UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDA DE CARVALHO OLIVEIRA

Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na
obtenção de aroma de queijo

Lorena
2010

FERNANDA DE CARVALHO OLIVEIRA

Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na
obtenção de aroma de queijo

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves

Lorena
2010

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Oliveira, Fernanda de Carvalho

Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo / Fernanda de Carvalho Oliveira ; orientador Adilson Roberto Gonçalves. – Lorena: 2010.

124 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Lipase 2. *Penicillium roqueforti* 3. Queijo (Aroma Natural). I.

Título

**À minha amada mãe, por estar sempre ao meu lado,
segurando minha mão e me transmitindo confiança,
crença e coragem sempre.**

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao professor Dr. Adilson Roberto Gonçalves pela orientação, confiança e amizade.

Ao meu pai Luiz, exemplo de compreensão, e a minha mãe Henriqueta, exemplo de força e persistência, pelo amor, pela confiança, por serem meu porto seguro e me incentivarem em cada etapa da minha vida. Amo vocês.

Aos meus irmãos Luiz Henrique, André e Fabiano pelo apoio, lealdade e incentivo, mesmo que estando fisicamente distante. As minhas cunhadas Patricia e Tricia, pela amizade e pelos meus sobrinhos lindos, Nicholas, Rafa e Luke.

Ao Victor pelo amor, paciência e por fazer minha vida mais feliz.

A todos meus familiares, pelo apoio e torcida sempre.

Aos amigos do Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal, Cibele, José Carlos, Jussara, Rafael, Bruno, Naila, Priscila, Fernando, Patricia, Dorival, Vinicius e Simone, pela amizade e por caminharem ao meu lado. A Graziela, a Livia, a Joseana, ao Fabrício e a Bárbara pelo auxílio, amizade e colaboração.

Ao amigo Germano, pela paciência e colaboração, ao Victor, Celso, Robson e a amiga especial Paula, pela amizade, força, hospitalidade e muitos momentos de distração.

Ao professor MSc. Gustavo F. R. Peão, pela amizade, confiança, ensinamentos e grande incentivo

A professora Dra. Maria Bernadete de Medeiros pelo ensinamento, disponibilidade, incentivo e amizade.

Ao professor Dr. Messias Borges Silva pela disponibilidade e amizade.

Aos professores Dr. Walter de Carvalho e Dra. Heizir Ferreira de Castro pela colaboração.

Aos funcionários e professores do Departamento de Biotecnologia pelo aprendizado e respeito.

A professora Dra. Gisele Leticia Alves pela amizade e disponibilidade.

A Aromax, especialmente ao Sr. Mariano Ibanes Marques e ao Luciano Marques pelo apoio, amizade e por disponibilizar a empresa e funcionários contribuindo na realização deste trabalho.

A todos amigos que, de alguma forma participam da minha vida.

A banca examinadora, pela contribuição, disponibilidade e atenção.

À Capes pelo apoio financeiro.

“Somente os fortes alcançam a vitória, porque os fracos logo se deixam vencer pelo desânimo...

Somente os fortes conquistam os altos cumes, porque sabem escalar a montanha passo a passo e lentamente vencer os percalços...

Toda subida exige esforços, perseverança e coragem. Aqueles que temem os desafios ou que já antecipam o fracasso são vencidos pelo descrédito em si mesmos e serão, na certa, derrotados...

Pois, antes de tudo, é a força interior que nos faz capazes de vencer!”

RESUMO

OLIVEIRA, F. C. **Produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e sua aplicação na obtenção de aroma de queijo**. 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

A proposta desse trabalho foi avaliar meios de cultivo para produção de lipase por *Penicillium roqueforti* e utilizá-la na forma bruta em um processo industrial em escala de bancada de síntese de aroma de queijo, procurando, desta forma, contribuir na busca por processos biotecnológicos viáveis para síntese de aroma natural desse produto que participa da formulação de muitos produtos alimentício, o aroma de queijo. Para tanto, estudou-se a produção de lipase pelo fungo em fermentação submersa, utilizando dez diferentes meios de cultivo, na presença e na ausência de óleo de oliva. Os extratos obtidos foram avaliados quanto à atividade de lipase, protease e quantificação de biomassa. O meio denominado H+óleo induziu a maior atividade lipolítica em 96 h (7,5 U/mL) e foi, portanto, selecionado para aplicação no processo industrial em escala de bancada. A produção da enzima foi realizada utilizando o fungo *Penicillium roqueforti* em meio H+óleo, sendo esta denominada extrato enzimático bruto, apresentando atividade lipolítica de 10,97 U/mL e atividade específica de 2184,07 U/mg. A atividade proteolítica desse extrato foi 166,30 U/mL e seu perfil eletroforético apresentou 7 bandas proteicas de massas molares variando entre 122,2 kDa e 11,9 kDa. Após a determinação das atividades enzimáticas, este extrato enzimático bruto foi aplicado no processo na indústria através de um planejamento fatorial completo avaliando a influência da temperatura, tempo de reação e pH sobre a intensificação de sabor e odor de queijo, sendo esta determinada através de análise sensorial utilizando Teste de Comparação Múltipla, definindo como padrão o aroma produzido por este processo nas condições realizadas pela empresa. O mesmo planejamento fatorial foi aplicado para este processo avaliando uma enzima comercial. O extrato enzimático aplicado nas condições de temperatura de 50°C, tempo de reação de 24 h e pH 5,0 levou a síntese de um aroma de queijo mais intenso, sendo este o preferido pelos provadores quando avaliado juntamente com o aroma padrão da empresa e o aroma mais intenso resultante do planejamento utilizando a enzima comercial, em análise sensorial utilizando teste de preferência. Esses resultados evidenciam a potencialidade do uso desse extrato enzimático na obtenção de aroma natural de queijo.

Palavra-chaves: Lipase. *Penicillium roqueforti*. Queijo (Aroma natural).

ABSTRACT

OLIVEIRA, F. C. **Production of lipase by *Penicillium roqueforti* and its application in obtaining cheese flavor**. 2010. 124 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

The purpose of this study was to evaluate culture media for lipase production by *Penicillium roqueforti* and apply it in raw form in an industrial bench scale process of cheese flavor's synthesis, thereby attempting to contribute in the search for viable biotechnological processes for the synthesis of natural cheese flavor, a product that participates in the formulation of many food products. For this, the lipase production by the fungus in submerged fermentation was studied, using ten different culture media, in the presence and absence of olive oil. The extracts obtained were investigated for lipase and protease activities and for the biomass quantification. The media called H+oil induced the highest lipolytic activity at 96 h (7,5 U/mL) and was therefore selected for use in industrial bench scale process. The enzyme production was performed by *Penicillium roqueforti* in the H+oil media, which was called crude enzyme extract, and showed lipolytic activity of 10,97 U/mL and specific activity of 2184,07 U/mg. The proteolytic activity of this extract was 166,30 U/mL and its electrophoretic profile showed seven protein bands of molecular weights ranging from 122,2 kDa to 11,9 kDa. After the determination of enzymes activities, this crude enzyme extract was applied in the industry through a full factorial design evaluating the effects of temperature, reaction time and pH on the intensification of taste and smell of cheese, which was determined by sensorial analysis using Multiple Comparison Test, defining as standart flavor the one produced by the company's conditions process. The same factorial design was applied to evaluate a commercial enzyme on this process. The enzyme crude extract applied at a temperature of 50 °C, reaction time of 24 h and pH 5,0 led to the synthesis of a more intense cheese flavor, which was also the preferred when evaluated along with the company's standard flavor and the more intense flavor resulting from the factorial design using the commercial enzyme by a sensorial Preference Test. These results demonstrate the potential of this enzyme extract in obtaining a natural cheese flavor.

Keywords: Lipase. *Penicillium roqueforti*. Natural flavor. Cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do catabolismo microbiano de amino ácidos durante maturação do queijo. Adaptado de HEMME et al., 1982	30
Figura 2 - Catabolismo de ácidos graxos livres. Fonte: MOLIMARD; SPINNLER, 1996.	33
Figura 3 - Fluxograma de fabricação de EMC. Adaptado de KILCAWLEY, 1998.....	37
Figura 4 - Ação catalítica das lipases. Fonte: JAEGER; REETZ, 1998	43
Figura 5 - Esquema da hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Adaptado de HARALDSSON, 1991	43
Figura 6 - Diferentes reações catalisadas por lipase. Adaptado de HOUDE et al., 2004.....	44
Figura 7 - Micrografia eletrônica de ramificações em <i>Penicillium</i> . (A) <i>P. glabrum</i> (<i>Monoverticillata</i>); (B) <i>P. citrinum</i> (<i>Biverticillata</i> , Assimétrica); (C) <i>P. funiculosum</i> (<i>Biverticillata</i> , Simétrica); (D) <i>P. Cyclopium</i> (<i>Terverticillata</i>). Escala em bar: 4 µm (A,C); 10 µm (B,D). Fonte: PEBERDY, 1987.	51
Figura 8 - (a) Esporos de <i>Penicillium roqueforti</i> ; Microfotografia ampliada 1000x. (b) Crescimento de <i>P. roqueforti</i> em meio batata dextrose ágar após 7 dias de incubação a 28°C.	52
Figura 9 - Representação esquemática da cadeia de percepção sensorial. Fonte: MEILGAARD et al., 1999.....	55
Figura 10 - Ficha de avaliação utilizada na análise sensorial dos aromas de queijo para o atributo aroma	73
Figura 11 - Ficha de avaliação utilizada na análise sensorial dos aromas para o teste de ordenação-preferência.....	74
Figura 12 - Massa celular de <i>Penicillium roqueforti</i> nos diferentes meios, expressa em massa seca de micélio, após 144 h de cultivo.....	75
Figura 13 - Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio A e A+óleo; (b) Meio B e B+óleo; (c) Meio C e C+óleo; (d) Meio D e D+óleo; (e) Meio E e E+óleo; (f) Meio F e F+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.....	79
Figura 14 - Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio G e G+óleo; (b) Meio H e H+óleo; (c) Meio I e I+óleo; (d) Meio J e J+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras	80

Figura 15 - Cinética da produção de protease nos diferentes meios. (a) Meio A e A+óleo; (b) Meio B e B+óleo; (c) Meio C e C+óleo; (d) Meio D e D+óleo; (e) Meio E e E+óleo; (f) Meio F e F+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.....84

Figura 16 - Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio G e G+óleo; (b) Meio H e H+óleo; (c) Meio I e I+óleo; (d) Meio J e J+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras85

Figura 17 - Cinética de produção de lipase e protease por *Penicillium roqueforti* em cultivo submerso em meio denominado H + óleo.....88

Figura 18 - SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 12,5% corado com nitrato de prata. P – Padrões kDa (Fosforilase, Albumina bovina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de Tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 2 – Extrato Enzimático Bruto.89

Figura 19 - SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 12,5% corado com azul de Coomassie. P – Padrões kDa (Fosforilase, Albumina bovina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de Tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 2 – Enzima comercial Lipomod 187P.....91

Figura 20 - Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Odor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p>0,05$); letra “b” indica diferença ($p>0,05$); Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.....93

Figura 21 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de odor utilizando as médias das respostas dos provadores – Extrato Enzimático Bruto..94

Figura 22 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)95

Figura 23 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)96

Figura 24 - Superfície de resposta dos efeitos de temperatura e tempo para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).....96

Figura 25 – Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Sabor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p>0,05$); letra “b” indica diferença ($p>0,05$). Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.....97

Figura 26 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de sabor utilizando as médias das respostas dos provadores – Extrato Enzimático Bruto.....	98
Figura 27 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	99
Figura 28 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	99
Figura 29 - Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	100
Figura 30 - Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Odor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p>0,05$); letra “b” indica diferença ($p>0,05$). Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras	101
Figura 31 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de odor utilizando as médias das respostas dos provadores – Enzima Comercial	102
Figura 32 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	103
Figura 33 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	103
Figura 34 - Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto à intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)	104
Figura 35 - Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Sabor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do Padrão pelo teste de Dunnett ($p>0,05$); letra “b” indica diferença ($p>0,05$); Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.	105

Figura 36 - Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de sabor utilizando as médias das respostas dos provadores – Enzima Comercial.106

Figura 37 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P)107

Figura 38 - Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).107

Figura 39 - Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns compostos aromáticos identificados em queijo parmesão. Adaptado de MEINHART; SCHREIER, 1986.....	34
Tabela 2 - Características de alguns compostos associados ao aroma de queijo. Adaptado de ARCTANDER, 1969.	35
Tabela 3 - Classificação dos queijos quanto aos processos de fabricação. Fonte: ABIQ, 2010.	39
Tabela 4 - Composição percentual do queijo mussarela e parmesão. Fonte: USDA, 2010	40
Tabela 5 - Composição média em gramas de ácidos graxos em queijos mussarela e parmesão. Fonte: USDA, 2010.....	40
Tabela 6 - Mercado Brasileiro de Aromas e Fragrâncias em 2008. Adaptado de LEFFINGWELL AND ASSOCIATES, 2010.....	41
Tabela 7 - Mercado Mundial de Aromas e Fragrâncias em 2009 – Estimativa do Volume de Vendas em Milhões de Dólares. Adaptado de LEFFINGWELL AND ASSOCIATES, 2010.	42
Tabela 8 - Possibilidades de uso, em escala industrial, das lipases em diferentes áreas Fonte: VULFSON, 1994; CASTRO; ANDERSEN, 1995..	48
Tabela 9 - Algumas lipases comerciais disponíveis e suas aplicações industriais. Fonte: HOUDE et al.,2004.....	50
Tabela 10 - Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador	67
Tabela 11 - Reagentes utilizados na preparação do gel separador.	67
Tabela 12 - Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.....	68
Tabela 13 - Marcadores de baixa massa molecular.	70
Tabela 14 - Valores reais e os níveis dos fatores estudados para o planejamento fatorial completo (2 ³) com 4 pontos centrais.....	71
Tabela 15 - Planejamento fatorial completo (2 ³) com 4 pontos centrais	71
Tabela 16 - Comparação do efeito da utilização de óleo de oliva sobre a atividade lipolítica nos diferentes meios. Os valores de F inferiores a 0,05 apresentam diferença significativa....	77
Tabela 17 - ANOVA dos picos de atividade lipolítica dos diferentes meios de cultivo avaliados	81

Tabela 18 - Média dos picos de atividade lipolítica e seus respectivos desvios padrão dos diferentes meios de cultivo	81
Tabela 19 - Comparação do efeito da utilização de óleo de oliva sobre a atividade proteolítica nos diferentes meios. Os valores de F inferiores a 0,05 apresentam diferença significativa.....	83
Tabela 20 - Variação do pH inicial e pH final após 144 h de fermentação nos diferentes meios	86
Tabela 21 - ANOVA dos picos de atividade proteolítica dos diferentes meios de cultivo avaliados.....	86
Tabela 22 - Média dos picos de atividade proteolítica e seus respectivos desvios padrão dos diferentes meios de cultivo	87
Tabela 23 - Caracterização enzimática do extrato enzimático bruto	88
Tabela 24 - Caracterização enzimática da enzima comercial	90
Tabela 25 - Atividades lipolítica e proteolítica das enzimas utilizadas no processo industrial.....	92
Tabela 26 - ANOVA de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Odor	93
Tabela 27 - ANOVA de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Sabor.	97
Tabela 28 - ANOVA de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Odor.....	101
Tabela 39 - ANOVA de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Sabor.	104
Tabela 30 - Médias de odor e sabor obtidas para amostras obtidas quando utilizado o extrato enzimático bruto e a enzima comercial.....	109
Tabela 31 - Resultado do Teste de ordenação-preferência	110

LISTA DE SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Da	Dalton
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EMC	Enzyme Modified Cheese
EC	Enzyme Comission
FAO	Food and Agriculture Organization
GRAS	Generally Recognized as Safe
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	Patato Dextrose Agar
SDS	Dodecil sulfato de sódio
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Aromas e Biotecnologia de Alimentos	27
2.1.1 Aroma de Queijo.....	29
2.1.2 Queijo Enzimaticamente Modificado (<i>EMC</i>)	36
2.1.3 Queijo – Substrato para obtenção de <i>EMC</i>	38
2.1.4 Mercado de Aromas.....	41
2.2 Lipases – Aspectos Gerais	43
2.2.1 Fonte e Propriedades.....	45
2.2.2 Especificidade das Lipases	46
2.2.3 Purificação das Lipases.....	46
2.2.4 Aplicações e Mercado de Lipases.....	47
2.3 O fungo <i>Penicillium roqueforti</i>	51
2.4 Avaliação Sensorial em Alimentos.....	54
3 OBJETIVOS	59
3.1 Geral.....	59
3.2 Específicos	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1 Produção da Lipase em Cultivo Submerso	61
4.1.1 Cultivo e Manutenção de Cultura	61
4.1.2 Preparo do Inóculo.....	61
4.1.3 Preparo dos Meios	62
4.1.4 Determinação da Atividade Lipolítica.....	64
4.1.5 Determinação da Atividade Proteolítica	65

4.1.6 Quantificação da Biomassa.....	66
4.2 Seleção do Meio de Cultivo para Síntese da Enzima.....	66
4.2.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	66
4.2.1.1 Preparo dos géis	67
4.2.1.2 Preparo das amostras.....	67
4.2.1.3 Preparo do tampão da amostra	68
4.2.1.4 Coloração com azul de Coomassies.....	68
4.2.1.5 Coloração com Nitrato de Prata	68
4.2.2 Dosagem de Proteína	69
4.2.3 Determinação da Massa Molecular das Proteínas.....	70
4.3 Avaliação da Enzima Comercial.....	70
4.4 Aprimoramento do Processo Industrial.....	70
4.4.1 Planejamento Experimental	71
4.4.2 Análise Sensorial.....	72
4.4.2.1 Teste de Comparação Múltipla	72
4.4.2.2 Teste de Ordenação-Preferência	74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Produção de Lipase em Cultivo Submerso	75
5.1.1 Determinação da Atividade Lipolítica	75
5.1.2 Determinação da Atividade Proteolítica	76
5.1.3 Quantificação da Biomassa.....	82
5.2 Seleção do Meio de Cultivo para Síntese da Enzima.....	87
5.3 Caracterização Enzimática da Enzima Comercial	90
5.4 Aprimoramento do Processo Industrial.....	91
5.4.1 Planejamento Experimental	91

5.4.2 Análise Sensorial	92
5.4.2.1 Teste de Comparação Múltipla	92
5.4.2.1.1 Processo utilizando o Extrato Enzimático Bruto	93
5.4.2.1.2 Processo utilizando a Enzima Comercial.....	100
5.4.2.2 Teste de Preferência.....	109
6 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma crescente busca por um estilo de vida saudável, o que inclui principalmente uma alimentação baseada em produtos que não comprometam a saúde ou, preferencialmente, promovam benefícios à saúde. Com isso, surge uma maior demanda dos consumidores por alimentos e ingredientes naturais, recebendo especial atenção os aditivos naturais. Isso faz com que cresça o interesse em novas formas de síntese de um dos principais aditivos utilizados na indústria alimentícia, os aromas.

Avanços recentes na biotecnologia de plantas e de fungos, na tecnologia enzimática, na engenharia genética, no monitoramento de bioprocessos e nas técnicas de recuperação de produtos proporcionaram novas oportunidades em potencial para produção biotecnológica de aromas (CHIAPPINI, 2008), os quais podem ser classificados como aromas naturais de acordo com a legislação vigente no país. Neste contexto, a produção biotecnológica de aromas utilizando microrganismos merece atenção devido à grande variedade de espécies na natureza que podem ser avaliadas, ao curto tempo de geração, a reprodutibilidade na produção, ao reduzido impacto ambiental, à diversidade de processos metabólicos e, principalmente, a grande diversidade de enzimas envolvidas.

Dentre essas enzimas, as lipases apresentam grande interesse no setor biotecnológico, pois catalisam diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacylglycerol acyl hydrolases, E.C.3.1.1.) e atuam sobre a ligação éster de acilgliceróis, dando origem a ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (plasma sanguíneo, saliva, suco pancreático, leite), vegetais (plantas oleaginosas como soja, amendoim e mamona) e microbianas (bactérias, leveduras e fungos) (JAEGER; REETZ, 1998), sendo estas as mais utilizadas industrialmente, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. Destacam-se neste grupo os fungos, que são largamente utilizados devido a grande maioria das enzimas por eles produzidas ser extracelular, o que facilita a sua recuperação do meio de cultivo e também porque a maioria dos fungos são geralmente reconhecidos como seguros (*GRAS* – *Generally Recognized as Safe*), sendo portanto, inócuo à saúde humana.

