN et al,

(2008) relataram que alguns micro-organismos apresentam atividades mais elevadas, quando cultivadas em meio contendo glicose.

O pH inicial do meio de crescimento é importante para a produção de lipase (RATHI et al, 2001). ERTUGRUL et al, (2007) relataram que a utilização de meios com um pH inicial moderadamente ácido (6,0 – 6,5), otimizam a produção de lipase em amostras de *Bacillus sp.*

Segundo ADAMS e BRAWLEY, (1981) e KAIMI et al, (1998) os valores ótimos de pH para a produção de lipase bacteriana, variam entre 6,5 e 8,5

Vários autores relatam que o pH neutro é geralmente definido como ótimo para a atividade lipolítica .(KAMINI et al., 1998; ABBAS et al., 2002; FADILU et al., 2002; BURKERT, 2003; e TAN et al., 2003)

Utilizando a metodologia de Soares et. al, (1999) avaliou-se a atividade lipolítica dos meios utilizados (Figura 3), e constatou-se a maior atividade no meio C equivalente a 255,5 (U/mL), com 56 horas, pH 7,03. Em comparação com o meio A, 170 (U/mL), em 96 horas, pH 8,2, enquanto o meio B apresentou uma atividade de 153 (U/mL) com 84 horas, pH 8,0. FEITOSA, (2009) em seu trabalho com bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo, obteve uma atividade lipolítica máxima de 4617 U/mL a 37°C no pH 7,0 em 120h de fermentação. Já KANWAR *et al.* (2002), alcançaram uma atividade lipolítica de 25 U/mL, a 34°C e pH 8,0, utilizando como fonte de enzimas lipolíticas, a bactéria *Pseudomonas G6*, isoladas de solo contaminado com petróleo.

Após a 56^a hora houve um decréscimo na atividade enzimática do meio C. Segundo (SANCHEZ et al, 1999), a redução na produção de lipase após o longo período de fermentação pode ser devido à inativação da enzima por proteases extracelulares, o que é observado para outros micro-organismos produtores de lipase. Isto pode ser devido a secreção de proteínas no final da

fase logarítmica levando a uma diminuição na atividade da lipase (DHEEMAN et al, 2010).

Um dos fatores mais importantes para a expressão da atividade da lipase é a fonte de carbono, porque lipases são enzimas induzíveis e elas geralmente são produzidas na presença de lipídios. O óleo de oliva, presente no meio C, é uma fonte de carbono adequada e tem efeito significativo para induzir a produção de lipase (SUGIHARA, A. et al., 1991; WANG, Y. et al., 1995; SHAFEI e ELSALAM-ABD, 2005; ARAVINDAN et al.; 2007; SHARMA, A. et al. (2009)

Segundo Dheeman, Frias e Henehan, (2010), o aumento da produção de lipase, pode está relacionado com a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presente nos óleos naturais, onde o óleo de oliva, utilizado no meio C, apresenta 71% de ácido oléico e 10% de ácido linoléico. Para Zhen Qian e Yun-Chun (2009), o óleo de oliva contém cerca de 89% de ácidos graxos insaturados, e em seus estudos relataram o aumento de 4,07% na atividade da lipase na presença do mesmo óleo.

Neste trabalho, o óleo de oliva a 1% (v / v) no meio C, influenciou na produção de lipase. Paralelo aos nossos achados, Adinarayana, et. al., (2004) informou que a incorporação deste mesmo óleo e na mesma proporção, resultou na produção da lipase elevada.

Entre as fontes de nitrogênio, o extrato de levedura, também presente no meio C, demonstra ser um substrato adequado. Kim et al.(1994) em seus estudos conseguiram a produção de lipase utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Mahanta et al., (2008) concluiu que fontes de nitrogênio no meio pode contribuir para a produção de lipases microbianas, conforme demonstrado na produção de lipase em torta de *Jatropha curcas* (pinhão manso) por *Pseudomonas aeruginosa* suplementada com NaNO_3 .

Outro ponto que pode ter induzido uma maior atividade lipolítica no meio C, provavelmente foram a presença de sais de potássio e magnésio. O potássio e o magnésio são compostos de grande importância para o metabolismo de micro-organismos, pois dependendo de sua concentração podem atuar favorecendo ou inibindo determinadas rotas. (CASTIGLIONI, G. L., 2009)

O acréscimo na demanda de energia exige que os níveis de magnésio estejam adequados, pois a produção de ATP, a partir de carboidratos, lipídeos e proteínas, não é concretizada na falta de magnésio. Considerando que grande parte da energia provém da hidrólise de ATP, baixa concentração de magnésio pode resultar na queda do rendimento de alguns metabólitos, devido à diminuição da produção de energia (AIRAWA, 1981).

O magnésio é um co-fator enzimático essencial para o funcionamento dos micro-organismos, mas em excesso, provoca interferências na absorção de cálcio e potássio. Também atua na estabilização de ribossomas e membranas. Já o potássio atua como regulador osmótico necessário à atividade enzimática e à síntese protéica, sendo também um nutriente (AIRAWA, 1981).

As fermentações realizadas para a produção de enzimas lipolíticas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) foram todas conduzidas a 37°C. Walavalkar e Bapat (2001) relataram em estudos da influência da temperatura do meio para a produção de lipases, cepas isoladas apresentaram maior atividade da enzima em 37°C quando comparados com os de 27 e 47°C. Para BURKERT (2003), a temperatura de 37°C é definida como ótima para a produção de enzimas lipolíticas por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552, no seu estudo para a otimização da produção de lipases.

CONCLUSÕES

O *Bacillus licheniformis* possui capacidade para produção de lipase utilizando diferentes meios de produção, constituindo-se assim uma alternativa promissora para a produção de lipase;

A implementação dos meios a base de óleos naturais como o óleo de soja e o óleo de oliva aumentam a atividade da produção de lipase;

O óleo de oliva como fonte de carbono teve diferente efeito na produção de lipase, constituindo assim uma alternativa viável para a produção de substâncias de interesse econômico.

A produção enzimática de lipase demonstrou ser eficiente, utilizando meios relativamente econômicos, no entanto, vale ressaltar considerações para trabalhos futuros visando à melhoria na eficiência do processo utilizando meios contendo resíduos industriais oleosos.

Resumo

O gênero *Bacillus* tem se destacado como um excelente produtor de diversos produtos biotecnológicos no mercado mundial, principalmente as enzimas. As lipases microbianas, apresentam um grande potencial para aplicações comerciais devido sua estabilidade, seletividade e larga especificidade por substratos. A utilização e a elaboração de meios de produção para as enzimas microbianas têm sido bastante utilizada nas últimas décadas. Foram testados três meios de composições diferentes: Meio A (5,0% de peptona, 0,1% de NaNO_3 , 0,1% de MgSO_4 e 1,0% de óleo de soja), Meio B (peptona 1%, NaCl 0,5%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, Tween 20 1%) e o Meio C (glicose 1,0%, peptona, 2,0%, extrato de levedura 0,5%, óleo de oliva, 1,0%, NaNO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%). Os resultados obtidos indicaram que o *B. licheniformis* obteve um melhor crescimento no Meio C, apresentando valores de pH variando de 5,8 a 7,5, e atividade lipolítica de 256 U/mL.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CNPq e CAPES, além do PROCAD-CAPES pelo intercâmbio com a UNICAMP

REFERÊNCIAS

ADINARAYANA, K. et al. Optimization of process parameters for production of lipase in solid state fermentation by newly isolated *Aspergillus sp.* **Indian J Biotechnol** v. 3, p.65–69, 2004

ALLOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDES, S.; VAN OOSTERHOUT, D. Exploring the specific features of interfacial enzymology base on lipase studies. Review. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 176, p. 995-1013, 2006.

