

**GECERNIR COLEN**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES**

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2006**

**GECERNIR COLEN**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS  
FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

**Faculdade de Farmácia da UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2006**

Dedico este trabalho aos meus familiares com os quais compartilhei momentos de alegria e de ansiedade.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida;  
ao Professor doutor Tasso Moraes e Santos, pela orientação deste trabalho;  
ao Professor doutor Roberto Gonçalves Junqueira, pela coorientação deste trabalho;  
à Professora Débora Torres Mendes de Oliveira, pela colaboração e amizade;  
aos alunos de iniciação científica que, em algum momento, ao colaborarem na execução de parte do projeto de pesquisa, com interesse e dedicação, revigoravam no interior do meu ser, o sentido da perseverança, do entusiasmo e da percepção do trabalho em equipe;  
aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos , pela contribuição em minha formação acadêmica;  
aos colegas professores da Faculdade de Farmácia da UFMG o meu agradecimento sincero pelo incentivo constante;  
aos colegas do curso de pós-graduação pelo incentivo e pelo companheirismo;  
a todos, que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não há lugar de parada nesta vida nem jamais houve um lugar de parada para qualquer homem, por maior que tenha sido sua caminhada. Antes de tudo, estejais, então, sempre prontos para receber os dons de Deus, e sempre prontos para receber os novos dons”

Johanes Eckart (1260-1327)

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
<b>1 Natureza e origem das enzimas com aplicações práticas .....</b>	<b>23</b>
<b>2 Esterases .....</b>	<b>25</b>
<b>3 Lipases de animais .....</b>	<b>28</b>
<b>4 Lipases de plantas .....</b>	<b>28</b>
<b>5 Lipases de bactérias .....</b>	<b>29</b>
<b>6 Lipases de leveduras .....</b>	<b>31</b>
<b>7 Exoenzimas fúngicas .....</b>	<b>31</b>
<b>8 Lipases de fungos filamentosos .....</b>	<b>33</b>
<b>9 Cutinases .....</b>	<b>34</b>
<b>10 Crescimento e fisiologia dos fungos .....</b>	<b>36</b>
<b>10.1 Aeração .....</b>	<b>37</b>
<b>10.2 Fontes de carbono .....</b>	<b>38</b>
<b>10.3 Fontes de nitrogênio .....</b>	<b>38</b>
<b>10.4 Relação carbono / nitrogênio .....</b>	<b>39</b>
<b>10.5 Outros nutrientes .....</b>	<b>39</b>
<b>10.6 Potencial de água .....</b>	<b>39</b>
<b>10.7 pH .....</b>	<b>40</b>
<b>10.8 Temperatura .....</b>	<b>40</b>
<b>11 Características dos microrganismos usados em processos fermentativos .....</b>	<b>41</b>

<b>12 Produção de lipases de fungos filamentosos .....</b>	<b>42</b>
12.1 <i>Geotrichum candidum</i> .....	43
12.2 <i>Penicillium spp</i> .....	44
12.3 <i>Aspergillus spp</i> .....	46
12.4 Fungos inferiores .....	49
12.5 Fungos patogênicos de plantas .....	50
12.6 Fungos patogênicos de insetos (entomopatógenos) .....	51
12.7 Outros fungos .....	52
<b>13 Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase .....</b>	<b>53</b>
13.1 Detecção de microrganismos lipolíticos .....	55
13.2 Determinação da atividade lipolítica presente em preparações brutas de lipase pela difusão em gel de ágar .....	59
13.3 Ensaio enzimático para determinação da atividade lipolítica .....	60
13.4 Isolamento e seleção propriamente ditos .....	62
<b>CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMA EXTRACELULAR COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM pH ALCALINO .....</b>	<b>66</b>
<b>I.1 ENSAIOS PRELIMINARES: DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA EM PLACA PARA DETECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS LIPOLÍTICOS .....</b>	<b>67</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>67</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>68</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
2.1 Material .....	70

<b>2.2 Fontes de microrganismos e manutenção de culturas .....</b>	<b>70</b>
<b>2.3 Condições de cultivo .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1 Meios de cultura em placa .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1.1 Meio basal (Meio M) .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1.2 Meio C .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1.3 Meio W .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1.4 Meio com sais biliares (Meio WS) .....</b>	<b>71</b>
<b>2.3.1.5 Meio com azul Vitória B (Meio WV) .....</b>	<b>72</b>
<b>2.3.2 pH inicial .....</b>	<b>72</b>
<b>2.4 Inoculação e incubação .....</b>	<b>72</b>
<b>2.5 Crescimento fúngico e detecção de linhagens fúngicas lipolíticas .....</b>	<b>72</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>I.2 ISOLAMENTO, SELEÇÃO PRIMÁRIA E SELEÇÃO SECUNDÁRIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASE EXTRACELULAR ATIVA EM pH ALCALINO .....</b>	<b>82</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>82</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>82</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>85</b>
<b>2.2 Métodos .....</b>	<b>86</b>
<b>2.2.1 Microorganismos .....</b>	<b>86</b>
<b>2.2.2 Isolamento de fungos filamentosos produtores de lipase .....</b>	<b>86</b>
<b>2.2.3 Seleção primária .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.4 Seleção secundária .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.4.1 Preparação do inóculo .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.4.2 Fermentação em substrato líquido (FSL) .....</b>	<b>87</b>
<b>2.2.4.3 Fermentação em substrato sólido (FSS) .....</b>	<b>88</b>



2.2.5 Detecção da atividade lipásica .....	88
2.2.5.1 Ensaio em placa de Petri (difusão em gel) .....	88
2.2.5.2 Método titulométrico .....	89
2.2.6 Detecção da atividade proteolítica .....	90
2.2.7 Produção de lipase .....	90
2.2.8 Produção de lipase e protease em meio de cultura com baixas concentrações de peptona e óleo de oliva .....	91
2.2.9 Hidrólise de óleos e gorduras naturais pela preparação bruta de lipase de <i>C. gloesporioides</i> .....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	91
4. CONCLUSÕES .....	98

<b>CAPÍTULO II – ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DE UMA LINHAGEM DE <i>Colletotrichum gloesporioides</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR ATIVA EM pH ALCALINO .....</b>	<b>99</b>
--	-----------

<b>II.1 ENSAIOS PRELIMINARES: IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES IMPORTANTES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR DE <i>C. gloesporioides</i> EM CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS AGITADOS .....</b>	<b>100</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>100</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>101</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>104</b>
2.1 Material .....	104
2.2 Métodos .....	104
2.2.1 Microrganismo .....	104
2.2.2. Meios de cultura .....	104

2.2.3 Preparar do inóculo .....	105
2.2.4 Cultivos submersos .....	106
2.2.5 Metodologias analíticas .....	106
2.2.5.1 Determinação da atividade lipásica .....	106
2.2.5.1.1 Atividade lipásica pela difusão da enzima e formação de halo de lipólise em gel de ágar ágar .....	106
2.2.5.1.2 Dosagem pelo método titulométrico .....	107
2.2.5.2 Determinação da atividade proteolítica .....	107
2.2.5.3 Perfil peptídico das peptonas .....	107
2.2.5.4 Análise estatística .....	107
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	108

II.2 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, QUANTO AOS FATORES ÓLEO DE OLIVA, PEPTONA E pH INICIAL DO CULTIVO, VISANDO A PRODUÇÃO MÁXIMA DE LIPASE EXTRACELULAR, ATIVA EM pH ALCALINO, PELO FUNGO <i>C. gloesporioides</i> .....	121
RESUMO .....	121
ABSTRACT .....	122
1 INTRODUÇÃO .....	123
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	125
2.1 Material .....	125
2.2 Métodos .....	126
2.2.1 Microrganismo .....	126
2.2.2 Meios de cultura .....	126
2.2.3 Delineamento experimental e Metodologia da Superfície de Resposta .....	126
2.2.4 Preparo do inóculo .....	128
2.2.5 Cultivos submersos .....	128
2.2.6 Determinação da atividade lipásica .....	128

2.2.6.1 Dosagem pelo método titulométrico .....	128
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	129
CONCLUSÕES INTEGRADAS .....	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	145
APÊNDICES .....	161
APÊNDICE A – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.5 .....	162
APÊNDICE B – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.6 .....	164
APÊNDICE C – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.7 .....	166
APÊNDICE D – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.9 .....	168
APÊNDICE E – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.10 .....	170
APÊNDICE F – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.11 .....	172
APÊNDICE G – MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.19 .....	176
APÊNDICE H – DESCRIÇÃO “PASSO A PASSO” DOS “ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO-----“ DO CAPÍTULO II“ .....	177
APÊNDICE I – TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (EM 23/12/2005) NO PERIÓDICO “ <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> “ .....	187

<b>ANEXOS .....</b>	<b>201</b>
<b>ANEXO A – ANÁLISE DOS EFEITOS POR MEIO DE GRÁFICOS NORMAIS .....</b>	<b>202</b>
<b>ANEXO B – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS (EM g/100g) DOS ÓLEOS VEGETAIS .....</b>	<b>205</b>
<b>ANEXO C – COMPOSIÇÃO DAS PEPTONAS SEGUNDO FABRICANTES .....</b>	<b>206</b>

## LISTA DE TABELAS

I.1	Influência da forma de dispersão do óleo de oliva como fonte principal de Carbono em meio de cultura em placa sobre o crescimento fúngico e sobre a produção da atividade lipolítica .....	74
I.2	Efeito de sais biliares adicionados ao meio W tamponado em pH alcalino sobre o crescimento fúngico e sobre a detecção da atividade lipolítica .....	76
I.3	Efeito de sais biliares adicionados ao meio W não tamponado com pH inicial neutro sobre o crescimento fúngico e sobre a formação da atividade lipolítica .....	77
I.4	Efeito do pH inicial de meios de cultura contendo óleo de oliva (10,0 g/L) e sais biliares (2,0 g/L) sobre o crescimento fúngico e sobre a formação de halo lipolítico .....	78
I.5	Efeito do corante azul Vitória B adicionado ao meio W no pH 7,0 sobre o crescimento fúngico e sobre a formação de lipase .....	80
I.6	Seleção primária de cepas fúngicas produtoras de lipase .....	92
I.7	Seleção secundária de fungos produtores de lipase em condições de fermentação em substrato líquido e fermentação em substrato sólido .....	94
I.8	Parâmetros fermentativos do cultivo submerso de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> em frascos sob agitação .....	95
II.1	Efeito da composição de sais inorgânicos do meio de cultura usado para cultivo submerso de <i>C. gloesporioides</i> em frascos sob agitação sobre a produção de lipase .....	108
II.2	Produção de lipase pelo fungo <i>C. gloesporioides</i> cultivado em meio de cultura formulado com sais de VOGEL contendo óleo de oliva e sem peptona, em função do tempo de cultivo .....	109
II.3	Produção de lipase pelo fungo <i>C. gloesporioides</i> cultivado em meio de cultura com sais de VOGEL adicionado de óleo de oliva (8,0 g/L) e de peptona (10,0 g/L) .....	110

II.4	Produção de lipase pelo fungo <i>C. gloesporioides</i> cultivado em meio de cultura com sais inorgânicos segundo SALLEH, contendo óleo de oliva e sem peptona, em função do tempo de cultivo .....	111
II.5	Efeito da combinação de diferentes concentrações de peptona bacteriológica e de óleo de oliva sobre a produção de lipase pelo fungo <i>C. gloesporioides</i> em cultivo submerso em frascos sob agitação .....	113
II.6	Efeito do pH inicial do cultivo de <i>C. gloesporioides</i> sobre a produção de lipase em frascos sob agitação .....	114
II.7	Efeito do tipo de peptona empregada como fonte nitrogenada na formulação de meio de cultura líquido para a produção de lipase pelo <i>C. gloesporioides</i> , em frascos sob agitação .....	115
II.8	Perfil peptídico das peptonas bacteriológicas A e B .....	116
II.9	Efeito do tipo de óleo vegetal como fonte de C em meio de cultura líquido sobre a produção de lipase pelo <i>C. gloesporioides</i> , em frascos sob agitação .....	117
II.10	Efeito do Tween 80 e do glicerol, em substituição do óleo vegetal, como fonte de C principal, em cultivo submerso, sobre a produção de lipase pelo <i>C. gloesporioides</i> , em frascos sob agitação .....	118
II.11	Efeito do tipo de inóculo sobre o crescimento de <i>C. gloesporioides</i> e produção de lipase, em cultivo submerso, em frascos sob agitação, em função do tempo de cultivo .....	120
II.12	Especificação dos níveis para cada fator (variável) .....	126
II.13	Matriz (X) do planejamento $2^3$ com a combinação dos fatores peptona bacteriológica (Fator A), óleo de oliva (Fator B) e pH (Fator C) .....	127
II.14	Matriz de planejamento $2^3$ com ponto central e correspondentes resultados experimentais. Delineamento de primeira ordem .....	129
II.15	Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes .....	130
II.16	Correspondência entre os efeitos dos fatores, segundo o planejamento $2^3$ , e os valores de probabilidade acumulada .....	133

<b>II.17</b>	<b>Análise sobre a influência da concentração de óleo de oliva, da concentração de peptona e do pH inicial sobre a produção de lipase extracelular por <i>C. glosesporioides</i> .....</b>	<b>135</b>
<b>II.18</b>	<b>Valores experimentais e valores estimados de produção de lipase pela cepa de <i>C. glosesporioides</i> .....</b>	<b>138</b>
<b>II.19</b>	<b>ANOVA para o modelo ajustado .....</b>	<b>137</b>

## LISTA DE FIGURAS

I.1	Características do crescimento do fungo <i>Rhizopus boulard</i> NRRL 1891 cultivado em meio W (sem sais biliares) com ausência de halo lipolítico.....	75
I.2	Aspecto de colônias isoladas da cepa # 41 ( <i>Colletotrichum gloesporioides</i> ) cultivada em meio W no pH 7,0, adicionado de sais biliares (2,0 g/L), com seus respectivos halos lipolíticos.....	79
I.3	Aspecto dos halos lipolíticos da cepa # 41 ( <i>Colletotrichum gloesporioides</i> ) cultivada em meio W no pH 7,0 adicionado de corante azul Vitória B (1,0 mg/L).....	79
I.4	Produção de lipase e protease em cultivo submerso de <i>C. gloesporioides</i> crescido em meio de cultura com baixas concentrações de peptona e óleo de oliva .....	97
I.5	Hidrólise relativa de diferentes substratos lipídicos pela enzima bruta de <i>C. gloesporioides</i> .....	98
II.1	Representação gráfica de um planejamento fatorial de duas variáveis e dois níveis com ponto central .....	124
II.2	Efeito das combinações de concentrações de óleo de oliva e de peptona sobre os valores médios de produção de lipase .....	131
II.3	Figura geométrica básica que representa os efeitos calculados de um planejamento fatorial $2^3$ .....	132
II.4	Gráfico de probabilidade Normal dos efeitos padronizados .....	134
II.5	Curvas de nível do plano descrito pela equação $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$ .....	138



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC – American Type Culture Collection

FSL – Fermentação em Substrato Líquido

FSS – Fermentação em Substrato Sólido

GBF – Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbh

GRAS – Generally Regarded as Safe

IF – Institute of Fermentation

IMI – International Mycological Institute

UAMH – University of Alberta Microfungus Collection and Herbaria

## RESUMO

Os estudos sobre a produção de substâncias de origem microbiana são realizados a partir de cepas adquiridas de coleções de cultura ou cepas isoladas de nichos naturais. No presente estudo foi avaliada a capacidade de produção de lipase por 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de cultura e 59 isoladas de amostras do solo do cerrado de Minas Gerais, com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. O isolamento e seleção primária foram realizados em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva, sais biliares e nutrientes. As colônias lipolíticas foram detectadas pela presença no meio opaco de uma zona clara ao redor delas. Vinte e uma cepas foram avaliadas como produtoras em potencial e a capacidade de produção determinada em condições de cultivo submerso e cultivo em estado sólido (seleção secundária). Apenas 7 delas foram selecionadas como boas produtoras. A cepa melhor produtora, identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, produziu 27.700 U/L de lipase, empregando-se inóculo vegetativo, com cultivo submerso em frascos agitados a 150 rpm e 30 °C, durante 96 h, em meio de cultura basal contendo peptona bacteriológica (20,0 g/L), óleo de oliva (8,0 mL/L) e sais inorgânicos, no pH 7,0. A preparação bruta da enzima foi capaz de hidrolisar amplo espectro de substratos incluindo gordura de porco (banha), óleos vegetais e tributirina. Foram realizados estudos visando a determinação das melhores condições para a produção da lipase pelo *C. gloesporioides*. Inicialmente foram identificados os fatores (variáveis) mais importantes, tendo sido, em seguida, selecionados como significativos a peptona bacteriológica, o óleo de oliva e o pH inicial do meio de cultura. Os estudos para a determinação das condições otimizadas para a produção da lipase foram realizados aplicando-se a metodologia de superfícies de respostas, com o emprego de um planejamento fatorial  $2^3$  com cinco pontos centrais. Foi demonstrado que o modelo estatístico linear que indicou a variação da produção da enzima em função da concentração da peptona (na faixa de 10 a 30 g/L), do óleo de oliva (na faixa de 4-16 mL/L) e do pH (na faixa de 6-7) foi representado pela equação ajustada  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$ , sendo simplificada para  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$ , devido ao efeito do pH e das possíveis interações entre os efeitos não serem significativos. Desse modo, foi verificado que a representação bidimensional da superfície de resposta do referido modelo foi um plano inclinado

obliquamente em relação aos eixos cartesianos com direção descendente indo da direita para a esquerda. Concluiu-se que, para serem conseguidos maiores rendimentos de produção, devia-se deslocar a região experimental para menores valores de  $x_1$  (peptona) e de  $x_2$  (óleo de oliva). Seguindo essa orientação conseguiu-se que a cepa fúngica produzisse cerca de 36.000 U/L de lipase extracelular que se mostrou bastante ativa em pH alcalino.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloesporioides*; fungos lipolíticos; lipase; produção; seleção.