Uma importante aplicação das lipases nas indústrias de aromas é na produção de queijos enzimaticamente modificados (*EMC – Enzyme Modified Cheese*), que são queijos que têm seu aroma intensificado pela ação de enzimas, principalmente enzimas lipolíticas e proteolíticas. O aroma de queijo é importante na composição de muitos produtos salgados e petiscos; no entanto os níveis adequados de aroma nesses produtos muitas vezes não são alcançados utilizando queijos *in natura*, sendo necessário o emprego de tecnologia enzimática. As lipases são extensivamente utilizadas para intensificação de aromas em queijos enzimaticamente modificados devido à formação de ácidos graxos proveniente da hidrólise da gordura do leite, principalmente ácidos orgânicos de cadeia curta, que são componentes chaves na formação de aroma de queijo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aromas e Biotecnologia de Alimentos

A indústria de aromas tem um extenso número de compostos aromatizantes disponíveis para o desenvolvimento de aromas, presentes em muitos organismos vivos, como flores, frutas e animais (FENAROLI, 1995). Tradicionalmente, a obtenção de aromas e fragrâncias era realizada através do isolamento de fontes naturais, como óleos essenciais de plantas, ou através de síntese orgânica, produzindo aromas classificados como artificiais.

Recentemente, aromas artificiais tendem a ser utilizados quando não há um material aromatizante natural para síntese, como por exemplo, em algumas tendência do aroma (chamadas de *notas*) de carne e alguns componentes de aromas de frutas, ou quando o produto é de baixo custo e não irá comportar gastos adicionais com aromas naturais. Assim, o mercado para aromas químicos artificiais tem diminuído ao longo do tempo (REINECCIUS, 2006).

Além disso, nas últimas décadas, existe uma demanda dos consumidores por aditivos naturais. Não há distinção química entre um aroma sintetizado pela natureza ou o mesmo composto orgânico sintético. Porém, a ideia de que qualquer substância natural é benéfica e que as sintéticas são prejudiciais ainda é comum entre os consumidores (LUGAY, 1986), apesar de ilógica.

Devido à essa preferência dos consumidores por aditivos naturais nos alimentos, a demanda por aromas naturais excede a quantidade de aromas produzida pelas plantas superiores. Além disso, essa quantidade é altamente dependente de fatores de difícil controle tais como influência do clima, pragas e flutuação da qualidade (KRINGS et al., 1995).

A produção de aromas naturais estimulou as indústrias à utilização de enzimas ou microrganismos para a produção destes produtos orgânicos sintéticos (CHEETHAM, 1997). Neste contexto, a biotecnologia representa uma alternativa promissora (KRINGS et al., 1995).

As três principais técnicas de biotransformação podem ser distinguidas da seguinte forma: (1) uso de enzimas, (2) uso de microrganismos, e (3) uso de células vegetais e cultura de tecidos. A técnica de biotransformação mais utilizada é a aplicação de enzimas (BERGER et al., 1999).

Dentre o grande número de reações catalisadas por enzimas, há aquelas que envolvem a modificação de substratos levando à síntese de aromas. Gordura de leite lipolisada foi um dos primeiros aromas produto de fermentação a serem produzidos em larga escala. A gordura do leite foi submetida a uma hidrólise enzimática controlada utilizando lipase. A importância dos ácidos graxos livres nos aromas característicos de vários laticínios é um fato não contestado, e ácidos graxos diferentes apresentam características de aroma consideravelmente distintas (LEE, 1996).

A biotransformação apresenta algumas vantagens que certamente levarão a um aumento da importância comercial da síntese de aromas por esse processo, como: produção de aromas naturais, obtenção de produtos uniformes com uma produtividade constante, métodos de processo compatíveis com a atual preocupação ambiental, produção de aromas naturais que não são encontrados em quantidades apreciáveis na natureza, alta especificidade, velocidade e seletividade nas reações (BERGER et al., 1999).

Esta última vantagem citada pode ser explicada pelo fato da estrutura de um aroma influenciar fortemente suas propriedades sensoriais. Um grande número de aromas e fragrâncias são quirais e, muitas vezes os enantiômeros têm diferentes propriedades sensoriais (BOELEN et al., 1993). As enzimas não são apenas regio-, mas também altamente estereosseletiva e são, portanto, catalisadores por excelência no preparo de enantiômeros puros em aromas e fragrâncias (FRANSSEN et al., 2005), enquanto métodos químicos geralmente levam a formação de misturas de isômeros (BERGER et al., 1999).

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos orgânicos, biologicamente ativos, apresentando estruturas complexas de vários grupos funcionais como alcoóis, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos e outras moléculas complexas (MARQUES, 1998).

Várias substâncias foram identificadas como associadas a aromas específicos: 2-isobutiltiazol com aroma de tomate, cinamatos de metila e etila com aroma de morango,

antranilato de metila com aroma de uva, benzaldeído com aroma de cereja (ARMSTRONG et al., 1989).

A legislação norte-americana e europeia referem-se aos compostos de aroma naturais àqueles obtidos por processos físicos (extração de suas fontes naturais) ou por processos enzimáticos e microbianos que envolvem precursores isolados na natureza, sendo que o composto obtido deve ser existente na natureza para que a substância seja legalmente rotulada como “natural” (SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

No Brasil, segundo a Resolução nº 2 de 15 de janeiro de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aromatizantes/aromas naturais são obtidos exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias primas aromatizantes naturais. Entende-se por matérias primas aromatizantes naturais, os produtos de origem animal ou vegetal aceitáveis para consumo humano, que contenham substâncias odoríferas e/ou sápidas, seja em seu estado natural ou após um tratamento adequado, como: torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento, tratamentos enzimático ou outros. Os aromatizantes naturais compreendem: óleos essenciais, extratos, bálsamos, oleoresinas e oleogomaresinas, e substâncias aromatizantes naturais isoladas (ANVISA, 2007).

A fermentação é um processo útil para os propósitos deste trabalho, pois fornece uma variedade grande de aroma, além de outros produtos. Alguns produtos de fermentação incluem queijos, iogurtes, cerveja e vinho. O aroma desses produtos pode ser resultado do metabolismo primário de microrganismos da fermentação ou da atividade enzimática residual. O metabolismo primário é responsável principalmente pelo aroma em bebidas alcoólicas, enquanto a atividade enzimática residual é essencial para o desenvolvimento de aroma de queijos maturados (REINECCIUS, 2006).

2.1.1 Aroma de Queijo

A formulação do aroma de queijo inclui compostos como alcoóis, aldeídos, ésteres, ácidos orgânicos de cadeias médias e curtas, metilcetonas, lactonas, compostos fenólicos e compostos sulfurados (URBACH, 1997). Os compostos envolvidos no aroma e no sabor de

vários queijos são derivados de três grandes vias metabólicas: o catabolismo de proteínas, de lactose e de lipídios (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

A maturação do queijo é caracterizada por uma série de mudanças físicas, químicas e microbiológicas que afetam os principais componentes do queijo. As mudanças que envolvem lipídeos e proteínas são as mais características e significativas (FERNANDEZ-SALGUEIRO et al., 1988). A lipólise e a proteólise contribuem na síntese desses compostos e a extensão desses processos varia de acordo com a variedade do queijo (FOX, 1993). Diferente de muitos alimentos processados onde a estabilidade é um critério chave, a obtenção do queijo é um processo dinâmico e sofre diferentes mudanças durante a maturação.

A proteólise é provavelmente o mais importante evento bioquímico durante a maturação da maioria das variedades de queijo. A degradação de proteínas forma aminoácidos, peptídeos e compostos sulfurados. É responsável pelo desenvolvimento da textura desejada e tem uma contribuição direta para a intensidade de aroma (FOX et al. 1993; FOX et al. 1996). A figura 1 apresenta o esquema de proteólise realizada por enzimas produzidas por microrganismo durante a maturação de queijo.

Figura 1 – Esquema do catabolismo microbiano de amino ácidos durante maturação do queijo. Adaptado de HEMME et al., 1982.

A degradação dos aminoácidos liberada por proteólise representa um fenômeno bioquímico importante na maturação de queijos, em especial na formação de sabor e aroma (CHOISY et al., 1984). No esquema geral do catabolismo microbiano de aminoácidos, HEMME et al. (1982) distingui três níveis de reação (Figura 1). A primeira diz respeito à ação de descarboxilases, transaminase, desaminases e enzimas degradativas das cadeias laterais; esta é notadamente a origem da formação de aminas e α -cetonas. Estes por sua vez, no segundo nível de reação, podem ser transformados em aldeídos sob a ação da desaminases ou descarboxilases. No terceiro nível, aldeídos podem ser reduzidos em alcoóis pelas redutases ou transformados em ácidos pelas oxidases.

A composição de aminoácidos livres de queijo é a tradução de um conjunto complexo de reações, especialmente a hidrólise de proteína de queijo. As quantidades relativas dos aminoácidos podem mudar significativamente como resultado de alterações ou degradação enzimática, a excreções ou lise microbiana. Daqui resulta que cada tipo de queijo é caracterizado por um perfil de aminoácidos próprio (DO NGOC et al., 1971).

A lipólise em queijo ocorre devido à presença de enzimas lipolíticas, que são hidrolases que clivam a ligação éster entre um ácido graxo e glicerol do triacilglicerídeo, produzindo ácidos graxos livres, e mono e diacilglicerídeos (DEETH; TOUCH, 2000). O grau de contribuição da lipólise ao aroma do queijo varia consideravelmente entre as variedades (FOX, 1993). A lipólise é um importante evento bioquímico que ocorre durante a maturação de queijo e tem sido estudado extensivamente em variedades como em queijos azuis e queijos duros italianos, onde a lipólise atinge altos níveis e é uma importante via para a geração de aroma e sabor. Ácidos graxos livres são importantes precursores de reações catabólicas que produzem compostos voláteis e contribuem para o aroma e sabor, no entanto, essas reações catabólicas não são bem compreendidos (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

Os ácidos de cadeia curta, por serem voláteis, estão entre os mais importantes grupos de compostos contribuintes para o aroma de produtos lácteos, especialmente queijos. Ácidos graxos livres são considerados compostos-chaves que contribuem fortemente nas características do aroma de queijos italianos maturados (HA; LINDSAY, 1993). A hidrólise dos triglicerídeos, com liberação de ácidos graxos, é o resultado de uma ação enzimática, que pode aparecer em todos os produtos lácteos e é denominada lipólise. Ácidos de cadeia longa (com cadeia de 14 a 18 carbonos) não contribuem intrinsicamente

para o sabor do queijo; no entanto, ácidos de cadeia curta (C4:0 – C8:0) e de cadeia média (C10:0 – C12:0) conferem notas de sabor característico nos queijos (COLLINS et al., 2003; MOLIMARD; SPINNLER, 1996). Sendo a gordura o substrato para variadas reações bioquímicas que levam à formação de aromas e sabor no queijo, grande importância é dada aos agentes responsáveis pela sua hidrólise durante a maturação (FURTADO; CHANDAN, 1983).

Lipídios presentes nos alimentos podem sofrer degradação oxidativa ou hidrolítica (McSWEENEY; SOUSA, 2000). Os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente propensos à oxidação, que leva à formação de vários aldeídos insaturados, que têm forte aroma e resultam em defeito de sabor conhecido como ranço oxidativo (FOX et al., 1998). A oxidação lipídica não ocorre de forma significativa no queijo (FOX et al., 1998; McSWEENEY; SOUSA, 2000); a sua contribuição para o desenvolvimento do sabor do queijo é considerado de pouca importância. No entanto, a hidrólise enzimática de triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol, mono-ou diacilglicerídeos (lipólise) é essencial para o desenvolvimento do sabor em algumas variedades de queijo (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

Portanto, em queijo, ácidos graxos liberados como resultado da lipólise, especialmente ácidos de cadeia curta e média contribuem diretamente para o aroma do queijo. Ácidos graxos também atuam como moléculas precursoras de uma série de reações catabólicas que levam à produção de compostos de sabor e aroma, tais como metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos e alcoóis secundários (McSWEENEY; SOUSA, 2000). Vias de catabolismo de ácidos graxos são apresentadas na figura 2.

Figura 2 – Catabolismo de ácidos graxos livres. Fonte: MOLIMARD; SPINNLER, 1996.

As cetonas são consideradas compostos importantes no perfil de voláteis em queijo parmesão, principalmente metilcetonas de C3 a C15 (predominando 2-pentanona, heptanona e 2-nonanona), diacetil e acetoína (BARBIERI et al, 1994; QIAN; REINECCIUS, 2002a). A maioria desses compostos está associada com notas de manteiga, fruta, floral e mofo (QIAN; REINECCIUS, 2002a; QIAN; REINECCIUS, 2002b).

Metilcetonas derivam de lipídeos por meio de uma degradação microbiana via β -oxidação (BARBIERI et al, 1994; McSWEENEY; SOUSA, 2000), devido à ação das lipases, por exemplo, de *Penicillium roqueforti* (URBACH, 1997).

Ésteres e tioésteres são outros produtos do catabolismo de ácidos graxos, e são componentes comuns de compostos voláteis do queijo (URBACH, 1997). Uma grande diversidade de ésteres está presente em queijos (MOLIMARD; SPINNLER, 1996). Os ésteres são altamente aromatizado e são formados quando ácidos graxos reagem com alcoóis. Reações de esterificação, resultando na produção de ésteres ocorrem entre ácidos graxos de cadeia curta ou média e os álcoois provenientes de fermentação da lactose ou a partir do catabolismo de aminoácidos. Ésteres de etila, metila, propila e butila de ácidos graxos de C2:0 a C10:0 têm sido relatados em diversas variedades de queijo (MEINHART;

SCHREIER, 1986). Tioésteres são formados quando ácidos graxos livres reagem com grupos sulfídricos (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

Alcoóis secundários podem ser formados em queijos pela redução enzimática de metilcetonas (ENGELS et al., 1997).

Lactonas são compostos cíclicos formado por esterificação intramolecular de hidróxi ácidos graxos (CHRISTIE, 1983), através da perda de água, e a formação resultante de uma estrutura cíclica (MOLIMARD; SPINNLER, 1996). Os aldeídos são formados a partir de aminoácidos por transaminação. No entanto, alguns aldeídos de cadeia curta insaturada, como butanal, heptanal e nonanal podem ser formados como resultado da β -oxidação de ácidos graxos insaturados. Queijo parmesão tem altos níveis de lipólise e contém altas concentrações de aldeídos de cadeia insaturada (MOIO et al., 1993).

Centenas de compostos influenciam no aroma de queijo; alguns deles foram identificados em queijo parmesão e estão listados na Tabela 1 e alguns descritos na Tabela 2.

Tabela 1 – Alguns compostos aromáticos identificados em queijo parmesão. Adaptado de MEINHART; SCHREIER, 1986.

benzotiazole	2-butanona	ácido tetradecanóico
tolueno	2-heptanona	ácido hexadecanóico
1-butanol	2-nonanona	formiato de butila
álcool isoamílico	2-undecanona	acetato de etila
2-pentanol	ácido etanóico	acetato de butila
1-hexanol	ácido propanóico	acetato de isopentila
2-heptanol	ácido butanóico	benzoato de etila
α -terpineol	ácido hexanóico	piruvato de etila
acetaldeído	ácido octanóico	butirato de etila
valeraldeído	ácido decanóico	butanoato de butila
caproaldeído	ácido dodecanóico	3-metil butanoato de etila
ácido 5-hidroxi octanóico lactona	ácido 9-octadecenóico	octanoato de etila
2,6-dimetil pirazina	lactona	decanoato de etila
2,3-dietil-5-metilpirazina	éter dietílico	dodecanoato de etila
benzotiazole	guaiacol	furfural

Tabela 2: Características de alguns compostos associados ao aroma de queijo. Adaptado de ARCTANDER, 1969.

Composto	Solubilidade	Odor	Produção
Ácido Butanóico	Água, propilenoglicol, glicerina, álcool e óleo	Amargo, lambrando manteiga rançosa	Obtido por processo controlado de fermentação seletiva de carboidrato
Butirato de Etila	Pouco solúvel em água, miscível em álcool e óleo	Frutas	Produzido pela esterificação do etanol com ácido n-bútrico sob condições azeotrópicas
Ácido Cáprico	Álcool e óleo	Desagradável, rançoso	Produzido por oxidação do decanol
Ácido Caprílico	Solúvel em água quente e miscível em óleo e álcool	Desagradável, rançoso	Isolado de ácido graxo do coco por esterificação

Ácidos de cadeia longa (> 12 átomos de carbono) são considerados a desempenhar um papel menor no sabor do queijo, devido ao seu alto limiar de percepção (MOLIMARD; SPINNLER, 1996). Ácidos de cadeia curta e média (C4:0-C12:0) têm consideravelmente menores limiares de percepção e cada um dá uma nota de sabor característico. Ácido butanóico contribui com sabores de "ranço" e "*cheesy*". O ácido hexanóico tem uma nota "pungente", "de queijo azul", e o ácido octanóico tem uma nota de "cera", "sabão", "cabra", "mofo", "ranço" e "frutado". Ácidos graxos livres são importantes contribuintes para o sabor de variedades duras italianas, como romano, parmesão e provolone (ASTON; DULLEY, 1982).

Queijo mussarela tem uma baixa concentração de ácidos graxos livres, o que está associado ao seu sabor suave (WOO; KOLLODGE; LINDSAY, 1984).

Metilcetonas, são responsáveis pelo sabor único de queijo azul, em especial, 2-heptanona e 2-nonanona (JOLLY; KOSIKOWSKI, 1975). Os ácidos graxos e alcoóis secundários também são importantes componentes do sabor (KING; CLEGG, 1979).

As lactonas, embora seus aromas não sejam parecidos com queijo, elas podem contribuir para o sabor do queijo (FOX et al., 2000) e tem sido relatadas por contribuir com uma nota amanteigada ao queijo (DIRINCK; de WINNE, 1999).

Tem sido relatado que os ésteres são importantes contribuintes para o sabor do queijo Parmigiano-Reggiano (MEINHART; SCHREIER, 1986). Em um levantamento de diferentes variedades de queijo, Engels et al. (1997), em um estudo comparativo dos

compostos voláteis da fração solúvel em água de vários tipos de queijo maturado encontraram concentrações elevadas de butanoato de etila em queijos com nota frutada, como o parmesão e o *gruyere*. Em particular, butanoato de etila e hexanoato de etila são considerados compostos aromáticos chave (QIAN; REINECCIUS, 2002a; QIAN; REINECCIUS, 2002b).

Os alcoóis primários são considerados correspondentes de aldeídos produzidos a partir do metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (BARBIERI et al., 1994; McSWEENEY; SOUSA, 2000) e alcoóis secundários formados por redução enzimática de metilcetonas (COLLINS et al., 2003). 2-Propanol, 2-butanol, 2-octanol e nonanol são encontrados na maioria dos queijos de pasta mole e são componentes típicos no sabor dos queijos azuis.

Os aromas de queijo são muito importantes em alimentos salgados e petiscos. Em algumas instâncias, um nível adequado de aroma pode ser alcançado pela cuidadosa seleção e uso de queijos naturais, mas em muitas circunstâncias a porcentagem necessária para alcançar o aroma adequado não é tecnicamente aceitável. Em alguns produtos, são exigidos aromas de queijos mais intensos, e a indústria tem produzido isso pela aplicação de tecnologia de enzimas (REINECCIUS, 2006).

2.1.2 Queijo Enzimaticamente Modificado (EMC)

Queijo enzimaticamente modificado (*EMC – Enzyme-Modified Cheese*) são queijos tratados com enzimas com o intuito de intensificar seu aroma (MOSKOWITZ; NOELCK, 1987). Queijo enzimaticamente modificado tipo cheddar, suíço, romano, mussarela, provolone, feta, parmesão, gouda, *gruyère*, colby, e brick estão disponíveis comercialmente (KILCAWLEY, 1998). Esses queijos são utilizados como ingredientes em molhos, sopas, snacks e outros (WOOLLEY; PETERSEN, 1994) e fornecem a esses produtos uma nota forte de queijo de forma rentável e natural (MOSKOWITZ; NOELCK, 1987).

Para a produção de queijo enzimaticamente modificado é necessária a escolha de enzimas apropriadas e sua aplicação sob condições ótimas de temperatura. A maioria das pesquisas nesta área tem sido sobre as lipases. A escolha da lipase é crítica porque cada

lipase tem uma especificidade para hidrólise, determinando assim o perfil de ácidos graxos livres em *EMC* (KILCAWLEY, 1998).

As lipases mais utilizadas são de origem microbiana. A maioria das lipases microbianas apresenta especificidade pela posição 1 ou 3 do triglicerídeo, onde os ácidos de cadeia curta são encontrados, que caracterizam os queijos naturais (KILCAWLEY, 1998).

Com base nos resultados de um estudo sobre a contribuição da lipólise em alguns tipos de queijo enzimaticamente modificado (*EMC*), Moskowitz e Noelck (1987) concluíram que, o perfil ou intensidade do aroma foi proporcional ao grau de lipólise e liberação de ácidos de baixa massa molecular.

Enquanto as lipases apresentam papel principal na determinação do aroma de muitos queijos, a atividade proteolítica é importante para contribuição do aroma em queijos duros, como o cheddar, segundo a classificação da literatura (KILCAWLEY, 1998).

Queijo enzimaticamente modificado é geralmente feito a partir de pasta de queijos feita a partir de queijos do mesmo tipo. A pasta de queijo contendo a enzima é incubada, o tempo e temperatura de incubação influenciam na ação da enzima e devem ser cuidadosamente controlados. Após esse período de incubação, a enzima deve ser inativada para parar a reação e garantir a estabilidade do aroma (Figura 3) (KILCAWLEY, 1998).