AIRAWA, J. R. Magnesium: its biological significance. CRC Press, Boca Raton, 1981.

ARAVINDAN, R. et al Statistical evaluation of medium components by Plackett–Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Psuedomonas fluorescens*. **Indian J. Biotechnol.**v. 6, p. 469–478, 2007

BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G. E.; MARKE, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1997.

BORNSCHEUER, U. T. Methods to Increase Lipases and Esterases. **Currents Opinions Biotechnology**, v.13,p. 543-547, 2002.

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K. and GUPTA, R. – Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* , **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p. 87-91, 1999.

CASTIGLIONI G. L., Estudo da produção e utilização de lipase de *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática de biodiesel Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Tese de Doutorado p.152, 2009

CORZO, G. REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v.70, p. 173-180, 1999.

ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G. e TAKAC, S.S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal Hazard Mater**, v.149, p. 720–724, 2007.

HANKIN, L. e ANAGNOSTAKI, S. L. The Use of Solid Media for detection of Enzymes Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597 – 607, 1979.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v 39, p. 235-251.

KUMAR, R. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. **New Biotechnology** v. 28, Number 1, p. 65 – 71, 2011

Mahanta.N., Gupta, A., Khare, S.K., Production of protease by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1729-1735, 2008

PLACKETT–BURMAN experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. **Indian J. Biotechnol.** v. 6, p. 469–478, 2007.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A. e WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SHAFEI, M.S. and ABD-ELSALAM, I.S. Role of some fermentation parameters affecting lipase production by *Fusarium solani*. **Acta Pharm. Turcica**. v.47, p. 209– 223, 2005

SHARMA, R.; CHISTI, Y. e BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIDHU, P. et al. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. **Folia Microb.** v. 43, p. 51–54, 1998.

SUGIHARA, A. et al. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **J. Biochem.** v.109, p. 211–216, 1991.

WALAVALKAR, G.S. e BAPAL M.M. *Staphylococcus warneri* BW 94 A new source of lipase. **Indian Journal Experimental Biology**, v.40, p. 1280-1284, 2002.

WANG, Y. et al. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 53841). **J. Ferment. Bioeng.** v.79, p. 433–438, 1995.

ZHEN-QIAN, Z. and CHUN-YUN, G. Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. **African J. Biotechnol.** v.8, p.1273– 1279, 2009.

Anexos

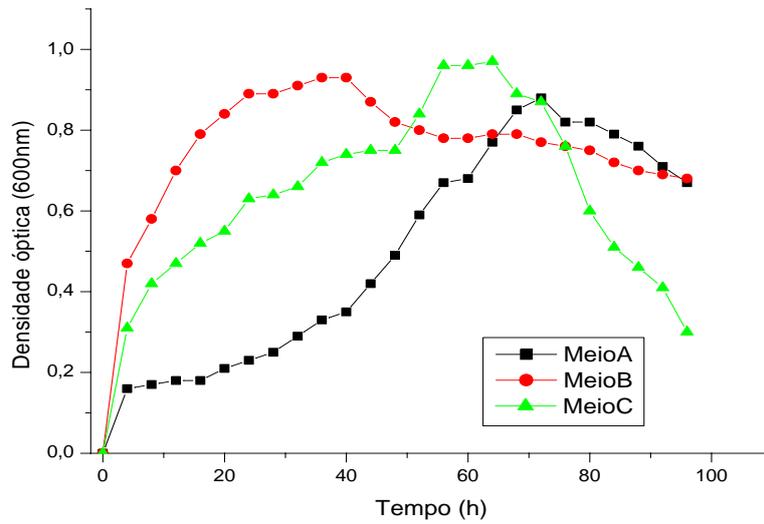


Figura 1 – Crescimento por *B. licheniformis* em diferentes meios de produção, 150 rpm, 37 °C, 96 horas

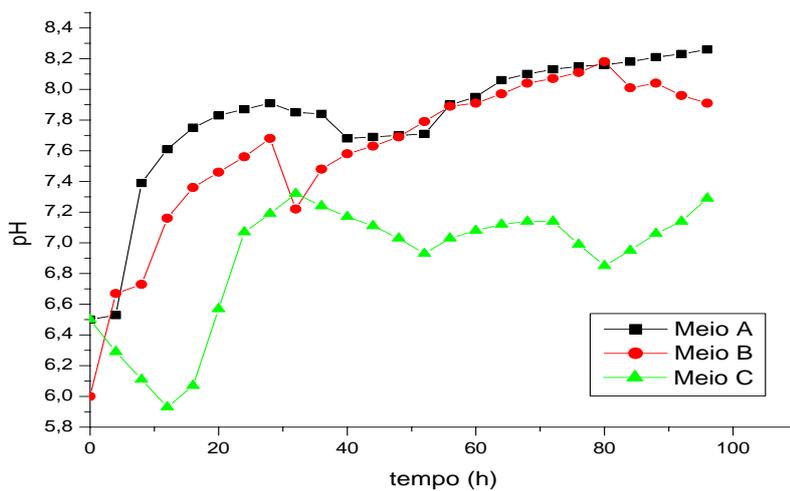


Figura 2 – Variação do pH em diferentes meios de produção de lipase utilizando o *B. licheniformis*, 150 rpm, 37 °C, 96 horas

Tabela 01. Atividade lipolítica dos meios A, B e C durante 96 horas a 37⁰ C e 150 rpm por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014).

Tempo (h)	Meio A (U/mL)	Meio B (U/mL)	MeioC (U/mL)
4	40	33,3	45
8	75	63,6	80
12	87,8	104	181
24	20	85	181
28	20	70	133
32	126	55	105
36	90	48	189,5
48	65	30	157,5
52	129	120	157,5
56	129	120	256
60	98	125	219
72	115	123	158
76	133	119	112,5
80	140	126	164
84	145	153	130
96	170	140	159

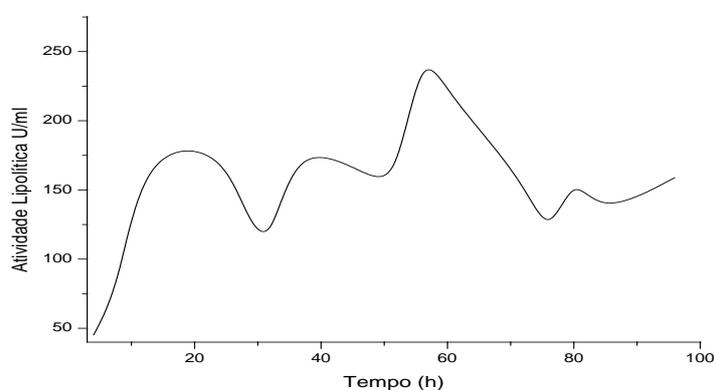


Figura 3 – Determinação da atividade lipolítica no meio C de produção de lipase utilizando o *B. licheniformis*, 150 rpm, 37⁰ C, 96 horas

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido a Revista Brazilian Archives of Biology and Technology

**PRODUÇÃO DE LIPASE UTILIZANDO MEIO A BASE DE RESÍDUO
INDUSTRIAL (SORVETE DE CHOCOLATE) ATRAVÉS DE UM
PLANEJAMENTO FATORIAL**

**Ladiel Luiz Pedrozo Tavares^{1, 4}; Clarissa Daisy da Costa Albuquerque⁴
Kaoru Okada^{3, 4} e Carlos Alberto Alves da Silva^{2, 4}**

1- Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais; 2 – Cursos de Engenharias Ambiental e Química; 3- Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas; 4- Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), R. do Príncipe, 526, Boa Vista, Recife-PE, 50050-900.