## ABSTRACT

The microorganisms used to produce substances are strains obtained from culture collections or are isolated from natural niches. This work analyzed the extracellular lipase production by 73 strains of filamentous fungi, 14 of them from culture collections and 59 isolated from savanna soil samples of the Minas Gerais state, Brazil. Isolation and primary screening were made with selective enrichment techniques, using agar culture medium containing olive oil emulsion, mineral salts and bile salts. Twenty-one strains were selected as potential producers and their production capacity were evaluated in culture conditions of liquid substrate fermentation and solid-state fermentation. Only seven good lipase producers were selected. The best producing fungus, a *Colletotrichum gloesporioides* strain, produced 27,700 U/L of extracellular lipase, under submerge culture, in Erlenmeyers flasks with agitation (150 rpm), at 30 °C, with 96 hours of incubation. The culture medium (pH 7.0) contained olive oil (8.0 mL/L), peptone (20.0 g/L) and inorganic salts. The crude lipase preparation was able to hydrolyze a broad range of substrates, including lard, natural oils and tributyrin. Experimental assays were realized to determine the best production conditions. The optimization of combined effect of olive oil, peptone and initial pH on extracellular lipase production was studied by Response Surface Methodology (RSM). It was employed a factorial design ( $2^3$ ) with five central points: three factors (olive oil, peptone and initial pH) with five replicates of the central points. It was concluded that the olive oil (range concentration of 4.0 to 10.0 mL/L) was more significant than peptone (range concentration of 10.0 – 30.0 g/L) and that the initial pH (range 6.0 to 7.0) had little influence on the lipase production. It was obtained the fitted first-order model  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$ . The equation was simplified for  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$ , because the effect of pH and the effects of interactions between the factors were not significative. The equation describes a geometric plane and explains the relationship between the factors in the intervals studied. As a consequence, the direction of the steep ascent, perpendicular to the contour lines, should be obtained by decreasing olive oil and peptone concentrations, in the basal medium. In this direction the fungi produced about 37,000 U/L of extracellular lipase with significative alkaline pH activity.

Keywords: *Colletotrichum gloesporioides*, lipase; lipolytic-producing fungi; screening

## INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas que têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação. A enzima, uma vez elaborada, poderá atuar independentemente da célula que a produziu, mesmo “in vitro”, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados.

As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas nos processos industriais. As lipases, em particular, têm sido as enzimas com maior potencial de emprego tanto em pesquisas científicas quanto em processos tecnológicos devido a algumas características relacionadas com estabilidade, com seletividade e com especificidade por substrato.

Apesar de as lipases poderem ser obtidas de animais, de vegetais e de microorganismos, os últimos as produzem amplamente diversificadas, nas suas propriedades enzimáticas e especificidade pelo substrato, e em grandes quantidades, o que facilita bastante o seu emprego em processos industriais.

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Essa diversidade tem propiciado ao homem explorar racionalmente algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, sejam capazes de produzir substâncias ou capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais. Os fungos têm sido reconhecidos como as melhores fontes de lipases e, ultimamente, várias patentes envolvendo aplicação de lipases fúngicas têm sido requeridas.

A descoberta de linhagens microbianas potencialmente interessantes está fundamentada na capacidade de adaptação dos microorganismos aos diversos ambientes – quanto maior for a variedade de ambientes aos quais estiverem adaptados, em decorrência da complexidade química do mundo que os envolve, maior será a chance de existir linhagens produtoras de alguma substância de interesse.

A linhagem microbiana é, dentre vários fatores, o mais importante para o sucesso ou fracasso de um processo fermentativo. Ela deve apresentar bom rendimento de produção, ser de fácil cultivo, de fácil manutenção e manter constância fisiológica.

A enorme potencialidade de aplicação das lipases e as características diferenciadas destas enzimas, variável entre microrganismos e mesmo entre espécies, justificam a procura por novas linhagens produtoras bem como a caracterização da enzima produzida.

O presente estudo teve como objetivo geral isolar e selecionar fungos filamentosos lipolíticos bem como avaliar a capacidade de produção (em bancada) de lipase extracelular das cepas isoladas e selecionadas e, também, em conjunto, de algumas cepas adquiridas de coleções de cultura. Para se atingir este objetivo usou-se como estratégia desenvolver as seguintes ações: 1. desenvolver um meio de cultura adequado para detecção eficiente de colônias de fungos com halo lipolítico; 2. isolar fungos filamentosos a partir de amostras de terra; 3. efetuar a seleção primária das cepas fúngicas isoladas e de cepas de coleções de cultura, empregando o meio de cultura a ser desenvolvido (item 1); 4. efetuar a seleção secundária das cepas com potencial produtor de lipase, em condições de fermentação em substrato líquido e de fermentação em substrato sólido; 5. avaliar a produção de lipase extracelular pela cepa de maior potencial, identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, em condições de fermentação em substrato líquido desenvolvida em frascos Erlenmeyer sob agitação.

Esta tese foi estruturada em dois capítulos, com a disposição seguinte:

Capítulo 1- Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de Enzima extracelular com atividade lipolítica em pH alcalino:

- Ensaio preliminares: desenvolvimento de meio de cultura em placa para detecção de fungos filamentosos lipolíticos
- Isolamento, seleção primária e seleção secundária de fungos filamentosos produtores de lipase extracelular ativa em pH alcalino

Capítulo 2 – Estudos sobre as condições de cultivo submerso de uma cepa de *C. gloesporioides* sobre a produção de lipase extracelular ativa em pH alcalino

- Ensaio preliminares: identificação dos fatores (variáveis) importantes que influenciam a produção de lipase pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*
- Estudo de diferentes condições de cultivo visando a produção máxima de lipase.
- Estudos de otimização das condições experimentais quanto aos fatores óleo de oliva, peptona e pH inicial do cultivo visando a produção máxima de lipase extracelular, ativa em pH alcalino, pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*.

# REVISÃO DA LITERATURA

## 1 Natureza e origem das enzimas com aplicações práticas

As enzimas apresentam propriedades que tornam o seu uso altamente desejável como catalisadores. Elas são bastante ativas, versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação. Ao contrário dos catalisadores não enzimáticos que, em geral, têm ação ampla, as enzimas não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar a natureza do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do pH ou pela adição de algum efetor. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Conseqüentemente, os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO & PARK, 2003).

As transformações químicas em moléculas orgânicas, mediadas por microorganismos vivos ou catalisadas por enzimas de origem microbiana, são alternativas de grande potencial de aplicação na indústria de alimentos (GADEN, 1985; STEAD, 1986; YAMADA & SHIMIZU, 1988; WELSH & WILLIAMS, 1989; WASSERMAN, 1990; WHITAKER, 1990; DZIEZAK, 1991; VULFSON, 1993; JAMES & SIMPSON, 1996), na indústria farmacêutica e na área de química fina (ZAKS *et al.*, 1988; KIRK *et al.*, 2002; PIZARRO & PARK, 2003).

As enzimas que hidrolisam polissacarídeos e proteínas são requeridas pela indústria em grandes quantidades. Elas não são usadas geralmente puras e podem ser comercializadas em preparações em que a enzima constitui 5% ou menos do material sólido. As enzimas sob a forma de preparações brutas, pouco purificadas, são, em geral, produzidas em grandes quantidades e vendidas com preços relativamente baixos, devendo apresentar, portanto, baixos custos de produção. As enzimas “finas”, mais purificadas, entretanto, são mais caras, pois são produzidas em pequenas quantidades, com custos de produção maiores. Em geral, as primeiras são empregadas em operações de manufatura e as últimas em programas de pesquisas bioquímicas, farmacêuticas ou médicas. A finalidade de uso, portanto, determina o grau de pureza com o qual a enzima deve ser produzida (GOLDSTEIN, 1987).

O uso prático das enzimas tem sido explorado pelo ser humano há milhares de anos de forma direta via emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. Por outro lado, a produção e uso de enzimas de origem microbiana, sob uma forma controlada, apesar de serem relativamente recentes constituem, hoje, o maior setor da indústria biotecnológica (NEIDLEMAN, 1991).

O estágio atual da indústria de enzimas é resultante de um rápido desenvolvimento acontecido inicialmente nas quatro décadas passadas, graças à evolução da moderna biotecnologia. O desenvolvimento dos processos fermentativos, acontecido no final do último século, concentrou-se especificamente na produção de enzimas pelo uso de linhagens microbianas produtoras selecionadas. Isso tem permitido a obtenção de enzimas bastante purificadas e preparações bem caracterizadas mesmo quando produzidas em larga escala. Isso aliado ao uso da tecnologia do DNA recombinante impulsionou os processos de manufatura permitindo a comercialização de enzimas que até então não eram produzidas. Enfim, mais recentemente, a introdução da engenharia de proteínas e da técnica da evolução direta tem revolucionado o desenvolvimento do setor de enzimas industriais. Estes avanços têm possibilitado a produção de enzimas sob medida, apresentando atividades novas e adaptadas às novas condições de processo, o que tem provocado a expansão de seus usos industriais (KIRK *et al.*, 2002).

As enzimas de origem vegetal de interesse são, principalmente, proteases tais como papaína (extraída do látex do fruto verde do mamão - *Carica papaya*); bromelina (extraída do pedúnculo do abacaxi - *Ananas comosus* Merr.); ficina (extraída do látex da figueira – *Ficus carica*) e o malte (variedade de enzimas originárias da germinação de cereais).

Dentre as enzimas de origem animal, têm importância a pancreatina (uma mistura de enzimas e extraída do pâncreas de suínos); a tripsina e quimiotripsina (extraídas do pâncreas de suínos) a pepsina (extraída da mucosa do estômago de suínos); a renina ou coalho (extraída do quarto estômago de bezerros); e a catalase (extraída do fígado e sangue de animais, bem como de microorganismos) (LIMA *et al.*, 2001).

As enzimas microbianas produzidas comercialmente são provenientes de bactérias e de fungos (filamentosos e leveduras), sendo na sua maioria extracelulares, da classe das hidrolases. Em termos de volume de produção, as enzimas de



importância comercial são:  $\alpha$  amilases (*Bacillus licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*); glicoamilase (*Aspergillus niger*); proteases alcalinas e neutras (*B. licheniformis* e *B. subtilis*); proteases ácidas (*A. niger*; *Mucor mihei*; *M. pusillus*; *Endotia parasitica*);  $\beta$  glicanase (*A. niger* e *B. subtilis*); celulases (*Trichoderma viride*) e pectinases, entre outras (OLSON *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1994).

As lipases (EC 3.1.1.3) ocorrem amplamente na natureza, sendo encontradas tanto em microorganismos (bactérias e fungos) como em animais e vegetais (OLSON *et al.*, 1994). A ação dessas enzimas, além da natural importância para a fisiologia do organismo produtor, apresenta aspectos aplicados importantes. É bem conhecido o papel das lipases como fator de virulência em infecções de origem microbiana, e a sua aplicação em processos biotecnológicos tem aumentado a cada dia. O principal motivo para o interesse crescente nas lipases é a versatilidade biotecnológica dessas enzimas, devido à sua capacidade para, dependendo das condições da reação que catalisa, realizar hidrólise ou síntese de ésteres - reações já conhecidas há cerca de 70 anos (JAEGER *et al.*, 1994).

Tanto pelas razões técnicas como econômicas, as enzimas microbianas têm tido sua importância cada vez mais aumentada. No caso das enzimas vegetais, há necessidade de grande quantidade de plantas para se obter a quantidade necessária da enzima de interesse. Muitas vezes, isso se torna inviável como consequência do alto custo da terra e custos operacionais, situação que, provavelmente sofrerá mudanças com o emprego das plantas transgênicas. As enzimas de origem animal são subprodutos das indústrias de carne, cujo suprimento é limitado, principalmente, para atendimento a uma demanda súbita, em grande escala.

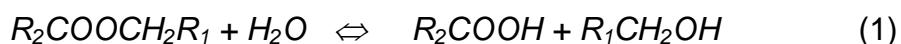
As enzimas microbianas, entretanto, não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento. Além disso, a diversidade das enzimas microbianas é enorme, tendo aumentado a cada dia, devido à descoberta de novas enzimas e novas aplicações.

## **2 Esterases**

As esterases (EC 3.1.1. X) representam um grupo diversificado de hidrolases que catalisam a quebra e a formação da ligação éster, com potencial aplicação, nas áreas da agricultura, de alimentos e da indústria farmacêutica (PANDA & GOWRISHANKAR, 2005). Estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas nos animais, nas plantas e nos microrganismos. Como muitas delas são ativas sobre uma gama de substratos, supõe-se que elas facilitem o acesso de organismos às fontes de

carbono participando de seu catabolismo. Apresentam alta especificidade espacial e/ou regional, propriedade que as tornam atrativas como biocatalisadores para a obtenção de compostos óticamente puros em reações de síntese da química fina (JAEGER & REETZ, 1998). Lipases (EC 3.1.1.1, triacilglicerol hidrolases) e as esterases “verdadeiras” (EC 3.1.1.3, carboxil ester hidrolases) são as duas maiores classes dessas hidrolases e apresentam as mesmas estruturas tridimensionais - dobra característica  $\alpha/\beta$  das hidrolases. Apesar de apresentarem a mesma tríade catalítica das serino-hidrolases e o mecanismo de hidrólise, ou formação de éster, ser essencialmente iguais, as lipases diferem das hidrolases pelo fenômeno da ativação interfacial que é observado apenas com as lipases (BORNSCHEUER, 2002).

As lipases, portanto, são mais bem definidas como carboxiesterases que catalisam tanto a hidrólise como a síntese de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER *et al.*, 1999). São enzimas largamente presentes na natureza, sendo encontradas em animais, vegetais e microorganismos. Elas pertencem à classe das serino hidrolases, e, ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de cofatores para que possam atuar. A função biológica das lipases é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres, di e mono-acilgliceróis e glicerol, segundo a reação geral:



Em condições de reação com baixo teor de água, *in vitro*, entretanto, catalisam a reação de esterificação, levando à formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol. A hidrólise de gorduras e óleos, portanto, é direcionada pelo conteúdo de água da mistura de reação, de modo tal que num ambiente não aquoso a lipase catalisa a síntese do éster (NAKAMURA *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 1988; CERNIA & PALOCCI, 1997).

*In vitro*, as reações de síntese com lipases podem ser com síntese comum de éster a partir de glicerol e ácidos graxos e reações de transesterificação que são mais importantes para processos biotecnológicos, nos quais o doador do grupo acila é um éster. As reações de transesterificações de gorduras e óleos, dependendo do tipo de acceptor do grupo acila, são denominadas glicerólise (glicerol como acceptor) ou alcoólise (alcoól como acceptor). Nas interesterificações o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster. A interesterificação exige uma pequena quantidade de água além daquela necessária para a enzima manter-se num estado hidratado ativo. Como a

presença de muita água diminui a síntese de éster, o conteúdo de água pode ser controlado cuidadosamente para controlar a quantidade desejada dos produtos formados (OKOMURA *et al.*, 1984).

As lipases catalisam, portanto, em determinadas condições, reações de síntese, sendo algumas delas mostradas abaixo:

### **Esterificação**



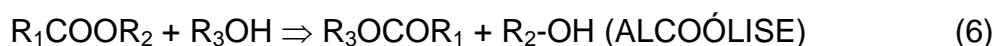
### **Hidrólise**



### **Interesterificação**



### **Transesterificação**



Pela escolha correta da enzima e do substrato, tais reações podem ser fortemente influenciadas por estereoisomeria e, pela modificação das condições de reação, pode-se alterar o equilíbrio termodinâmico em favor da direção de síntese (WELSH & WILLIAMS, 1989). O mecanismo da reação é similar para todas as reações mediadas por hidrolases. É formado um complexo acil-enzima, seguida da subsequente liberação dos produtos finais. O tipo da reação é definido empregando-se os parâmetros que asseguram que tais reações ocorram, como seleção de solvente, hidratação da enzima, tempo de reação, concentração do substrato, tamanho do substrato e sua estrutura química (PARK & PASTORE, 1989; ROBERTS *et al.*, 1995; ARCOS & OTERO, 1996; PERSSON *et al.*, 2002).