Figura 3: Fluxograma de fabricação de *EMC*. Adaptado de KILCAWLEY, 1998.

O uso de queijo enzimaticamente modificado pode resultar em economia nos custos de matéria-prima, na formulação de alguns produtos uma economia superior a 50% da quantidade de queijo natural pode ser alcançada substituindo por uma pequena quantidade de queijo enzimaticamente modificado (KILCAWLEY, 1998).

2.1.3 Queijo – Substrato para obtenção de EMC

O queijo é um derivado do leite, obtido por meio da coagulação enzimática seguido da dessoragem do coágulo (RIBEIRO, 2001). No mundo existem mais de 100 tipos de queijo. A tecnologia de fabricação e os coalhos utilizados é que fazem a diferença de um queijo para outro. O queijo gorgonzola, por exemplo, é de origem italiana e caracteriza-se por maturação com *Penicillium roqueforti*, que confere aos queijos seus sulcos azulados. Por isso, faz parte da família dos queijos azuis, como também o queijo roquefort, de origem francesa e o queijo stilton, um queijo de origem inglesa (ABIQ, 2010).

Os principais ácidos encontrados na gordura do leite são butanóico (C4:0), hexanóico (C6:0), octanóico (C8:0), decanóico (C10:0), dodecanóico (C12:0), tetradecanóico (C14:0), hexadecanóico (C16:0), octadecanóico (C18:0), cis-9-octadecenóico (C18: 1), cis 9,12-octadecadienóico (C18:2), e ácido 9,12,15-octadecatrienóico (C18:3) (JENSEN et al., 1991).

Os ácidos graxos mais abundantes são hexadecanóico e octadecanóico (BANKS, 1991). Algumas características notáveis dos perfis de ácidos graxos da gordura do leite bovino incluem o nível elevado de ácido butanóico e outros ácidos de cadeia curta, os baixos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e ao fato de que esses lipídios são ricos em ácidos de cadeia média (OBA; WILTHOLT, 1994). Os principais lipídios do leite são os triacilglicerídeos, que podem representar até 98% dos lipídios totais (CHRISTIE, 1983; JENSEN et al., 1991).

O processo de fabricação de queijo consiste em adicionar coalho, fermento ou ácido láctico ao leite pasteurizado para possibilitar a coagulação do leite. Após a coagulação, corta-se a coalhada para a separação do soro. Dependendo do tipo de massa cada queijo passa por um processo diferente de agitação e aquecimento da massa. A massa é então enformada em diferentes moldes e tamanhos que conferem ao queijo seu formato final.

Depois de enformados os queijos são prensados para expulsar o excedente de soro e passam pelo processo de salga. Após a salga, os queijos passam por processos de secagem em câmaras frias. Em seguida vão para câmaras de maturação, aonde permanecem em temperatura e teor de umidade adequados, até atingir o ponto ideal, que varia conforme cada queijo. A maturação é muito importante na definição da aparência, da textura e do sabor do queijo. Em seguida são embalados (ABIQ, 2010). A tabela 3 apresenta a classificação dos queijos quanto ao processo de fabricação.

Tabela 3: Classificação dos queijos quanto aos processos de fabricação. Fonte: ABIQ, 2010.

Tratamento da massa	Características da cura	Exemplos
Massa não cozida	sem cura	minas, frescal
	cura por <i>P. candidum</i>	camembert, brie
	cura por <i>P. roqueforti</i>	gorgonzola
Massa semi cozida	cura rápida	gouda
	cura prolongada	prato
Massa cozida	cura prolongada	parmesão, reino, gruyère
Massa filada	sem cura	mussarela
	com cura	provolone

O queijo mussarela tem origem italiana e antigamente só era fabricada a partir de leite de búfala. Hoje dada a sua grande aplicação culinária, é fabricada a partir de leite de vaca. É o queijo mais fabricado e consumido no Brasil. Sua massa é esbranquiçada, firme e filante. Seu sabor é ligeiramente ácido e salgado e seu derretimento é fácil (ABIQ, 2010).

O queijo parmesão também é de origem italiana. É um queijo de massa seca, sabor picante e textura granular. A massa é amarelo palha e seus sabor é picante. Em geral são maturados apenas por 6 meses embora hoje já se fabrique no Brasil queijo tipo grana, com 12 meses de maturação (ABIQ, 2010).

As composições dos queijos mussarela e parmesão estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Composição porcentual do queijo mussarela e parmesão. Fonte: USDA, 2010.

Nutriente	Mussarela	Parmesão
	Valor por 100 g	Valor por 100 g
Água	50,01	29,16
Proteína	22,17	35,75
Lipídeos	22,35	25,83
Cinzas	3,28	6,04
Carboidratos	2,19	3,22

Os lipídeos são biossintetizados a partir do metabolismo de várias espécies vivas. São substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, formadas predominantemente de produtos de condensação entre o glicerol e ácidos graxos, mais conhecidos como triglicerídeos (MORETO, 1998).

Os ácidos graxos têm uma estrutura R-COOH, onde R é geralmente uma cadeia de hidrocarbônica longa, saturada ou insaturada, com número par de átomos de carbono. Há alguns ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono (RAMPIM, 2007).

A tabela 5 apresenta a composição média dos ácidos graxos em queijo tipo mussarela e parmesão.

Tabela 5: Composição média em gramas de ácidos graxos em queijos mussarela e parmesão. Fonte: USDA, 2010.

Ácido graxo	Estrutura	Mussarela	Parmesão
Ácidos saturados		13,15	16,41
Butírico	C4:0	0,81	1,30
Capróico	C6:0	0,45	0,49
Caprílico	C8:0	0,26	0,26
Cáprico	C10:0	0,58	0,65
Láurico	C12:0	0,69	0,87
Mirístico	C14:0	2,19	2,91
Palmítico	C16:0	5,33	6,97
Esteárico	C18:0	2,44	2,30
Ácidos graxos monoinsaturados		6,57	7,52
Palmitoléico	C16:1	0,60	0,39
Oléico	C18:1	5,65	6,66
Ácidos graxos poliinsaturados		0,77	0,57
Linoléico	C18:2	0,39	0,27
Linolênico	C18:3	0,37	0,30

Tanto o queijo mussarela como o queijo parmesão apresentam como ácidos graxos principais o ácido palmítico, que apresenta 16 átomos de carbono, e o ácido oleico, que apresenta 18 átomos de carbono e 1 insaturação.

2.1.4 Mercado de Aromas

Para uma empresa produtora de aroma, manter seus projetos de desenvolvimento em sigilo é maneira de agregar valor ao negócio. Uma fórmula para criar um aroma pode envolver até 40 componentes e depende de precisa perícia dos aromistas. Porém, mesmo assim, os projetos são confidenciais e mantidos em segredo, como forma de garantir a exclusividade e proteger o produto (PACHIONE, 2004).

Com taxa de crescimento anual de 5%, a indústria nacional de aromas, segundo estimativa de seus representantes, movimentou US\$ 135 milhões em 2004. Esses números se sustentam em constantes investimentos tecnológicos e, sobretudo nas necessidades do cliente. Grande investidor em pesquisa e desenvolvimento, o mercado já identificou cerca de 7 mil aromas (PACHIONE, 2004). As Tabelas 6 e 7 mostram as indústrias que detêm as maiores fatias do mercado de aromas e fragrâncias no Brasil e no mundo, respectivamente.

Tabela 6 – Mercado Brasileiro de Aromas e Fragrâncias em 2008. Adaptado de LEFFINGWELL AND ASSOCIATES, 2010.

Posição	Companhia	Fatia do mercado %
1	Duas Rodas	22,00
2	Givaudan (compra da Quest)	18,80
3	Firminich (compra da Danisco)	11,50
4	IFF	11,40
5	Symrise (compra da HR)	8,60
6	Mane	3,10
Total das 6 maiores empresas		75,40
Demais companhias		24,60
Total de mercado		100

Tabela 7 – Mercado Mundial de Aromas e Fragrâncias em 2009 – Estimativa do Volume de Vendas em Milhões de Dólares. Adaptado de LEFFINGWELL AND ASSOCIATES, 2010.

Posição	Companhia	2009 US\$	Fatia do mercado %
1	Givaudan	3824,00	19,1
2	Firmenich	2729,50	13,6
3	IFF	2326,20	11,6
4	Symrise	1952,50	9,8
5	Takasago	1257,00	6,3
6	Sensient Flavors	548,70	2,7
7	Mane AS	539,30	2,7
8	T. Hasegawa	464,60	2,3
9	Robertet AS	437,40	2,2
10	Frutarom	425,20	2,1
Total das 10 maiores empresas		14504,40	72,4
Demais companhias		5495,60	27,6
Total do mercado mundial		20.000,00	100

O aroma não é uma *commodity* (produto obtido em larga escala a baixo custo) e sim *tailor-made* (feito sob medida). O aroma representa um elemento crítico no sucesso de outras indústrias alimentícias que o utilizam como insumo. O ingrediente responde pela principal característica de uma formulação: a identidade. Responsável pelas propriedades sensoriais de um gênero alimentício, o aroma, apesar de não possuir nenhuma qualidade nutritiva, tem papel essencial na aceitação do consumidor. Além disso, o ingrediente instiga as percepções sensoriais, sendo capaz de satisfazer os sentidos, proporcionar prazer e estimular sentimentos (PACHIONE, 2004).

No Brasil, o uso de aditivos foi regulamentado pelo decreto n° 55.871 de 23 de março de 1965 e atualizado pelo decreto n° 63.526 de 4 de março de 1968. A especificação e utilização dessas substâncias seguem as normas da *FAO (Food and Agriculture Organization)* e da *OMS (Organização Mundial da Saúde)*, sendo controladas, no Brasil, pela ANVISA (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2008).

Durante os últimos 35 anos os processos biotecnológicos se estabeleceram nas indústrias de aromas para produção de substâncias naturais (GATFIELD et al., 1995), produzindo um aroma natural, de melhor qualidade, prontamente disponível e a um custo viável permitindo sua comercialização (LUGAY, 1986).

2.2 Lipases – Aspectos Gerais

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam. Dessa forma as lipases, constituem um grupo específico de enzimas, classificadas internacionalmente pela Comissão de Enzimas como triacilglicerol acil hidrolases (E.C. 3.1.1.3), pois, compreendem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise reversível de triacilgliceróis na ligação éster-carboxílica, fornecendo glicerol e ácidos graxos livres (Figura 4) (SAXENA et al., 2003), sendo biocatalisadores versáteis capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito (JAEGER et al., 1994).

Figura 4: Ação catalítica das lipases. Fonte: JAEGER; REETZ, 1998.

Esta reação ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma que, num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis, conforme mostra a figura 5 (HARALDSSON, 1991).

Figura 5: Esquema da hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Adaptado de HARALDSSON, 1991.

Além de hidrolisar as ligações éster de triacilgliceróis na presença de água, as lipases são também capazes de catalisar a reação inversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (esterificação) (YAHYA et al., 1998). O deslocamento do equilíbrio no sentido da hidrólise ou da esterificação pode ser controlado pela quantidade de água presente no meio (RAMPIM, 2007).

Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação) (VULFSON, 1994), resultando em diferentes produtos dependendo da molécula utilizada como fornecedora do grupamento acila, quando esta molécula é um álcool tem-se uma reação de alcoólise, quando trata-se de um ácido, tem-se a acidólise, e no caso de um éster, tem-se a transesterificação (Figura 6).

Figura 6: Diferentes reações catalisadas por lipase. Adaptado de HOUDE et al., 2004.

Os termos esterase e lipase são usados frequentemente na literatura. Entretanto, estas duas subclasses de enzimas diferem significativamente uma do outra, e compreender estas diferenças é importante para uma compreensão de seu potencial em contribuir ao aroma de queijo. As esterases e as lipases podem ser diferenciadas de acordo com três características principais: (1) comprimento da cadeia acil-éster hidrolisado (2), natureza físico-química do substrato e (3) da cinética enzimática. Carboxil éster hidrolase (as esterases, EC 3.1.1.x) hidrolisam as cadeias de ésteres de acila com comprimento entre 2 e 8 átomos de carbono, enquanto as lipases hidrolisam as cadeias de ésteres de acila de 10 ou mais átomos de carbono. Esterases hidrolisam substratos solúveis em soluções aquosas, enquanto as lipases hidrolisam substratos emulsificados. A cinética enzimática de lipases e

esterases também é diferente: esterases apresentam cinética do tipo clássico de Michaelis-Menten, enquanto as lipases, uma vez que são ativadas na presença de uma interface óleo/água, apresentam um tipo de cinética interfacial de Michaelis-Menten (CHICH; MARCHESSEAU; GRIPON, 1997).

2.2.1 Fonte e Propriedades

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (plasma sanguíneo, saliva, suco pancreático, leite), vegetais (plantas oleaginosas como soja, amendoim e mamona) e microbianas (bactérias, leveduras e fungos) (JAEGER; REETZ, 1998).

Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados para produção de enzimas porque (a) as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação, (b) à existência de diferentes tipos de atividade enzimática, (c) à rapidez e estabilidade de produção por meio de fermentação microbiana de baixo custo, reprodutível e segura, (d) na sua grande maioria, não são nocivas a saúde humana, sendo reconhecidas como “*Generally Regarded as Safe – GRAS*”, e (e) às otimizações no rendimento que são obtidas muito mais facilmente com engenharia genética ou de proteínas do que a partir de culturas de plantas ou animais (LEE, 1996).

A produção de lipase é dependente de fatores ambientais, tais como temperatura de cultivo, pH, composição de nitrogênio, fontes de carbono e lipídeos, concentração de sais inorgânicos e oxigênio dissolvido no meio. A produção de lipase é induzida por lipídeos como manteiga, banha de porco, óleo de oliva e ácidos graxos (WOOLLEY; PETERSEN, 1994).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, atividade em pH na faixa entre 4,0 a 9,0 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C (VULFSON, 1994). Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoenzimas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações

também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura (BUENO, 2005).

2.2.2 Especificidade das Lipases

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN et al., 1983). No que diz respeito a sua atuação sobre determinada região do triacilglicerídeos, as lipases microbianas podem ser divididas em dois grupos: (a) lipases não-específica, que agem independente da posição de esterificação na molécula de glicerídeo, hidrolisam as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. São exemplos lipases produzidas por *Candida cylindracea*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* spp.; e (b) lipases 1,3 específicas, que liberam ácidos graxos pela hidrólise preferencial das posições 1 e 3 do triacilglicerídeo e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico (WILLIS; MARAGONI, 1999). São exemplos lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roqueforti*.

O ácido butanóico, assim como os outros ácidos de cadeia curta e média, está localizado principalmente na posição sn-3 e é preferencialmente liberado por enzimas lipolíticas (CHRISTIE, 1995).

2.2.3 Purificação das Lipases

Lipases têm sido purificada de fontes de mamíferos, bactérias, fungos e plantas por diferentes métodos (WOOLLEY; PETERSEN, 1994). A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com

maior atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final (PALEKAR; VASUDEVAN; YAN, 2000).

Como regra geral a maioria dos protocolos de purificação de lipases segue a seguinte lógica: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca e baixo custo. Estão aí incluídas as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Estas últimas têm sido aplicadas com excelentes resultados na purificação de lipases e apresentam a vantagem adicional de dispensarem diálise de extratos precipitados pela adição de sais. Nas etapas finais de purificação em geral são aplicadas colunas de filtração em gel que garantem a remoção de agregados e produtos de degradação sofrida pela enzima ao longo do processo de purificação. Entretanto, este tipo de cromatografia fatalmente irá provocar a diluição do produto final, exigindo uma etapa de concentração posterior, como a liofilização (KOBLITZ; PASTORE, 2004).

2.2.4 Aplicações e Mercado de Lipases

As aplicações de enzimas podem ser divididas em aplicações industriais, aplicação em uso médico e em uso analítico. Estas aplicações estão dentro do que se chama de biotecnologia, que abrange as áreas da microbiologia, bioquímica, genética, engenharia química e engenharia bioquímica, com o objetivo de melhorar processos já existentes ou possibilitar o uso de novas matérias primas (LIMA et al., 2001).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, proporcionando um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias consistentes para utilização no setor industrial (JAEGER et al., 1994).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (FABER, 2000). A Tabela 8 mostra algumas aplicações de lipase em diferentes áreas.

Tabela 8 – Possibilidades de uso, em escala industrial, das lipases em diferentes áreas. Fonte: VULFSON, 1994; CASTRO; ANDERSEN, 1995.

Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas, ex: saque, vinho e outras
Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diglicerídeos e monoglicerídeos)	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Químico		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Análítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas

Gatfield (1986) realizou a síntese enzimática de aroma de uma mistura de ésteres de etila a partir de gordura de manteiga usando a lipase de *Candida cylindracea*. Ambas as gorduras de manteiga hidrolisada e não hidrolisada sofreram considerável esterificação com etanol na presença da lipase.

A lipase extraída do microrganismo psicrotrófico, *Pseudomonas fluorescens* P38 foi capaz de realizar a síntese do éster de aroma caprilato de metila em baixas temperaturas (TAN; APENTEN, 1995).

Segundo Macedo (1997), a lipase de *Rhizopus* sp. apresenta grande habilidade em esterificar o álcool citronelol, principalmente na síntese de ésteres de baixa massa molar, empregados como formadores de aroma em alimentos, tais como acetato e butirato de citronelila.

A hidrólise seletiva da gordura do leite é outro exemplo de aplicação potencial de lipases. Segundo Balcão e Malcata (1998), o declínio do consumo per capita de gordura de leite em diversos países e a demanda por leite e derivados com menor teor de gordura têm aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o

uso desta gordura. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo Cheddar, para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, molhos, aperitivos e assados em geral e bolos. A adição desses hidrolisados aos alimentos confere uma variedade de efeitos sensoriais e é dependente da quantidade empregada (BALCÃO; MALCATA, 1998). Em níveis baixos, nenhum aroma de ácido graxo livre no alimento é detectável, ocorrendo apenas um enriquecimento característico no aroma; conforme essa concentração é aumentada, um aroma semelhante à manteiga começa a ser detectado e, em presença de elevados níveis, o aroma sugere queijo. As características dos hidrolisados dependem da fonte da lipase utilizada, sendo adequadas as enzimas oriundas do leite (lipase lipoprotéica), pâncreas (lipase pancreática), fungos (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*), bactérias (*Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas fluorescens*) e trato gastrointestinal (BALCÃO; MALCATA, 1998).

Como os microrganismos usados para obtenção de enzimas devem ser seguros para produção de alimentos, normalmente é possível comercializar misturas de enzimas que não foram extremamente purificadas (em outras palavras, a purificação para remover impurezas e compostos indesejados é desnecessária); por exemplo, uma companhia pode vender um produto caracterizado como “protease” que, na verdade, contem um número de proteases diferentes, frequentemente produzidas pelo mesmo microrganismo. Misturas de enzimas relacionadas são comumente úteis, porque muitas aplicações de enzimas são descobertas em experimentos empíricos. Na maioria dos casos, o mecanismo exato da ação da enzima é desconhecido, tornando difícil a determinação da função específica das enzimas. Por esta razão, as companhias preferem vender enzimas como “categorias” (por exemplo, proteases) a produzir enzimas específicas. Isto diminui o custo da produção da enzima sem comprometer a qualidade ou segurança (JOHNSON-GREEN, 2002). A Tabela 9 apresenta algumas lipases comerciais disponíveis no mercado.

Tabela 9 – Algumas lipases comerciais disponíveis e suas aplicações industriais. Adaptado de HOUDE et al., 2004.