Mestrado em Desenvolvimento de Processos, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil.

Abstract

Lipases are enzymes known as hydrolases and catalyze the hydrolysis of long-chain triglycerides. The potential use of these enzymes in various types of industries such as food, fine chemicals, waste water treatment and pharmaceuticals products, have attracted interest for this class of enzymes. The factorial design is an important tool in the observation of statistical effects and interactions of variables in fermentation processes. Studies were conducted for lipase production using a factorial design 2^4 with 20 assays. The results showed the best was assay condition 11 (5% of residual ice cream at pH 3.0 in the final composition medium), 200 rpm, 96 hours, 37°C, produced 480 UI/mL of lipase.

Palavras chave: Lipase, *Bacillus licheniformis*, residual ice cream

Autor para correspondência, Carlos Alberto Alves da Silva Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, Recife, PE, Brasil. Fone: 55 81 21194045 E. mail: calves@unicap.br

1. Introdução

A biotecnologia em processos fermentativos permite a utilização de subprodutos e dejetos de indústrias e agroindústrias como fontes nutricionais para micro-organismos, visando obtenção de insumos (BIERGI e RINALDI, 2009).

Os sistemas industriais brasileiros abrangem uma vasta gama de atividades agrícolas ou agropecuárias, pois o país é considerado um grande fornecedor de alimentos para o mundo. Contudo, os resíduos líquidos gerados, por indústrias de alimentos, apresentam grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases. Dentre as enzimas hidrolíticas de maior interesse, 5-10% cabem as lipases (CARVALHO et al, 2005). Lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos. As lipases microbianas ganharam atenção especial para industriais devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substrato (Dutra et al 2008;. Griebeler et al 2009). Além disso, as lipases são extremamente versáteis, pois catalisam várias reações e diversos substratos, quando comparadas às outras hidrolases (CARVALHO et al, 2005). Esta classe de enzimas ocupa um lugar de destaque entre os biocatalisadores e têm muitas aplicações, motivo este que faz crescer significativamente sua participação no mercado mundial de enzimas industriais. As lipases, no futuro, terão importância industrial e comercial comparável às das peptidases, cuja venda entre as enzimas industriais, alcança 25 a 40% (SAXENA, et al., 2003b; HASAN et al., 2006; FREIRE & CASTILHO, 2008; CAI et al., 2009). Outro fator importante é que as lipases não requer cofatores, são de baixo custo, atuam em regiões consideradas específicas e em uma larga faixa de pH. Além de efetuarem reações de hidrólise, podem também exercer atividade catalítica (SARKAR et al., 1998; SCHMIDT-DANNER, 1999; NASCIMENTO et al, 2004; TREICHEL et al.,

2009).

A capacidade das lipases realizarem transformações químicas muito específicas (Biotransformação) as torna cada vez mais popular em comida, detergente, síntese, cosméticos orgânicos, e produtos farmacêuticos indústrias (Park et al 2005;. Gupta et al 2007.; Grbavcic et al.2007; Franken et al.2009).

O número de lipases disponível, no mercado mundial, tem aumentado desde 1980. Isso é resultado, principalmente, das enormes conquistas ocorridas na clonagem e expressão de enzimas dos micro-organismos, bem como, de uma crescente demanda por estes biocatalisadores com afinidade e propriedades específicas, tais como estabilidade, especificidade, pH e temperatura (Bornscheuer et al.2002; al Menoncin al. 2009).

O potencial biotecnológico das lipases relaciona-se ao fato de catalisar não apenas a hidrólise, mas também reações inversas como a esterificação e a transesterificação. Normalmente, mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores e requerem condições brandas de temperatura e pressão. Apresentam uma larga especificidade pelo substrato e alta enantiosseletividade (ELIBOL & OZER, 2002; CARVALHO et al., 2003; BURKERT et al., 2004; de CASTRO et al., 2004; CONTESINI et al., 2009; RIGO et al., 2010).

O sítio ativo da lipase não pode ser acessado pelo substrato diretamente, uma vez que é coberto por uma superfície entrelaçada chamada de tampa . Com a ligação do substrato superfície da enzima, essa tampa se move, abrindo a enzima. Dessa forma, o sítio ativo torna-se prontamente acessível ao substrato, expondo uma área hidrofóbica significativa para a interação da lipase com a interface lipídica. Esse mecanismo explica o fenômeno de ativação interfacial (VERGER, 1997; DRAVANOV & KHALAMEIZER, 1997; JAEGER et al., 1999; JAEGER & REETZ, 1998; OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA, 2000; ELIBOL & OZER, 2002; CASTRO et al., 2004; GONÇALVES, 2007; REIS et al., 2009; VOLPATO et al., 2010).

Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica consiste na produção e uso de enzimas de origem microbiana. Embora alguns

biocatalisadores sejam até hoje extraídos de tecidos animais e vegetais, microorganismos, em particular, são requisitados como fontes de enzimas (bactérias, fungos e leveduras) (NEIDLEMAN, 1991; SHIMIZU et al., 1997; BON et al., 2008).

O gênero *Bacillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de substâncias biotecnológicas, apresentando diversas espécies encontradas na natureza, e algumas como participantes da biota intestinal humana e animal (JAEGER et al., 1994; LOGAN; DE VOUS, 1998; JORGENSEN et al., 2000; FENG et al., 2001; CHANTAWANNAKUL et al., 2002; DEMAIN, and ADRIO, 2008). Diversas espécies do gênero *Bacillus* possuem uma alta capacidade em produzir e secretar uma grande quantidade de enzimas extracelulares. Particularmente, as espécies termofílicas têm contribuído para o desenvolvimento de uma grande variedade de novos produtos enzimáticos lançados recentemente no mercado.

Bacillus licheniformis (uma bactéria de interesse, pelo caráter não patogênico) está amplamente distribuída na natureza, sendo uma bactéria do solo, encontrada principalmente associada com plantas e materiais próximos a estas pela alta resistência de seus endósporos que são disseminados com a poeira (VEITH et al., 2004).

Neste trabalho foi avaliada a influência do resíduo da indústria de sorvete utilizando um planejamento fatorial de 2^4 para produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP1014), considerando seu potencial biotecnológico.

Material e Métodos

Micro-organismo

Os estudos foram realizados com a amostra do do *Bacillus licheniformis* UCP 1014, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, registrada no World Federation Culture for Collection-WFCC, e mantida em meio AN (Ágar Nutritivo), a temperatura de 4°C.

Pré- inóculo

As amostras de *B. licheniformis* foram mantidas no meio Ágar Nutritivo (AN) durante 24h e a seguir transferidas para o pré-inóculo que foi realizado em shaker orbital, utilizando Erlenmeyers de 1000mL de capacidade, contendo 450 mL de meio AN, 37°C a 150 rpm, durante aproximadamente 12 horas.