As lipases extracelulares são produzidas por muitos microrganismos quando em condições favoráveis, tendo sido estudadas por quatro grandes motivos. São eles: as lipases de bactérias patogênicas tais como *Corynebacteria acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Leptospira pomona* e *Mycoplasma spp* estão implicadas na etiologia de doenças infecciosas; as lipases bacterianas desempenham importante papel no meio ambiente, pois hidrolisam gorduras presentes no esgoto doméstico; as lipases, produzidas por bactérias psicrófilas contaminantes de alimentos, participam da deterioração de produtos lácteos (e outros); e, lipases, principalmente de fungos, têm sido usadas pela indústria de alimentos e outras, devido às diversificadas

especificidades por substratos (STEAD, 1986; JAEGER *et al.*, 1994; SHARMA *et al.*, 2001). As lipases microbianas comumente diferem entre si nas suas propriedades moleculares e catalíticas.

As lipases são esterases cuja ação sobre triglicerídeos é fortemente aumentada na interface lipídio-água. Este fenômeno, conhecido como ativação interfacial, tem sido explicado pelo fato de que a estrutura da molécula da enzima possui uma tampa hidrofóbica, permanentemente apoiada sobre o sítio catalítico na ausência de substrato. Quando se liga ao substrato ou inibidor, esta tampa é deslocada e, provavelmente, interage com a matriz lipídica.

### **3 Lipases de animais**

Nos mamíferos, as lipases são classificadas quanto ao local principal onde ocorre a ação lipolítica bem como quanto à especificidade por substrato: lipases que são liberadas pelos órgãos específicos e que atuam dentro do trato intestinal; lipases que atuam nos tecidos; e, lipases que são excretadas no leite.

A lipase mais usada industrialmente é extraída de homogenatos de pâncreas de porco por solventes orgânicos à baixa temperatura (pancreatina), sendo a maioria das preparações contaminadas com colipase, uma proteína que ativa a lipase pancreática *in vivo*. Entretanto, a propriedade da colipase de apresentar afinidade pelos sais minerais e pelas superfícies apolares tem permitido a obtenção de preparações livres da colipase (TAIPA *et al.*, 1992). Por outro lado, os extratos pancreáticos além de apresentarem outras atividades enzimáticas, além da lipolítica, como a atividade amilolítica e proteolítica (esta, devido à tripsina e à quimotripsina), mostram grande variação dessas atividades (RIBET *et al.*, 1979).

As lipases são encontradas, também, em diversos tecidos ou órgãos de mamíferos tais como coração, cérebro, músculo, artérias, rins, baço, pulmão, fígado, tecido adiposo e sangue (soro), em geral, como lipoproteínas. Peixes e invertebrados também contêm lipases (TAIPA *et al.*, 1992).

No leite, além de outras esterases, as lipases também estão presentes, fato de importância sob o aspecto tecnológico visto que a hidrólise da gordura endógena interfere no aroma do leite e derivados (TAIPA *et al.*, 1992).

### **4 Lipases de plantas**

Apesar de a atividade lipolítica ter sido comprovada em vários tecidos vegetais (do trigo, da aveia, do milho e frutos da palmeira), poucos estudos de distribuição por

toda a planta têm sido realizados, tendo sido mais bem estudado, apenas nas sementes e frutos. As sementes contêm usualmente uma quantidade considerável de triacilgliceróis que após hidrólise pelas lipases a ácidos graxos e glicerol são convertidos em açúcares que suportam o crescimento da planta. As sementes oleaginosas em germinação têm sido bastante estudadas como fontes de lipases, por exemplo, nos cotilédones de colza (*Brassica napus*), mostarda (*Sinapsis alba*), tremoço (*Lupinus alba*), amendoim (*Arachis hypogoea*) e soja (*Glycine max*) (HILLS & MURPHY, 1988).

## 5 Lipases de bactérias

As lipases foram detectadas há mais de um século em bactérias, então agrupadas como parte do gênero *Bacillus* (*B. prodigiosus*, *B. pyocyaneus* e *B. fluorescens*) e hoje estão identificadas como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (JAEGER *et al.*, 1994).

A maioria das bactérias que têm sido empregadas para a produção de lipases e aquelas que têm sido empregadas na clonagem de genes não são patogênicas e, portanto, poderiam vir a serem aplicadas em algum processo biotecnológico. Entretanto, o emprego de lipases com alto grau de pureza, bem como o uso em transformação de substratos não naturais, tem propiciado o emprêgo de linhagens patogênicas.

Sabe-se que em algumas bactérias patogênicas as lipases são conhecidas pela importância que apresentam no desenvolvimento de algumas doenças, tendo, em alguns casos, grande importância como fator de virulência. Assim acontece na patogênese da acne vulgaris pela *Propionibacterium acnes*. Estafilococos são conhecidos causadores de uma variedade de infecções como abscessos profundos e superficiais, endocardite, meningite, infecção de ferimentos e septicemia, além de estarem envolvidos em intoxicação alimentar e na síndrome do choque tóxico. Algumas enzimas extracelulares de *S. aureus* têm sido implicadas no processo patogênico, especialmente coagulase, proteases, nucleases, exotoxinas pirogênicas, hemolisinas, além de uma lipase (ROLLOF *et al.*, 1988). O patógeno produtor de lipase mais importante é, provavelmente, a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria oportunista causa uma variedade de doenças infecciosas em pacientes imunodeprimidos/imunocompromissados, como aqueles que sofrem de câncer, ferimentos de queimadura, ou fibrose cística, em que as infecções de pulmão provocadas por esta bactéria são, em geral, apontadas como *causa mortis* (JAEGER *et al.*, 1991). Têm sido

encontradas poucas linhagens produtoras de lipase pertencentes ao gênero *Streptomyces* (SZTAJER & MALISWESKA, 1988; LARGE *et al.*, 1999), mas é conhecido que várias espécies de *Nocardia* são boas produtoras desta enzima (NESBIT & GUNASEKARAN, 1993). Têm sido isoladas, também, várias linhagens produtoras do gênero *Acinetobacter* a partir de várias fontes (BREUIL & KUSHNER, 1975).

As lipases de aplicações comerciais são predominantemente de origem fúngica. Talvez isso se explique pelo fato de que, culturalmente, a maioria das aplicações das lipases se dê na área de alimentos, na qual se empregam fungos considerados GRAS (“Generally Regarded As Safe”). Em decorrência do aumento do uso de lipases em outras áreas, entretanto, tem aumentado o emprego das lipases bacterianas em processos biotecnológicos, mesmo sendo originária de um patógeno. Atualmente sabe-se que diversas espécies bacterianas são produtoras de lipases, sendo as mais importantes do ponto de vista industrial bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* e *Pseudomonas*, sobressaindo-se esta última (WATANABE *et al.*, 1977; JAEGER *et al.*, 1994; RATHI *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2004; VARGAS *et al.*, 2004). Em detergentes, vários produtos comerciais têm na sua composição lipases bacterianas. Os produtos comerciais LUMAFast com lipase de *Pseudomonas putida* e LIPOMAX de *P. pseudoalcaligenes* são exemplos. No processamento de gorduras e óleos têm sido empregadas lipases de *Pseudomonas* em reações de hidrólise. Na produção de monoglicerídeos, usados como emulsificantes em diversos alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, altos rendimentos têm sido obtidos com lipases, também, de *Pseudomonas* (KOSUGI *et al.*, 1988; YAMAMOTO & FUJIWARA, 1998). Em síntese orgânica, as lipases bacterianas têm sido empregadas para obtenção de compostos óticamente ativos, principalmente na resolução de misturas racêmicas de ácidos carboxílicos ou álcoois como, por exemplo, lipases de *Arthrobacter* (MITSUDA *et al.*, 1988), de *Pseudomonas cepacia* (MARGOLIN, 1993) e de *Chromobacterium* (MARGOLIN *et al.*, 1987), entre outras.

Em geral as lipases são produzidas pelas bactérias como consequência do crescimento delas em meios de cultura que contêm lipídio com fonte de carbono (óleos vegetais, ácidos graxos, glicerol ou tensoativos como o Tween) e uma fonte orgânica de nitrogênio (LI *et al.* 2004; LI *et al.*, 2005). Apesar de as lipases bacterianas poderem atuar em ampla faixa de pH e temperatura, elas agem,

preferencialmente, em condições alcalinas (GUPTA *et al.*, 2004; DOMINGUEZ *et al.*, 2005).

## 6 Lipases de leveduras

O primeiro registro de uma levedura produtora de lipase (*Mycotorula lipolytica*) aconteceu na metade do século passado (PETERS & NELSON, 1948). Sabe-se, hoje, que a habilidade das leveduras para sintetizar lipase está limitada aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomyopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia*. Enquanto as lipases de muitas espécies de bactérias e fungos filamentosos são produzidas em grandes quantidades em escala industrial, apenas a lipase da levedura *Candida rugosa*, primeiramente nominada *C. cylindrica*, tem tido papel de destaque quanto às suas aplicações (HADEBALL, 1991).

A produção da lipase por *C. rugosa* pode ser induzida pela adição de ácidos graxos ao meio de cultura, como o ácido oléico. A lipase desta levedura é composta por várias isoformas que apresentam ligeiras diferenças nas suas propriedades catalíticas (OBRADORS *et al.*, 1993; SHARMA *et al.*, 2001; PUTHLI *et al.*, 2006).

Mais recentemente, tem sido demonstrado que as lipases de *Candida spp* apresentam excelente capacidade de esterificação, sem demonstrar especificidade posicional para os triglicerídeos, apresentando aplicação potencial para a síntese de ésteres de cadeia curta que podem ser usados como compostos flavorizantes ou aromatizantes ou como combustíveis na forma de biodiesel, neste caso como ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (NELSON *et al.*, 1996; FUKUDA *et al.*, 2001; LEE. *et al.*, 2002; TAN *et al.*, 2003; LARIOS *et al.*, 2004).

## 7 Exoenzimas fúngicas

A produção de exoenzimas é comum em muitas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais, pela expressão de genes e posterior secreção das enzimas formadas. Os fungos secretam uma grande variedade de enzimas extracelulares como proteases, amilases, pectinases, celulases, ligninases, xylanases, lipases e outras. A síntese destas enzimas está sujeita aos vários mecanismos regulatórios passíveis de indução e repressão, sendo a secreção direcionada por peptídeos sinal, que fazem parte da proteína a ser exportada, e que ao serem reconhecidos pela célula garantem a passagem através do canal exportador (ARCHER & WOOD, 1995). Esta característica permite aos fungos colonizar amplo espectro de tecidos vivos (como patógenos) ou mortos (como saprófitas) de plantas e

animais, produtos de madeira, papel e solos de composição diversa. Algumas dessas atividades enzimáticas, como a de esterase que está presente no complexo enzimático da cutinase, participam do processo da patogênese de alguns fungos, como no caso dos fitopatógenos na fase inicial de aderência e invasão do tecido vegetal (KÖLLER, 1991). Algumas enzimas extracelulares fúngicas são de grande importância comercial, principalmente na área de alimentos, como proteases ácidas, lipases, nucleases e carbohidrases, sendo poucas as enzimas intracelulares de importância. O gênero *Aspergillus* tem sobressaído como o fungo mais importante para a produção comercial de enzimas (CARLILE & WATKINSON, 1997). Os fungos filamentosos, especialmente as espécies *Aspergillus* e *Penicillium*, têm o “status” GRAS devido ao uso histórico na preparação e produção industrial de alimentos e bebidas tradicionais como queijos, miso, saquê, etc., bem como na produção industrial de enzimas. Mais recentemente, linhagens recombinantes de fungos filamentosos têm sido desenvolvidas para a produção de vários tipos de proteínas homólogas e heterólogas, devido à alta capacidade da célula fúngica em secretar proteínas (IWASHITA, 2002).

Os fungos filamentosos estão distribuídos amplamente na natureza onde, usualmente, crescem na superfície de materiais orgânicos. A evolução dos fungos superiores se deu com o seu desenvolvimento em substratos sólidos, nos quais a quantidade de água disponível é baixa.

A produção de enzimas fúngicas, em escala industrial no mundo ocidental, tem sido realizada pelo cultivo do fungo em meio de cultura líquido (fermentação submersa) como processo majoritário, provavelmente por ser tecnologicamente fácil de executar e controlar bem como apresentar rendimentos de produção considerados satisfatórios (SANT'ANNA Jr, 2001). No Japão, entretanto, tem-se utilizado a fermentação em substrato sólido para a produção não apenas de alimentos e bebidas tradicionais, mas, também, industrialmente, para a produção de enzimas fúngicas, procedimento mais compatível com o comportamento natural dos fungos. Os avanços tecnológicos que têm sido incorporados aos processos de fermentação em substrato sólido, como o aumento dos rendimentos de produção, têm, aos poucos, alterado o perfil da produção de substâncias de origem fúngica no ocidente.

De acordo com ACUNA–ARGUELES *et al.* (1995) e IWASHITA (2002) a diferença das condições entre os cultivos com os dois processos pode levar a modificações na expressão de vários genes que resulta na alteração de fenótipos importantes como crescimento, desenvolvimento, produção de enzimas e produção de metabólitos secundários, como micotoxinas, por exemplo.



Com o atual estado da arte, tem-se verificado que em pesquisa de bancada o processo de fermentação em substrato sólido (FSS) tem-se mostrado superior ao de fermentação em substrato líquido (FSL). O escalonamento até o nível industrial com este processo (FSS) tem, entretanto, dificuldades devido ao aparecimento de gradientes de temperatura, de pH, de O<sub>2</sub> livre, de substrato e de umidade no meio fermentativo, problemas que, para serem solucionados, requerem grandes esforços na área da engenharia. Em pesquisa de bancada a FSS apresenta vantagens biotecnológicas significativas: a fermentação apresenta maior produtividade; o produto final é formado em concentração mais alta e de maior estabilidade nos caldos fermentados; o processo é menos susceptível à repressão catabólica; o processo permite o emprego de cultivos com microrganismos adaptados à substratos insolúveis em água; há menor exigência pela esterilidade do meio de cultura devido à baixa atividade de água presente no substrato (HÖLKER *et al.*, 2004).

## **8 Lipases de fungos filamentosos**

Lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos quando estes são cultivados em condições apropriadas, sendo facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação. Apenas pequena quantidade de lipases tem sido encontrada dentro ou aderida ao micélio (SALLEH *et al.*, 1993; RAPP, 1995). Entre os fungos filamentosos a lipase, como outras enzimas extracelulares, também pode estar em formas múltiplas (JACOBSEN *et al.*, 1989b), sendo a sua formação dependente de características de cultivo tais como composição do meio de cultura, parâmetros físico-químicos, idade do cultivo e a presença de agentes indutores ou inibidores. AALBAEK *et al.* (2002) demonstraram que o aparecimento de múltiplas formas de glicoamilase em cultivos de *Aspergillus niger* era devido à ação de uma protease ácida também produzida pelo fungo. Apesar de a presença de enzimas, sob formas múltiplas, trazer benefícios para o microrganismo pois favorecem a adaptação e competição em ambientes naturais em mudança constante, a presença delas em preparações enzimáticas brutas dificulta o processo de purificação (OLIVEIRA, 2000).

O termo “formas múltiplas de enzimas”, segundo a CBN (Commission on Biochemical Nomenclature, da IUPAC-IUB), tem sido usado para a totalidade das proteínas que catalisam a mesma reação e que ocorrem naturalmente em espécie única, podendo apresentarem parâmetros cinéticos diferentes, características regulatórias diferentes ou diferente estabilidade. O termo “isoenzima” tem sido

empregado apenas para aquelas formas múltiplas de enzimas que resultam de diferenças determinadas geneticamente na estrutura primária (NAESSENS & VANDAMME, 2003). Há vários registros de formas múltiplas de lipases produzidas pelos microrganismos. Essa multiplicidade tem sido explicada pelo processamento pós-tradução, por proteólise parcial, por desglicolização ou pela síntese de diferentes lipases (isoenzimas).

Os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (CARDENAS *et al.*, 2001a). Grande número de lipases de fungos filamentosos tem sido estudado extensivamente sob os pontos de vista genético e bioquímico. As espécies melhores produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (STCKLEIN *et al.*, 1993). Apesar de o grande número de lipases fúngicas estar descrito na literatura, somente as enzimas de poucas espécies têm demonstrado possuir a estabilidade adequada e capacidade satisfatória de biocatálise para serem empregadas em reações de síntese nos laboratórios de química orgânica e, assim, serem consideradas de relevância à aplicação industrial (MARGOLIN, 1993).

As lipases fúngicas têm sido empregadas para o desenvolvimento de flavor de manteiga e de leite em produtos alimentícios diversos bem como o seu emprego tem sido recomendado para os processos de fabricação de queijo e iogurte. Em geral, as preparações enzimáticas empregadas são de grau técnico. Os produtos comerciais contêm, também, outras hidrolases, além das lipases, cujas atividades variam quantitativamente entre eles, o que causa problemas quanto ao uso adequado e controlado das lipases. Assim, faz-se necessário que o produto e as propriedades das atividades enzimáticas nele presentes sejam conhecidas para que sejam adequadamente usadas (HOFELMANN *et al.*, 1985).