Indústria	Aplicação	Nome Comercial	Fornecedor
Lácteos		Lipase A "Amano" 6 (<i>Aspergillus niger</i>)	Amano
		Lipase M "Amano" 10 (<i>Mucor javanicus</i>)	Amano
		Lipase F-API5 (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Amano
		Lipase AY "Amano" 30 (<i>Candida rugosa</i>)	Amano
		Lipase G "Amano" 50 (<i>Penicillium camemberti</i>)	Amano
		Piccnate (<i>Mucor miehei</i>)	Gist-Brocades
	EMC (aroma tipo cheddar)	Lipomod 187P (lipase fungica)	Biocatalysts
	EMC (aroma tipo cheddar)	Lipomod 224P (pâncreas suíno)	Biocatalysts
	EMC (aroma de queijos azuis)	Lipomod 338P (<i>Penicillium roqueforti</i>)	Biocatalysts
	EMC	Lipomod 34P (<i>Candida cylindracea</i>)	Biocatalysts
	Aroma de queijo (tipo cheddar)	Lipomod 621P (<i>Penicillium</i> sp./ <i>Aspergillus</i> sp.)	Biocatalysts
	EMC (aroma tipo cheddar)	Lipomod 29P (<i>Candida cylindracea</i> + pâncreas suíno)	Biocatalysts
	Intensificação de aroma de queijo	Palatase (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Novozymes
Óleo e gordura		Lipase A "Amano" 6 (<i>Aspergillus niger</i>)	Amano
		Lipase M "Amano" 10 (<i>Mucor javanicus</i>)	Amano
		Lipase G "Amano" 50 (<i>Penicillium camemberti</i>)	Amano
		Lipase F-API5 (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Amano
		Lipase AY "Amano" 30 (<i>Candida rugosa</i>)	Amano
		Newlase F (<i>Rhizopus niveus</i>)	Amano
	Interesterificação de óleo vegetal	Lipozyme TL IM	Novozymes
Farmacêutico	Ingrediente farmacêutico	Lipase MY (<i>Candida cylindracea</i>)	Meito Sangyo
	Síntese de compostos quirais	Lipase ALC, Lipase ALG (<i>Achromobacter</i> sp.)	Meito Sangyo
	Síntese de compostos quirais	Lipase PLC, Lipase PLG, Lipase QLC, Lipase QLG (<i>Alcaligenes</i> sp.)	Meito Sangyo
	Síntese de compostos quirais	Lipase AK "Amano" (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	Amano
		Lipolase, Lipolase Ultra, Lipo Prime, Lipex (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Novozymes
Detergente			
Assados	Melhora da textura e cor da massa	Lipomod 657P (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Biocatalysts
	Emulsificante	Lipopan F	Novozymes
Couro	Calagem	NovoLime (com protease)	Novozymes
	Dispersão de gordura	Greasex, NovoCor AD	Novozymes
Cosmético	Produção de miristato de isopropila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i> B)	Novozymes
Massas	Melhoria na qualidade de macarrão e de massas alimentícias a base de trigo	Noopazyme	Novozymes
Suplemento Alimentar		Lipase L036P (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Biocatalysts
		Lipase F-DS (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Amano
Diversos		Lypolyve NA (<i>Aspergillus niger</i>)	Lyven
		Lypolyve CC (<i>Candida cylindracea</i>)	Lyven

A quantidade de companhias que comercializam enzimas está próximo do milhar, em contrapartida o número de produtores é muito inferior. Ao todo, nos Estados Unidos e parte oeste da Europa, existem somente cerca de 30 indústrias produtoras de enzimas.

Muitos produtores são do ramo da indústria químico-farmacêutica, para os quais o lucro proveniente da comercialização das enzimas desempenha um papel pouco significativo no seu faturamento global. Cerca de 90% da produção anual derivam das maiores empresas produtoras de enzima, como Novozymes com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2003).

2.3 O fungo *Penicillium roqueforti*

Pertence ao Reino Fungi sendo classificado na Classe do Deuteromycetes do Filo Ascomycota. Pertence a subdivisão Deuteromycotina e apresenta o micélio septado, entretanto não produz nenhum tipo de esporo sexuado. Por esse motivo são conhecidos como fungos imperfeitos. Os conídios de coloração verde são formados após divisão nuclear mitótica e são produzidos em cadeia nas fiálides e estão fixos nas métulas através dos esterigmas. As células conidiogênicas são formadas após o crescimento do micélio vegetativo do fungo. Com base nas ramificações dos braços originados no conidióforo a espécie *Penicillium roqueforti* é denominada de Terverticillata (Figura 7) (GREUTER et al., 2000).

Figura 7: Micrografia eletrônica de ramificações em *Penicillium*. (A) *P. glabrum* (Monoverticillata); (B) *P. citrinum* (Biverticillata, Assimétrica); (C) *P. funiculosum* (Biverticillata, Simétrica); (D) *P. Cyclopium* (Terverticillata). Escala em bar: 4 μ m (A,C); 10 μ m (B,D). Fonte: PEBERDY, 1987.

A classificação do fungo é baseada nas características morfológicas e a categoria taxonômica é determinada pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica (GREUTER et al., 2000). Como organismo eucarioto o *P. roqueforti* está classificado no domínio Eukarya. Recentemente a espécie *P. roqueforti* foi reclassificada com base na análise da seqüência dos nucleotídeos do RNA do ribossoma subunidade 18S. As linhagens analisadas apresentaram diferenças significativas no pareamento das bases nitrogenadas e foram classificadas como espécies distintas e denominadas de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium carneum* e *Penicillium paneum* (BOYSEN et al., 1996).

O micélio vegetativo responsável pela nutrição do fungo é formado por hifas septadas com aspecto brilhante e o seu conjunto forma o micélio. Como organismo sapróbio, nutre de matéria orgânica em decomposição e utiliza uma diversidade de substratos orgânicos. Como fonte de carbono utiliza os mono e dissacarídeos. Entretanto apresenta maior versatilidade quanto a fonte de nitrogênio, utilizando compostos nitrogenados orgânicos ou inorgânico com o íon nitrato. Necessita de diferentes tipos de sais e não apresenta nenhuma exigência nutricional quanto à vitamina. Quando cultivado em laboratório o fungo apresenta bom crescimento em meio de cultura sintético como o Czapeck-Dox ou complexo como o extrato de batata (Figura 8). Com relação a temperatura, cresce na faixa de 20 a 30°C e o pH 5,0 é considerado ótimo para o seu crescimento. Nessas condições há crescimento de colônias em meio Agar nutriente com 5 dias de cultivo (PEBERDY, 1987).

Figura 8: (a) Esporos de *Penicillium roqueforti*; Microfotografia ampliada 1000x. (b) Crescimento de *P. roqueforti* em meio batata dextrose ágar após 7 dias de incubação a 28°C.

O crescimento da hifa é apical e na extremidade hifal o *P. roqueforti* excreta as suas enzimas. Dentre as quais, as hidrolases como as lipases que nesse fungo estão focadas no desenvolvimento de substâncias que estimula os aromas e, as proteases que estão comprometidas com a maturação do queijo (PEBERDY, 1987).

O sistema lipolítico de *P. roqueforti* tem sido extensivamente pesquisado. Estudos demonstraram que essa espécie pode sintetizar lipase quando cultivada em meio isento de óleo como fonte de carbono. Como também, pode produzir no mínimo dois tipos de isoenzimas de lipase extracelulares. Essas enzimas apresentaram valores diferentes com relação ao pH ótimo de atividade sob condições ácida e alcalina (EITENMILLER et al., 1970a); MENASSA; LAMBERET, 1982). Lobyreva e Marchenkova (1980) isolaram de uma linhagem de *P. roqueforti* três tipos de lipases com diferentes massas moleculares como também especificidade diferentes quanto ao substrato.

Stepaniak et al. (1980) examinaram a possibilidade das três linhagens *P. roqueforti*, *P. candidum* e *P. camemberti* de produzir simultaneamente as lipases e proteases extracelulares sob condições idênticas de cultivo. Após analisar os resultados eles concluíram que poderiam ser selecionados de cada espécie linhagens que apresentaram relativa alta atividade lipolítica e baixa proteolítica ou vice-versa. Na seleção de fungos do gênero *Penicillium* produtores de lipase e proteases as espécies *Penicillium cyclopium*, *Penicillium patulum*, *Penicillium puberulum* e *P. roqueforti* foram as que apresentaram os maiores valores de atividades lipolítica e proteolítica (EL-GENDY; MARTH, 1980).

A lipase extracelular produzida pela linhagem *P. roqueforti* foi purificada e caracterizada. A enzima com propriedade alcalina foi parcialmente purificada por precipitação com sulfato de amônio (EITENMILLER et al., 1970a). O extrato enzimático apresentou atividade em óleo de manteiga numa faixa de pH que variou de 7,5 a 9,0, sendo que o melhor nível de atividade foi em pH 8,0. Com relação a lipase obtida em cultivo conduzido em meio de cultura sob condição ácida, a lipase foi precipitada com solução alcoólica com etanol 50%, em seguida foi purificada por cromatografia de troca iônica usando coluna DEAE-Sephadex A50. Em seguida, foram adicionados dois tratamentos sucessivos utilizando a coluna SP Sephadex C50. A enzima purificada apresentou atividade em pH na faixa de 1,7 a 10,5 com uma atividade ótima em pH 6,5 a temperatura de 20°C ou em pH 6,5 em 30°C, respectivamente (EITENMILLER et al., 1970a).

Menassa e Lamberet (1982) compararam a lipase produzida por *P. roqueforti* sob diferentes condições de cultivo e concluíram que as enzimas apresentaram propriedades alcalina e ácida, respectivamente.

O fungo *P. roqueforti* quando crescido no queijo apresenta um sistema proteolítico composto de 2 endopeptidases (ZEVACO et al., 1973) e 3 exopeptidases (GRIPON; DEBEST, 1976). Uma das endopeptidases é uma proteína com propriedade ácida. Essa enzima é sintetizada principalmente sob condição ácida em pH 4,0. Entretanto, a outra endopeptidase que é uma metalproteína somente foi sintetizada sob condições de pH 6,0 em sistema tamponado.

O original aroma e sabor apimentado ou picante de um queijo azul de qualidade é dependente principalmente da produção de ácidos graxos por *P. roqueforti* e sua subsequente conversão em metilcetonas, alcoóis secundários, e outros componentes de aroma (BAKALOR, 1962). A esse respeito, o sistema lipolítico de *P. roqueforti* é de particular importância. Lamberet e Menassa (1983) examinaram a atividade lipolítica de 7 amostras de queijo azul usando suspensões do queijo e micélio de *P. roqueforti* como fonte de enzima extracelular e triglicerídeos sintéticos como substrato. Eles concluíram que a atividade lipolítica total nos queijos pode ser considerada como resultado de atividade de lipase alcalina e ácida de *P. roqueforti* previamente caracterizada.

2.4 Avaliação Sensorial em Alimentos

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

A análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas ao produto (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A cadeia de percepção sensorial envolve três etapas básicas, conforme esquematizado na figura 9. O estímulo alcança o órgão sensor e é convertido em sinal nervoso (impulsos elétricos) transportado até o cérebro, que organiza e interpreta a sensação recebida em percepção. Por último a resposta é elaborada com base na percepção (MEILGAARD et al., 1999).

Figura 9: Representação esquemática da cadeia de percepção sensorial. Fonte: MEILGAARD et al., 1999.

O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos. As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Nesta avaliação, os indivíduos, por meio dos próprios órgãos sensórios, numa percepção somato-sensorial, utilizam os sentidos da visão, olfato, audição, tato e gosto (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A mucosa do nariz humano possui milhares de receptores nervosos e o bulbo olfativo está ligado no cérebro a um “banco de dados” capaz de armazenar, em nível psíquico, os odores sentidos pelo indivíduo durante toda a vida. Na percepção do odor, as substâncias desprendidas e aspiradas são solubilizadas pela secreção aquosa que recobre as terminações ciliadas, entrando em contato com os receptores nervosos e produzindo impulsos elétricos. Estes, quando chegam ao cérebro, geram informações que, comparadas aos padrões conhecidos por ele se encaixam como num sistema de “chave-fechadura”. Em média, o ser humano pode distinguir de 2000 a 4000 impressões olfativas distintas. Para avaliar o poder de discriminação, certas substâncias químicas comuns ou raras podem ser apresentadas ao indivíduo para reconhecimento e identificação, como por exemplo: acético, alcoólico, amoníaco, sulfídrico, pinho, lenhoso, cítrico, caramelo, mentol, eugenol, etc (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Na boca, a língua é o maior órgão sensório e está recoberta por uma membrana cuja superfície contém as papilas, onde se localizam as células gustativas ou botões gustativos e os corpúsculos de Krause, com as sensações táteis. O mecanismo de transmissão da sensação gustativa se ativa quando estimulado por substâncias químicas solúveis que se difundem pelos poros e alcançam as células receptoras que estão conectadas, de forma única ou conjuntamente com outras, a uma fibra nervosa que transmite a sensação ao

cérebro. A sensibilidade não se limita apenas à língua, pois outras regiões também respondem aos estímulos, como o palato duro, amídalas, epiglote, mucosa dos lábios, as bochechas e superfície inferior da boca. A percepção mais conhecida envolve quatro gostos primários: doce, salgado, ácido e amargo, sendo citado também o umami (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A análise sensorial usa elementos da psicofísica (psico= resposta comportamental, física = estímulos) e referem-se às técnicas de medidas, quantificação e interpretação das características que são percebidas pelos sentidos humanos (MEILGAARD et al., 1991). Ao analista sensorial cabe compreender que as diferenças entre as respostas dos julgadores são causadas pela sensação diferenciada de cada indivíduo, ou seja, dependem da sensibilidade de cada um as diferentes substâncias, sendo função dos diferentes tratamentos mentais do sinal (percepção) ao estímulo (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

Faria e Yotsuyanagi (2002) descrevem os atributos sensoriais observados em um produto:

- (a) aparência: cor, tamanho e forma, textura, brilho;
- (b) odor: componentes voláteis. Considera-se aroma o odor de um alimento e fragrância o odor de um perfume ou cosmético;
- (c) consistência ou textura: propriedades físicas (viscosidade, dureza, etc);
- (d) sabor: doce, ácido, salgado, amargo, umami.

Basicamente, os métodos sensoriais estão agrupados em analíticos e afetivos (FERREIRA et al., 2000):

Afetivos: testes de preferência/aceitação (comparação pareada – preferência, ordenação, escala hedônica e escala do ideal);

Analíticos: testes de diferença ou discriminativos (comparação pareada, triangular, duo-trio, ordenação, comparação múltipla ou diferença do controle) e testes descritivos (perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa).

Os testes sensoriais discriminativos ou de diferença são considerados métodos objetivos e medem atributos específicos pela discriminação simples, indicando por

comparações, se existem ou não diferenças estatísticas entre amostras. Nos testes afetivos provadores e consumidores relatam sua preferência, aceitação e opinião sobre um produto, sem terem recebido treinamento específico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O planejamento dos testes deve ser realizado adequadamente, por meio do qual será escolhido o melhor delineamento para se obter as informações desejadas. Este delineamento consistirá no tipo de teste a ser aplicado, número ideal de provadores e tipo de análise estatística executável.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi produzir lipase com o fungo *Penicillium roqueforti* e utilizá-la em um processo industrial de síntese de aroma de queijo, procurando desta forma contribuir no aprimoramento de processos biotecnológicos para síntese de aromas naturais de um produto que participa da formulação de muitos produtos alimentício, o queijo.

3.2 Específicos

- Avaliar diferentes composições de meio de cultivo para a produção de lipase utilizando o fungo *Penicillium roqueforti* em cultivo submerso;
- Avaliar a utilização do extrato enzimático produzido pelo fungo como substituto à enzima comercial no processo utilizado na indústria para síntese de aroma natural de queijo;
- Propor modificações no processo de fabricação de queijo enzimaticamente modificado utilizado na indústria para síntese de aroma de queijo, identificando, por meio de análise sensorial, qual a amostra do planejamento experimental apresenta sabor e odor mais intensos;
- Identificar através de análise sensorial qual amostra resultante dos planejamentos utilizando a enzima comercial e o extrato enzimático produzido é a preferida entre os provadores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia Geral, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica e no Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal do Departamento de Biotecnologia, da Escola de Engenharia de Lorena-USP e nos Laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento e de Análise Sensorial da empresa Aromax Indústria e Comércio Ltda, em Pindamonhangaba- SP.

Foi produzida lipase com uma cepa de *Penicillium roqueforti* e a enzima aplicada em um processo industrial de síntese de aroma natural de queijo em escala de bancada. O aroma obtido foi comparado ao resultado do mesmo processo utilizando a enzima comercial.

4.1 PRODUÇÃO DA LIPASE EM CULTIVO SUBMERSO

4.1.1 Cultivo e Manutenção de Cultura

O microrganismo utilizado neste trabalho foi uma cepa do fungo *Penicillium roqueforti* PV LYO 10D obtida da Cultures Division da Danisco France, sendo este fungo considerado *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*). A cultura liofilizada foi reidratada conforme descrito pelo fornecedor na especificação técnica (Anexo A).

O fungo *Penicillium roqueforti* PV LYO 10D foi cultivado em placas de Petri contendo meio *PDA* (*Potato Dextrose Agar*). As placas foram incubados em câmara de germinação (Fanem – 347 CD) com temperatura controlada de 28°C, por 7 dias ou até esporulação abundante, observado visivelmente devido seus conídios apresentarem a cor verde. A cultura pura foi mantida a 4°C, com repiques mensais.

4.1.2 Preparo do Inóculo

Uma suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) foi obtida utilizando-se o fungo *Penicillium roqueforti* PV LYO 10D cultivado em meio *PDA* a 28°C por 7 dias. Após esse

período de incubação, a suspensão de esporos foi obtida pela raspagem da superfície do meio de cultivo presente na placa de Petri com água destilada estéril, e em seguida, a suspensão foi filtrada em um sistema estéril através de lã de vidro, para separação do micélio, recolhida em tubo de ensaio e homogeneizada em vórtex. Uma alíquota foi utilizada para a contagem de esporos em câmara de Neubauer.

4.1.3 Preparo dos meios

Os meios de cultivo foram preparados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50,0 mL de meio de cultura com as seguintes composições:

Meio A: 20 g/L glicose; 1 g/L extrato de levedura; 20 mL/L Solução de Sais de Vogel (Meio Vogel) (pH 5,8).

Solução de Sais de Vogel (VOGEL, 1956) – Macroelementos: 2,5 g/L Na Citrato.2H₂O; 5 g/L KH₂PO₄.5H₂O; 2 g/L NH₄NO₃; 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,1 g/L CaCl₂.2H₂O. Microelementos: 5 mg/L Ácido cítrico; 5 mg/L ZnSO₄.7H₂O; 1 mg/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.5H₂O; 0,25 mg/L CuSO₄.5H₂O; 0,05 mg/L MnSO₄.2H₂O; 0,05 g/L H₃BO₃; 0,05 mg/L NaMoO₂.H₂O; 0,2 mg/L CaCl₂.6H₂O.

Meio B: 2 g/L NaNO₃; 0,5 g/L KCl; 0,5 g/L glicerofosfato de magnésio; 0,01 g/L FeSO₄; 0,35 g/L K₂SO₄; 0,35 g/L sacarose (Meio CzapeckDox Modificado) (pH 6,8).

Meio C: 3 g/L NaNO₃; 0,5 g/L KCl; 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O; 0,01 g/L FeSO₄.7H₂O; 1 g/L KH₂PO₄; 30 g/L sacarose (Meio Czapeck) (pH 6,5), adaptado de Peberdy, 1987.

Meio D: 300 g/L NaNO₃; 50 g/L KCl; 5 g/L MgSO₄.7H₂O; 1 g/L FeSO₄.7H₂O (Meio Czapeck concentrado) (pH 10,0), conforme Peberdy, 1987.

Meio E: 20 g/L peptona bacteriológica; 10 g/L glicose; 1 g/L NaNO₃; 0,6 g/L MgSO₄.7H₂O; 1 g/L KH₂PO₄ (pH 6,5), adaptado de Colen, 2006.

Meio F: 3 g/L extrato de carne; 5 g/L peptona; 1 g/L glicose (pH 7,0), conforme Shipe Jr., 1951.

Meio G: 20 g/L extrato de malte; 1 g/L peptona; 20 g/L glicose (pH 5,0) , conforme Peberdy, 1987.

Meio H: 10 g/L extrato de levedura; 10 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 5 g/L glicose; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 g/L ácido oléico (pH 6,0), adaptado de Mase et al., 1994.

Meio I: 10 g/L glicose; 20 g/L peptona; 5 g/L extrato de levedura; 1 g/L NaNO_3 ; 1 g/L KH_2PO_4 ; 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 6,5), conforme Carvalho et al., 2005.

Meio J: 5 g/L caldo de carne; 10 g/L goma arábica; 1 g/L CaCl_2 (pH 6,0).

A escolha desses meios para avaliação foi baseada em relatos de outros autores que, para produção de lipase utilizaram a mesma espécie ou gêneros do fungo.

Os frascos foram tampados e autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, foi feita a inoculação de uma alíquota de 5,0 mL da suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) (COLEN, 2006) em 50,0 mL de meio de cultura esterelizado.

Para cada um dos meios foi realizada a fermentação na ausência e na presença de óleo de oliva (10 mL/L), verificando seu papel como indutor na produção da enzima. Os meios contendo o óleo de oliva foram denominados como “nome do meio + óleo”, por exemplo, meio A + óleo.

O pH inicial dos meios foi acertado utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Os frascos tampados contendo os meios foram incubados em incubadora (TE-420 – Tecnal) com rotação orbital a 120 rpm e 30°C, por 144 h. Foram inoculados 3 frascos para cada meio avaliado. A amostragem foi realizada a cada 24 h, retirando-se alíquotas de 3 mL de cada meio e centrifugando-as a 1100 x g por 5 min (Centra CL2 – Thermo IEC). Os experimentos foram feitos em triplicata, entretanto, foram utilizados os valores das médias. As análises foram realizadas em duplicata visando a diminuição dos erros associados. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na determinação das atividades enzimáticas (itens

4.1.4 e 4.1.5). A análise estatística dos dados experimentais foi realizada utilizando o software Design Expert 5.

4.1.4 Determinação da Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada pelo método de emulsão de óleo de oliva de acordo com a modificação proposta por Soares et al. (1999).