Inóculo

As amostras foram coletadas e submetidas à leitura no espectrofotômetro a 600 nm ao atingir a densidade ótica de 1, foram transferidos 10%, (20mL) do meio fermentado para frascos de Erlenmeyers com 250 mL de capacidade, contendo glicose 1,0%, extrato de levedura 0,5%, peptona 2,0%, NaNO_3 0,1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, pH 7,0. Os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^4 , por 120 h à 37°C.

Cinética de crescimento e produção de Lipase

A cinética de crescimento foi realizada com condição selecionada do planejamento fatorial, sendo coletadas amostras de 5 mL a cada 4h num total de 96h condicionadas em frascos de âmbar devidamente esterilizados.

Métodos Analíticos

Determinação pH.

O pH do meio livre de células foi medido utilizando-se um pHmetro Orion, modelo 310.

Deteção da atividade Lipolítica

No sobrenadante do meio de cultura, foi determinada a atividade lipolítica pelo método descrito por Soares et al. (1999). O substrato composto de óleo

de oliva foi emulsionado com goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática composta por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL de solução enzimática. A temperatura da reação foi mantida a 37°C em banho termostático, por 5 min., em agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera em 1 mol de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1 U/mL = 1 moles/mL. Min).

Cálculo da atividade enzimática

A atividade enzimática de lipase foi calculada através da apresentada abaixo:

$$\text{Atividade lipolítica (U/mL)} = \frac{(\text{Va} - \text{Vb}) \times \text{N} \times 1000}{t \times \text{Vc}}$$

onde:

AE é a atividade lipolítica (U/mL);

Va é o volume da amostra titulada (mL);

Vb é o volume do branco titulado (mL);

Vc é o volume da amostra utilizada na reação (mL);

N é a normalidade da solução de KOH (mol/L);

t é o tempo de reação em minutos. (SOARES, et. al., 1999)

Planejamento fatorial completo de 2⁴

Foi utilizado um planejamento experimental, que compreende um fatorial 2⁴, com os níveis + 1 e - 1 e 4 pontos centrais, nível zero, (tabelas 1 e 2). Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações glicose, resíduo, pH e agitação (rpm) foi utilizado o software STATISTICA versão 5.0 da StatSoft®, USA.

Resultados e Discussão

A tabela 3 apresenta a máxima atividade lipolítica atingida nos ensaios do planejamento fatorial em suas respectivas horas, nesta mesma tabela observamos que a maior atividade de todos os ensaios ocorreu a partir da 36^a hora de fermentação, sendo que o ensaio 11 foi superior aos demais com uma máxima atividade de 480 U/mL em 60 horas de fermentação.

Cinética de crescimento e produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) no ensaio 11.

A cinética de crescimento, do ensaio 11, do *Bacillus licheniformes* (UCP 1014) está representada na figura 01. Pode-se perceber que nas primeiras 4 horas houve a adaptação do micro-organismo (fase lag) em seguida, na fase log, o micro-organismo cresceu de forma rápida e constante atingido seu auge em 28 horas. A partir daí entrou em declínio encontrando-se duas fases estacionárias compreendidas entre 36 e 60 horas. Após a 60^a hora o declínio foi constante porém de forma lenta.

Através da curva de crescimento do micro-organismo a maior atividade enzimática foi registrada no final da segunda fase estacionária, próximo a fase de morte, equivalente a 480 U/mL, em 60 horas de fermentação. Tumang e Costa (2006) e Borzani *et al.* (2005), comprovaram que a máxima atividade lipolítica alcançada apresenta-se logo após a concentração de massa celular seca entrar em fase de morte, pois, no início da fermentação predominam transformações produtoras de energia com formação de biomassa, a enzima só é formada quando o metabolismo oxidativo encontra-se atenuado.

Nossos resultados encontram-se superiores comparando-se com Riaz, M. *et. al.* (2010), que analisou a caracterização e produção de lipase por *Bacillus sp.* FH5, obtendo a atividade máxima da enzima, após 48 h igual a (5,12U/ml), Já Mormeneo, *et. al.*, (2008) analisando a produção de lipase por *Bacillus subtilis* obteve uma atividade máxima de 440 U/mL em 48h, enquanto KANWAR *et al.* (2002), alcançaram uma atividade lipolítica de 25 U/mL, utilizando como fonte de enzimas lipolíticas, em fermentação submersa a 34°C e pH 8,0, as bactérias *Pseudomonas G6*, isoladas de solo contaminado com petróleo, já Fernandes, M. L. M., (2007) analisando a produção de lipases por *Burkholderia cepacia*, obteve uma atividade máxima de de 49,5 U/mL a 72 h de cultivo,

Porém nossos resultados são inferiores quando comparados com Feitosa, (2009), que analisando a produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa obteve a máxima atividade 3891 U/mL atingida a 96h de fermentação. Enquanto Ruchi *et. al.*,(2008) realizando uma otimização para produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa*, conseguiu uma atividade de 4580 U/mL

Efeito do pH durante a produção de lipase por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) no ensaio 11 do planejamento fatorial 2⁴.

A variação do pH correspondente ao ensaio (11) do planejamento fatorial 2⁴, conforme apresentado na figura 03, não sofreu muita alteração variando de 3,27 a 3,32. A máxima atividade lipolítica foi atingida quando o pH apresentava-se igual a 3,32. As atividades das lipases são altamente dependentes do pH, e qualquer alteração pode vir a afetar o seu potencial catalítico, uma vez que o pH influencia a estrutura de proteínas e, portanto,

rege a sua atividade catalítica (SHAH, et. al., 2007). Segundo Nawani, et. al., (2007) as lipases de *Bacillus* geralmente têm pH ótimo de 7,0-9,0. Porém na própria literatura encontramos trabalhos como o de Feitosa, (2009) que conseguiu a máxima atividade lipolítica em pH 3,0 utilizando bactérias da biopetro.

A agitação e a aeração são parâmetros que influenciam diretamente na produção de enzimas lipolíticas. Conforme mostra a tabela 1, três níveis de rotações foram utilizadas neste trabalho indicando que a maior delas, 200rpm, referente ao 11º ensaio foi quem mais influenciou na atividade enzimática.

DIAZ *et al.* (2006), na produção de lipase do fungo termotolerante de *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa utilizaram pH 6,5, temperatura de 40º C e uma velocidade de agitação de 170 rpm obteve uma atividade lipolítica máxima de 50 U/mL. Por sua vez SHU *et al.* (2006), obtiveram uma atividade lipolítica máxima de 26 U/mL utilizando lipase de *A. cinnamomea* a uma velocidade de agitação de 150 rpm, temperatura de 28º C e pH 4,0. Enquanto que Potumarthi et al. (2008) estudando a influência da (aeração e agitação) para a produção de lipase utilizando *R. Mucilaginosa* MTCC 8737, obteve a atividade lipolítica máxima de 72 U/mL durante 96 h de fermentação a 200rpm.

Na produção de lipases ácidas pelo microrganismo mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa, MAHADIK *et al.* (2004), utilizaram uma velocidade de agitação que variou entre 150 e 180 rpm, à 30ºC e pH 5,5, atingindo uma atividade lipolítica máxima de 25,8 U/mL. TUMANG & COSTA *et al.* (2006), empregando fermentação submersa para a produção de uma lipase de *Yarrowia lipolytica* com uma agitação de 160 rpm, numa temperatura de 30º C e pH 6,0 obtiveram uma atividade lipolítica de 1200 U/L.