## **9 Cutinases**

As paredes externas da epiderme das células vegetais são cobertas por uma camada contínua de material lipídico, denominado membrana cuticular ou, em sentido mais amplo, cutícula que fica anexada à parede celular por uma camada intermediária rica em pectina. Os dois componentes maiores da cutícula, de natureza lipídica, são uma mistura complexa de compostos alifáticos de cadeia longa (ceras) e um material polimérico, também insolúvel, denominado cutina. Os constituintes mais comuns da cera são hidrocarbonetos (29C e 31C), álcoois primários (26C e 28C), ácidos

alcanóicos (24C, 26C e 28C) e monoésteres (44C a 50C). Os monômeros despolarizados da cutina são formados primariamente de ácidos graxos com 16C e 18C e apresentam como característica um grupo hidroxila ligado na posição  $\omega$ - e, geralmente, uma segunda e terceira hidroxila na posição mediana da cadeia. As famílias com 16C e 18C são derivadas do ácido palmítico e do ácido oléico ou linoléico, respectivamente, por bioconversão mediada por um citocromo P450. No polímero da cutina, os monômeros dos ácidos graxos estão ligados por ligações éster, sendo, portanto, um poliéster. A função primária da cutícula hidrofóbica é atuar como barreira contra a difusão de água e nutrientes da planta e protegê-la dos efeitos adversos de substâncias químicas do ambiente bem como dos microrganismos. Entretanto, fitopatógenos como alguns fungos, os mais eficientes, são capazes de atravessar a superfície intacta da planta (KÖLLER, 1991).

O processo da patogênese dos fungos se inicia com a disseminação dos inóculos (propágulos) a partir de fontes como partes doentes de plantas, de restos de matéria orgânica (caso de o patógeno atuar também como saprófita), ou de estruturas de resistência (esclerócios, clamidosporos, etc.). Os propágulos, após serem depositados na superfície do hospedeiro, passam por uma série de transformações que resultam na germinação e formação do tubo germinativo, formando o promicélio (filamento bastante frágil). Em seguida, o promicélio penetra no hospedeiro de várias formas, de acordo com a espécie, seja através de aberturas naturais na superfície ou provocadas por agressões mecânicas ou mesmo através da superfície íntegra. Neste caso o promicélio adere à superfície por intermédio de uma estrutura de penetração – o apressório. Finalmente, ocorre a colonização que, também, pode se dar de várias formas, sendo que numa delas o micélio excreta enzimas, ácidos e toxinas que matam as células ao seu redor. O ciclo se fecha com o aparecimento dos sintomas da doença e com a reprodução do fungo (PUTZKE & PUTZKE, 2004).

Durante a penetração ocorre, portanto, a liberação de várias enzimas extracelulares tais como cutinases, pectinases, celulases e proteases (WALTON, 1994; MENDGEN *et al.*, 1996).

As cutinases têm sido detectadas em cultivos líquidos de vários fungos fitopatogênicos tais como: *Alternaria alternata*; *Botrytis cinerea*; *Cladosporium cucumerinum*; *Colletotricum sp (gloesporioides, graminicola)*; *Gloeocercospora sorghi*; *Helminthosporium (carbonum, maydis, sativum)*; *Fusarium (solani, roseum)*; *Pythium (aphanidermatum, arrhenomanes, ultimum)*; *Rhizoctonia solani*; *Stemphyllium loti*; *Sclerotium rolfsii*; *Ulocladium consortiale* e *Venturia inaequalis* (KÖLLER, 1991).

O gênero *Colletotricum* tem sido o fungo mais bem sucedido como fitopatógeno, sendo que várias espécies causam a doença conhecida como antracnose em diferentes vegetais tais como: - abacateiro (*Persea americana*); - algodoeiro (*Gossypium spp*); - alho / cebola (Liliaceae); - cacauzeiro (*Theobroma cacao*); - cana de açúcar (*Saccharella spp*); - citros (*Citrus spp*); - macieira (*Malus domestica*), etc. (MARTINEZ *et al.*, 1992; MOZAFFAR & WEETE, 1993; CRISTAKOPOULOS *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2000).

As cutinases são enzimas relativamente pequenas de massa molecular de 20.000 – 30.000 daltons, compostas de cadeia única de polipeptídeo. As cutinases de *Fusarium* e *Colletotricum* são glicoproteínas que apresentam cerca de 40% de homologia entre as suas seqüências sendo que na sua maioria isso ocorre na região em torno do centro ativo de resíduo da serina e uma das cisteínas envolvida em ponte dissulfeto (KÖLLER, 1991).

As cutinases diferem das lipases clássicas porque não exibem a ativação interfacial, sendo ativas tanto sobre triglicerídeos solúveis quanto sob a forma agregada em emulsão. Assim, talvez se encaixem como intermediários entre as lipases e as esterases (KÖLLER, 1991; MARTINEZ *et al.*, 1992; MARTINEZ *et al.*, 1994; NICOLAS *et al.*, 1996).

## **10 Crescimento e fisiologia dos fungos**

A fisiologia microbiana estuda as células vivas numa visão geral. Leva em consideração aspectos de crescimento, diferenciação celular, metabolismo geral e formação de produto, decorrentes da interação do microorganismo com o ambiente externo celular frente ao suprimento de nutrientes, temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio. Portanto, o crescimento microbiano e a resultante formação de produto ocorrem em resposta ao ambiente, ou seja, de modo interativo. Para entender o crescimento de microorganismos e a formação de produto microbiano é essencial, portanto, entender a relação entre a regulação do metabolismo microbiano e o ambiente a que a célula microbiana fica exposta. O microorganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos tanto de natureza física como química. Assim, em microbiologia industrial, é importante quantificar o crescimento microbiano e caracterizá-lo como resposta ao ambiente, procurando-se, sempre, obter a melhor resposta. Para isso, faz-se necessário desenvolver alguns princípios fundamentais para moldar o ambiente, com o objetivo de extrair a resposta desejada de crescimento e de formação de produto. Uma cepa de um microorganismo apropriado

com alto rendimento de produção é o requerimento primeiro para um processo fermentativo. Tendo esta cepa, geralmente obtida por procedimentos de seleção, é necessário obter o máximo de rendimento do produto pela seleção das condições ótimas de cultivo (SCHMIDT, 2005). Por outro lado, para cultivar um microorganismo é necessário empregar uma fonte de energia, disponibilizar nutrientes que forneçam materiais essenciais para a síntese de biomassa, evitar a presença de inibidores de crescimento, usar um inóculo viável e, submetê-lo às condições ambientais favoráveis. A formulação do meio de cultura atende aos três primeiros parâmetros e conjuntamente com as condições ambientais nas quais o microorganismo é cultivado, contribuem significativamente para a viabilidade do inóculo (DEMAIN, 1972). Assim, é necessário determinar as condições ambientais mais adequadas, sejam físicas, como a atividade de água e temperatura, sejam químicas, como o pH, a fonte de C e a fonte de N. Por isso, um dos fatores mais importantes para otimização de um processo fermentativo, com o objetivo de se obter a substância desejada em quantidade satisfatória, é a formulação do meio de cultura para que atenda, em primeira mão, o crescimento do microorganismo. Neste caso, o meio não deve apenas atender aos requerimentos nutricionais e ambientais do microorganismo, mas, também, às limitações de ordem técnica e econômica - no caso de processo industrial (COONEY, 1981).

Os fungos têm se diversificado ao longo do processo evolutivo em aproveitar uma ampla variedade de substratos e de habitats. Por isso, diferentes espécies requerem diferentes condições para um crescimento ótimo (CARLILE & WATKINSON, 1997; GRIMM *et al.*, 2005).

### **10.1 Aeração**

Os organismos podem obter energia pelo metabolismo oxidativo (respiratório) ou pela fermentação. Os fungos filamentosos, na sua quase totalidade, utilizam oxigênio como receptor final de elétrons para completar o processo respiratório. Há evidência, entretanto, de que sob baixa tensão de oxigênio alguns fungos podem fazer uso do íon nitrato com esta finalidade (neste caso há limitação devido à toxicidade do íon nítrito que se forma, que é tóxico). Além do papel do oxigênio para a geração de energia, ele também é usado pelo fungo para etapas metabólicas de biossíntese de esteróis, ácidos graxos insaturados e de algumas vitaminas e para a degradação de compostos aromáticos. O ar contém cerca de 21% de oxigênio. Assim, a maioria dos fungos cresce bem na superfície de meios de cultura. O

oxigênio apresenta, entretanto, uma baixa solubilidade em água e por isso difunde-se lentamente em fluidos não agitados ou materiais embebidos em água. Os fungos, sendo heterótrofos, obtêm energia pela decomposição de compostos orgânicos com formação de dióxido de carbono. Ao contrário dos autótrofos, não realizam fixação de dióxido de carbono e, apesar de necessitarem dele em importantes reações metabólicas (fixação heterotrófica do dióxido de carbono, em reações anapleróticas), o seu acúmulo é prejudicial. Tudo isso, associado à formação de outros gases ou compostos voláteis, compõe uma complexa troca de gases que, por isso, exige um sistema de aeração que favoreça o microorganismo. Tal condição pode ser obtida por um sistema de trocas gasosas, alcançada, por exemplo, por agitação vigorosa da massa líquida (no caso do cultivo submerso) (CARLILE & WATKINSON, 1997).

## **10.2 Fontes de carbono**

A maioria dos fungos utiliza glicose, mas muitos outros açúcares podem servir como fontes de carbono. A utilização de outros compostos orgânicos como fonte de C, que não sejam carboidratos, juntamente com a necessidade universal por açúcares para finalidades biossintéticas, indica a ocorrência de gliconeogênese nestes fungos. Fungos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que podem hidrolisar amido (amilases), celulose (celulases), lignina (lignase), quitina (quitinase), proteínas (proteases), entre outras, sendo a produção dependente da espécie fúngica e das condições de cultivo. Considerando que o ciclo dos ácidos tricarbóxicos está presente praticamente em todos os fungos, os intermediários do ciclo podem atuar como fonte de carbono para muitos deles. Para muitos fungos uma fonte exógena destes ácidos não consegue penetrar na célula, entretanto o ácido cítrico e ácido succínico podem ser utilizados por muitos deles. Outros ácidos orgânicos como os ácidos láctico, tartárico e acético e ácidos graxos de cadeia longa podem ser assimilados por alguns fungos. Os ácidos orgânicos são fornecidos como sais (de sódio, potássio ou amônio) para evitar que o meio se torne muito ácido. O glicerol é uma ótima fonte de C para muitos fungos. Alguns fungos produzem lipase extracelular que hidrolisa lipídios a glicerol e ácidos graxos, que podem ser assimilados. Apesar de os aminoácidos e proteínas serem usados principalmente como fonte de nitrogênio eles, também, podem atuar como fonte única de carbono por alguns fungos (CARLILE & WATKINSON, 1997).

## **10.3 Fontes de nitrogênio**

A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia em adição à utilização de grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados. A amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, é reprimida a utilização de outras fontes nitrogenadas como nitrato, aminoácido e proteína. Os aminoácidos e pequenos peptídeos obtidos de hidrolisados de proteínas (peptonas) podem ser transportados para dentro da célula. Peptídeos grandes e proteínas necessitam, antes, ser hidrolisados por enzimas extracelulares, as proteinases (CARLILE & WATKINSON, 1997).

#### **10.4 Relação carbono / nitrogênio**

Um meio balanceado poderá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (10:1). Uma relação de 10:1 ou menos garante um alto conteúdo protéico e uma relação muito maior, por exemplo, 50:1, favorece acumulação de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares. Por isso, a relação carbono/nitrogênio exige grande atenção durante o cultivo em processos fermentativos (CARLILE & WATKINSON, 1997).

#### **10.5 Outros nutrientes**

Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade porque participam da quase totalidade das substâncias celulares. Os três primeiros (C, H e O) são fornecidos na forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água e o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica). Os quatro elementos seguintes (S, P, Mg e K) são fornecidos ao fungo sob a forma de sais e, como macronutrientes são fornecidos em quantidades próximas a  $10^{-3}$  M. Alguns fungos requerem fatores de crescimento, principalmente vitaminas e outros como o ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio, que, por serem micronutrientes, são requeridos em quantidades mínimas (cerca de  $10^{-6}$  M).

#### **10.6 Potencial de água (MPa)**

Os organismos vivos contêm grande quantidade de água. Por isso, eles necessitam de água para que possam se multiplicar. A membrana plasmática e a parede celular dos fungos são permeáveis à água, podendo levar à perda ou ganho de água para o ambiente. A perda excessiva pode levar à dessecação e morte celulares. A direção deste fluxo depende do potencial de água da célula e do meio

que a circula, mas sempre move do potencial alto para o baixo. O potencial de água é a soma dos componentes denominados potencial osmótico, potencial de matriz e potencial de turgor. O potencial osmótico tem o mesmo valor da pressão osmótica; o potencial de matriz resulta da interação da água com interfaces e é de importância para determinar se a água dentro de uma matriz sólida, tal como o solo ou madeira, está disponível para o fungo - é determinada pelo raio do poro. O potencial de turgor é a pressão exercida pela parede celular esticada de uma célula inchada pelos componentes celulares (tem valor positivo, tendendo para zero quando a célula desincha). Por outro lado, em condições de baixa disponibilidade de água, como no caso da fermentação em substrato sólido, o termo mais empregado tem sido atividade de água ( $a_w$ ), que mede a água disponível, não ligada a íons, colóides, etc. Meios de cultura comuns (líquidos) contendo cerca de 2% de sacarose tem alto potencial de água (CARLILE & WATKINSON, 1997). A relação entre potencial de água e atividade de água é dada pela equação: Potencial de água (MPa) =  $K \cdot \ln a_w$ . O valor de K varia com a temperatura. Um meio comumente usado em micologia apresenta  $Mpa = -0,7$ .

### 10.7 pH

Na literatura há deficiência de informações sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do cultivo. O metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo o tamponamento é difícil, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. Apenas em fermentadores, o pH pode ser mantido constante, automaticamente, durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio num meio pode afetar o crescimento indiretamente pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou diretamente pela sua ação nas superfícies celulares (CARLILE & WATKINSON, 1997).

### 10.8 Temperatura

A grande maioria dos fungos é mesofílica. Apesar de alguns tolerarem temperaturas próximas ao congelamento da água e outros tolerarem temperaturas acima de 40 °C (termotolerantes), a grande maioria cresce bem entre 25-40 °C. A temperatura afeta os parâmetros de crescimento como o tempo de adaptação (fase



lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento total, diferentemente, influenciando tanto o metabolismo primário quanto secundário de vários modos. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, exige um suprimento de ácido pantotênico a 38 °C, mas não a 30 °C. As regulações metabólicas do fungo podem ser desreguladas em temperaturas subótimas do crescimento, um efeito que pode ser útil na tecnologia de fermentação. O ascomiceto *Ashbya gossypii*, por exemplo, cresce bem a 37 °C, mas é a 28 °C que apresenta superprodução de riboflavina (CARLILE & WATKINSON, 1997).

## **11 Características dos microrganismos usados em processos fermentativos**

O microrganismo produtor é o fator mais determinante para o sucesso ou fracasso de um processo fermentativo. A cepa ideal deve, entretanto, apresentar características especiais como bom rendimento de produção, ser de fácil cultivo e manutenção, manter constância fisiológica, ser sensível às mudanças induzidas pela exposição controlada a agentes mutagênicos e, preferencialmente, não ser patogênica (BU'LOCK & KRISTIANSEN, 1987).

Os microrganismos a serem empregados podem ser isolados de nichos ecológicos naturais ou podem ser adquiridos de coleções de cultura (Bancos de Cepas). No laboratório são mantidos em cultura pura, selecionados quanto às suas potencialidades, melhorados geneticamente, e cultivados em condições que favorecem a expressão máxima do seu potencial genético (NAKAYAMA, 1981; DALBOGE, 1997; LEE *et al.*, 1998; OGAWA & SHIMISU, 1999; PAREKH *et al.*, 2000; BORNSCHEUER & POHL, 2001; HANDELSMAN & WACRETT, 2002; OGAWA & SHIMIZU, 2002).

O sucesso para a produção de um metabólito de fungo requer um conhecimento detalhado das características de crescimento e da fisiologia do fungo em questão. Sabe-se que não apenas a produção de diferentes metabólitos requer diferentes condições fisiológicas, mas, também, cada fungo é único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. Essas diferenças ocorrem não apenas entre o modo do cultivo, isto é, em substrato líquido ou sólido, mas, também, dentro de cada um, devido à alteração em algum fator que venha a interferir no desenvolvimento do fungo. Por isso, para cada fermentação, as condições precisas e o correto estágio de desenvolvimento do fungo devem ser estabelecidos para que seja conseguida a produção máxima do metabólito de interesse. Em outras palavras, o controle da morfologia desses microrganismos é um ponto que necessita grande atenção de modo

que possam ser usados na sua forma ótima para maximizar a capacidade potencial de produção (PAPAGIANNI, 2004).