A emulsão foi preparada misturando-se 50 mL de substrato óleo de oliva com 50 mL de solução de goma arábica (7% m/v). A mistura contendo 5 mL de emulsão, 2 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 1 mL do extrato enzimático foi incubada a 37°C e 150 rpm, por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 10 mL de solução acetona:etanol (1:1 v/v). Foram feitos controles para cada amostra, adicionando a solução acetona:etanol antes do extrato enzimático. Os ácidos graxos liberados foram titulados com KOH 25 mmol L⁻¹ utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1,0 µmol de ácido graxo livre por minuto, sob as condições de ensaio, conforme equação 1.

$$\text{Atividade Lipolítica [U/mL]} = \frac{(V_a - V_b) \cdot f_c \cdot M_{\text{KOH}}}{t \cdot V_c} \quad (\text{Equação 1})$$

sendo,

V_a = volume gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática, em mL

V_b = volume gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco, em mL

V_c = volume de extrato enzimático usado na reação, em mL

f_c = fator de correção da solução titulante de KOH 25mM padronizada

M_{KOH} = molaridade da solução de KOH

t = tempo de reação, em min

Para a determinação da atividade lipolítica realizada posteriormente (item 4.3) para a enzima comercial utilizou-se t=5 min e V_c=1 mL de enzima numa concentração de 0,5 mg/mL. Os demais procedimentos foram os mesmos.

4.1.5 Determinação da Atividade Proteolítica

O método utilizado para medir a atividade enzimática das proteases produzidas por *P. roqueforti* foi baseado na hidrólise da caseína, de acordo com o método descrito por Joo e Chang (2005) modificado.

Uma alíquota de 0,5 mL de caseína 1%, pH 8,0 (caseína de leite bovino – Sigma) e 0,4 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0 foi adicionada a 0,1 mL de extrato enzimático e incubados a 45°C por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético 10%. Após resfriamento, o meio de reação foi centrifugado a 7800 x g por 5 min (Microfuge 12 – Beckman) e o sobrenadante coletado para realização da leitura da absorbância. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm, comprimento de onda na região do UV em que a tirosina absorve luz devido à presença de grupamento aromático. Foi preparado um controle para ajuste do zero do aparelho (branco) no qual se substituiu o volume de extrato enzimático pelo tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0.

A curva padrão foi construída através da medição da absorbância a 280 nm de soluções de tirosina (Merck) em diferentes concentrações (40 – 200 µg/mL).

Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a concentração de enzima capaz de catalisar a liberação de 1,0 µg de tirosina na mistura de reação por minuto, sob as condições de ensaio, conforme a equação 2.

$$\text{Atividade proteolítica [U/mL]} = \frac{m_a \cdot f_a}{t \cdot V_a} \quad (\text{Equação 2})$$

sendo,

m_a = massa de tirosina da amostra, em µg

f_a = fator de diluição

t = tempo de reação, em min

V_a = volume de extrato enzimático usado na reação, em mL

4.1.6 Quantificação da Biomassa

Após 144 h de incubação, os meios de cultura foram filtrados em papel de filtro Whatman n° 1, previamente secos e pesados. O papel de filtro contendo a biomassa foi seco por 24 h a 60°C e por mais 2 h a 100°C, e posteriormente foi pesado, determinando-se a concentração de biomassa, expressa em mg de massa seca de micélio por mL de meio de cultivo.

4.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA SÍNTESE DA ENZIMA

A seleção do meio de cultivo utilizado para a síntese da enzima foi realizada determinando-se o meio em que foi registrada a maior atividade lipolítica e o tempo de reação em que ela ocorre.

Para a síntese da enzima em volume suficiente a ser aplicado nas condições de processo da indústria foi utilizado procedimento semelhante ao de síntese da enzima descrito no item 4.1.3. Os frascos contendo o meio selecionado foram tampados e autoclavados por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento, foi feita a inoculação de uma alíquota de 5,0 mL da suspensão de esporos de *P. roqueforti* PV LYO 10D (10^6 esporos/mL) em 50,0 mL de meio de cultura estéril. Após o período de incubação em agitador com rotação orbital a 120 rpm e 30°C, o volume contido em cada frasco foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1 e os filtrados misturados e denominados extrato enzimático bruto, o qual foi aplicado no processo industrial de síntese de aroma de queijo em escala de bancada.

Uma fração de 5 mL do extrato enzimático bruto foi coletada e analisada quanto às atividades lipolítica e proteolítica (itens 4.1.4 e 4.1.5), pH, e o perfil protéico da amostra foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

4.2.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas em gel de poliacrilamida com agente desnaturante (SDS) segundo a técnica descrita por Alfenas et al. (1991). Na fase de concentração das

amostras no gel, o aparelho foi ajustado para 100 V e 30 mA e, na fase de separação, aplicou-se 150 V e 50 mA ao gel. Os géis foram montados em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. O tampão da corrida foi Tris/glicina pH 8,9 acrescido de SDS (ALFENAS et al., 1991).

4.2.1.1 Preparo dos géis

Géis de poliacrilamida foram produzidos por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos foram preparados segundo Laemmli (1970), em duas fases, que consiste em géis concentrador e separador, preparados com os componentes descritos na tabela 10 e 11.

Tabela 10 – Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador.

Soluções	Concentração 4,5 %
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	2,785 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,375 mL
Água destilada	2,785 mL
SDS 10% (p/v)	25 µL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	62,5 µL
TEMED	20 µL

Tabela 11 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.

Soluções	Concentração 12,5 %
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	3,125 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,75 mL
Água destilada	3,575 mL
SDS 10% (p/v)	50 µL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	125 µL
TEMED	20 µL

4.2.1.2 Preparo das amostras

As amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas em frascos eppendorfs de 0,5 mL, colocando 20 µL de amostra e 10 µL de tampão da amostra. Os

frascos foram levados à fervura, por 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador.

4.2.1.3 Preparo do tampão da amostra

O tampão da amostra foi preparado de acordo com a tabela 12.

Tabela 12 – Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.

Reagentes	Quantidades
Tris-HCl 1 M pH 6,8	2,0 mL
SDS 10 % (p/v)	4,0 mL
β -Mercaptoetanol	2,0 mL
Glicerol	5,0 mL
Azul de Bromofenol	10 mg

4.2.1.4 Coloração com azul de Coomassie

A solução fixadora foi preparada adicionando-se 10 mL de ácido acético glacial, 45 mL de metanol e 45 mL de água destilada.

A solução corante foi preparada adicionando 0,1 g de azul de Coomassie a 100 mL da solução fixadora.

As bandas protéicas presentes no SDS-PAGE puderam ser visualizadas após a incubação do gel em solução corante, por 24 h a 37°C. Depois do período de incubação, o gel foi lavado de 2 a 3 vezes com a solução fixadora, para a retirada do excesso corante.

4.2.1.5 Coloração com nitrato de prata

Após a corrida eletroforética, as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas por impregnação com nitrato de prata. O gel foi incubado por 30 min em uma solução contendo 20 mL de etanol, 5 mL de ácido acético glacial e água destilada em quantidade suficiente para completar 50 mL de solução.

Em seguida, o gel foi novamente incubado por mais 30 min, numa solução contendo 15 mL de etanol, 0,25 mL de glutardialdeído (25%), 2 mL de tiosulfato de sódio (5%), 3,4 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para completar 50 mL de solução. O gel foi então lavado com água destilada por 3 vezes, com duração de 5 minutos para cada lavagem.

Após as lavagens, o gel foi mantido por 20 min, ao abrigo da luz, numa solução contendo 5 mL de nitrato de prata (2,5%), 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada até o volume de 50 mL. O gel foi novamente lavado com água destilada por 2 vezes e em seguida levado a uma solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução, no qual permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas.

A reação foi interrompida pela adição de uma solução contendo 3,65 g de EDTA em 250 mL de água destilada. Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

4.2.2 Dosagem de Proteína

O teor de proteínas no extrato enzimático bruto foi determinado utilizando método colorimétrico como descrito por Bradford (1976). A reação foi iniciada adicionando 0,1 mL da amostra a 1 mL do Reagente de Bradford. Após 5 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

O Reagente de Bradford foi preparado pela dissolução completa de 100 mg de Azul de Coomassie G-250 (Biochemical) em 50 mL de metanol 95%. A seguir, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%. O frasco fechado foi mantido em repouso no escuro, por 24 h. O volume da solução foi ajustado para 1 L com água deionizada e deixado em repouso por mais 24 h, no escuro. Então, a solução foi filtrada 2 vezes, até obter uma coloração de chá, e armazenada em geladeira.

A curva padrão de proteína foi construída através da medição da absorbância a 595 nm de solução de albumina de soro bovino (Merk) nas concentrações de 20, 40, 50, 100, 150, 200 e 400 µg/mL em Reagente de Bradford. A concentração de proteína foi expressa em µg de proteína por mL.

4.2.3 Determinação da massa molecular das proteínas

As massas molares das proteínas presentes foram estimadas por SDS-PAGE, utilizando-se do gráfico dos logaritmos das massas molares (log MM) das proteínas padrões (Tabela 13) pelas suas respectivas mobilidades eletroforéticas (R_f). Os marcadores foram dissolvidos em 100 μ L de tampão da amostra, fervidos por 15 min e armazenados no congelador. Em cada gel foram aplicados, em uma canaleta, 7 μ L dessa solução padrão.

Tabela 13 – Marcadores de baixa massa molar.

Proteína	Massa Molar
Fosforilase	97,0 kDa
Albumina	66,0 kDa
Ovoalbumina	45,0 kDa
Anidrase Carbônica	30,0 kDa
Inibidor de Tripsina	20,1 kDa
α -lactoalbumina	14,4 kDa

4.3 AVALIAÇÃO DA ENZIMA COMERCIAL

A enzima comercial Lipomod 187 P (Biocatalysts) utilizada no processo industrial de síntese de aroma de queijo em escala de bancada foi avaliada quanto a atividade lipolítica e proteolítica (itens 4.1.4 e 4.1.5), pH, e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (item 4.2.1) para estimar a massa molecular e analisar o grau de pureza da enzima comercial.

4.4 APRIMORAMENTO DO PROCESSO INDUSTRIAL

O processo enzimático em questão utilizado na indústria para síntese de aroma natural de queijo é realizado utilizando-se a enzima comercial Lipomod 187P (Biocatalysts), aroma este obtido na forma de pasta e classificado como natural. O processo utiliza como substrato queijo mussarela e visa a obtenção de um aroma com sabor e odor intensificados e com nota de queijo parmesão. Nesse processo trabalha-se em uma temperatura compreendida na faixa de temperatura indicada na especificação técnica da enzima comercial fornecida pelo fabricante (Anexo B). As demais variáveis do processo

como o pH e o tempo de reação não são comumente controlados. Visando a melhoria das condições de processo sobre a síntese de aroma natural de queijo foi proposto um estudo do efeito dessas variáveis no processo, avaliando-se a utilização da enzima comercial e do extrato enzimático bruto.

4.4.1 Planejamento Experimental

Foi realizado planejamento fatorial completo (2^3) avaliando a influência das variáveis temperatura, tempo de reação e pH sobre o processo enzimático de síntese de aroma natural de queijo utilizando a enzima comercial Lipomod 187P (Biocatalysts) e o extrato enzimático bruto obtido por fermentação com *P. roqueforti* (Tabela 14 e 15).

Tabela 14 – Valores reais e os níveis dos fatores estudados para o planejamento fatorial completo (2^3) com 4 pontos centrais.

Variáveis	Nível +1	Ponto Central	Nível -1
Temperatura [°C]	50	45	40
Tempo [h]	24	16	8
pH	7	6	5

Tabela 15 – Planejamento fatorial completo (2^3) com 4 pontos centrais.

Experimento	Variáveis		
	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	pH
1	40 (-1)	8 (-1)	5 (-1)
2	50 (1)	8 (-1)	5 (-1)
3	40 (-1)	24 (1)	5 (-1)
4	50 (1)	24 (1)	5 (-1)
5	40 (-1)	8 (-1)	7 (1)
6	50 (1)	8 (-1)	7 (1)
7	40 (-1)	24 (1)	7 (1)
8	50 (1)	24 (1)	7 (1)
9	45 (0)	16 (0)	6 (0)
10	45 (0)	16 (0)	6 (0)
11	45 (0)	16 (0)	6 (0)
12	45 (0)	16(0)	6 (0)

A síntese de aroma natural de queijo foi avaliada por meio de análise sensorial utilizando Teste de Comparação Múltipla, sendo a faixa ótima para se operar no processo aquela que fornecer uma maior intensidade de sabor e odor. Foram geradas as superfícies

de respostas utilizando as médias dos resultados de análise sensorial utilizando o software Statistica 8.0.

4.4.2 Análise Sensorial

4.4.2.1 Teste de Comparação Múltipla

A intensidade de sabor e odor das amostras obtidas no planejamento fatorial foram avaliadas sensorialmente através de Teste de Comparação Múltipla, que permite verificar se existe diferença entre uma amostra controle (Padrão) e uma ou mais amostras-teste e, ao mesmo tempo, estimar o grau de diferença existente (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

Todos os testes foram conduzidos em cabines individuais. Foi utilizada luz fluorescente já que as amostras apresentavam características visuais semelhantes.

As amostras foram avaliadas quanto a intensidade de aroma e sabor, em relação ao padrão, em sessões separadas para cada grupo de amostras (enzima comercial/extrato enzimático bruto). Foi utilizado como padrão o aroma comercializado pela indústria. Foi solicitado ao provador em cada sessão que descrevesse o aroma percebido.

A equipe de provadores foi composta por 28 provadores previamente treinados pela empresa e membros da equipe de avaliação sensorial nesta indústria. O treinamento para formação da equipe foi realizado pela empresa através de testes com relação a identificação de sabores básicos (doce – açúcar, salgado – sal, amargo – quinino, ácido – ácido cítrico), identificação de aromas (bacon, abacaxi, queijo, laranja e outros), intensidade de sabores básicos (preparando soluções em diversas concentrações), teste de ordenação em relação a dureza e viscosidade e avaliação de diferença entre amostras (através de teste duo-trio). Os provadores que acertaram menos de 80% dos testes não foram selecionados para integrar a equipe de sensorial da empresa.

Foi empregada no teste a seguinte escala de Comparação Múltipla (Figura 10):

Nome: _____		Data: _____	Produto: Queijo Enzimático
<p>Instruções: Você receberá uma amostra Padrão (P) e cinco amostras codificadas. Por favor, avalie as amostras da esquerda para a direita quanto à intensidade de AROMA de queijo e assinale o grau de diferença entre cada amostra com relação ao Padrão, anotando o código da amostra correspondente à escala segundo sua percepção.</p>			
Código da(s) amostra(s)	Escala		
_____	1.Extremamente mais intenso que P		
_____	2.Muito mais intenso que P		
_____	3.Moderadamente mais intenso que P		
_____	4.Ligeiramente mais intenso que P		
_____	5.Não há diferença entre P e a amostra quanto a intensidade de aroma		
_____	6.Ligeiramente menos intenso que P		
_____	7.Moderadamente menos intenso que P		
_____	8.Muito menos intenso que P		
_____	9.Extremamente menos intenso que P		
Tipo de queijo percebido: _____			

Figura 10 – Ficha de avaliação utilizada na análise sensorial dos aromas de queijo para o atributo aroma.

Ficha semelhante a apresentada na figura 8 foi utilizada para avaliação do atributo sabor.

Para cada grupo de amostras, os julgadores receberam, além do padrão identificado (P), cinco amostras, todas devidamente codificadas, incluindo o padrão. A introdução do padrão codificado entre as amostras tem como objetivo monitorar a equipe de julgadores. A apresentação das amostras seguiu um delineamento de blocos incompletos casualizados, sendo apresentadas em três sessões para cada grupo de amostras.

Os resultados das avaliações dos julgadores que classificaram o padrão codificado entre as amostras com valores da escala utilizada diferente de 4, 5 ou 6 foram descartados, uma vez que esses julgadores não apresentaram avaliações consistentes. Os resultados obtidos nos julgamentos corretos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Dunnet (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

4.4.2.2 Teste de Ordenação-Preferência

Após avaliado os resultados obtidos no teste de comparação múltipla e definida a amostra de maior intensidade de aroma e sabor de queijo, tanto do planejamento utilizando o extrato enzimático bruto como do planejamento utilizando a enzima comercial, essas duas amostras e o aroma de queijo comercializado pela indústria foram submetidos a um teste de preferência.

Para isso, foi utilizada uma escala de ordenação-preferência (Figura 11). A cada provador foram oferecidas as três amostras simultaneamente, devidamente codificadas com números de três dígitos segundo um delineamento de blocos completos casualizados, sendo solicitado que ordenassem as amostras em ordem crescente de preferência. Foram atribuídas as ordens 1 a 3 às amostras de menor e maior preferência, respectivamente.

A equipe de provadores foi composta por 40 provadores previamente treinados pela empresa com relação a gostos básicos e reconhecimento de aromas. Os testes foram conduzidos em cabines individuais, iluminadas com lâmpadas fluorescentes.

Nome: _____			Data: _____			Produto: Queijo Enzimático		
Instruções: Você receberá três amostras codificadas. Por favor, avalie as amostras e classifique-as em ordem crescente de sua preferência.								
_____			_____			_____		
(1)			(2)			(3)		
(menos preferida)						(mais preferida)		
Comentários: _____								

Figura 11 – Ficha de avaliação utilizada na análise sensorial dos aromas para o teste de ordenação-preferência. Fonte: ABNT, NBR 13170, 1994.

Os resultados foram analisados estatisticamente com base na análise de Friedman, conforme sugerido por Meilgaard et al. (1991).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DA LIPASE EM CULTIVO SUBMERSO

5.1.1 Quantificação da Biomassa

Os cultivos para obtenção da enzima foram realizados utilizando-se o fungo *Penicillium roqueforti* em diferentes meios, de composição e pH variados. Os frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultivo esterelizados foram inoculados com esporos do fungo (10^6 esporos/mL) e incubados em shaker rotatório a 120 rpm e 30°C por 144 h.

Ao término desse período foi determinada a massa celular do fungo, expressa em mg de massa seca de micélio por mL de meio de cultivo (Figura 12).

Figura 12: Massa celular de *Penicillium roqueforti* nos diferentes meios, expressa em mg de massa seca de micélio por mL de meio, após 144 h de cultivo.

Como pôde ser observado na figura 12, a presença de nutrientes nos meios, o pH e a presença de óleo de oliva tiveram influência sobre o crescimento celular do fungo. A variável que parece ter tido maior influência foi o óleo de oliva, alcançando um crescimento celular superior em todos os ensaios quando comparado aos meios sem o óleo.

Os meios A, A+óleo, D, D+óleo, G+óleo, H+óleo, I, I+óleo, J e J+óleo apresentaram crescimento superior a 19 mg/mL, sendo notado máximo crescimento do fungo no meio D+óleo (pH 10,0), de 36,83 mg/mL. Dos meios ausentes de óleo de oliva o que apresentou maior crescimento foi o meio D. Os meios que apresentaram os menores crescimentos foram meio B com 2,14 mg/mL, seguido de meio F com 3,26 e C com 3,66 mg/mL, com pH inicial variando entre 6,5 e 7,0.

Os valores de biomassa e, em especial, da atividade da enzima na hidrólise do óleo de oliva tem sido amplamente utilizados para efeito de comparação e seleção de linhagens produtoras de lipase. Esses valores podem variar significativamente dependendo do tipo de fermentação, da composição do meio de cultivo e também de outras variáveis do processo fermentativo, tais como pH, temperatura de incubação e presença de indutores da síntese de lipase como os óleos vegetais (POKORNY et al., 1994).

Nos meios avaliados um maior crescimento da massa celular não significou maior produção de lipase pelo fungo.

Mahadik et al. (2002) em estudo de produção de lipase por *Aspergillus niger*, obtiveram valor de biomassa de 9,62 mg/mL de meio e atividade lipolítica de 18,0 U/mL, após 72 h de fermentação a 30°C em meio de cultivo composto (p/v) de extrato de levedura 0,1%, bactopectona 0,5%, glicose 1,0%, óleo de oliva 1,0%, 0,5% de Triton X-100 e alguns sais minerais. Os autores também relataram que a atividade da enzima foi praticamente nula (0,02 U/mL) quando a fermentação foi realizada sem a adição de óleo de oliva.

5.1.2 Determinação da Atividade Lipolítica

O objetivo do acompanhamento cinético foi identificar a fase de máxima produção de lipase e o meio que apresenta uma maior atividade, para que este seja posteriormente selecionado e utilizado no processo industrial.

Na tabela 16, pôde-se observar que, nas mesmas condições experimentais, o óleo de oliva não levou a um aumento significativo de produção de lipase. No meio D+óleo, quando comparado ao meio D, o óleo de oliva provavelmente atuou como um inibidor, não induzindo a produção de lipase pelo fungo *P. roqueforti*. Esses resultados se mostram

contraditórios quando comparados a resultados obtidos por (VARGAS, 2004) para produção de lipase por *P. simplicissimum*, onde o óleo de oliva levou a uma maior produção da enzima, mas estão de acordo com os dados obtidos por Eitenmiller et al. (1970b) que observaram uma inibição da produção de lipase por *P. roqueforti* quando utilizado óleo de oliva, óleo de milho e gordura de manteiga.