Os resultados expressos no Diagrama de Pareto (Figura 4) com os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p , com as seguintes variáveis independentes: glicose, resíduo oleoso, pH e agitação, assim como suas associações, influenciaram na produção de lipase. Sendo que a agitação, o pH e o resíduo foram as variáveis independente mais relevante para produção da enzima, por ambas estarem acima dos valores de p .

Desta forma, os resíduos oleosos podem ser uma fonte alternativa tanto de carbono como de nitrogênio, a fim de propiciar a produção de insumos biotecnológicos de elevado valor agregado.

ANEXOS

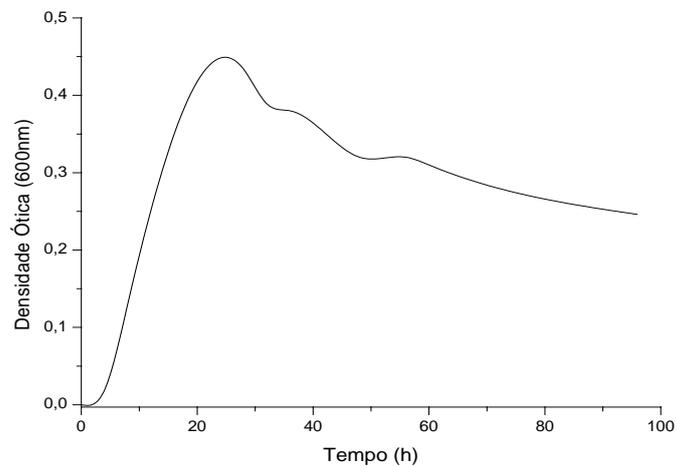


Figura 1. Crescimento do *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) em função do tempo após 96 horas a 37⁰C, 200 rpm e pH 3,0 (ensaio 11).

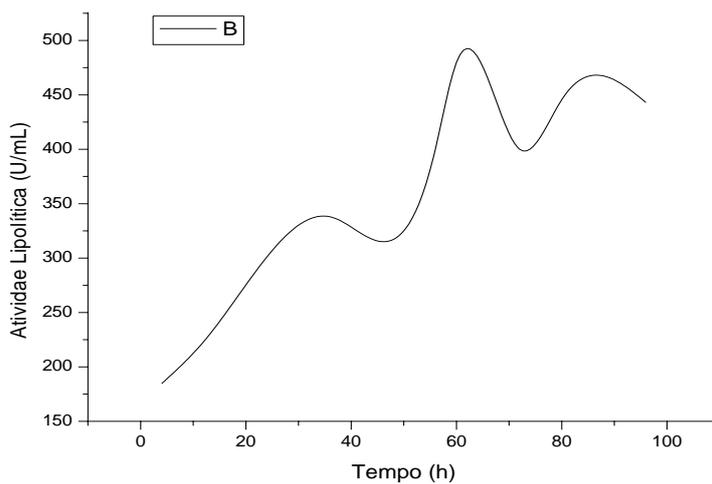


Figura 2. Atividade lipolítica de *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) durante 96 horas a 37⁰C, 200 rpm e pH 3,0 (ensaio 11).

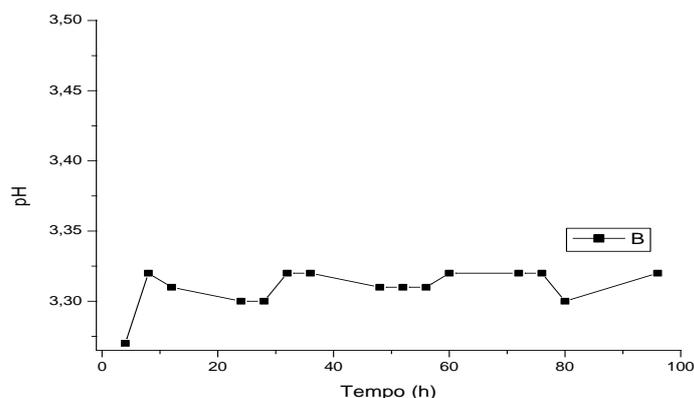


Figura 3. Variação do pH no ensaio 11 do planejamento fatorial 2^4 durante 96 horas a 37°C e 200rpm

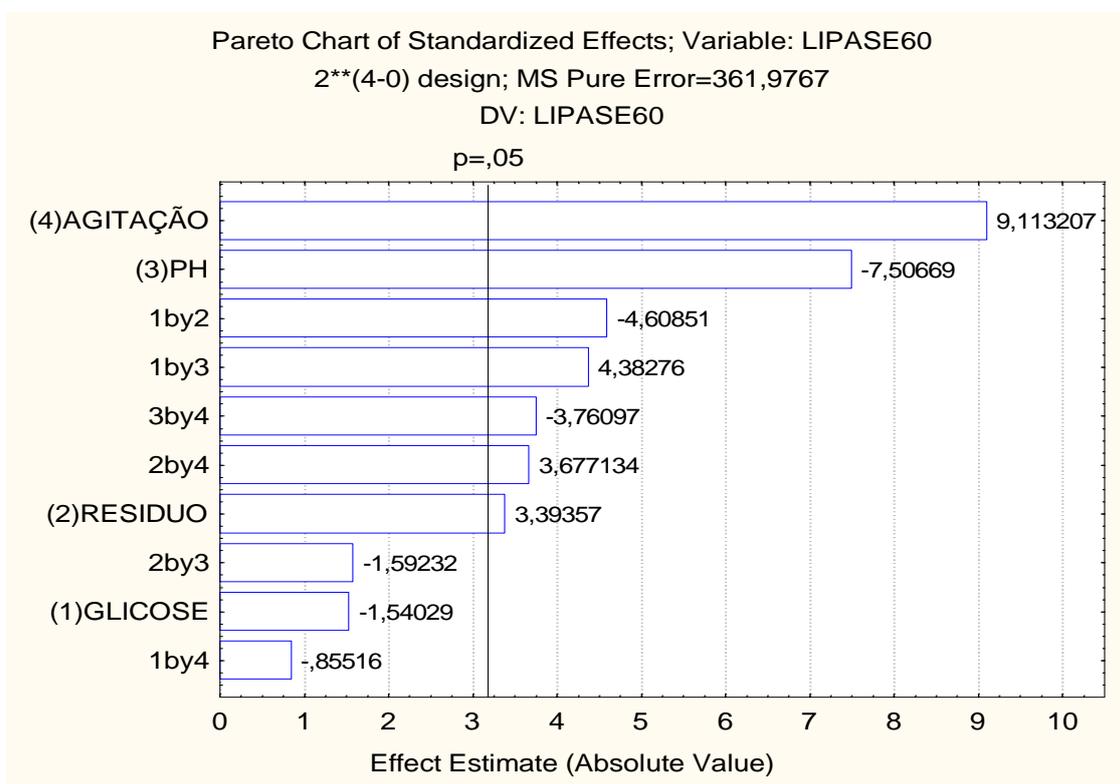


Figura 4. Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e interações das variáveis independentes no processo de produção de lipase por *Bacillus licheniformis*, a 60 h de cultivo a 37°C . (1) glicose, (2) resíduo oleoso, (3) pH e (4) agitação (rpm)

Tabela 1: Matriz do Planejamento Fatorial 2⁴

Fator	Nível		
	-1	0	+1
Glicose (g/L)	0	3,75	7,5
Resíduo (g/L)	0	2,5	5
pH	3	6	9
Agitação (rpm)	100	150	200

Tabela 2: Planejamento fatorial 2⁴, tendo como variáveis glicose, resíduo, pH e agitação como variável resposta para a produção de lipase.