## **12 Produção de lipases por fungos filamentosos**

A produção de lipases por fungos filamentosos tem sido estudada, principalmente, em nível de bancada. A fermentação submersa (FSL) desenvolvida em frascos erlenmeyer, com auxílio de incubadoras com controles de agitação e temperatura têm sido a mais empregada como pode ser visto nos trabalhos de TSUJISAKA *et al.*, 1973; AKHTAR *et al.*, 1980; AKHTAR *et al.*, 1983; SZTAJER & MALISZEWSKA, 1988; SZTAJER & MALISZEWSKA, 1989; PETROVIC *et al.*, 1990; ESPINOSA *et al.*, 1990; RAPP & BACKHAUS, 1992; CRISTAKOPOULOS *et al.*, 1992; MALISZEWSKA & MASTALERZ, 1992; SALLEH *et al.*, 1993; MAREK & BEDNARSKI, 1996; MACRIS *et al.*, 1996; BERTO *et al.*, 1997; MAIA *et al.*, 1999; GULATI *et al.*, 1999; MAKHSUMKHANOV *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2004; CIHANDIR & SARIKAYA, 2004; GINALSKA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005). Em seguida aparecem os estudos em fermentadores de bancada como relatado por OMAR *et al.*, 1987; JACOBSEN *et al.*, 1989a; JACOBSEN *et al.*, 1989b; RAPP, 1995; SAN'ANNA *et al.*, 1997 e, por último, os estudos com cultivos estáticos (EITENMILLER *et al.*, 1970; HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1988; NAHAS, 1988; OKEKE & OKOKO, 1990). Poucos trabalhos têm sido publicados sobre pesquisas com a fermentação em substrato sólido (FSS), apesar do emprego crescente da FSS nos últimos anos (KAMINISHI, 1998; MAHADIK *et al.*, 2002). Alguns poucos casos de fermentações com cultivos de células imobilizadas têm sido realizados (ELIBOL & ÖZER, 2000; HEMACHANDER *et al.*, 2001; ELLAIAH *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para definir as condições ótimas de produção de lipases em cultivos submersos. Os estudos reportados na literatura têm como objetivo em geral otimizar a composição de meio de cultura para a produção das lipases. Entretanto, o entendimento do metabolismo e da fisiologia microbiana como resposta à composição do meio de cultura e às outras condições de cultivo encontra-se ainda incipiente. Tem sido verificado que a produção é influenciada pelo tipo e concentração de fontes de C e de N, pelo pH do cultivo, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido (ELIBOL & OZER, 2001). As fontes de C lipídicas têm mostrado, geralmente, ser essenciais para a obtenção de lipase com alto rendimento. Muitas lipases são produzidas somente na presença de

uma substância indutora, que pode ser um triglicerídeo, um ácido graxo ou outro lipídio (TSUJISAKA *et al.*, 1973; SHIMADA *et al.*, 1992). Um segundo grupo de microrganismos parece não exigir lipídios ou ácidos graxos para a produção da lipase, mas a incorporação destes compostos aumenta a quantidade da enzima produzida (YOSHIDA *et al.*, 1968; CHEN *et al.*, 1992). E, num terceiro grupo, as lipases são produzidas constitutivamente (CHANDER & KLOSTERMEYER, 1983). Alguns autores, entretanto, têm conseguido bons rendimentos mesmo na ausência de gorduras e óleos (SZTAJER *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 2001). Em alguns casos, verificou-se que a produção foi estimulada com indutores como óleo de oliva, fontes complexas de N, farinha de soja e carbonato de cálcio (SZTAGER & MALISZENWSKA, 1988; SZTAGER & MALISZENWSKA, 1989; HEGEDUS & KHACHATOURIANS, 1988; RAPP, 1995) e, em algumas situações, foi verificado que a produção pode ser inibida por ácidos graxos. Resultados contraditórios têm sido encontrados na literatura quanto ao efeito dos elementos Fe, Cu e Mg (EITENMILLER *et al.*, 1970) e quanto ao efeito de Tweens.

Como descrito anteriormente a produção de lipases pelos fungos filamentosos é influenciada por uma variedade de fatores ambientais. Além disso, as respostas aos fatores ambientais são, também, diferentes entre as cepas fúngicas sendo que, para uma determinada cepa o mesmo fator pode estimular a produção mas para outra pode não afetar ou até mesmo inibir a produção da lipase. Isso poderá ser constatado com os dados obtidos por alguns pesquisadores quando estudaram a produção de lipases por alguns fungos filamentosos importantes, como será mostrado a seguir.

### **12.1 *Geotrichum candidum***

Sob condições de fermentação em substrato líquido (FSL), em frascos Erlenmeyer sob agitação, este fungo, encontrado em instalações de manufatura de laticínios, foi cultivado em meio de cultura de composição básica com glicose (1%, p/v) e peptona (5%, p/v) e suplementado com óleos vegetais ou ácidos graxos, tendo sido detectada a atividade lipolítica, como demonstrado por TSUJISAKA *et al.* (1973). Eles verificaram que a enzima somente podia ser detectada na presença de lipídios e, apenas, quando o óleo de oliva, no caso, era adicionado ao cultivo no início da fermentação, isto é, em até oito horas de cultivo. GINASLKA *et al.* (2004), praticamente nas mesmas condições, exceto pela substituição da peptona pela uréia, verificaram com outra cepa, que a lipase foi produzida na presença de

diversos tipos de óleos vegetais e triglicerídeos. A maior produção foi detectada em meio de cultura que continha trioleína, tendo sido produzida pouca ou nenhuma lipase em meios com ácidos graxos. Verificaram, também, que a adição de carboidrato (exceto frutose) ao meio basal já contendo o óleo de oliva aumentou a produção da lipase e que foi produzida pouca lipase na presença de triglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia curta como a tributirina e a tricaprilina. JACOBSEN *et al.* (1989a), em estudos realizados em fermentador de 1000 L de capacidade, empregaram meio de cultura cuja composição básica continha uréia como fonte nitrogenada, sais minerais e óleo de oliva (1%, p/v) sob a forma de emulsão previamente preparada com solução de goma acácia e pH inicial ajustado para 6,5. O crescimento máximo da cepa de *G. candidum* foi alcançado após 22 h de cultivo, mas a produção máxima de lipase aconteceu com 27 h. Foi verificado que o pH, após um decréscimo lento na etapa inicial da fermentação, subiu novamente chegando ao valor de 7,4 na fase estacionária. No caldo fermentado, livre da massa micelial, foi verificado que as quantidades de proteína e de lipase eram baixas nos estágios iniciais do crescimento e altas na fase estacionária, após 20 h de cultivo. JACOBSEN *et al.* (1989b), em outro estudo, demonstraram que este fungo produzia maior quantidade de lipase quando era crescido em meio que continha peptona (1%, p/v) em vez de uréia. Ao adicionarem óleo de oliva ou Tween 80 ao meio basal com peptona foi percebido aumento de produção da enzima ocorrendo aumento significativo com o Tween. Dados da literatura mostram que surfactantes, especialmente o Tween 80, quando adicionados ao meio de cultura para o crescimento de fungos filamentosos, aumenta o rendimento de produção de muitas enzimas extracelulares (FAITH *et al.*, 1971; ASTHER & CORRIEU, 1987).

Pode-se concluir, portanto, que o *G. candidum* somente produziu a lipase em meios de cultura contendo óleos vegetais ou triglicerídios e peptona ou uréia, tendo sido detectado efeito benéfico com a adição de um tensoativo. As respostas entre diferentes cepas foram diferentes quanto à presença de ácidos graxos, tendo-se conseguido produção com uma cepa (TSUJISAKA *et al.* 1973) e pouca ou nenhuma produção de lipase com outra (GINASLKA *et al.* 2004).

## 12.2 *Penicillium spp*

*P. roqueforti* e em menor uso, também, o *P. camembertii*, graças à elaboração de diversas enzimas hidrolíticas, entre elas, as proteases e as lipases têm sido utilizado na indústria alimentícia para a produção de queijos especiais

(EITENMILLER *et al.*, 1970) e para a produção de embutidos crus e escaldados (salames). PETROVIC *et al.* (1990) estudaram as condições para a produção de lipase extracelular de uma cepa de *P. roqueforti*, isolada de uma amostra comercial de queijo da mesma denominação, empregando como meio basal (%; p/v):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2); KCl (0,05);  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,06);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,3). O pH inicial era 4,0. Estes autores estudaram o efeito da adição dos carboidratos glicose, frutose e sacarose na concentração de 2% (p/v) e dos lipídios manteiga (1 e 2 %; p/v), óleo de oliva (2%; p/v), em cultivos submersos em frascos Erlenmeyer sob agitação (220 rpm), à 27°C. A quantidade máxima de lipase foi detectada após seis dias de incubação no meio com glicose. Neste meio foi verificado que a substituição do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pela peptona (1,5%; p/v) diminuiu o tempo de produção da enzima, apesar da quantidade final produzida de lipase não ter sido alterada.

Estudos foram realizados por TAN *et al.* (2004) para a otimização das condições de cultivo de *P. camembertii* visando a produção de lipase, em frascos agitados. A melhor formulação do meio de cultura, após a avaliação de fontes de nitrogênio, fontes de carbono e sais minerais diversos foi (em %; p/v): farelo de soja desengordurado (4,0); óleo de jojoba (0,5);  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  (0,1); Tween 60 (0,1). Foi utilizado o pH inicial de 6,3. A melhor temperatura de incubação foi de 28°C e o tempo de fermentação foi de 96 h.

Também, em cultivo submerso com frascos sob agitação, MAKHSUMKHANOV *et al.* (2003) concluíram que as melhores condições para a produção de lipase pelo *P. melinii* foram temperatura de incubação de 25°C, 150 rpm e meio de cultura com a composição seguinte (%; p/v): farelo de soja (1,0);  $\text{NaNO}_3$  (0,6); KCl (0,1);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,85);  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,025);  $\text{CaCO}_3$  (0,1); glicerol (1,5). O meio foi preparado em água não destilada e o pH inicial ajustado para 8,0.

Com experimentos de fermentação submersa (FSL) realizados em fermentador, SANT'ANNA *et al.* (1997) estudaram a produção de lipase e protease por uma cepa de *P. restrictum* que foi isolada de solo contaminado com resíduos da indústria de óleo de babaçú. Empregaram o meio de cultura com a composição seguinte (%; p/v): óleo de oliva (1,0); peptona (2,0); NaCl (0,5); extrato de levedura (0,1). O pH inicial foi de 5,5 e a incubação foi de 30 °C, com agitação de 250 rpm. A atividade lipolítica máxima foi observada após 80 h de cultivo e coincidiu com a exaustão da fonte de carbono. Foi detectado início de lise celular a partir de 75 h e aumento da concentração de protease no caldo fermentado em paralelo. O pH aumentou até 8,0 com 90 h ocorrendo também neste tempo queda da atividade

lipolítica, como consequência provável de inativação da enzima ou sua proteólise, ou mesmo devido à ação conjunta dos dois fatores, segundo os autores.

SZTAJER & MALISZEWSKA (1989) avaliaram a produção de lipase pelo fungo *P. citrinum* sob condições de fermentação submersa em frascos agitados (150 rpm), a 22°C, tendo sido empregado como meio basal (em %; p/v): amido (2); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,025); CaCO<sub>3</sub> (0,5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,05); extrato de levedura (0,1). Foi estudado o efeito da adição de prováveis indutores da formação de lipase (1%; p/v) tais como tributirina, óleos vegetais (oliva, semente de colza e girassol) e resíduos de efluentes de indústrias de beneficiamento de óleos vegetais. Também foram testados vários carboidratos como fontes de carbono e vários compostos nitrogenados (uréia, sulfato de amônio, água de maceração de milho, peptona e farelo de soja), adicionados ao meio que continha o óleo de colza. Concluiu-se que o melhor meio tinha na sua formulação peptona (5%) e amido (2%), pH inicial de 7,2 e temperatura de incubação de 22 °C.

A produção de lipase pelo fungo *P. citrinum* também foi estudada por MALISZEWSKA & MASTALERZ (1992) nas condições otimizadas e descritas anteriormente. Foi estudado o efeito da adição de Tween 80 e óleo de oliva (0,1 a 1,0 %; p/v) bem como de ácidos graxos (láurico, palmítico, linoléico, linolênico e oléico) na concentração de 4 mM. Foi demonstrado um aumento significativo da produção de lipase com a menor concentração do óleo de oliva e efeito estimulante crescente com aumento da concentração de Tween 80, até 0,7%. Foi detectado, também, efeito positivo com os ácidos linoléico, linolênico e oléico, mas, inibição com o ácido láurico. A lipase não foi detectada no micélio tendo sido totalmente liberada no meio de cultivo.

Como mostrado acima, foram empregados meios de cultura com formulações bastante diferentes para estudar a produção de lipase por cinco espécies do mesmo gênero de fungo. Destacam-se a variação do pH inicial do meio de cultura (mínimo de 4,0 e máximo de 8,0), o melhor meio que foi detectado para a produção de lipase por *P. roqueforti* (com glicose) e para o *P. citrinum* o meio com amido. Esses dados, mais uma vez, demonstram a variedade de respostas dos fungos filamentosos, mesmo entre aqueles mais aparentados, às condições experimentais de cultivo.

### 12.3 *Aspergillus spp*

Alguns aspectos relacionados com a produção e localização da lipase de *A. niger* em experimentos de fermentação submersa com frascos sob agitação (225

rpm), a 29°C, foram investigados por MACRIS *et al.* (1996). Foi estudado o efeito do óleo de oliva e da sacarose como fontes de carbono. Foram adicionados em meio de cultura mineral, químicamente definido, com a seguinte composição (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10,0); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (12,0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,3); CaCl<sub>2</sub> (0,25); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,005); MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,015); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,03); pH 5,5. Foi verificado que o meio contendo a mistura de óleo de oliva e sacarose (1,5 e 0,5 %, p/p, respectivamente) apresentou os melhores resultados visto que a sacarose permitiu o crescimento mais rápido do fungo quando comparado com o meio que continha apenas o óleo de oliva. Também neste trabalho, os autores estudaram a produção de lipase quando o fungo foi crescido em meio de cultura com 2% (p/v) de óleo de oliva. Após a separação do meio o micélio foi lavado, incubado em meio tamponado no pH 5,5 em presença de óleo de oliva, óleo de milho, trioleína, sacarose ou glicerol, numa concentração de 1,5% (p/v) e incubados a 30 °C, com agitação (200 rpm). Foi empregado como controle apenas o micélio em tampão. Concluiu-se que havia pouca lipase aderida ao micélio, tendo sido ela quase que totalmente liberada no meio. Foi verificado que a biossíntese “de novo” da enzima ocorria apenas na presença dos óleos vegetais e que era totalmente reprimida pela sacarose e pelo glicerol.

Estudos de produção de lipase com fermentação em substrato sólido (FSS) pelo cultivo de *A. niger* em vários substratos foram desenvolvidos por KAMINISHI *et al.* (1988). A produção de lipase foi avaliada em cultivos estáticos com duração de cinco dias, à 30°C em que 10 g de cada substrato era colocado em frasco Erlenmeyer e 10 mL de água eram incorporados para gerar a umidade necessária para o desenvolvimento do fungo. Foram testados como substratos: tortas do óleo de gergelim; do óleo da semente de algodão e do amendoim; farelos de arroz e de trigo; sementes, após secagem e moagem, de gergelim, de mamona e de amendoim; bagaço de cana; casca de café e cevada usada, resíduo da indústria cervejeira. A produção de lipase foi maior com a torta de gergelim seguida do farelo de trigo, não tendo sido detectado efeito positivo com a adição de várias fontes nitrogenadas, carboidratos e indutores. MAHADIK *et al.* (2002) também estudaram o cultivo de *A. niger* com o mesmo processo fermentativo, contendo o meio de cultura, no pH 5,5, farelo de trigo (10 g/frasco) embebido em solução nutriente com a seguinte composição (%; p/v): NaNO<sub>3</sub> (0,05); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,05); KCl (0,05); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2); extrato de levedura (0,1); peptona (0,5); pH 5,5. Foi testado o efeito da adição de 1% (p/v) de óleo vegetal (oliva, girassol, mamona e coco). Concluiu-se

que todos os óleos testados suportaram o crescimento fúngico bem como propiciaram a produção de lipase destacando-se, entre eles, o óleo de oliva. A enzima, após extração com solução de NaCl a 1% (p/v), mostrou-se bastante ativa em pH ácido (pH 2,5) e temperatura ótima de 45 °C.

Sob fermentação submersa em frascos agitados GULATI *et al.* (1999) pesquisaram a produção de lipase pelo *A. terreus* em meio basal de composição mineral mínima de Czapek Dox modificada, contendo (em g/L): NaNO<sub>3</sub> (6); KCl (0,52); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,52); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,52); CuNO<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,001); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,001); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,001); glicose (20,0). Foi estudado: o efeito da adição de diferentes tipos de lipídios (21 ao todo) numa concentração de 1,5% (p/v); o efeito de diferentes concentrações de óleo de milho; o efeito da adição de emulsão preparada com vários emulsionantes (goma acácia; álcool polivinílico; Tweens 20, 40 e 80); o efeito da temperatura de incubação; o efeito do pH inicial, ajustado com soluções tampões; o efeito de várias fontes de nitrogênio inorgânicas (cloreto de amônio, nitrato de amônio, fosfato de amônio dihidrogenado, sulfato de amônio) e orgânicas (hidrolisado de caseína, peptona, extrato de carne, extrato de levedura, farinha de glúten de milho, caseína, triptona, asparagina e ácido aspártico). Conseguiu-se maior produção da lipase com o óleo de milho, seguida dos óleos de jasmin, oliva, gordura de coco e sebo. Conclui-se que a produção de lipase pelo fungo foi possível tanto com gordura insaturada quanto saturada. O melhor resultado foi conseguido com 2% (v/v) de óleo de milho, emulsionado em solução de goma acácia, na temperatura de 37 °C, com pH inicial do meio de cultura igual a 9,0, contendo caseína como fonte nitrogenada (0,1%; p/v). Não foi detectado efeito significativo da adição de fonte inorgânica de nitrogênio além daquela produção conseguida com a substância presente no meio base, o nitrato de sódio.