Tabela 16: Comparação do efeito da utilização de óleo de oliva sobre a atividade lipolítica nos diferentes meios. Os valores de F inferiores a 0,05 apresentam diferença significativa.

	Média do Pico de Atividade Lipolítica		Desvio Padrão		Teste F
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	
A versus A + óleo	1,0625	1,065	0,088	0,177	1,0000
B versus B + óleo	0,000	0,125	0,000	0,177	0,4226
C versus C + óleo	0,000	0,000	0,000	0,000	
D versus D + óleo	1,625	1,000	0,000	0,000	0,0001
E versus E + óleo	0,000	0,000	0,000	0,000	
F versus F + óleo	0,000	2,250	0,000	1,768	0,2137
G versus G + óleo	2,000	0,000	2,121	0,000	0,3140
H versus H + óleo	6,750	7,500	1,061	0,354	0,4429
I versus I + óleo	3,750	4,5	1,061	1,414	0,6094
J versus J + óleo	1,750	3,375	1,061	0,530	0,1922

As figuras 13 e 14 apresentam a cinética de produção de lipase nos diferentes meios. Os meios B, C, C+óleo, E, E+óleo, F e G+óleo não apresentaram atividade lipolítica, e o meio B+óleo apresentou atividade próxima a zero.

Apesar do meio Czapek ser utilizado por diversos autores para produção de lipase por *Penicillium*, ele não demonstrou ser um bom produtor para esta cepa utilizada nas condições de cultivo avaliadas, visto que os meios B, C e D, com ou sem óleo não foram bons meios para produção da lipase pelo fungo. Resultados similares foram obtidos por Eitenmiller et al. (1970b), que mostrou que o fungo cultivado em meio de cultura Czapek não produziu quantidade significativa de lipase. Morris e Jezeski (1973) obtiveram resultado similar com meio Czapek.

É interessante observar na figura 14 que o pico máximo de atividade lipolítica foi de 7,50 U/mL, alcançado com 96 h de cultivo em meio H+óleo composto por 10 g/L extrato de levedura, 10 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L glicose, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g/L ácido oleico em pH 6,0. Kosugi e Kamibayshi (1971) observaram que ácidos graxos, como ácido oleico, ácido linoleico e ácido linolênico, estimularam a produção de lipase por *Pseudomonas mephitica*.

No meio H o pico da produção de lipase também foi alcançado com 96 h de cultivo, apresentando uma atividade de 6,75 U/mL. O meio I+óleo apresentou uma atividade lipolítica máxima de 4,5 U/mL, com um tempo de fermentação de 96 h. Os meios I e J+óleo apresentaram o pico de atividade com 120 h, apresentando atividade lipolíticas de 3,75 U/mL e 3,38 U/mL, respectivamente. Esses picos de atividade lipolíticas estão de acordo com o tempo relatado por outros autores, como Azeredo et al. (2007) e Wolski et al. (2009) para atingir a máxima atividade lipolítica. Nos demais meios obteve-se uma atividade lipolítica baixa, inferior a 3 U/mL.

Azeredo et al. (2007) em estudo da variação de fonte de carbono na produção de lipase por *P. restrictum* em fermentação submersa, alcançou máxima atividade lipolítica de 12,1 U/mL usando óleo de oliva, 5,1 U/mL usando ácido oleico e 1,9 U/mL usando glicose como fonte de carbono, em tempos de 96, 120 e 172 h de fermentação, respectivamente.

Wolski et al. (2009), em estudo da otimização da produção de lipase em fermentação submersa por células imobilizadas de *Penicillium* sp. encontrou máxima produção de lipase de 20,96 U/ml após 120 h de fermentação, utilizando para isso meio composto por peptona 2% (p/v), NaCl 0,5% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v) e óleo de oliva 1% (p/v), e afirmou que esta atividade obtida é mais alta do que o observado na literatura para produção de lipase utilizando células livres e células imobilizadas desse microrganismo.

Figura 13: Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio A e A+óleo; (b) Meio B e B+óleo; (c) Meio C e C+óleo; (d) Meio D e D+óleo; (e) Meio E e E+óleo; (f) Meio F e F+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

Figura 14: Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio G e G+óleo; (b) Meio H e H+óleo; (c) Meio I e I+óleo; (d) Meio J e J+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

Ellaiah et al. (2004) avaliou a produção de lipase por fungo filamentosso *Aspergillus niger* e obteve com 96 h de fermentação atividade de 4,09 U/mL, em experimento conduzido em cultivo submerso a 28°C e 200 rpm por 120 h, sendo este um valor muito inferior ao obtido por Mahadik et al. (2002) utilizando o mesmo microrganismo, porém condições de cultivo diferentes.

Uma cepa brasileira de *Penicillium restrictum* apresentou atividade lipolítica de 13,0 U/mL e biomassa de 14,2 mg/mL após fermentação em meio líquido composto de (p/v) óleo de oliva 1%, peptona de carne 2,0%, extrato de levedura 0,1% e NaCl 0,5% (FREIRE et al., 1997). O mesmo valor de atividade foi constatado para a lipase de *P. aurantiogriseum* após 72 h de fermentação em meio contendo (p/v) extrato de levedura 0,5%, óleo de oliva 1,0%, sais minerais e sulfato de amônio 1,0% (LIMA et al., 2003). No caso de lipase produzida por *P. expansum*, a atividade de hidrólise relatada pelos autores foi de apenas 6,1 U/mL (STÖCKLEIN et al., 1993) e para lipase produzida por *P. solitum* a

atividade constatada foi de 10,5 U/mL e biomassa de 6,56 mg/mL de meio (CARVALHO et al. 2005).

Para verificação se houve diferença significativa entre os picos alcançados nos diferentes meios de cultivo avaliados foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) dos dados (Tabela 17).

Tabela 17: ANOVA dos picos de atividade lipolítica dos diferentes meios de cultivo avaliados.

FV	GL	SQ	QM	F
Modelo	19	196,03	10,32	15,31
Resíduo	20	13,48	0,67	
Total	39	209,51		

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

Tabela 18: Média dos picos de atividade lipolítica e seus respectivos desvios padrão dos diferentes meios de cultivo. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Meio	Pico de Atividade Lipolítica
A	$1,06 \pm 0,09$ ^{e, f, g}
A + óleo	$1,07 \pm 0,18$ ^{e, f, g}
B	$0,00 \pm 0,00$ ^g
B + óleo	$0,13 \pm 0,18$ ^{f, g}
C	$0,00 \pm 0,00$ ^g
C + óleo	$0,00 \pm 0,00$ ^g
D	$1,63 \pm 0,00$ ^{e, f, g}
D + óleo	$1,00 \pm 0,00$ ^{f, g}
E	$0,00 \pm 0,00$ ^g
E + óleo	$0,00 \pm 0,00$ ^g
F	$0,00 \pm 0,00$ ^g
F + óleo	$2,25 \pm 1,77$ ^{c, d, e}
G	$2,00 \pm 2,12$ ^{d, e}
G + óleo	$0,00 \pm 0,00$ ^g
H	$6,75 \pm 1,06$ ^a
H + óleo	$7,50 \pm 0,35$ ^a
I	$3,75 \pm 1,06$ ^{b, c}
I + óleo	$4,50 \pm 1,41$ ^b
J	$1,75 \pm 1,06$ ^{d, e, f}
J + óleo	$3,38 \pm 0,53$ ^{b, c, d}

De acordo com os dados apresentados na tabela 18, os picos de atividade lipolítica alcançados nos meios H e H+óleo não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade e são estes os meios onde se determinou maior atividade. Esses meios utilizaram ácido oleico em sua composição, o que pode ter induzido o fungo a uma maior produção da enzima.

Em seguida, os meios nos quais se determinaram os maiores picos foram os meios I, I+óleo e J+óleo, não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$). Nota-se que nesses meios H, H+óleo, I e I+óleo foi utilizado como fonte de nitrogênio o extrato de levedura em concentração acima de 5 g/L, o que pode ter influenciado em uma maior produção da enzima pelo fungo, visto que nos demais meios utilizaram-se outros componentes como fonte de nitrogênio ou como no caso dos meios A e A+óleo em que o extrato de levedura numa concentração inferior foi utilizado.

Portanto, comparados aos dados da literatura relacionados ao crescimento e à atividade de hidrólise, a cepa de *P. roqueforti* utilizada neste trabalho pode ser considerada como produtora regular de lipase quando cultivado em meio H e H+óleo.

5.1.3 Determinação da Atividade Proteolítica

Foi avaliado o uso do óleo de oliva na composição dos meios quanto a indução da atividade proteolítica. Na tabela 19, pôde-se observar que, nas mesmas condições experimentais, o meio G+óleo apresentou um pico de atividade proteolítica maior e diferente estatisticamente do meio sem óleo de oliva, o meio G. Nos demais meios avaliados o óleo não levou a um aumento significativo na atividade lipolítica.

Tabela 19: Comparação do efeito da utilização de óleo de oliva sobre a atividade proteolítica nos diferentes meios. Os valores de F inferiores a 0,05 apresentam diferença significativa.

	Média do Pico de Atividade Proteolítica		Desvio Padrão		Teste F
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	
A versus A + óleo	28,783	28,358	1,220	1,545	0,7889
B versus B + óleo	30,510	30,440	1,428	4,752	0,9859
C versus C + óleo	10,826	18,738	0,665	13,055	0,4822
D versus D + óleo	62,539	72,900	0,504	15,388	0,4415
E versus E + óleo	16,770	16,970	2,079	0,467	0,9065
F versus F + óleo	34,630	32,201	0,568	4,004	0,4848
G versus G + óleo	75,402	93,800	2,680	1,485	0,0136
H versus H + óleo	165,621	175,292	55,426	45,545	0,8663
I versus I + óleo	233,594	203,356	13,257	10,752	0,1292
J versus J + óleo	20,091	19,445	0,129	0,332	0,1244

Foi realizado também um acompanhamento cinético da atividade proteolítica nos diferentes meios. Esse estudo se fez necessário devido à interferência que a produção de protease parece exercer na atividade lipolítica, conforme relatado por Salvadori et al. (1964), Niki et al. (1966) e Vargas (2004), e também devido a sua contribuição no processo de desenvolvimento de compostos de aroma em queijo, conforme descrito no item 2.1.1.

Esse comportamento foi observado por Salvadori et al. (1964) que testando 19 diferentes estirpes de *P. roqueforti* notaram que elas pareciam se diferir inversamente com relação à capacidade proteolítica e lipolítica. Niki et al. (1966) mostraram estirpes de *P. roqueforti* com alta atividade proteolítica possuindo baixa atividade lipolítica, e vice-versa.

As figuras 15 e 16 apresentam os gráficos de atividade proteolítica em função do tempo.

Figura 15: Cinética da produção de protease nos diferentes meios. (a) Meio A e A+óleo; (b) Meio B e B+óleo; (c) Meio C e C+óleo; (d) Meio D e D+óleo; (e) Meio E e E+óleo; (f) Meio F e F+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

Figura 16: Cinética da produção de lipase nos diferentes meios. (a) Meio G e G+óleo; (b) Meio H e H+óleo; (c) Meio I e I+óleo; (d) Meio J e J+óleo. Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

As figuras 15 e 16 demonstram que os meios onde se determinou a maior atividade proteolítica foram os meios H, H+óleo, I e I+óleo, com picos de atividade variando entre 165,62 e 233,59 U/mL.

Quando se busca maximizar a produção de lipase uma alta produção de protease é uma característica indesejável, pois leva a uma queda na produção de lipase (VARGAS, 2004).

Dos meios testados onde não foi identificada atividade lipolítica (meio B, B+óleo, C, C+óleo, E, E+óleo, F e F+óleo) foi observada atividade proteolítica variando entre 10,83 e 37,00 U/mL.

Os meios nos quais se determinou maior atividade proteolítica foram também os que apresentaram maior atividade lipolítica. Segundo Gombert et al. (1999), a princípio, um aumento da atividade proteolítica ou a alcalinização do meio levaria a uma queda na atividade lipolítica. Este comportamento não foi observado, pois nos meios onde houve

uma maior produção de lipase houve também uma maior produção de protease quando comparado aos demais meios avaliados, devendo-se notar também que o pH inicial dos meios sofreu pouca alteração após as 144 h de fermentação (Tabela 20). Vargas (2004) em estudo de lipase produzida por *P. simplicissimum* ressaltou que esta não é afetada pela proteólise e pelo pH.

Tabela 20: Variação do pH inicial e pH final após 144 h de fermentação nos diferentes meios.

Meio	sem óleo		com óleo
	pH inicial	pH final	pH final
A	5,8	5,9	5,6
B	6,8	6,9	6,9
C	6,5	6,7	6,5
D	10,0	10,2	10,1
E	6,5	5,3	5,4
F	7,0	5,8	6,1
G	5,0	5,4	5,5
H	6,0	5,8	6,0
I	6,5	6,5	6,5
J	6,0	6,8	6,5

Estes resultados podem ser verificados nas tabelas 21 e 22, que apresentam os dados estatísticos para os picos de atividade proteolítica determinados nos diferentes meios de cultivo.

Tabela 21: ANOVA dos picos de atividade proteolítica dos diferentes meios de cultivo avaliados.

FV	GL	SQ	QM	F
Modelo	19	1,83E+05	9626,40	32,61
Resíduo	20	5904,59	295,23	
Total	39	1,88E+05		

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F = valor calculado.

Tabela 22: Média dos picos de atividade proteolítica e seus respectivos desvios padrão dos diferentes meios de cultivo. As médias com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Meio	Pico de Atividade Proteolítica
A	$28,78 \pm 1,22^{e, f}$
A + óleo	$28,36 \pm 1,55^{e, f}$
B	$30,51 \pm 1,43^{e, f}$
B + óleo	$30,44 \pm 4,75^{e, f}$
C	$10,83 \pm 0,67^f$
C + óleo	$18,74 \pm 13,06^f$
D	$62,54 \pm 0,50^{d, e, f}$
D + óleo	$72,90 \pm 15,39^d$
E	$16,77 \pm 2,08^f$
E + óleo	$16,97 \pm 0,47^f$
F	$34,63 \pm 0,57^{e, f}$
F + óleo	$32,20 \pm 4,00^{e, f}$
G	$75,40 \pm 2,68^d$
G + óleo	$93,80 \pm 1,48^d$
H	$165,62 \pm 55,43^c$
H + óleo	$175,29 \pm 45,55^{b, c}$
I	$233,59 \pm 13,26^a$
I + óleo	$203,36 \pm 10,75^{a, b}$
J	$20,09 \pm 0,13^f$
J + óleo	$19,45 \pm 0,33^f$

O meio I, onde foi determinado o maior pico de atividade proteolítica, não diferiu significativamente do meio I+óleo, mas apresentou diferença significativa dos demais meios avaliados. O meio H+óleo, meio que apresentou maior pico de atividade lipolítica, também apresentou alta atividade proteolítica, com um pico de 175,29 U/mL após 96 h de fermentação. Este meio não apresentou diferença significativa em relação ao meio I+óleo e meio H.

5.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA SÍNTESE DA ENZIMA

A seleção do meio de cultivo utilizado para a síntese da enzima foi realizada determinando-se o meio em que foi registrada a maior atividade lipolítica e o tempo de reação em que ela ocorre.

De acordo com a tabela 18 apresentada anteriormente, os meios que apresentaram maior atividade lipolítica foram os meios H e H+óleo, não se diferenciando estatisticamente entre si a um nível de significância de 95%. No entanto, o meio H+óleo foi selecionado para produção da enzima devido a seu pico de atividade lipolítica ter sido superior ao pico observado no meio H e com um menor desvio padrão. Com relação ao tempo de reação em que esses picos ocorreram, ambos foram após 96 h de incubação. A atividade proteolítica, de acordo com a tabela 22 apresentada anteriormente, o meio H+óleo apresentou alta atividade, com um pico de atividade de 175,29 U/mL com 96 h de incubação. Estes dados estão apresentados na figura 17 para uma melhor visualização.

Figura 17: Cinética de produção de lipase e protease por *Penicillium roqueforti* em cultivo submerso em meio denominado H + óleo.

Após definido o meio e o tempo de reação em que foi determinada a maior atividade lipolítica, o meio H+óleo foi selecionado para produção da enzima, com um tempo de reação de 96 h. O extrato enzimático bruto obtido para a aplicação nas condições de processo da indústria para síntese de aroma de queijo em escala de bancada apresentou as seguintes características (Tabela 23).

Tabela 23: Caracterização enzimática do extrato enzimático bruto.

	Atividade Lipolítica (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Proteolítica (U/mL)	pH final
Extrato Enzimático Bruto	10,97	2.184,07	166,30	6,1

Foi avaliado o extrato enzimático bruto, pois ele se apresentando resultado satisfatório no processo de obtenção de aroma de queijo é obtida uma redução no tempo de produção e dos gastos com purificação, quando comparado a enzimas comerciais, que são normalmente enzimas purificadas ou parcialmente purificadas. A alta atividade proteolítica obtida nesse meio contribuirá também de forma positiva na produção do aroma, visto que a proteólise por *P. roqueforti* é essencial para o desenvolvimento de textura e aroma em queijos (KINSELLA; HWANG, 1976).

Foi realizada eletroforese SDS-PAGE para estimar a massa molar das proteínas presentes no extrato. A figura 18 mostra a corrida eletroforética do extrato enzimático bruto. Na revelação com nitrato de prata, pôde-se notar a presença de 7 bandas protéicas, com massas molares correspondente a 122,2 kDa, 90,7 kDa, 78,1 kDa, 44,3 kDa, 22,3 kDa, 17,0 kDa e 11,9 kDa.

Resultados semelhantes foram reportados para esta espécie. Isobe et al. (1988), encontram massa molar de aproximadamente 110 kDa para *Penicillium cyclopium* M1 por filtração em gel. Análise de SDS-PAGE revelaram duas subunidades com massas molares idênticas, 54 kDa. Já lipase extracelular de *P. simplicissimum* foi purificada e apresentou massa molar de 56 kDa em SDS-PAGE (SZTAJER et al., 1991), e lipase extracelular de *P. camembertii* U-150 apresentou massa molar de 37 kDa (ISOBE, NOKIHARA, 1991). Lianghua et al. (2007) purificaram uma lipase de *P. expansum* PED-03 e determinaram massa molar de 33 kDa. Para uma lipase produzida por *P. roqueforti* IAM 7268 que foi purificada, determinou-se por eletroforese uma massa molar de 25 kDa (MASE et al., 1995).

Figura 18: SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 12,5% corado com nitrato de prata. P – Padrões kDa (Fosforilase, Albumina bovina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de Tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 2 – Extrato Enzimático Bruto.

Segundo Deive et al. (2003), de maneira geral, a massa molar de lipases microbianas varia entre 19 e 65 kDa, sendo que as cutinases (CYGLER; SCHRAG, 1997) e as lipases de *B. pumilus* e de *B. licheniformis* (NTHANGENI et al., 2001) são as menores lipases (19 kDa) de estrutura conhecida. Como lipases fúngicas são geralmente proteínas glicosiladas, alguns autores sugerem que uma alta massa molar seja decorrente da porção carboidrato ligada à enzima.

Fawzi (2009) purificou e caracterizou protease produzida por *Penicillium velutinum* em fermentação em estado sólido e determinou a massa molar da protease produzida por eletroforese, encontrando 63 kDa. ZHU et al. (2008), encontrou massa molar de 41 kDa através de eletroforese SDS-PAGE para protease produzida por *Penicillium chrysogenum*. Modler et al. (1974) após purificação de protease extracelular de *Penicillium roqueforti* BP-13, encontraram massas molares de 49 kDa e 45 kDa.

Dessa forma não é possível identificar quais as bandas protéicas correspondem a lipase ou protease, pois suas massas molares encontram-se numa mesma faixa de tamanho.

5.3 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ENZIMA COMERCIAL

A enzima comercial Lipomod 187 P (Biocatalysts) utilizada no processo industrial de síntese de aroma de queijo apresentou atividade lipolítica de 11.655,43 U/g; as demais características da enzima estão apresentadas na tabela 24. Para a utilização no processo industrial essa enzima é devidamente pesada e diluída em água, passando a apresentar uma atividade de 54,8 U/mL.

Tabela 24: Caracterização enzimática da enzima comercial.

	Atividade Lipolítica (U/g)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Proteolítica (U/mL)	pH final
Enzima Comercial	11.655,43	1.408,81	0,00	5,5

O pH foi medido realizando a diluição da enzima em água destilada.

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 12,5% com agente desnaturante (SDS) para estimar a massa molar e verificar o grau de pureza da enzima comercial Lipomod 187P (Figura19).

Figura 19: SDS-PAGE com gel de Bis/Acrilamida 12,5% corado com azul de Coomassie. P – Padrões kDa (Fosforilase, Albumina bovina, Ovoalbumina, Anidrase Carbônica, Inibidor de Tripsina e α -lactoalbumina); 1 e 2 – Enzima comercial Lipomod 187P.