Ensaio	Glicose	Resíduo	pH	Agitação
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Tabela 03. Atividade lipolítica máxima nos respectivos tempos dos ensaios do planejamento fatorial 2⁴ durante a fermentação por *Bacillus licheniformis* (UCP 1014) a 37°C.

Ensaio	Atividade Lipolítica UI/mL	Tempo (h)
1	124,2	60
2	136	36
3	124,5	36
4	108,07	80
5	178,9	76
6	65,3	36
7	118,47	56
8	110,61	48
9	161,2	36
10	300	72
11	480	60
12	110,7	32
13	214,2	72
14	350	72
15	89,35	80
16	293,5	72
17	380	72
18	378	76
19	442	76
20	422	72

Bibliografia

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDES, S.; VAN OOSTERHOUT, D. Exploring the specific features of interfacial enzymology base on lipase studies. Review. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 176, p. 995-1013, 2006.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. **J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.**, v. 10, p. 377- 383, 2000.

Andrade, R.F.S. **Produção de biossurfactante por *Candida glabrata* isolada de solo do semi-árido em fermentação submersa utilizando rejeitos industriais (milhocina e soro de leite), como meio de baixo custo, 2009 –** Dissertação Mestrado – UNICAP

ARPIGNY, J.K. and JAEGER, K.E. – Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, n.343, p. 177-183, 1999

BANAT, I.M.; MAKKAR, M.R.S.; CAMEOTRA, S.S. – Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BECKER,P.; ABU-REESH, L.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANKIAN, G.; MÄRKL, H. – Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1977.

BEISSON, F., TISS, A., RIVIÉRE, C. And VERGER, R. – Methods for Lipase Detection and Assay: A Critical Review, **European Journal of Lipid Science and Technology**, 102, p. 133-153, 2000.

BORNSCHEUER, U.T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R. and KRISHNA, S.H. – Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, **Trends in Biotechnology**, v. 20, p.10, 433-437, 2002.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Química**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2005.

BRADDOO, S.; SAXENA, R.K. and GUPTA, R. – Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus spp.* , **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p. 87-91, 1999.

BULL, A. T., WARD, A. C. & GOODFELLOW, M. – Search and Discovery strategies for biotechnology : the paradigm shift, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, p. 573-606, 2000.

CHANTAWANNAKUL, P., ONCHAROEN, A., KLANBUT, K., CHUKEATIROTE, E. and LUMYONG, S. – Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **ScienceAsia**, v.28, p. 241-245, 2002.

CHIRUMAMILLA, R.R.; MURALIDHAR, R.M.; MARCHANT, R. and NIGAM, P. – Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution, **Molecular and Cellular Biochemistry**, **224**, 159-168, 2001.

CLAUS, D. and BERKELEY, R.C.W.- Genus *Bacillus* Cohn 1872, 1105-1139. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**., v 2, Baltimore, 1999.

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>> Acesso em : 15 de maio de 2009.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE., D. M. G; LAGO, R. C. A.; COURI, S.Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 676-68, 2008.

DEMAIN, A.L and ADRIO, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology, **Molecular Biotechnology**, v. 38, p. 41–55, 2008.

DEMAIN, A.L. – Small bugs, big business: the economic power of the microbe, **Biotechnology Advances**, v.18, p. 499-514, 2000.

DESAI, J. D. and BANAT, I.M. – Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v 61, 47-64, 1997.

DIAZ, J.C.M.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p. 1042–1050, 2006.

DICKINSON, D.N.; DUC, M.T.L; HASKINS, W.E; GORNUSHKIN, I.; WINEFORDNER, J.D. and POWELL, D.H. – Species differentiation of suite of *Bacillus* spores by mass spectrometry based protein profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.475-482, 2004.

DRIKS, A. – Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 389-391, 2002.

EGGERT, T.; BROCKMEIER, U.; DRÖGE, M.J.; QUAX, W.J.; JAEGER, K.E. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH, **FEMS Microbiology Letters**, **225**, p.319-324, 2003.

ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Proc. Biochem.*, v. 38, p. 367-372, 2002.

FALCONE, C. O. 2009. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento**, 2009. Dissertação mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

FEITOSA, I. G. 2009. **Produção de enzima lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**, 2009. Dissertação Mestrado – Universidade Tiradentes – UNIT

FENG, Y. Y., YANG, W. B., ONG, S. L., HU, J. Y. and NG, W. J. – Fermentation of Starch for Enhanced Alkaline Protease Production by Constructing an Alkalophilic *Bacillus pumilus* Strain, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p.153-160, 2001.

FERNANDES, M.L.M – Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise. p. 120. Curso de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Paraná. Tese de Doutorado (2007)

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses. **Enz. Microb. Technol.** (2010)

GUPTA, R.; GUPTA, N. and RATHI, P. – Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HAKI, G.D. and RAKSHIT, S.K. – Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, **Biosource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKI, S. L. – **The Use of Solid Media for detection of Enzymes Production by Fung**, *Mycologia*, v. 67, p. 597 – 607, 1979.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.

HONDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D. – Lipases and their applications: an overview. **Applied Biochemical and Biotechnology**, **118**, (1-3), 155-170, 2004.

HUNTER-CEVERA, J. C.- The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p. 278-285, 1998.

IMAMURA, S., KITAURA, S. Purification and Characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.**, v. 127, p. 419-425, 2000.

JAEGER, K.E. and EGGERT, T. – Lipases for biotechnology, **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B.W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. and MISSET, O. – Bacterial Lipases, **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.L. and REETZ, M. T. – Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, **TIBTECH**, v.16, p. 396-403, 1998.

JORGENSEN, P.L., TANGNEY, M., PEDERSEN, P.E., HASTRUP, S., DIDERICHSEN, B. and JORGENSEN, S. – Cloning and Sequencing of na Alkaline Protease Gene from *Bacillus lentus* and Amplification of the Gene on the *B. lentus* Chromosome by na Improved Technique, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 825-827, 2000.

KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, v.84, p. 207–211, 2002.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P. and FONTANA, J.D. – Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n.2, p. 105-110, 2003.

LOGAN, N. A. and DE VOUS, P. – *Bacillus* et Industrie, **Bulletin de la Societé Française de Microbiologie**, v.13, p.130- 136, 1998.

LOPES, M.F.S.; CUNHA, A.E.; CLEMENTE, J.J.; TEIXEIRA CARRONDO, M.J. and CRESPO, M.T.B. – Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p. 249-254, 1999.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.39, p. 2031–2034, 2004.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. – An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **58**, 428-434, 2002.

MANZANO, M.; GIUSTO, C., IACUMIN, L.; CANTONI, C. and COMI, G. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiology*, v.26, n.3, p. 259-264, 2009.

MENOCIN, SILVANA. 2007 – Concentração, Imobilização e Produção Parcial de Lipase produzida por *Penicillium Verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido, 2009. Dissertação de Mestrado, 2009.

MORMENEO, M.; ANDRÉS, I.; BOFILL, C.; DÍAZ, P.; AND ZUECO, J. Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Applied microbiology and biotechnology* v. 80, n. 3, p. 437 – 445. 2008.

NAESSENS, M. and VANDAMME, E.J. – Multiple forms of microbial enzymes, **Biotechnology Letters**, v.25, p. 1119-1124, 2003.