Com cepa de *Aspergillus spp*, isolada de amostra de solo da Turquia, CIHANGIR & SARIKAYA (2004), em experimentos com cultivo submerso em frascos agitados, confirmaram o efeito benéfico da presença do óleo de oliva e da peptona no meio de cultura sobre a produção da lipase, mas, neste caso, com pH inicial de 5,5 e a 30 °C e menor produção quando os carboidratos glicose, sacarose, ou lactose foram empregados como fonte única de C.

Com esses estudos pôde-se constatar a produção de lipase extracelular pelo fungo do gênero *Aspergillus*. Verificou-se, também nesse caso, que os óleos vegetais estimularam a produção da enzima, independentemente da fonte nitrogenada empregada.



## 12.4 Fungos inferiores

AKHTAR *et al.* (1980) cresceram o fungo *Mucor hiemalis* em meio de cultura que tinha como composição básica peptona (3%; p/v), minerais e glicose (1%; p/v) e testaram vários óleos vegetais (óleo de oliva, de coco e de mostarda) sob a forma de emulsão como fonte primária de carbono (1%; p/v), bem como estudaram o efeito da adição de glicose ao meio basal. Detectaram quantidade razoável da enzima quando o fungo foi crescido no meio basal, mas, também, aumento significativo da atividade lipolítica com a adição do óleo de oliva, desde que efetuada na etapa inicial da fermentação. Foi percebido que a lipase, de produção induzida por um tipo particular de triglicerídeo, não se mostrou específica quanto à sua ação sobre o mesmo lipídio nem tão pouco quanto ao efeito de inibição. Ao aumentarem a concentração do óleo de oliva, previamente purificado, no meio de cultura de mesma composição básica, AKHTAR *et al.* (1983) constataram que *M. hiemalis* cresceu bem até a concentração de 1,5% (p/v), não ocorrendo o mesmo com a produção da lipase, visto que ocorreu aumento da produção até, no máximo, 1% (p/v). Foi demonstrado que a atividade lipolítica da enzima aderida ao micélio atingiu o máximo no final da fase exponencial do crescimento enquanto que a atividade lipolítica presente no caldo fermentado alcançou o máximo após ter ocorrido a lise celular na fase estacionária.

Trabalhando com *Rhizopus oligosporus*, NAHAS (1988) demonstrou que em meios de cultura contendo proteínas brutas ou seus hidrolisados (extrato de levedura, gelatina, uréia, hidrolisado ácido de caseína, peptona, triptona, etc.) como fonte orgânica única de N e C, somente extrato de farinha de soja apresentou efeito estimulador sobre a produção da enzima, não ocorrendo o crescimento com a uréia

ESPINOSA *et al.* (1990) estudaram o efeito de várias fontes de nutrientes sobre a produção de lipase pela cepa CDBB H 313 de *Rhizopus delemar*, empregando meio de sais minerais suplementado com 1% (p/v) de casaminoácidos como meio basal. Foi estudado o efeito de vários compostos como fonte de carbono (1%; p/v): carboidratos (sacarose, amido, dextrina e glicose); lipídios (óleo de oliva, de girassol e de milho). Também foi avaliada a adição ao meio basal contendo glicose de vários compostos como possíveis indutores da produção de lipase, nas concentrações de 0,02; 0,2; e 2,0% (p/v): óleo de oliva, tributirina, ácido oléico, ácido butírico e Tween 80. Várias fontes nitrogenadas foram avaliadas (1%; p/v): casaminoácidos; extrato de levedura; peptona; NaNO<sub>3</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Concluiu-se

que dextrina foi a melhor fonte de carbono, extrato de levedura a melhor fonte de nitrogênio e que, a presença de uma fonte lipídica no meio de cultura até 2% (p/v), no máximo, promoveu maior produção da enzima, assim como o Tween 80 apresentou um efeito positivo sobre a produção da lipase.

SALLEH *et al.* (1993) avaliaram o efeito de vários fatores sobre a produção de lipases extracelular e intracelular pelo fungo *R. oryzae*, empregando como meio basal (g/L): peptona (50,0); NaNO<sub>3</sub> (1,0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5) com pH inicial igual a 6,0. Foi estudado o efeito da adição de carboidratos (1%; p/v): glicose, frutose, arabinose, sorbitol, maltose, sacarose; lipídios (5%; v/v): trioleína, óleo de oliva, ácido oléico, Tween (85,80,60), SPAN (60, 40) e glicerol; fonte nitrogenada (5%; p/v): peptona, triptona, hidrolisado triptico de soja; polipeptona; água de maceração de milho; extrato de carne, farinha de soja e caseína. Com exceção da sacarose, todos os carboidratos testados inibiram a produção de lipase extracelular, mas apresentaram efeito oposto sobre a produção da lipase intracelular. A peptona foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção da lipase extracelular não ocorrendo, entretanto, diferença com as outras fontes quanto à quantidade da lipase intracelular. Foi detectado efeito estimulador da produção da lipase extracelular apenas pelo glicerol.

Foi verificado, portanto, que a produção de lipase por fungos filamentosos inferiores (dos gêneros *Rhizopus* e *Mucor*) também era estimulada por uma fonte lipídica mas que era inibida por carboidratos simples e que a peptona funcionou como a melhor fonte nitrogenada.

## 12.5 Fungos patogênicos de plantas

A produção de enzima com atividade lipolítica pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. Vasinfectum foi estudada em frascos agitados, por RAPP (1995), em meio basal de composição seguinte (g/L): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0); NaNO<sub>3</sub> (3,0); extrato de levedura (1,0); peptona (30,0). Foi avaliado o efeito da adição de vários compostos (1%; p/v) como fonte de carbono (glicose, glicerol, ácido mirístico, ácido oléico, trilaurina, trimiristina, óleo de oliva, SPAN 85). Foi verificado que a atividade lipolítica era predominantemente extracelular tendo sido encontrada pequena quantidade dentro ou aderida ao micélio. O fungo não produziu a enzima em meio sem peptona, e os compostos trimiristina, óleo de oliva, SPAN 85 e ácido oléico estimularam a produção de lipase. Foi detectada a repressão da síntese da lipase pela glicose e pelo glicerol. Foi sugerido que nesta linhagem a repressão

catabólica da formação de lipase era regulada principalmente pelo controle em nível de transcrição.

MAIA *et al.* (1999) estudaram a produção de lipase e protease extracelulares pelo fitopatógeno *Fusarium solani* FS1, em frascos agitados (120 rpm), a 28°C, em meio de cultura no pH 6,0, com a composição básica seguinte (em g/L): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0); NaNO<sub>3</sub> (3,0); peptona (30,0); pH 6,0. Foi avaliada a suplementação com glicose, óleo de oliva ou ambos os compostos como fontes de carbono e, também, foi estudado o efeito de diferentes concentrações de peptona (até 3,0 %; p/v) adicionadas ao meio basal contendo 0,5 % (v/v) de óleo de oliva. O fungo produziu a maior quantidade de lipase após 72 h de cultivo no meio que continha peptona (3%; p/v) e óleo de oliva (0,5%; v/v). Foi verificado que a glicose inibiu a síntese da lipase, mesmo em presença do óleo de oliva. Como também detectado com outros fungos, durante o curso da fermentação, ocorreu aumento do pH do caldo fermentado chegando a 8,3. A produção máxima de protease foi detectada a partir de 72 h de cultivo.

BERTO *et al.* (1997) cultivaram *Alternaria brassicicola* em meio de cultura químicamente definido contendo maltose, sais inorgânicos e vitaminas com pH inicial de 5,5 em frascos agitados (120 rpm). Foram estudados parâmetros como agitação e adição de substâncias com provável capacidade de indução de produção de lipase como tributirina, glicerol, laureato de metila, palmitato de metila, oleato de metila, β ciclodextrina e Tween 80. Após nove dias de incubação a 25 °C, foi verificado que a maior indução de produção da enzima ocorreu com o oleato de metila. O crescimento fúngico e a produção de lipase foram maiores com o cultivo sob agitação quando os resultados foram comparados com os obtidos com cultivo estático.

## **12.6 Fungos patogênicos de insetos (entomopatógenos)**

HEGEDUS & KHACHATOURIANS (1988) estudaram a produção de lipase extracelular pelo fungo entomopatógeno *Beauveria bassiana* quando crescido em meio basal líquido que continha dextrose, peptona e extrato de levedura, em frascos agitados. A adição de óleo de oliva induziu a produção da lipase, mas a adição de ácidos graxos (mirístico, palmítico, esteárico, linoléico e araquídico), ao contrário, inibiu o crescimento do fungo e a produção da lipase. Em meio de cultura mineral mínimo, a adição de óleo de oliva, apesar de também induzir a produção da enzima, não o fez com a mesma intensidade.

SILVA *et al.* (2005) investigaram a produção de lipase por uma cepa de *Metarhizium anisopliae*, isolada no Brasil e usada em controle biológico de pragas da lavoura, em frascos agitados, empregando como meio basal (%; p/v): glicose (0,2); peptona (0,5); MgSO<sub>4</sub> (0,01); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1) e óleo de oliva (2,0) no pH 7,2. Os autores testaram diferentes gorduras animais (porcina e bovina) e óleos vegetais (de babaçú, de soja, de girassol, de sésamo, de palma, de arroz, de canola, de milho, de semente de linho, de oliva e gordura hidrogenada de soja, numa concentração de 2,0 % (p/v), como fonte carbonada). O pH inicial do meio de cultura também foi avaliado, empregando-se soluções tampão no pH 5,7; 6,3; 7,0; 8,0 e foi também estudada a temperatura de incubação (28; 32 e 36°C). Foi verificado que a produção de lipase foi influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono, pelo pH inicial do meio de cultura e pela temperatura de incubação. O maior crescimento foi detectado com óleo de oliva, de girassol e de soja bem como com as gorduras animais. Foi detectada a atividade lipolítica nos meios com cada um de todos os lipídios testados, variando de 1,64 U/mL (com gordura de porco) a 4,97 U/mL (com óleo de girassol), enquanto que, com o óleo de oliva, foi conseguido caldo fermentado com a maior atividade específica (108,38 U/mg de proteína). Foi avaliado, também, o efeito de surfatantes (duodecil sulfato de sódio - SDS; polietileno glicol - PEG; Tween 20 e 80; Triton x-100) sobre a produção da enzima, quando adicionados no momento da inoculação do fungo ou, após 50 h de cultivo, visto que, como sabido, estes podem alterar a permeabilidade celular com conseqüente aumento na secreção de proteínas ou podem facilitar o contato entre a enzima e seu substrato. Todos os surfatantes apresentaram efeito positivo. Entretanto, com exceção do PEG, os melhores resultados foram conseguidos quando os surfatantes foram adicionados após 50 h de cultivo e a produção foi máxima com o SDS e o Tween 80. Provavelmente, o tempo de aplicação teve importância devido ao maior efeito tóxico que pode ter ocorrido durante a inoculação, com interferência na germinação dos conídios e posterior crescimento do fungo.

## 12.7 Outros fungos

*Calvatia gigantea* é um fungo superior (basidiomiceto) comestível, conhecido como “puffball” ou “bufa de lobo”. Degrada substratos ricos em taninos, excretando grandes quantidades de  $\alpha$  amilase quando cultivados em subprodutos agrícolas com altos teores destes compostos (KEKOS & MACRIS, 1983). CHRISTAKOPOULOS *et*

*al.* (1992) pesquisaram a produção de lipase extracelular por este fungo, empregando como meio básico o meio de cultura mineral com a composição seguinte (g/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (12,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,3). Os autores estudaram o efeito da adição de fontes de carbono (2%; p/v) como alguns carboidratos (frutose, glicose, lactose e sacarose) e lipídios (óleo de milho, de oliva, de soja e de girassol, previamente emulsionados em solução de goma arábica), o efeito do tipo de fonte de nitrogênio (sais de amônio: cloreto, fosfato e sulfato; caseína; água de maceração de milho; peptona; uréia; e extrato de levedura), o efeito do pH inicial do meio de cultura e a temperatura de incubação. Foi demonstrado que ocorreu maior produção de lipase com a glicose e com o óleo de girassol, tendo este último propiciado maior rendimento. Isso confirma dados da literatura de que os lipídios são melhores fontes de carbono do que carboidratos para a produção de lipases. Também foi demonstrado que o fosfato de amônio foi superior à peptona como fonte nitrogenada. Empregando um meio de composição otimizada quanto às fontes de carbono e de nitrogênio, foi verificado que o pH 6,0 e incubação a 25 °C, completaram as condições para se obter maior produção de lipase.

A produção de lipase pelo fungo termofílico *Humicola lanuginosa* foi pesquisada por OMAR *et al.* (1987) em cultivo submerso em fermentador de dez litros de capacidade, com agitação e aeração de 200 rpm e 1,0 vvm, respectivamente, empregando inóculo de 4% (v/v) e incubação a 45 °C. Os autores empregaram como meio basal no pH 7,0 (em %; p/v): extrato de levedura (1,0); NaCl (0,5);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01); óleo de oliva (1,0). Foram estudados o efeito da adição de fontes de carbono, em substituição do óleo de oliva, na forma de treze diferentes carboidratos (1%; p/v), tendo o sorbitol despontado como a melhor alternativa. Com formulação contendo sorbitol foram testados vários compostos nitrogenados como água de maceração de milho, peptona, sais de amônio e extrato de levedura a 1,0% (p/v). As fontes de nitrogênio foram adicionadas após 48 h de cultivo, tendo o primeiro composto apresentado a maior produção (63 U/mL). A produção de lipase que praticamente ficou estagnada na ausência de material lipídico (menos de 10 U/mL), aumentou significativamente com Tween 80, óleo de castor e óleo de baleia.

### **13 Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**

Nos anos recentes, o desenvolvimento mais importante no campo da síntese química tem sido a aplicação de sistemas biológicos em reações químicas, sendo o

Japão o país que mais domina este campo de pesquisa aplicada. As reações catalisadas por enzimas ou sistemas enzimáticos apresentam maior especificidade do que as formas convencionais de reações orgânicas. Conseqüentemente, o uso industrial de enzimas tem desenvolvido rapidamente. Por isso, a procura constante de enzimas que sejam capazes de catalisar novas reações é importante. Provavelmente, o meio mais eficiente para encontrar novas enzimas seja o isolamento e seleção de microorganismos como conseqüência das suas características de diversidade e versatilidade (SHIMIZU *et al.*, 1997; OGAWA & SHIMIZU, 1999; 2002).

Os microorganismos, possuindo os atributos fundamentais para que possam ser usados em processos biotecnológicos, podem ser isolados, purificados, selecionados e testados como culturas puras, a partir de uma fonte natural (NAKAYAMA, 1981). Essas fontes podem ser o solo (terra); água; vegetais frescos e fermentados; plantas e animais vivos; águas residuais; alimentos frescos e deteriorados: No caso das lipases os fungos produtores podem ser isolados de resíduos industriais gordurosos, de fábricas de processamento de óleos vegetais e laticínios, de solos contaminados com óleo e de sementes oleaginosas (SZTAJER *et al.*, 1988; SHARMA *et al.*, 2001). As culturas puras podem ser obtidas por meio das técnicas de isolamento direto ou com enriquecimento seletivo (NAKAYAMA, 1981). Em seguida, estas culturas são submetidas às condições altamente seletivas para permitir a detecção e seleção daqueles microorganismos ou metabólitos de interesse, primeiramente em meio de cultura sólido em placa de Petri (seleção primária), em que os microorganismos que possuam a capacidade de produzir o metabólito ou substância de interesse são detectados. Na etapa seguinte as culturas selecionadas, em geral, são cultivadas em cultivo submerso, sob diversas condições, obtendo-se, assim, diversos tipos de caldos fermentados resultantes do crescimento do mesmo microorganismo. A quantidade produzida dos metabólitos ou das substâncias em cada cultivo é comparada, tendo-se uma avaliação do rendimento de produção em diferentes situações, podendo-se, assim, selecionar as cepas mais promissoras, descartando-se as demais (NAKAYAMA, 1981).

O isolamento primário de fungos a partir de materiais naturais contaminados com uma flora microbiana mista de bactérias e actinomicetos, além dos fungos, requer o emprego de condições de enriquecimento seletivo. Neste caso, isso pode ser feito empregando-se meios de cultura com pH ácido e ou adicionados de substâncias inibidoras de crescimento tais como antibióticos, corantes e outras

substâncias de ação específica. No caso dos fungos filamentosos ocorre, ainda, a necessidade de se evitar o crescimento rápido e espalhado de alguns fungos saprófitas. Estes problemas foram primeiramente estudados por LITTMAN (1947) o que resultou no desenvolvimento de um meio de cultura considerado adequado que continha 1,5 % (p/V) de bile bruta ("Oxgall"), 1,0 mg% de cristal violeta e 30 U/100 mL de estreptomicina. Este meio tem sido, desde então, empregado para isolamento de fungos patogênicos para o ser humano a partir de amostras biológicas.