A figura 19 mostra a corrida eletroforética da enzima comercial. Na revelação com azul de Coomassie, pôde-se notar a presença de duas bandas proteicas, com massa molar correspondente a 61,38 kDa, sendo esta uma lipase de alta massa molar, e uma leve banda de proteína de massa molar de 43,19 kDa, caracterizando uma proteína com bom grau de pureza.

Os perfis enzimáticos da enzima comercial e do extrato enzimático se assemelham com relação as suas massas molares, mas não ao número de bandas.

5.4 APRIMORAMENTO DO PROCESSO INDUSTRIAL

5.4.1 Planejamento Experimental

O planejamento fatorial foi empregado visando obter as melhores condições operacionais do processo utilizado na indústria, medindo os efeitos das variáveis e suas interações sobre a resposta. Foi utilizado planejamento fatorial completo (2^3) com 4 pontos centrais, estudando a influência das variáveis de entrada temperatura, tempo e pH sobre a variável resposta intensidade de sabor e odor.

A síntese de aroma natural de queijo foi avaliada por meio de análise sensorial utilizando Teste de Comparação Múltipla, sendo a faixa ótima para se operar no processo aquela que forneceu uma maior intensidade de sabor e aroma.

A quantidade de enzima utilizada nos ensaios de síntese de aroma de queijo foi determinada baseando-se na atividade de lipase. Foi utilizado o extrato enzimático bruto com atividade lipolítica 5 vezes inferior a atividade da enzima comercial. As atividades das enzimas estão apresentadas na tabela 25.

Tabela 25: Atividades lipolítica e proteolítica das enzimas utilizadas no processo industrial.

Enzimas (U/mL)	Lipase	Protease
Extrato Enzimático Bruto	10,97	166,30
Lipomod 187P	54,80	0,00

Para uma análise consistente dos resultados do planejamento, os resultados obtidos nos julgamentos corretos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Dunnet (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002). Foram gerados os gráficos de Pareto para avaliação dos efeitos das variáveis e geradas as superfícies de resposta utilizando o software Statistica 8.0.

5.4.2 Análise Sensorial

5.4.2.1 Teste de Comparação Múltipla

Foi utilizado o Teste de Comparação Múltipla para avaliar quais as condições de processo estudadas que fornecem um aroma de queijo de maior intensidade de sabor e odor, quando comparado a uma amostra padrão, sendo esta o aroma produzido pela empresa nas suas condições pré-estabelecidas. Esse teste permite avaliar sensorialmente se existe diferença entre as amostras testes e a amostra padrão, e ao mesmo tempo, permite estimar o grau de diferença existente (FARIA; YOTSUYANAGI, 2002).

5.4.2.1.1 Processo utilizando o Extrato Enzimático Bruto

Na avaliação do odor dos aromas de queijo obtidos nas condições estabelecidas no planejamento fatorial foram constadas diferenças significativas entre as amostras e o padrão (Tabela 26).

Tabela 26: ANOVA de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Odor.

FV	GL	SQ	QM	F _c	F _o
Amostra	12	260,13	21,68	8,15	1,86
Provador	23	179,08	7,79		
Resíduo	241	640,80	2,66		
Total	276	1080,00			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F_c = valor calculado; F_o = valor observado de estatística “F” de Snedecor.

Figura 20: Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Odor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p > 0,05$); letra “b” indica diferença ($p > 0,05$); Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

As amostras correspondentes aos experimentos 1, 2, 3 e 7 não diferiram da amostra padrão a 95% de significância (Figura 20). O experimento 1 corresponde a interação temperatura de 40°C, tempo de reação de 8 h e pH 5,0. O experimento 2 difere do 1 em relação a temperatura, utilizando 50°C e o 3 difere do 1 com relação ao tempo, utilizando 24 h de reação. Dos experimentos utilizando o pH no nível inferior, pH 5,0, o único que apresentou diferença significativa do padrão foi o 4, que alcançou a melhor média entre

todas as condições de processos avaliadas, representado na escala de pontos pela avaliação entre 4 (ligeiramente mais intenso que Padrão) e 3 (moderadamente mais intenso que Padrão). O experimento 4 corresponde a temperatura de 50°C, tempo de 24 h e pH igual a 5,0. O experimento 7 também não diferiu do padrão, e utilizou temperatura de 40°C, tempo de 24 h e pH 7,0.

Os demais experimentos utilizando pH 7,0 ou 6,0 (ponto central), exceto o experimento 7, apresentaram diferença significativa do padrão, alcançando médias inferiores de intensidade, variando entre 6 (ligeiramente menos intenso que Padrão) e 7 (moderadamente menos intenso que Padrão) na escala de intensidade de aroma, apresentando essas condições não proporcionar uma maior intensidade de odor, mostrando-se inadequadas na obtenção de um aroma mais intenso.

A figura 21 apresenta o Gráfico de Pareto que apresenta a magnitude dos efeitos absolutos das variáveis manipuladas sobre variável resposta. Pôde-se observar que o pH é a variável que mais influencia na intensificação do odor, apresentando um efeito positivo a 95% de confiança. Como uma maior intensidade de aroma é representado na escala pelo número 1 e uma menor intensidade de aroma em relação ao padrão é representado pelo número 9, o pH no nível negativo influencia positivamente na intensificação do odor.

Figura 21: Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de odor utilizando as médias das respostas dos provadores – Extrato Enzimático Bruto.

As superfícies de resposta mostram que a maximização da intensidade de odor é obtida operando-se no nível +1 para temperatura, tempo e nível -1 para o pH. Na figura 22 observa-se que a intensidade de odor é aumentada conforme a temperatura caminha para o nível positivo e o pH para o nível negativo. O mesmo comportamento é observado na figura 23 para o pH em relação ao tempo. De acordo com a figura 24, um ligeiro aumento da intensidade de odor é observado conforme o tempo e a temperatura se aproximam do nível positivo.

Figura 22: Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 23: Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 24: Superfície de resposta dos efeitos de temperatura e tempo para intensidade de odor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

De acordo com as notas dos provadores e a análise estatística, a variável que teve maior influência no processo de intensificação do odor de queijo foi o pH, mostrando que essa enzima atua melhor em um pH mais ácido; o pH de 5,0 associado a uma temperatura de 50°C e tempo de reação de 24 h forneceram a melhor média de intensidade de odor.

Em relação ao atributo sabor pôde ser observada diferença significativa entre as amostras (Tabela 27).

Tabela 27: ANOVA de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Sabor.

	FV	GL	SQ	QM	F c	F o
Amostra		12	91,87	7,66	2,54	1,86
Provador		23	207,18	9,01		
Resíduo		241	727,21	3,02		
Total		276	1026,26			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; Fc = valor calculado; Fo = valor observado de estatística “F” de Snedecor.

De acordo com as notas oferecidas pelos provadores, apresentados na figura 25, a única condição que levou a um aumento significativo da intensidade de sabor, em relação ao padrão, foi o experimento 4. As demais condições avaliadas não diferiram estatisticamente do padrão.

Figura 25: Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando o Extrato Enzimático Bruto – Atributo Sabor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p > 0,05$); letra “b” indica diferença ($p > 0,05$). Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

De acordo com a figura 26, novamente o pH foi a variável que apresentou maior influência na obtenção de um sabor mais intenso.

Figura 26: Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de sabor utilizando as médias das respostas dos provadores – Extrato Enzimático Bruto.

Avaliando as superfícies de resposta geradas, observa-se através da figura 27 que, conforme o pH se aproxima do nível -1 e o tempo do nível +1 a intensidade de sabor é aumentada. O mesmo comportamento é observado na figura 28 avaliando o pH em relação a temperatura, obtendo uma maior intensidade de sabor em um pH mais baixo e um tempo de reação maior. Em relação a figura 29, é observado uma maior intensificação de sabor quando o tempo e a temperatura caminham para o nível superior.

Figura 27: Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 28: Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 29: Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Extrato Enzimático Bruto. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Os resultados demonstram que trabalhar nesse processo com o extrato enzimático bruto produzido em pH 6,0 ou 7,0, ou com tempo de reação de 8 e 16 h, ou com um temperatura de 40°C e 45°C não remetem a resultados satisfatórios de processo. Não foi possível alcançar a otimização desse processo nas condições avaliadas devido as limitações dos parâmetros avaliados em relação a atividade enzimática.

Portanto, as condições experimentais que levaram a produção de um aroma com odor e sabor mais intensos foram as condições referentes a amostra 4 (pH = 5,0; tempo = 24 h; temperatura = 50°C), e foi esta a selecionada para ser avaliada no teste de preferência.

5.4.2.1.2 Processo utilizando a Enzima Comercial

Na avaliação do odor dos aromas de queijo obtidos nas condições estabelecidas no planejamento fatorial foram constadas diferenças significativas entre as amostras utilizando-se Análise de Variância (Tabela 28). No entanto, o Teste de Dunnet mostra que

não há diferença significativa das amostras com o padrão (Figura 30). Uma hipótese é que a dispersão dos resultados das amostras acaba sendo mais significativa do que uma eventual diferença das amostras com o padrão. Esse comportamento ocorreu somente para a avaliação do odor quando utilizada a enzima comercial e não invalida as demais avaliações.

Tabela 28: ANOVA de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Odor.

FV	GL	SQ	QM	F _c	F _o
Amostra	12	59,39	4,95	2,18	1,86
Provador	23	152,32	6,62		
Resíduo	241	546,51	2,27		
Total	276	758,22			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; F_c = valor calculado; F_o = valor observado de estatística “F” de Snedecor.

Figura 30: Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Odor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do P (Padrão) pelo teste de Dunnett ($p > 0,05$); letra “b” indica diferença ($p > 0,05$). Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

A figura 31 apresenta o Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis sobre a intensidade do odor utilizando as médias das respostas dos provadores. Pôde-se observar que o tempo é a variável que mais influencia a intensificação do odor, sendo seguida pela interação tempo versus pH, apresentando um efeito significativo a 95% de confiança.

Figura 31: Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de odor utilizando as médias das respostas dos provadores – Enzima Comercial.

Avaliando as superfícies de resposta geradas, pôde-se observar na figura 32 que, conforme o pH decresce sentido o nível -1 e o tempo para o nível +1 a intensidade de odor é aumentada. Na figura 33 a intensidade do odor aumenta quando o pH e a temperatura estão no nível -1. Em relação a figura 34, é observado uma maior intensificação de sabor quando o tempo e a temperatura caminham para o nível superior.

Figura 32: Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 33: Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 34: Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto à intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Em relação ao atributo sabor, quando utilizado a enzima comercial no processo, foi observada diferença significativa entre as amostras a 95% de confiança (Tabela 29).

Tabela 29: ANOVA de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Sabor.

FV	GL	SQ	QM	F c	F o
Amostra	12	76,3	6,39	3,00	1,86
Provador	23	89,26	3,88		
Resíduo	241	513,68	2,13		
Total	276	679,67			

FV = fontes de variação; GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; Fc = valor calculado; Fo = valor observado de estatística “F” de Snedecor.

De acordo com os valores das médias apresentados na figura 35, a única condição que diferiu estatisticamente do padrão foi o experimento 3, que corresponde as condições de temperatura de 40°C, tempo de 24 h e pH 5,0. O experimento 3 apresentou a menor média, representado na escala de pontos pela avaliação entre 4 (ligeiramente mais intenso que Padrão) e 3 (moderadamente mais intenso que Padrão).

Figura 35: Análise Estatística Descritiva de aroma obtido utilizando a Enzima Comercial – Atributo Sabor. As médias das amostras seguidas da letra “a” indicam que não diferem do Padrão pelo teste de Dunnett ($p>0,05$); letra “b” indica diferença ($p>0,05$); Os desvios padrão estão representados no gráfico por barras.

A figura 36 apresenta o Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis sobre a intensidade de sabor. Pôde-se observar que o pH e o tempo de reação foram as variáveis que mais influenciaram na intensificação do sabor, apresentando diferença significativa a 95% de confiança.

Figura 36: Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis manipuladas sobre a intensidade de sabor utilizando as médias das respostas dos provadores – Enzima Comercial.

As superfícies de resposta mostram que a maximização da intensidade de sabor quando utilizando a enzima comercial é obtida operando-se no nível -1 para temperatura, +1 para o tempo e nível -1 para o pH. Na figura 37 observa-se que a intensidade de sabor é aumentada conforme o pH se aproxima do nível -1 e o tempo do nível +1. Em relação a interação pH e temperatura, é observado na figura 38 que a intensidade do sabor é aumentada conforme a temperatura e o pH se aproximam do nível negativo. Na figura 39, observa-se que uma melhor resposta é obtida quando a temperatura de reação diminui e o tempo de reação aumenta.

Figura 37: Superfície de resposta dos efeitos de pH e tempo para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 38: Superfície de resposta dos efeitos de pH e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Figura 39: Superfície de resposta dos efeitos de tempo e temperatura para intensidade de sabor – Enzima Comercial. Resposta intensidade de odor segundo a escala de intensidade (1 = extremamente mais intenso que P; 5 = não há diferença entre P e amostra quanto a intensidade de aroma; 9 = extremamente menos intenso que P).

Portanto, a amostra escolhida como a de odor e sabor mais intenso dentro das condições avaliadas nesse planejamento fatorial, e selecionada para compor o teste de preferência foi a amostra 3, que foi obtida trabalhando em temperatura de 40°C, tempo de 24 h e pH 5,0. Não foi possível alcançar a otimização desse processo nas condições avaliadas devido as limitações dos parâmetros avaliados em relação a atividade enzimática.

Na tabela 30 são apresentadas as médias de odor e sabor obtidas para amostras obtidas quando utilizado o extrato enzimático bruto e a enzima comercial, para comparação.

Tabela 30: Médias de odor e sabor obtidas para amostras obtidas quando utilizado o extrato enzimático bruto e a enzima comercial.

Amostra	Odor – Extrato Enzimático Bruto	Sabor – Extrato Enzimático Bruto	Odor – Enzima Comercial	Sabor – Enzima Comercial
padrão	5.167	5.167	4.903	4.889
1	4.125 ^a	4.125 ^a	5.792	4.292 ^a
2	4.542 ^a	4.542 ^a	5.750	4.292 ^a
3	4.167 ^a	4.167 ^a	4.750	3.208 ^b
4	3.208 ^b	3.208 ^b	4.250	3.833 ^a
5	5.125 ^a	5.125 ^a	5.000	5.042 ^a
6	4.292 ^a	4.292 ^a	5.583	4.792 ^a
7	5.083 ^a	5.083 ^a	5.083	3.917 ^a
8	4.958 ^a	4.958 ^a	5.333	4.708 ^a
9	3.833 ^a	3.833 ^a	4.917	4.708 ^a
10	4.375 ^a	4.375 ^a	4.625	4.542 ^a
11	4.375 ^a	4.375 ^a	4.708	3.958 ^a
12	4.667 ^a	4.667 ^a	5.042	4.500 ^a

Os resultados apresentados tanto para o planejamento experimental utilizando o extrato enzimático bruto como para a enzima comercial nos mostram que as características dessas enzimas com relação ao pH e ao tempo necessário de reação para se obter um aroma de queijo com odor e sabor mais intensos são semelhantes, diferindo apenas a temperatura de reação que para o extrato enzimático bruto foi 40°C e para a enzima comercial foi 50°C. Vale ressaltar que a grande maioria dos provadores classificaram as amostras de ambos os planejamentos como aroma de queijo parmesão, o que está de acordo com o esperado nos experimentos.

5.4.2.2 Teste de Preferência

Para o teste de preferência foram utilizadas a amostra 4 (temperatura de 40°C, tempo de 24 h e pH 5,0) para o processo industrial utilizando o extrato enzimático bruto, e 3 (temperatura de 50°C, tempo de 24 h e pH 5,0) para o processo industrial utilizando a enzima comercial, que foram as amostras que levaram a uma maior intensidade de aroma. Essas amostras também foram avaliadas quanto a preferência juntamente com a amostra resultante do aroma produzido e comercializado pela empresa. Os resultados foram avaliados estatisticamente com base na análise de Friedman (Tabela 31).

Tabela 31: Resultado do Teste de ordenação-preferência.

Amostra	Ordenação*
Mais preferido	
Condição 4 (temperatura = 40°C ; tempo de reação = 24 h ; pH = 5,0) do planejamento utilizando o Extrato Enzimático Bruto	97,0 ^a
Menos preferido	
Condição de processo utilizada pela empresa	74,0 ^b
Condição 3 (temperatura = 50°C ; tempo de reação = 24 h ; pH = 5,0) do planejamento utilizando a Enzima Comercial	69,0 ^b

*Resultados representam a soma total da pontuação dada pelos provadores, segundo a ordem de preferência (1 = menos preferida; 3 = mais preferida). Resultados com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O aroma da condição experimental 4, que utiliza o extrato enzimático bruto como catalisador na reação de formação de compostos aromáticos com notas de queijo, teve a maior preferência entre os provadores e diferiu significativamente das outras duas amostras avaliadas ($p < 0,05$).

O aroma da condição experimental 3 que utiliza a enzima comercial, apresentou média superior na escala de intensidade de sabor e odor em relação ao aroma padrão no teste de comparação múltipla, e não diferiu estatisticamente do padrão no teste de preferência, o que evidencia a necessidade de maiores estudos para se propor uma condição otimizada da obtenção do aroma de queijo, visto que a condição utilizada não é aquela que origina um aroma de maior intensidade de sabor e odor.

É importante notar que entre as três formulações avaliadas no teste de ordenação-preferência, a enzima produzida por *Penicillium roqueforti* em meio composto por 10 g/L extrato de levedura, 10 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L glicose, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L ácido oleico e 10 mL/L de óleo de oliva, e sem passar por processos de purificação, e portanto com um custo inferior, alcançou resultados satisfatório para produção de aroma natural de queijo, demonstrando apresentar características semelhantes ao aroma obtido quando utilizada a enzima comercial, e tida como a preferida entre os provadores.

6 CONCLUSÕES

Foi possível a síntese de lipase por *Penicillium roqueforti* nas condições avaliadas.

A composição do meio e a utilização do óleo de oliva tiveram uma influência positiva no crescimento do fungo, sendo o meio D+óleo o que apresentou um crescimento mais elevado. No entanto, estas diferentes taxas de crescimento celular não foram associadas a uma maior produção de lipase.

O fungo *Penicillium roqueforti* apresentou um desempenho razoável na produção da enzima, permitindo-se obter valor máximo de atividade lipolítica de 7,50 U/mL com 96 h de cultivo quando utilizado meio denominado H+óleo, composto por 10 g/L extrato de levedura, 10 g/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L glicose, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L ácido oleico e 10 mL/L de óleo de oliva, o qual apresentou ser o mais promissor na produção da enzima e foi o meio selecionado para prosseguir os testes de aplicação enzimática em processo industrial para obtenção de um aroma de queijo modificado e intensificado.

É interessante otimizar as condições de processo para que se obtenha uma maior produção de lipase, e selecionar um cepa de *P. roqueforti* que seja melhor produtora de lipase do que de protease, pois a lipólise representa o papel principal na produção de aroma em queijos enzimaticamente modificado, não deixando de também representar um importante fator a proteólise.

A enzima comercial Lipomod 187P utilizada no processo industrial refere-se a uma lipase fúngica. O perfil de eletroforese mostra que podem existir outras proteínas de massa molar mais baixa no preparado utilizado nos experimentos.

Nas avaliações sensoriais realizadas para avaliar os aromas obtidos nos planejamentos utilizando a enzima comercial e o extrato enzimático bruto, num primeiro teste realizado de comparação múltipla o extrato enzimático bruto mostrou-se satisfatório na produção de aroma de queijo, alcançando médias inferiores na escala de avaliação, portanto maior intensidade de odor e aroma quando comparado ao padrão. Nos experimentos utilizando a enzima comercial alcançou-se resultados semelhantes aos obtidos para o extrato enzimático bruto, demonstrando a necessidade de estudos posteriores para otimizar o processo e produzir um aroma com sabor e odor intensificados sem com isso gerar maior custo ao processo.

No teste de preferência a amostra que utilizou o extrato enzimático bruto como catalisador foi a preferida pelos provadores, ficando evidente sua potencialidade na produção e utilização desse extrato enzimático na obtenção de aroma de queijo. O extrato enzimático bruto utilizado no processo industrial levou a formação de aroma característico de queijo parmesão, ocorrendo uma modificação desejada do tipo de queijo e da intensidade de aroma. O processo é adequado na obtenção de um aroma de qualidade, e pode ser classificado como natural, atendendo as exigências e preferências das indústrias e consumidores.