Nawani, N., & Kaur J. (2007). Study on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: production, purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 881–887, 2007

PALLADINO, FERNANDA. 2008 – Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, 2008. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R and NIGAM, P. – Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes, **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.33, p.1-20, 1999.

PANTATAZAKI, A.A.; PRITSA, A.A.; KYRIAKIDIS, D.A. – Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*, **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 58, p.1-12, 2002.

POTUMARTHI, R., SUBHAKAR, C., VANAJAKSHI, J., & JETTY, A. (2008). Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa*-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 151, p. 700–710, 2008.

REGINATO, E. et al - Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia 2009. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p. 81-86, 2009

Riaz, M.; Shah, A.A.; Hameed, A.; Hasan, F. Characterization of lipase produced by *Bacillus* sp. FH5 in immobilized and free state. *Ann Microbiol* v. 60, p.169–175, 2010

RIGO, ELISANDRA – Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por FES de farelo de soja, 2009. Tese de Doutorado, 2009.

Ruchi, G., Anshu, G., & Khare, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4796–4802, 2008.

SAID, S e PIETRO, R. – Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico, **Eventos**, 2002, 122 p.

SANCHEZ, S. and DEMAIN, A.L. – Metabolic regulation of fermentation processes, **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 895-906, 2002.

SARKAR, S.; SCREEKANTH, B.; KANT, S.; BENERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. – Production and optimization of microbial lipase, **Bioprocess Engineering**, v.19, p. 29-32, 1998.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, BHOOPANDER, G.; DAVIDSON, W.S. – Purification strategies for microbial lipases, **Journal of Microbiological Methods**, **52**, 1-18, 2003.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, BHOOPANDER, G.; DAVIDSON, W.S. – Purification strategies for microbial lipases, **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O. P. – Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production, **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p. 1-17, 2004.

SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O. P. – Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production, **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHMIDT-DANNERT, C. – Recombinant microbial lipases for biotechnological applications, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 2123-2130, 1999.

SEMIONATO, S. - **Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura da ETE – UFES, 2006 –**
Dissertação de Mestrado – UFES

SHAH, K. R., PATEL, P. M., & BHATT, S. A. Lipase production by *Bacillus* sp. under different physio-chemical conditions. **Journal of Cell & Tissue Research**, v. 7, p. 913–916, 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y. and BANERJEE, U.C. – Production, purification, characterization and applications of lipases, **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R. and RAHMAN, M.M. – Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 595-597, 1998.

SHU, C-H.; XU, C-J.; LIN, G-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, p. 734–738, 2006.

STEELE, D.B. & STOWERS M. D. - Techniques for selection of industrially important microorganisms, **Annual Reviews Microbiology**, **45**, 89-106, 1991.
STEPHENSON, K. and HARWOOD, C. R. – Influence of a Cell-Wall-Associated Protease on Production of α -Amylase by *Bacillus subtilis*, **Applied and Environmental Microbiology**, **64**, 2875-2881, 1998.

STEWART, T.L. and FOGLER, H.S. – Biomass plug development and propagation in porous media. **Biotechnol. Bioeng.**, v 72, 353-363, 2001.

TAKAÇ, S. AND MARUL, B. Effects of lipidic carbon sources on the extracellular lipolytic activity of a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35 (9), 1019-1025, 2008.

THANGAM, E.B. and RAJKUMAR, G. S. – Purification and Characterization of Alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*, **Biotechnology Applied and Biochemistry**, 35, 149-154, 2002.

TUMANG, T. R.; COSTA, É. S. da. Maldi-tofms aplicada à produção, purificação e caracterização de lipases de interesse biotecnológico. XIV Seminário de Iniciação Científica. PIBIC –PUC-RIO, 2006.

VALENTE, A. M. - Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano, **Ciência e Tecnologia de Alimentos. Vol.30 no.2** Campinas Abril/Junho de 2010

VEITH ,B, HERZBERG C.; STECKEL S.; FEESCHE J.; MAUER KH, EHRENREICH P, BAUMER S, HENNE A, LIESEGANG H, MARKL R, EHRENREICH A,GOTTSCHALKG.- The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* an organism with great industrial potential, **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, 7(4) :204-211,2004

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2095–2103, 2005.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Dentre os meios de produção de lipase testados pelo *Bacillus licheniformis* (UCP 1014), o meio denominado C foi aquele que apresentou a maior atividade enzimática (256 UI/mL), quando comparado aos demais;
- A composição do meio C foi modificada pela substituição do óleo de oliva pelo resíduo da produção do sorvete de chocolate;
- O planejamento fatorial 2^4 utilizando o meio denominado C para produção de lipase, apresentou 20 ensaios, tendo como variáveis: glicose, resíduo de sorvete, pH e agitação;
- O ensaio denominado 11, cujas condições foram 5% de resíduo de sorvete, pH 3,0, na composição final do meio, 200 rpm, 96 horas, 37°C, obteve uma produção de 480 UI/mL;
- Esses resultados sugerem uma alternativa para reutilização de resíduos oleosos provenientes da indústria de sorvetes, como substratos para fins biotecnológicos, no intuito de auxiliar na composição de meios alternativos e econômicos para produção de lipase bacteriana.

Instruções Revista Exacta

Exacta <http://www.uninove.br/revistaexacta>

Diretrizes para Autores

Podem ser apresentados à análise da Comissão Editorial artigos e resenhas (de, no máximo, um ano entre o lançamento da obra e a data desta publicação) em português ou inglês.

SUBMISSÃO DE TRABALHOS, ASPECTOS ÉTICOS E DIREITOS AUTORAIS

- Os trabalhos submetidos à Comissão Editorial são avaliados quanto a seu mérito científico, sua adequação aos requisitos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) [www.abnt.org.br] e a estas instruções editoriais;
 - Os trabalhos devem ser inéditos no Brasil e não podem ser submetidos à avaliação simultânea em outro periódico. Textos já veiculados em eventos não podem ultrapassar um ano de sua divulgação e devem ter essa data explicitada;
 - A Comissão Editorial pode aceitar ou não os artigos a ela submetidos e, eventualmente, sugerir modificações ao(s) autor(es), a fim de adequar os textos à publicação;
 - Os textos devem vir acompanhados, em arquivo separado, de formulário de autorização (o modelo está disponível em www.uninove.br/revistaexacta), no qual deixarão explícita a exclusividade de publicação impressa e eletrônica do artigo pela revista Exacta. No formulário, deve constar endereço postal completo, telefones e *e-mail*;
 - A instituição e/ou qualquer dos organismos editoriais desta publicação não se responsabilizam pelas opiniões, idéias e conceitos emitidos nos textos, por serem de inteira responsabilidade de seu(s) autor(es);
-
- Todos os trabalhos são submetidos à leitura de, pelo menos, dois pareceristas, garantidos sigilo e anonimato tanto do(s) autor(es) quanto dos pareceristas;
-
- As sínteses dos pareceres, em caso de aceite condicionado ou recusa, são encaminhadas ao(s) autor(es);
 - Os trabalhos devem ser enviados exclusivamente para o endereço eletrônico www.uninove.br/revistaexacta

Formatação

Os textos devem ser elaborados conforme as seguintes instruções:

- Digitados em Word (.DOC) ou programa compatível de editoração; fonte Times New Roman, tamanho 12, alinhamento à esquerda, sem recuo de parágrafo, e espaçamento (entrelinha) duplo;