A seleção primária para detecção de uma atividade particular tem peso significativo no processo de seleção de microrganismos específicos. Os ensaios a serem empregados nesta fase devem levar em conta aspectos tais como simplicidade, custo, rapidez e especificidade. Segundo STEELE & STOWERS (1991) esta é, geralmente, a etapa que determinará o sucesso ou fracasso de um programa de seleção. A maioria dos métodos é categorizada como diretos quando permite a identificação específica do produto alvo. Como indiretos quando ocorre a indicação da presença de determinada substância pela detecção de alguma atividade específica, tal como a detecção de uma atividade enzimática via reação colorimétrica ou fluorimétrica. Em geral a seleção primária é realizada pelo cultivo do microrganismo que está sendo testado em meio de cultura solidificado com ágar grau bacteriológico, em placas de Petri. Segundo os mesmos autores, no caso das lipases, a detecção da atividade enzimática apresenta algumas peculiaridades que dificultam a seleção em placa de Petri tais como ausência de especificidade de algumas delas e problemas na distinção entre lipases verdadeiras e as esterases, quando não é usado o substrato adequado.

### **13.1 Detecção de microrganismos lipolíticos**

Provavelmente, a primeira avaliação do estado da arte da metodologia analítica, para detecção de microrganismos lipolíticos, foi desenvolvida por TURNER (1929), quando avaliou trabalhos publicados nos vinte e oito anos anteriores. Este autor empregou algumas técnicas até então recomendadas e testou os meios de cultura correspondentes para avaliar o desempenho de duas bactérias, sendo uma lipolítica e uma outra que não era lipolítica (*E. coli*).

Cinco diferentes meios de cultura foram testados quanto à sensibilidade para detecção do microrganismo produtor, efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano e tendência para prover reações falso-positivas. Os meios variavam quanto à composição e quanto ao modo como era realizada a diferenciação de uma colônia

lipolítica de outra não lipolítica. Três meios se baseavam em mudanças da opacidade e translucidez decorrentes da presença de gordura enquanto os outros dois dependiam de alterações de coloração devido à liberação de ácidos graxos que reagiam com indicador ácido-base (azul de bromo timol) ou com corantes (sulfato de azul do Nilo e Sudan III).

Nos meios formulados com sebo ou com glóbulos de emulsão de óleo de semente de algodão foi verificado que a diferenciação era difícil de ser feita e a sensibilidade era baixa, não ocorrendo, entretanto, inibição do crescimento bacteriano ou aparecimento de reações falso-positivas. Em meios em que a fonte lipídica era glicerídios puros (tributirina, tricaprilina, trimiristina, tripalmitina e triestearina), o autor observou que o tempo de aparecimento de zonas claras de hidrólise era mais demorado com glicerídios de ácidos graxos de cadeia carbônica longa e que não era detectado halo com a triestearina. O da bile também foi estudado empregando-se óleo de semente de algodão sob a forma de emulsão como fonte de substrato lipídico. Efeito significativo foi verificado, isto é, foi detectada a presença de halo transparente e cristalino com a metade do tempo de detecção na ausência do sal biliar que, quando presente, não era muito nítido ou seja, apenas ligeiramente translúcido. O autor concluiu que a bile aumentou a difusão da gordura neutra dentro do gel de ágar em torno dos glóbulos de gordura, tornando disponível, assim, pequenas massas de gordura de maior superfície de contato para a ação enzimática. Outra explicação dada é que a bile acelerou a difusão dos ácidos graxos e sabões, promovendo sua remoção uma vez formados pela lipase.

Os meios de cultura que se basearam na reação com os corantes indicadores apresentaram pouca sensibilidade e deram reações falso-positivas quando havia carboidrato no meio de cultura. A baixa sensibilidade nesse caso foi decorrente, talvez, do pequeno efeito dos ácidos graxos de cadeia longa sobre o pH. O meio com azul do Nilo proporcionou nítida diferenciação e alta sensibilidade, mas apresentou inibição bacteriana significativa. Com este corante as colônias lipolíticas, desenvolvidas em condições de anaerobiose, apresentaram zonas de azul intenso em volta delas. Ao serem colocadas em aerobiose a cor azul se desfazia, com perda de tonalidade, devido a possível neutralidade ou alcalinidade.

SMITH (1907) observou que soluções de corantes de sais derivados de oxazina como azul do Nilo, possuíam a propriedade de corar duplamente tecidos animais com gordura, ficando a gordura neutra vermelha e os ácidos graxos azuis



ou de cor púrpura. Também foi mostrado por THORPE (1907) que a solução deste corante continha duas substâncias vermelhas, a oxazina livre (um sal ácido) e sua forma oxidada, uma oxazona, que são insolúveis em água, mas solúveis em álcool, solventes orgânicos e gordura. A oxazona comporta-se frente às gorduras e ácidos graxos como azo-compostos, corando-os de vermelho pela sua dissolução. A oxazina, além de ter a mesma ação com a gordura neutra, combina-se com os ácidos graxos livres produzindo um sal de cor azul - um sabão de azul do Nilo. De lá para cá os corantes oxazínicos mais usados para indicar a lipólise pelos microrganismos em meios de cultura com gorduras neutras têm sido o azul Vitória e o sulfato de azul do Nilo. Neste caso o meio deve ser neutro ou fracamente alcalino, tamponado e livre de carboidrato fermentável (KNAYSI, 1941; SHELLEY *et al.*, 1987; SAMAD *et al.*, 1989).

O emprego de corantes para a detecção de lipólise pelos microrganismos foi criticado por OTERHOLM & ORDAL (1965), devido às limitações como dificuldade na interpretação dos resultados (principalmente no caso de baixa produção de lipase), toxicidade diversificada dos corantes e de alguns lipídios nas concentrações usualmente utilizadas, alterações nos lipídios decorrentes de ação de oxidases e detectadas pelos corantes como indicativas de possível atividade hidrolítica (FREYER *et al.*, 1967).

Uma detecção eficiente de microrganismos lipolíticos depende da ação conjunta e interrelacionada de diversos fatores como o crescimento do microrganismo, a produção e liberação da(s) lipase(s), a atividade e a especificidade da enzima, a sensibilidade de detecção da técnica. Segundo SHELLEY *et al.* (1987), deveriam ser empregadas condições ótimas para todos esses fatores na etapa de seleção primária mas, infelizmente, isso na prática é impossível. Como exemplo, diz que nem sempre as condições ótimas de temperatura de crescimento e de produção da enzima, para uma mesma cepa, são as mesmas. A situação se complica visto que grande variedade de microrganismos é capaz de produzir lipases e os efeitos decorrentes de alterações das condições dos cultivos podem ser diferentes entre eles. Isso foi demonstrado por ALFORD & STEINLE (1966) quando testaram 28 cepas de diferentes microrganismos frente a 36 condições diferentes. Apesar de ter sido detectada a atividade lipolítica nos cultivos de todas as cepas em uma ou outra condição, nenhuma das condições permitiu a detecção da atividade em 100 % das cepas testadas.

Os métodos de observação direta em placa se baseiam na formação de zonas claras ou turvas (opacas) em torno das colônias lipolíticas ou na formação de cristais de corantes no interior das gotículas de gordura na superfície do ágar. Os substratos solúveis em água são úteis para observação direta da lipólise quando a hidrólise resulta na liberação de produtos fluorogênicos ou cromogênicos ou na liberação de ácidos graxos insolúveis em água, ocorrendo, neste caso, a sua precipitação no meio, formando um halo opaco. Por outro lado, a ação da lipase num meio de cultura solidificado (com ágar) contendo substratos insolúveis resulta, usualmente, na formação de zona clara (ou transparente) correspondente à lipólise em torno da colônia, em fundo translúcido ou opaco do meio com o substrato não alterado (SHELLEY *et al.*, 1987). O substrato solúvel que mais tem sido usado é a tributirina que, ao ser hidrolisada gera dibutirina, monobutirina, glicerol e ácido butírico, todos eles solúveis em água. Sendo usada na forma de emulsão (preparada no ágar ainda fluido) permite a detecção de halo claro em fundo opaco. Apesar dos inconvenientes do uso da tributirina, de não ser substrato específico para lipase, e de nem sempre ocorrer correlação entre a sua ação e a ação da lipase sobre substratos lipídicos insolúveis (lipase verdadeira), alguns autores têm recomendado seu emprego em procedimentos de detecção e seleção primária de microrganismos lipolíticos (LIMA *et al.*, 1991), mas com posterior confirmação com lipídios insolúveis (SMITH & HAAS, 1992).

A trioleína não tem sido recomendada como substrato para detecção lipolítica em placa, devido à dificuldade de se notar a zona de lipólise (SHELLEY *et al.*, 1987), apesar de ter sido usada por alguns pesquisadores (JENSEN, 1983; PAPAPARASKEVAS *et al.*, 1992). Alternativamente, o óleo de oliva, após ter sido purificado em coluna de alumina neutra para remoção de ácidos graxos livres, pode ser usado como substituto da trioleína (JENSEN, 1983; OHNISHI *et al.*, 1994a; SHIMADA *et al.*, 1992; GAO & BREUIL, 1995). Segundo SHELLEY *et al.* (1987) e HADEBALL (1991), o óleo de oliva deve ser finamente emulsionado pela homogeneização de todo o meio em liquidificador ou, preferencialmente, pelo cisalhamento em rotação mais alta, para que sejam obtidos glóbulos bastante pequenos do óleo (HADEBALL, 1991). Gomas estabilizadoras, como a goma acácia, podem ser usadas no meio, mas emulsificadores como Tweens, mono e diacilgliceróis devem ser evitados, visto que a sua presença no meio de crescimento pode afetar a síntese e a atividade da lipase (HADEBALL, 1991; THOMSON *et al.*, 1999).

De acordo com JAEGER *et al.* (1994) o substrato lipídico é essencialmente imóvel e a lipase, sendo solúvel, difunde-se no gel até o substrato sendo que, em baixa concentração do agente gelificante (ágar), a enzima se difunde mais no gel (HOU & JOHNSTON, 1992).

### **13.2 Determinação da atividade lipolítica presente em preparações brutas de lipase por difusão em gel de ágar**

Vários autores têm empregado a medição do tamanho das zonas de lipólise produzidas em géis de ágar para comparar quantitativamente as atividades de diferentes preparações enzimáticas (LAWRENCE *et al.*, 1967; GRIFFITHS *et al.*, 1981; FOX & STEPANIAK, 1983). Segundo SHELLEY *et al.* (1987), essa prática deve ser executada com cuidados quando se comparam atividades de preparações enzimáticas provenientes de diferentes microrganismos porque a taxa de difusão de proteínas num gel de ágar é função da concentração da proteína. Assim, o diâmetro de zonas de hidrólise produzidas por enzimas difundidas no ágar é resultado mais da concentração enzimática do que da sua atividade. Portanto, comparações quantitativas entre zonas de lipólise em gel, provocadas por preparações enzimáticas cujas proteínas apresentam diferentes perfis de difusão não são corretas (HABERMANN & HARDT, 1972; SHELLEY *et al.*, 1987). Apesar dessas afirmações, comparações têm sido feitas por alguns autores como, por exemplo, SZTAJER & MALISZEWSKA (1989) que empregaram a medição do diâmetro de lipólise em géis preparados com óleo de oliva e óleo de babaçu, respectivamente. Foi demonstrado pelos autores ter havido boa correlação entre o método de difusão em ágar com o método espectrofotométrico em que foi usado paranitrofenillaureato (PNPL) como substrato. Substratos fluorogênicos, também, têm sido empregados quantitativamente, como descrito por KOUKER & JAEGER (1987), em ensaio em placa para lipases. Esses autores incorporaram rodamina B no gel como indicador da atividade lipolítica, ficando o gel, pronto para o uso, opaco e com coloração rosa. As colônias produtoras de lipase formaram halos fluorescentes verdes após revelação com luz ultravioleta remoto (350 nm). Eles afirmaram que o diâmetro do halo de lipólise apresentou correlação positiva com a atividade lipolítica e que o método era específico para lipases visto que não se formou halo fluorescente quando esterases foram testadas.

Na emulsificação do substrato lipídico, estabilizadores como goma acácia podem ser usados, mas emulsificadores como Tweens devem ser evitados porque

podem ser usados como substratos pelas esterases, podendo o álcool polivinílico ser, também, usado (JENSEN, 1983; KOUKER & JAEGER, 1987; SMITH & HAAS, 1992).

### **2.13.3 Ensaios enzimáticos para determinação da atividade lipolítica**

Vários ensaios enzimáticos têm sido desenvolvidos para a mensuração da atividade lipolítica em preparações brutas ou purificadas. A maioria deles está fundamentada no princípio da formação de produtos da reação em detrimento do consumo do substrato.

Como visto anteriormente, as lipases são solúveis em água, mas catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, e atuam na interface óleo-água. Por isso, a atividade lipolítica tem sido determinada em sistemas de emulsão. Entretanto, à medida que a reação se desenvolve, a composição da interface óleo-água varia, em decorrência da formação de produtos da hidrólise e degradação do substrato. Com isso, o tamanho das gotículas de óleo e a área da interface sofrem mudanças contínuas. Assim, a ação da lipase varia, não apenas com a concentração do substrato, mas, também, com o tamanho da área da interface óleo-água. Por isso um sistema controlado para ensaio enzimático da lipase exige que haja uma interface ampla e estável de gotículas lipídicas. Somente em emulsões de óleo em água, perfeitamente dispersas, homogêneas e estabilizadas, tais condições são alcançadas. Em geral a atividade lipolítica é determinada pela dosagem do produto formado - ácido graxo - liberado ao longo do tempo de incubação da reação enzimática, sob condições controladas (natureza e quantidade da emulsão; volume de reação; tampão; pH e temperatura). Os ácidos graxos liberados podem ser quantificados por métodos titulométricos, colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos (WATANABE *et al.*, 1977; JENSEN, 1983; DELABORDE DE MONPEZAT *et al.*, 1990; SMELTZER *et al.*, 1992; HENDRICKSON, 1994; HOPPE & THEIMER, 1995; THOMSON *et al.*, 1999).

Os métodos titulométricos fundamentam-se na titulação alcalina dos íons de hidrogênio liberados na dissociação dos ácidos graxos, resultantes da ação das lipases sobre as moléculas do triglicerídeo (WATANABE *et al.*, 1977; AKHTAR *et al.*, 1980; LINFIELD *et al.*, 1985). Como a ionização completa dos ácidos graxos livres ocorre em pH 9.0 (HOPPE & THEIMER, 1995) a titulação não pode ser concluída em pH abaixo deste valor. Por isso, indicador ácido-base como fenolftaleína (viragem em torno de pH 8.0) não é recomendável. De preferência o indicador ideal

deve ter ponto de viragem ligeiramente acima de pH 9.0, sendo mais apropriado a timolftaleína (AKTHAR *et al.*, 1980) para indicar o ponto final da titulação. Por outro lado, a titulação pode ser executada sem adição de indicador num sistema em que o pH é mantido num valor fixo, controlado por um potenciômetro em um titulador automático (DESNUELLE *et al.*, 1955; GARGOURI *et al.*, 1986; LINFIELD *et al.*, 1985; HOPPE & THEIMER, 1995). Desse modo é realizada a titulação dos íons hidrogênio, à medida que transcorre a ação hidrolítica da enzima, o que permite um acompanhamento contínuo da atividade lipásica sobre o substrato natural. Na mistura de reação o triglicerídeo é adicionado sob a forma de emulsão e seu preparo requer a adição de agentes emulsificantes ou estabilizantes de emulsão. Em geral usa-se a goma arábica como agente estabilizante sem a necessidade de adição de agentes tensoativos (HOPPE & THEIMER, 1995). Por outro lado, as emulsões de óleo de oliva, preparadas com solução de álcool polivinílico, conservam-se completamente homogêneas durante o ensaio e podem ser usadas na determinação da atividade lipásica (WATANABE *et al.*, 1977).

A necessidade de aumentar a velocidade e sensibilidade de ensaios para detectar ácidos graxos livres levou ao desenvolvimento de métodos colorimétricos (LOWRY & TINSLEY, 1976). Estes métodos baseiam-se na complexação dos ácidos graxos livres em solvente orgânico com um metal bivalente (usualmente cobre) seguida por análise espectrofotométrica do metal na fase orgânica. LOWRY & TINSLEY (1976) usaram benzeno como o solvente para os sabões de cobre porque amostras podiam ser aspiradas diretamente dentro da célula ("flow cell") de um espectrofotômetro, aumentando a velocidade de análise. Para aumentar a estabilidade e sensibilidade do cromóforo formado na presença de complexos de ácidos graxos livres cúpricos numa mistura de solventes (clorofórmio: heptano: metano), HRON & MENAHAN (1981) empregaram difenil carbazida contendo difenil carbazona como reagente de desenvolvimento de cor. Outras modificações do método de LOWRY & TINSLEY (1976) têm sido divulgadas, como a quantificação dos ácidos graxos após sua conversão a sais de cobre, pela comparação de valores de absorbância ( $\lambda = 715 \text{ nm}$ ) com aqueles obtidos numa curva para ácido oleico (PATEL *et al.*, 1996) ou após extração dos sais cúpricos dos ácidos graxos livres com clorofórmio e medidas de absorbância a 435 nm (GAO & BREVIL, 1995; LIPPI *et al.*, 1972; BRUNK & SWANSON, 1981 E HRON & MENAHAN, 1981).