O planejamento experimental combinado à enzimologia é uma ferramenta muito útil para a indústria de alimentos. Neste caso, além de gerar um aroma mais adequado, gera também uma economia de gastos para empresa, mostrando que as variáveis analisadas devem ser revistas para que se realize o processo em outras condições diferentes das estabelecidas em formulação utilizada pela indústria.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO – ABIQ. **Queijos:** queijos no Brasil. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 2 de julho de 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas:** terminologia. 1993. p. 8.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. NBR 13170: Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.
- ADITIVOS & INGREDIENTES. **Aromas naturais:** importância, variações. Estrutura e aceitação, n. 59, nov./dez. 2008. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/88.pdf>. Acesso em: 5 de julho de 2009.
- ALFENAS, A. C.; PETUS, I.; BRUNE, W.; PASSADOS, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: SIF, p. 242., 1991.
- ARCTANDER, S. **Perfume and flavor chemical.** 1. New Jersey: Steffen Arctander, publisher, 1969.
- ARMSTRONG, D. W.; GILLIES, B.; YAMAZAKI, H. Natural Flavors Produced by Biotechnological Processing. In: TERANISHI, R.; BUTTERY, R. G.; SHAHIDI, F. **Flavor Chemistry – Trends and Developments.** Washington, DC: American Chemical Society, 1989. p. 105-120. (ACS Symposium Series 388).
- ASTON, J. W.; DULLEY, J. R. Cheddar cheese flavour. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 37, p. 59-64, 1982.
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA JR., G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, p. 361-365, 2007.
- BAKALOR, S. Research related to the manufacture of blue veined cheese. Part 1. **Dairy Sei. Abstr.**, v. 24, p. 529-535, 1962.
- BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase Catalyzed Modification of Milkfat. **Biotechnol. Adv.**, v. 16, p. 309, 1998.
- BANKS, W. Milk fat production. In: RAJAH, K. K.; BURGESS, K. J. Editors. **Milk fat: production, technology and utilization.** Cambridgeshire: Society of Dairy Technology, 1991, p. 1-8.
- BARBIERI, G.; BOLZONI, L.; CARERI, M.; MANGIA, A.; PAROLARI, G.; SPAGNOLI, S.; VIRGILI, R. Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1170-1176, 1994.

BERGER, R. et al. **Biotransformations in the flavour industry**. Current Topics in Flavours and Fragrances. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1999.

BOELEN, M. H.; BOELEN, H.; VAN GEMERT, L. J. **Perfumer Flavorist**, v. 18, p. 2–16, 1993.

BOYSEN, M.; SKOUBOE, P.; FRISVAD, J.; ROSSEN, L. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. **Microbiology**, v. 142, p. 541-549, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. Resolução RDC n.2, de 15 de janeiro de 2007. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25812&word=>>>. Acesso em: 11 jun. 2009.

BUENO, T. **Obtenção de concentrado de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2005.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614, 2005.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n.5, p. 544, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHEETHAM, P. S. J. Combining the technical push and the business pull for natural flavours. In: SCHEPER, T.; BERGER, R. G. **Biotechnology of Aroma Compounds**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.v. 55, p. 1–49.

CHIAPPINI, C. C. de J. Aromas naturais produzidos por microorganismos. **Food Ingredients Brasil**, São Paulo, v. 10, 2008. p. 22.

CHICH, J. F.; MARCHESSEAU, K.; GRIPON, J. C. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purification and characterization. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 169–174, 1997.

CHRISTIE, W. W. The composition and structure of milk lipids. In: FOX, P. F. **Developments in dairy chemistry**. v. 2. Applied Science Publishers, London, 1983. p. 1–35.

CHRISTIE, W. W. Composition and structure of milk lipids. In FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. London: Chapman & Hall, 1995. v. 2, p. 1–36.

CHOISY, M. et al. Le phénomènes microbiologiques et enzymatiques et la biochimie de l'affinage. **Le Fromage**, Paris, p. 62–100, 1984.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, 2006.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H; WILKINSON, M. G. Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 105-113, 2003.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

DEETH, H.C.; TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 153–168, 2000.

DEIVE, F. J.; COSTAS, M.; LONGO, M. A. Production of a thermostable lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1403-1404, 2003.

DIRINCK, P.; de WINNE, A. Flavour characterisation of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. **Journal of Chromatography**, p. 203-208, 1999.

DO NGOC, M.; LENOIR, J.; CHOISY, C. Les acides aminés libres des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. **Rev. Lait.**, v. 288, p. 447-462, 1971.

EITENMILLER, R. R.; VAKIL, J. R.; SHAHANI, K.M (a) (1970). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v.1, p. 262-265.

EITENMILLER, R. R.; VAKIL, J. R.; SHAHANI, K.M. (b) Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. **Journal of Food Science**, v. 35, p. 130-133, 1970.

EL-GENDY, S. M.; MARTH, E. H. (1980) In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v. 1, p. 261.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RANAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.; ADINARAYANA, K. Production of by immobilized cells *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

ENGELS, W. J. M.; DEKKER, R.; de JONG, C.; NEETER, R.; VISSER, S. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 255-263, 1997.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**. 4 ed. Berlin: Springer-Verlag, 2000.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE, 2002. p. 30-34.

FAWZI, E. M. Purification and characterization of the pectin lyase and protease produced by *Penicillium velutinum* grown on *Eichhornia crassipes* under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 59, n.4, p. 755-761, 2009.

FENAROLI, G. **Fenaroli's handbook of flavor ingredients**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 2.

FERNANDEZ-SALGUEIRO, J.; MARCOS, A.; ALCALA, M.; ESTEBAN, M. A. Proteolysis of cabrales cheese and other European blue cheese varieties. **Journal of Dairy Research**, v.55, n.1, p.141-145, 1988.

FERREIRA, V. L. P. et al. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000. p. 1-6. (Manual: Série Qualidade).

FOX, P. F. Cheese: an overview. In: _____. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 1-37.

FOX, P. F.; LAW, J.; MCSWEENEY, P. L. H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1993. v. 1, p. 389-438.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M.; MORGAN, S.; LYNCH, C. M.; NILAND, E. J.; TOBIN, J. Acceleration of cheese ripening. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2-4, p. 271-297, 1996.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 1998. p. 587.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. Fresh acid-curd cheese varieties. In: _____. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, 2000. p. 363-387.

FRANSSEN, M. C. R.; ALESSANDRINI, L.; TERRANEO, G. Biocatalytic production of flavors and fragrances. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n.1, p. 273-279, 2005.

FREIRE, D. M. G.; TELES, E. M. F.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 409-421, 1997.

FURTADO, M.M.; CHANDAN, R.C. Efeito do teor de gordura na maturação de um queijo por *Penicillium caseicolum*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.38, n.225, p.19- 22, jan./fev. 1983.

GATFIELD, I. L. Generation of Flavor and Aroma Components by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. **Biogeneration of Aromas**. Washington, DC: American Chemical Society, 1986. p. 310-322. (ACS Symposium Series 317).

GATFIELD, I.; HAARMANN & REIMER GmbH. Enzymatic and Microbial Generation of Flavors. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, n. 5, p. 5-14, 1995.

GOMBERT, A. K.; LOPES, A.; CASTILHO, L. R. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Proc. Biochem.**, v. 35, p. 85-90, 1999.

GREUTER, W. et al. **International Code of Botanical Nomenclature**. Königstein: Koeltz Scientific Books (Saint Louis Code), 2000. p. 474.

GRIPON, J. C.; DEBEST, B. (1976). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v. 1, p. 265-270.

HA, J. K.; LINDSAY, R. C. Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. **Journal of Dairy Science**, v. 76, 1993, p. 677-690.

HARALDSSON, G. G. The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. **Marine Lipids Biotechnology**, p. 337, 1991.

HEMME, D.; BOUILLANNE, C.; METRO, F.; DESMAZEAUD, M. J. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. **Sci. Aliments**, v. 2, p. 113-123, 1982.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p.155-170, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Análise Sensorial. In:_____. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. cap. 6, p. 281 – 318.

ISOBE, K.; NOKIHARA, K. Physiochemical properties of mono and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii*. In: ALBERGHINA, L.; SCHMID, R. D.; VERGER, R. **Lipases: structure, mechanism and generic engineering**. Weinheim: VCH, v. 16, 1991. p. 339-344. (GBF monographs).

ISOBE, K.; AKIBA, T.; YAMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 52, p. 41-47, 1988.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **EMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech.**, v.16, p. 396-403, 1998.

JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; CLARK, R. M. Determination of lipase specificity. **Lipids**, v.18, n. 3, p. 239–252, 1983.

JENSEN, R. G.; FERRIS, A. M.; LAMMI-KEEFE, C. J. The composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3228-3243, 1991.

JOHNSON-GREEN, P. In: _____. **Introduction to food biotechnology**. New York: CRC Press LLC, 2002. p. 293.

JOLLY, R.C.; KOSIKOWSKI, F.V. Flavour development in pasteurized milk blue cheese by animal and microbial lipase preparations. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 846-921, 1975.

JOO, H.; CHANG, C. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. In: REHM, H. J.; STADER, P. **A Multi-volume comprehensive treatise biotechnology**, v. 8A, p. 38, 1998.

KILCAWLEY, K. N., 1998. In: REINECCIUS, G. **Flavor chemistry and technology**. Flavoring Materials Made by Processing – Enzyme-Modified Cheese (EMC). 2nd ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2006. p. 279-282.

KING R., CLEGG, G. H. The metabolism of fatty acids, methyl ketones and secondary alcohols by *Penicillium roqueforti* in blue cheese slurries. **J. Sci. Food. Agric.**, v. 30, p. 197-202, 1979.

KINSELLA, J. E.; HWANG, D. H. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. Cornell University, Ithaca, New York. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8, p. 191-228, 1976.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KOSUGI, Y.; KAMIBAYSHI, I. **Biotechnol. Lett.**, v. 10, p. 199-204, 1971.

KRINGS, U.; ABRAHAM, B.; BERGER, R. Plant Impact Volatiles from Higher Fungi: A Biotechnological Perspective. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, n. 5, p. 79-86, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBERET G., MENASSA, A. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti*. **J. Dairy Res.**, v. 50, p. 459-468, 1983.

LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. New York: VCH Publishers, 1996. p. 431.

LEFFINGWELL AND ASSOCIATES. **2005 – 2009 Flavor & Fragrance Leaders**. Disponível em: <http://www.leffingwell.com.br/top_10.htm>. Acesso em: 22 de março de 2010.

LIANGHUA, T.; LIMING, X.; HUAYING, G. Purification and Application of a Lipase from *Penicillium expansum* PED-03. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 142, p. 194-199, 2007.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 4, p.225-253.

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

LOBYREVA, L. B.; MARCHENKOVA, A. I. (1980). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v.1, p. 262-265.

LUGAY, J. C. Biogenesis of Aromas: An Industrial Perspective. In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. **Biogenesis of Aromas**. Washington, DC: American Chemical Society, 1986. p. 11-17. (ACS Symposium Series 317).

MACEDO, G. **Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico**. 1997. 143f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MARQUES, D. B. **Produção e caracterização de aromas de frutas por *Pichia membranaefaciens***. 1998. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochem.**, v. 38, p. 715, 2002.

MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; AKIBA, T. Purification and Characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 Lipase. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, 1995. p. 329-330.

MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; AKIBA, T. Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium* sp. YM-30. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, p. 1771-1772, 1995.

McSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Le Lait**, v. 80, p. 293-324, 2000.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory Evaluation Techniques. 2nd ed., Florida: CRC Press, 1991. p. 354.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory evaluation techniques. 3rd ed., Boca Raton: CRC, 1999. p. 390.

MEINHART, E.; SCHREIER, P. In: MAARSE, H.; VISSCHER, C. A. **Volatile compounds in food**: qualitative and quantitative data. The Netherlands: TNO-CIVO Food Analysis Institute, 1986. v. 1, p.568-372.

MENASSA, A.; LAMBERET, G. (1982). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v. 1, p. 262-265.

MODLER, H. W.; BRUNNER, J. R.; STINE, M. Extracellular Protease of *Penicillium roqueforti*. II. Characterization of a Purified Enzyme Preparation. **Journal of Dairy Science**. v. 37, n. 5, p. 528 – 534, 1974.

MOIO, L.; DEKIMPE, J.; ETIEVANT, P. X.; ADDEO, F. Volatile flavour compounds of water buffalo Mozzarella cheese. **Italian Journal of Food Science**, v. 5, p. 57-68, 1993.

MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 1998.

MORRIS, H. A.; JEZESKI, J. J. The action of microorganisms on fats. II. Some characteristics of the lipase system of *Penicillium roqueforti*. **J. Dairy Sci.**, v. 36, p. 1285, 1973.

MOSKOWITZ, G. J.; NOELCK, S. S. Enzyme-modified cheese technology. **J. Dairy Sci.**, v. 70, p. 1761-1769, 1987.

MOLIMARD, P.; SPINNLER, H. E. Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 169-184, 1996.

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

NIKI, T.; YOSHIOKA, Y.; AHILO, K. Proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium roqueforti* isolated from Blue Cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 17, 1966. Munich, Brussels. **Proceedings...** p. 531–537.

OBA, T.; WILTHOLT, B. Interesterification of milk fat with oleic acid catalysed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1790-1797, 1994.

PACHIONE, R. Aroma - Setor investe em novos sabores e cresce à razão de 5% ao ano. **Química e Derivados**, n. 42, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd424/aromas1.htm>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

PALEKAR, A. A.; VASUDEVAN, P. T., YAN, S. Purification of Lipase: a review. **Biocatalysis Biotransformation**. v. 18, p. 177-200, 2000.

PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v.1.

POKORNY, D.; FREDERICH, J.; CIMERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Letters**, v. 16, p. 363-366, 1994.

QIAN, M.; REINECCIUS, G.(a) Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1362-1369, 2002.

QIAN, M.; REINECCIUS, G.(b) Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 252-259, 2002.

RAMPIM, M. A. **Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)**. 2007. 263f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP, Campus de Ribeirão Preto, SP, 2007.

REINECCIUS, G. **Flavor chemistry and technology**. 2nd ed. Florida: Taylor & Francis Group, 2006. p. 131-191.

RIBEIRO, E. P.; W. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v.4, p.225-253.

SALVADORI, P.; BIANCHI, B.; CAVALLI, V. Study on the action of amino acids on penicillia used in making blue-veined cheese. **Lait**, v. 44, p. 129, 1964.

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

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNA, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. **Trends Biotechnol.** v. 23, p. 193-198, 2005.

SHIPE JR., W. F. A study of the relative specificity of lipase produced by *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus niger*. **Arch Biochem**, v. 30, p. 165-179, 1951.

SOARES, C. M. F.; de CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; de MORAES, F. F. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 77/ 79, p. 745-756, 1999.

STEPANIAK et al. (1980). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v. 1, p. 262-265.

STÖCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. **Biochem. Biophys.** v. 1168, p. 181, 1993.

SZTAJER, H.; ERDMANN, H.; ISOBE, K.; MORELLE, G.; SCHMID, R. Production and some properties of partially purified lipase from *Penicillium simplicissimum*. In:

ALBERGHINA, L., SCHMID, R. D., VERGER, R. **Lipases**: structure, mechanism and generic engineering. Weinheim: VCH, 1991, v. 16, p. 339-344.

TAN, S.; APENTEN, R. K. O. Low temperature organic phase biocatalysis using psychrotroph derived lipase. In: BIOFLAVOUR 95, Dijon. **Lectures and posters**. Paris: INRA Editions, 1995. v. 1. p. 361.

URBACH, G. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, p. 79–89, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Usda National Nutrient Database for Standard Reference**, 22, 2009. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>>. Acesso em: 15 de julho de 2010.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, RS, 2004.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

VULFSON, E. N. Industrial applications of lipases. In WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases**: their structure, biochemistry and application. Great Britain: Cambridge University Press, 1994, p. 271.

WILLIS, W. M.; MARAGONI, A. G. Biotechnological strategies for the modification of food lipids. **Biotechnology Genetic Engineering Review**, v. 16, p. 141-175, 1999.

WOO, A. H.; KOLLODGE, S.; LINDSAY, R. C. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. **Journal Dairy Science**, v. 67, p. 874-878, 1984.

WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. In: _____. **Lipases**: their structure, biochemistry and application. Great Britain: Cambridge University Press, 1994. p. 243.

WOLSKI, E.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; de OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 60–66, 2009.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, p. 438, 1998.

ZEVACO, C.; HERMIER, J.; GRIPON, J. C. (1973). In: PEBERDY, F. **Biotechnology handbooks: *Penicillium* and *Acremonium***. University of Nottingham, England. London: Plenum Press, 1987. v. 1, p. 265-270.

ZHU, H. Y.; TIAN, Y.; HOU, Y. H.; WANG, T. H. Purification and characterization of the cold-actice alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. **Molecular Biology Reports**. v. 36, n.8, p. 2169-2174, 2008.

ANEXO A – Especificação Técnica de *P. roqueforti* PV LYO 10 D fornecido pela Danisco.

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Página1 / 2

First you add knowledge...

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 206684-12.0PT

Código do material 13930073

P. roqueforti PV LYO 10 D

Descrição

Cultura liofilizada para inoculação direta em leite

Dosagens

Produto Dose
queijos azuis
queijos de mofo branco 1 - 2 dosagem / 1000 l de leite

As quantidades de inoculação indicadas devem ser consideradas como diretrizes. Culturas de suplemento devem ser requisitadas dependendo da tecnologia, teor de gordura e propriedades desejadas do produto.

Nós não nos responsabilizamos em caso de aplicação indevida.

Instruções de uso

Rehidrate a cultura sob condições assépticas (10 - 15 h antes do uso, dispersar em 250 ml de água esterilizada (garrafa de 500 ml) e completar até 500 ml; esta solução pode ser armazenada refrigerada por no máximo 3 dias) e adicionar ao leite antes da coagulação.

Composição

Penicillium roqueforti

Propriedades

P. roqueforti PV LYO 10 D é um fermento blue mould de rápido crescimento com elevada atividade proteolítica e lipolítica e extremamente tolerante a sais. Queijos produzidos com *P. roqueforti* PV LYO 10 D apresentam uma coloração azul-esverdeada escura e intensa e marmorizada em seu interior. As propriedades características são: aroma picante e uma boa consistência cremosa. Perda de umidade pode ocorrer assim como a tendência a apresentar sabor amargo.

P. roqueforti PV LYO 10 D pode ser usado para fabricação de queijos azuis com Roquefort e Gorgonzola.

Especificações microbiológicas

Controle de qualidade microbiológico - valores e métodos padrão [UM-]

Teste da cultura:

Contagem de células $\geq 2.0 \times 10^9$ / dose [UM-305]

bactérias totais	< 200 / g [UM-035]
enterobacteriaceae	< 1 / g [UM-031]
enterococci	< 10 / g [UM-033]
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1 / g [UM-034]
leveduras	< 10 / g [UM-017]
outros mofos (Malt Extract + CuSO ₄ + Czapek-Dox)	< 10 / g [UM-306]
<i>Bacillus cereus</i> *	< 10 / g [UM-041]
<i>salmonella</i> *	neg. / 25 g [UM-038]
<i>listeria</i> *	neg. / 25 g [UM-039]

contagem de células germinativas ≥ 30 %

[UM-317]

Controle de qualidade físico-químico - valores padrão e métodos [UT-]

humidade ≤ 3.0 % [UT-020]

* não necessariamente examinada em cada lote, mas assegurada por sistema APPCC também pela planta e higiene pessoal.

Estocagem

18 meses a partir da data de produção a ≤ -18 °C

Embalagem

PE, PET, Folha laminada de alumínio

Pureza e legislação

P. roqueforti PV LYO 10 D está de acordo com as especificações estabelecidas pela legislação da UE.

Legislação local em relação ao status do produto deve ser sempre consultada já que pode haver variações com relação ao uso em alimento dependendo do país.

As informações contidas nesta publicação baseiam-se em nosso próprio trabalho de pesquisa e de desenvolvimento e são de nossa total confiança. Entretanto, os usuários devem realizar seus próprios testes para determinar a adequação de nossos produtos a seus fins específicos e as situações jurídicas de uso do produto. As declarações aqui contidas não devem ser consideradas como garantia de qualquer tipo, expressa ou implícita, e não assumimos nenhuma responsabilidade legal pela infração de qualquer patente.

ANEXO B – Especificação Técnica da Enzima Comercial Lipomod 187P fornecida pela
Biocatalysts

Lipomod™ 187P - L187P

- Mixed fungal esterase
- EMC production
- Cheddar type flavour notes
- Protease free
- Vegetarian and kosher products

Lipases and esterases hydrolyse triglycerides to liberate fatty acids. These fatty acids have strong flavour characteristics and are responsible for the flavours associated with cheese products.

These enzymes are widespread throughout nature and have different degrees of activity to varying substrate triglycerides. For Enzyme Modified Cheese (EMC) they can be used to produce concentrated specific flavours.

DATA SHEET FLAVOUR

Lipomod™ 187P is a mixed fungal esterase. Commonly EMC is produced using enzymes of animal origin hence this fungal product is well placed in the market as an animal free alternative to these enzymes.

Products made using this esterase can be sold to vegetarian and kosher markets. A cheddar type flavour EMC is produced using this enzyme.

S P E C I F I C A T I O N	
Activity	11 000 Esterase units/gram
Biological Source	Blend including <i>Penicillium roqueforti</i>
Form	Off white powder
Working pH	6 - 7
Temperature range	40 - 50°C

sheet no: 001/2
issue date: 05:06:05

BIOCATALYSTS LIMITED Cefn Coed, Parc Nantgarw, CF15 7QQ, Wales, UK.
 Tel: +44 (0)1443 843712 Fax: +44 (0)1443 846500
 Email: sales@biocats.com www.biocatalysts.com