- Artigos devem ter entre 14 mil e 28 mil toques (caracteres + espaços), e resenhas, entre 3,5 mil e 7 mil toques (caracteres + espaços);

- Artigos devem apresentar título, resumo (entre cem e 150 palavras) e palavras-chave (máximo cinco) na língua de origem do texto. Artigos escritos em outra língua que não o inglês devem conter, ainda, *title*, *abstract* e *key words*. Ao final, obrigatoriamente, a lista de referências utilizadas no corpo do texto;

- Notas servem para explicações ou esclarecimentos e não se confundem com referência à fonte; devem vir ao final do texto, com numeração seqüencial em algarismos arábicos;

- Unidades de medida devem seguir os padrões do Sistema Internacional de Unidades (SI), elaborados pelo Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM) [www.bipm.org]; em casos excepcionais, a unidade adotada deve estar seguida da referência expressa no SI, entre parênteses;

- Palavras estrangeiras devem ser grafadas em itálico;

- Neologismos ou acepções incomuns, grafe entre “aspas”;

- Trabalhos que exijam publicação de gráficos, quadros, tabelas ou qualquer tipo de ilustração devem apresentar as respectivas legendas, citando a fonte completa e sua posição no texto. Os arquivos devem ser encaminhados separadamente e, sempre que possível, no formato original do programa de elaboração (por exemplo: CAD, CDR, EPS, JPG, TIF, XLS), e as imagens, com alta definição (mínimo de 300 *dots per inch* [DPIs]); para mapas ou micrografias, devem estar explícitas as marcas de escala.

Para citar

Há duas maneiras de citar uma fonte: direta (respeitando redação, ortografia e pontuação originais) ou indireta, na qual se usa apenas o conceito da fonte, que não aparece de forma literal ou textual. Observe:

A ironia seria assim uma forma implícita de heterogenia mostrada, conforme a classificação proposta por Authier-Reiriz (1982).

Oliveira e Leonardos (1943, p. 146) dizem que a “[...] relação da série São Roque com os granitos porfiróides pequenos é muito clara.”

Outro autor nos informa que “[...] apesar das aparências, a desconstrução do logocentrismo não é uma psicanálise da filosofia [...]” (DERRIDA, 1967, p. 293).

No caso de o trecho citado ultrapassar 210 toques (caracteres + espaços), deve-se adotar recuo à direita de 4 cm, justificação do parágrafo sem o uso de aspas, em tamanho 10 e com entrelinhas simples. Observe:

A teleconferência permite ao indivíduo participar de um encontro nacional ou regional sem a necessidade de deixar seu local de origem. Tipos comuns de teleconferência incluem o uso da televisão, telefone, e computador. Através de áudio-conferência, utilizando a companhia local de telefone, um sinal de áudio pode ser emitido em um salão de qualquer dimensão [...] (NICHOLS, 1993, p. 181).

Para referenciar

Ao referenciar uma fonte, atente à ordem dos elementos, à pontuação e, principalmente, às informações essenciais que devem ser fornecidas e, sempre que possível, informe se a fonte está disponível eletronicamente (*on-line*). Observe:

Livro

Os elementos essenciais são: autor(es) do livro, título do livro, edição, local, editora e data da publicação.

BUARQUE, C. *Benjamim*. 2. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2004.

Livro (parte)

Os elementos essenciais são: autor(es) da parte, título da parte, autor(es) do livro, título do livro, edição, local, editora, data da publicação e intervalo de páginas da parte.

DERENGOSKI, P. R. Imprensa na Serra. In: BALDESSAR, M. J.;

CHRISTOFOLETTI, R. (Org.). *Jornalismo em perspectiva*. 1. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2005. p. 13-20.

Livro (meio eletrônico)

Os elementos essenciais são os mesmos do livro ou da parte do livro, porém acrescidos do endereço eletrônico e data de acesso (se o meio for *on-line*).

ASSIS, M. de. Memórias póstumas de Brás Cubas. 1. ed. São Paulo: VirtualBooks, 2000. Disponível em:
<http://virtualbooks.terra.com.br/freebook/port/download/Memorias_Postumas_de_Bras_Cubas.pdf>. Acesso em: 31 dez. 2004.

FERREIRA, A. B. de H. *Novo dicionário Aurélio*. 3. ed. São Paulo: Positivo, 2004. 1 CD-ROM.

Periódico (parte)

Os elementos essenciais são: autor(es) da parte, título da parte, título do periódico, local, fascículo (número, tomo, volume etc.), intervalo de páginas da parte e data da publicação.

BIARNÈS, J. O significado da escola nas sociedades do século XXI (o exemplo da escola francesa). *EccoS – Revista Científica*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 107-128, jul./dez. 2004.

Periódico (meio eletrônico)

Os elementos essenciais são os mesmos da parte do periódico, porém acrescidos do endereço eletrônico e data de acesso (se o meio for *on-line*).

BIARNÈS, J. O significado da escola nas sociedades do século XXI (o exemplo da escola francesa). *EccoS – Revista Científica*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 107-128, jul./dez. 2004. Disponível em:
<http://portal.uninove.br/marketing/cope/pdfs_revistas/eccos/eccos_v6n2/eccosv6n2_jebianes_traddesire.pdf>. Acesso em: 31 dez. 2004.

Trabalho acadêmico

Os elementos essenciais são: autor(es) do trabalho acadêmico, título do trabalho acadêmico, data da apresentação, definição do trabalho (dissertação, monografia, tese etc.), titulação visada, instituição acadêmica (incluindo escola, faculdade, fundação etc.), local e data da publicação.

DE NIL, L. F.; BOSSHARDT, H-G. Studying stuttering from a neurological and cognitive information processing perspective. In: WORLD CONGRESS ON FLUENCY DISORDERS, 3., 2001, Nyborg. *Annals...* Nyborg: IFA, 2001. p. 53-58.
HARIMA, H. A. *Influência da glucana na evolução do Lupus murino*. 1990. Tese (Doutorado)–Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1990.

XAVIER, E. F. T. *Qualidade nos serviços ao cliente: um estudo de caso em bibliotecas universitárias da área odontológica*. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências da Comunicação)–Escola de Comunicações e Artes, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

Na elaboração destas normas editoriais, foram consultados os seguintes documentos da ABNT: NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027, NBR 6028, NBR 6034, NBR 10520, NBR 10522, NBR 10525, NBR 12256.

Itens de Verificação para Submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista;

O artigo atende a todos os aspectos normativos descritos em "Diretrizes para autores".

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

Exacta <http://www.uninove.br/revistaexacta>

Instruções da Revista Brazilian Archives of Biology and Technology

Scope

The **Brazilian Archives of Biology and Technology**, publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology.

Preparation of manuscripts

Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

Manuscript

Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following

headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font).

Title.

The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.

ABSTRACT

Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.

Key words

Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.

INTRODUCTION

This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.

MATERIALS AND METHODS

Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.

RESULTS AND DISCUSSION

Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.

RESUMO

An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.

REFERENCES

References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al.*, 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.

In journals:

Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem.*, 27, 109-117

Thesis:

Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India

In books:

Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In-*Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16

Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi

In conferences:

Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6th International Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah

Tables and Figures

Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.

Units and Abbreviations

The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.

Manuscript lay-out

It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).

Spacing

Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in

the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.

Electronic submission

Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).

Referees

When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

Page charges and reprints

There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol - **Brazilian Archives of Biology and Technology** ([address below](#)).