HAFKENSCHIED *et al.* (1983) comparou os métodos titulométricos e os métodos com desenvolvimento de sabões de cobre na determinação da atividade

lipásica no fluido duodenal usando uma emulsão de óleo de oliva. O autor verificou que houve boa correlação entre os dois tipos de métodos ( $R^2 = 0,96$ ), mas, entretanto, foram detectadas duas vezes mais lipases quando medidas com o método de sabão de cobre. Métodos clássicos de análise por cromatografia podem ser aplicados para a determinação da atividade lipolítica. Assim, têm sido registrados métodos que se baseiam na quantificação de produtos hidrolíticos da reação com lipase (ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis) por cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VEERARAGAVAN *et al.*, 1990).

Lipases alcalinas são produzidas por uma variedade de microorganismos, particularmente leveduras e bolores. SAVITA & RATLEDGE (1992) usaram um sistema de autotitulação para manter o pH de 8,8 durante a hidrólise de uma emulsão por lipases de *Aspergillus flavipes* assim como BRHUSHAN *et al.* (1994) determinaram a atividade lipolítica, em pH 8,0, pelo método titulométrico, em preparações obtidas de *Candida spp.*

#### **13.4 Isolamento e seleção propriamente ditos**

Fundamentados no fato de que poucas lipases apresentam valores de pH ótimo na faixa alcalina, WATANABE *et al.* (1977) realizaram extensivos programas de isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases. Para tanto usaram amostras de solo e de água bem como de coleção de culturas a fim de obterem microrganismos capazes de produzir lipases alcalinas que atuassem em faixa de pH de 9 a 10. Os autores empregaram como enriquecimento para o isolamento óleo de oliva (2,0%; p/v), fontes nitrogenadas inorgânicas e uréia adicionados ao meio de cultura e, para testes de produção de lipase meios de cultura com farinha de soja (2,0%; p/v) e amido (2,0%; p/v), com pH inicial de 8,0 e 8,5. De 722 amostras os autores isolaram 1606 cepas microbianas. Apenas quatro cepas, todas elas de bactérias, produziram lipase alcalina em quantidade significativa, não tendo sido detectada nenhuma de fungo filamentosos ou de levedura produtora.

SZTAJER & MALISZEWSKA (1988) isolaram 160 cepas produtoras de lipase a partir de 60 amostras de solos contaminados com resíduos industriais provenientes do beneficiamento de óleos vegetais e de indústrias de laticínios e de alimentos em deterioração. Para isolamento e seleção primária, usaram um meio no pH 7,5, contendo (em %; p/v): peptona (0,5); extrato de levedura (0,3); tributirina (1,0); ágar (2,0); pH (7,5). Para isolamento de fungos, adicionou-se estreptomicina

ao meio de cultura e o pH foi acidificado. Na seleção secundária em cultivo submerso com frascos agitados empregaram (%; p/v): farinha de soja (2,0); peptona (1,0); amido solúvel (1,0);  $K_2HPO_4$  (0,2);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1);  $CaCO_3$  (0,5). Das 16 cepas reconhecidas como altoprodutoras apenas 5 eram de fungos filamentosos (4 cepas de *Penicillium spp*) e as cepas que mais produziram a lipase eram de bactérias.

HOU & JOHNSTON (1992) testaram 1229 culturas (508 bactérias, 479 leveduras, 230 actinomicetos e 12 fungos filamentosos) da “Agricultural Research Service Culture Collection” (Peoria, IL, EUA), do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A seleção foi realizada apenas em placa de Petri com emprego de meios de cultura para bactérias e fungos de composição básica diferente, mas contendo óleo de soja (3,0%; p/v) e solução a 0,1% de rodamina B (0,2%; v/v). Cerca de 25% das cepas mostraram-se produtoras de lipase tendo sido classificadas em três categorias (boa, moderada ou fraca produtora), de acordo com o tamanho do halo lipolítico fluorescente. Os fungos apresentaram o maior percentual de cepas na categoria de boas produtoras.

RAPP & BACKHAUS (1992) avaliaram 700 linhagens microbianas da coleção de culturas da GBF (“Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbh”) quanto à produção de lipase extracelular. A seleção primária foi realizada em placa de Petri contendo ágar batata e dextrose, adicionado de trioleína e Tween 80 (na proporção de 3,75 mL:1,25 mL) após emulsificação. Poços no ágar (7,0 mm de diâmetro e 5,0 mm de profundidade) foram preenchidos com suspensão de cada cultura microbiana. Após incubação os diâmetros das zonas claras de lipólise em torno dos poços foram medidos. As cepas com halos mais nítidos e maiores foram selecionados para o cultivo submerso. Os autores também empregaram tributirina (1,0%; v/v) em substituição à mistura trioleína e Twee80 no teste em placa, para avaliarem a capacidade de produção de esterases. Na seleção secundária as cepas foram cultivadas em frascos agitados com meio de cultura de composição seguinte (g/L):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5);  $KH_2PO_4$  (1,0);  $NaNO_3$  (3,0); extrato de levedura (1,0); peptona (30,0); glicose (10,0) e óleo de oliva (10,0). A atividade lipolítica foi determinada em ensaio enzimático com trioleína como substrato em meio tamponado no pH 6,2 tendo sido usado, também, o p-nitrofenolpalmitato no pH 5,6. Da seleção primária, foram selecionadas 70 cepas (34 fungos filamentosos, 15 leveduras e 21 bactérias) para serem testadas em cultivo submerso. Os caldos fermentados que apresentaram maior atividade frente a trioleína foram obtidos de

cultivos de: *Rhizopus spp*, entre os fungos filamentosos; *Rhodotorula rubra* e *Saccharomycopsis capsularis*, entre as leveduras; e *Pseudomonas cepacia*, entre as bactérias. Os fungos *Rhizopus circinans*, *R. microsporus* e *Candida rugosa* apresentaram a maior produção de esterases. Neste trabalho, os autores concluíram que o p-nitrofenolpalmitato não é bom substrato para as lipases.

IONITA *et al.* (1997), testaram a capacidade lipolítica das cepas de fungos da coleção de culturas do “Chemical Pharmaceutical Research Institute” (Bucareste), empregando ágar nutriente suplementado com cloreto de cálcio e Tween 80. Pela determinação dos halos de opacidade, devido à formação de sabões de cálcio, desenvolvidos em torno das colônias lipolíticas, selecionaram como melhores produtores, as cepas de *Candida lipolytica* e *Aspergillus oryzae*.

CARDENAS *et al.* (2001a) têm desenvolvido trabalhos de isolamento e seleção de microorganismos lipolíticos. Duas mil cepas isoladas de amostras do solo foram submetidas a procedimentos de seleção primária (em placa de Petri) em ágar nutriente suplementado com 10% (v/v) de emulsão de óleo de oliva, preparada em solução de goma arábica ou com tributirina. As colônias que apresentaram zonas claras em volta delas eram repicadas e as culturas resultantes eram novamente selecionadas (seleção secundária) em cultivo submerso. Quatrocentas e cinqüenta colônias produziram halo claro em sua volta no meio com tributirina e somente 92 apresentaram halo nas placas com óleo de oliva, indicando predominância de lipases atuantes sobre triglicerídeos de cadeia curta. Das culturas inicialmente selecionadas apenas 14 mostraram-se boas produtoras, sendo 9 fungos filamentosos, uma levedura, uma bactéria e três actinomicetos.

Em outro trabalho do mesmo grupo, (CARDENAS *et al.*, 2001 b), de 960 microorganismos isolados (860 fungos filamentosos e 100 leveduras), 440 produziram halo claro no meio em placa contendo tributirina e destes, apenas 92 apresentaram hidrólise nos meios em placa contendo óleo de oliva. Todas as linhagens formadoras de lipase foram testadas quanto à produção em meio líquido de cultura contendo óleo de oliva como indutor (cultivo submerso). Dez cepas foram selecionadas como boas produtoras: os bolores *Achremonium murorum*, *Monascus mucoroides*, *Monascus sp*, *Arthroderma ciferrii*, *Fusarium poae*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Ovadendron sulphureo - ochraceum* e uma levedura - *Rhodotorula araucariae*.

VARGAS *et al.* (2004), da Universidade de Lund (Suécia), examinaram a produção de enzima lipolítica de 150 cepas isoladas de um lago salgado do Kênia.



As amostras do lago foram inoculadas em meio mineral basal enriquecido com óleo de oliva (3,0%; v/v), em pH 7,0 e 10,0; e incubação a 37 °C e 55 °C, em frascos sob agitação. Após cinco dias de incubação os cultivos foram semeados em meio de cultura em placa de Petri contendo rodamina B. As colônias que apresentaram halo fluorescente após revelação com luz U.V. (350 nm) foram mantidas em culturas puras e a produção de lipase foi avaliada em fermentação submersa em frascos agitados que continham óleo de oliva e extrato de levedura, adicionados ao meio mineral basal. A atividade lipolítica foi determinada nos caldos fermentados empregando-se p-nitrofenolpalmitato como substrato. Quinze isolados selecionados como bons produtores pertenciam aos “clusters” *Pseudomonas* (maioria), *Halomonas* e *Bacillus*.

## **CAPÍTULO I**

# **ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ENZIMA EXTRACELULAR COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM pH ALCALINO**

## **I.1 ENSAIOS PRELIMINARES: DESENVOLVIMENTO DE MEIO DE CULTURA EM PLACA PARA DETECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS LIPOLÍTICOS**

### **RESUMO**

A detecção de fungos filamentosos lipolíticos em placas de Petri é geralmente prejudicada pelo espalhamento do micélio fúngico por toda a superfície do meio de cultura, pela baixa atividade lipolítica de algumas linhagens ou por interferências decorrentes da interação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo com componentes do meio de cultura, principalmente corantes. Um método simples e sensível foi desenvolvido para detectar colônias fúngicas com atividade lipolítica, desenvolvidas em meios de cultura com ágar, em placas de Petri. Foram mensurados o crescimento fúngico que foi avaliado pelo tamanho das colônias e a produção de lipase que foi avaliada pela formação e tamanho de halo lipolítico. Foram empregadas 57 cepas fúngicas, isoladas de amostras de terra, de materiais gordurosos diversos e obtidas de coleções de culturas, que, em culturas puras, foram empregadas para testar as diferentes formulações de meios de cultura, após inoculação pontual nos respectivos meios. Foi estudada a influência do óleo de oliva e sua forma de dispersão como fonte de C, bem como os efeitos de sais biliares, corantes e pH do meio de cultura, usando-se como meio basal formulação contendo extrato de levedura e sais inorgânicos. A formulação contendo óleo de oliva (1,0 mL/L) emulsionado no próprio meio enquanto fluido (após fusão do ágar) e sais biliares (2,0 g/L), tanto no pH 5,6 quanto no pH 7,0, foi adequada para a detecção da atividade lipásica, com razoável reprodutibilidade e sensibilidade. Essa condição também propiciou efeito inibidor do crescimento fúngico na intensidade adequada. Com 72 h de cultivo a 30 °C, todas as cepas cresceram bem em meios com pH ácido e neutro, ocorrendo grande redução no diâmetro das colônias em meios com pH alcalino. As condições padronizadas, descritas no trabalho, podem ser usadas como método de seleção primária de fungos lipolíticos.

## ABSTRACT

The detection of lipolytic filamentous fungi in agar plates presents some difficulties due to the heavy mycelial growth, the low lipolytic activities and the interferences between secondary metabolites and dye indicators. A novel microbiological growth medium was developed to culture lipase producing fungi on agar plates. The fungal growth and lipase production were evaluated by colony size and lipolytic halo, respectively. Different culture media were used to grow 57 strains of filamentous fungi. The influence of olive oil and its dispersed form, the addition of bile salts or dyes and the initial pH were studied. The medium containing the oil emulsified in the melted agar (1.0 g/L) and bile salts (2.0 g/L) at pH 7.0 presented the highest efficiency. The proposed standardized conditions can be used as method for primary screening of lipolytic fungi.

Keywords: lipase-producing fungi; lipolytic activity detection

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda industrial por novas fontes de lipases e sua ampla diversidade quanto às características da enzima continua a estimular o isolamento e seleção de novas cepas de microrganismos lipolíticos (VARGAS *et al.*, 2004).

Em geral, a seleção é iniciada com o estudo do crescimento da cepa microbiana desenvolvida em meio de cultura sólido contendo um substrato lipídico, contido em placa de Petri. Dois métodos de seleção primária são usados: (i) aqueles em que a lipólise é detectada pela visualização de zona clara em volta da colônia contra um fundo opaco do restante do meio de cultura; e (ii) aqueles em que a atividade é detectada quando um corante indicador está incorporado ao meio de cultura. LIMA *et al.* (1991), em programa de seleção de fungo lipolítico, empregaram tributirina, trioleína ou Tween 20 e 80 como substratos, usando os dois últimos em conjunto com indicadores como azul de bromotimol ou vermelho de metila - azul de timol. Os autores encontraram dificuldades para interpretar os resultados com as formulações dos meios de cultura devido tanto ao crescimento exuberante dos fungos em alguns casos quanto à baixa atividade lipolítica detectada em outros, bem como, em determinadas situações, às interferências decorrentes da interação de metabólitos secundários gerados pelo crescimento fúngico e os corantes indicadores. Por outro lado, a tributirina

e o Tween não são substratos naturais para as lipases enquanto o trioleilglicerol (18:1-18:1-18:1) tem sido considerado o substrato ideal, sendo o óleo de oliva recomendado como um substituto adequado e barato (JENSEN, 1983).

As dificuldades encontradas para se determinar as melhores condições de detecção de enzimas lipolíticas produzidas pelos fungos e difundidas em gel de ágar têm sido maiores devido à grande variedade de fungos capazes de produzi-las. A determinação destas condições envolve, necessariamente, o estudo da influência de fatores que resultam em diferentes efeitos entre as cepas microbianas (SHELLEY *et al.*, 1987), podendo as mudanças desses fatores influenciar tanto a produção da enzima quanto a sua difusão bem como a atividade das lipases.

Os sais biliares têm sido usados como inibidores do crescimento de certos microrganismos, principalmente, em meios de enriquecimento seletivo para enterobactérias (VARNAM & EVANS, 1991; VANDERZANT *et al.*, 1992; KONEMAN *et al.*, 1997). Em formulações de meios de cultura para cultivo de fungos os sais biliares têm sido relativamente pouco empregados e, no caso, na forma de bile bruta ("Oxgall") (LITTMAN, 1947). Por outro lado, eles têm sido empregados em técnicas de ensaios enzimáticos para determinação da atividade lipolítica, devido às suas propriedades surfactantes que são benéficas para a formação e estabilização de emulsão óleo-água, gerando a formação da interface necessária para a efetiva ação de lipases (MOZAFAR & WEETE, 1995; KOLOSSVÁRY, 1966).

O presente estudo foi conduzido com a finalidade de desenvolver um método simples e eficiente para a detecção de fungos produtores de lipases em meios de cultura contidos em placas de Petri, com base na obtenção de colônias com tamanho adequado e na visualização de halo lipolítico em torno das colônias lipolíticas. Decidiu-se iniciar o estudo com meio de cultura basal descrito na literatura e testar a incorporação de alguns corantes e de sais biliares, em várias concentrações, em diferentes valores de pH e medir os efeitos quanto ao crescimento de fungos filamentosos e quanto à detecção de halo de lipólise. Os corantes fazem parte de formulações de meios de cultura quando há necessidade de inibir o crescimento microbiano ou são usados para indicar situações especiais. Os sais biliares, além de apresentarem efeito inibidor do crescimento de alguns microrganismos, interferem na ação de enzimas lipolíticas pois facilitam a ação da lipase sobre as gorduras, seus substratos naturais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Agar batata e dextrose (PDA), agar bacteriológico, extrato de levedura e sais biliares # 3, desidratados, foram adquiridos da Difco (EUA). O corante azul Vitória B foi adquirido da Aldrich (EUA) e óleo de oliva da Sigma (EUA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico, obtidos de fontes comerciais.

### 2.2 Fontes de microrganismos e manutenção de culturas

Os microorganismos empregados para testar os meios de cultura sob estudo foram provenientes de coleções de cultura e, principalmente, isolados no laboratório a partir de amostras de solo e materiais gordurosos. Inicialmente foram empregadas 57 cepas de fungos filamentosos. Quatorze cepas foram obtidas de coleções de culturas, tais como: da “American Type Culture Collection” (*Aspergillus ochraceus* 1009; *Aspergillus niger* 9142; *Cunninghamella elegans* 100228a; *Helicostylum piriforme* 8992; *Penicillium citrinum* 28752; *Rhizopus oligosporus* 22959; e *Wojmowicia graminis* 28348); da “Agriculture Research Service Culture Collection” (*Aspergillus awamori* 3112; *Aspergillus niger* 330; *Aspergillus oryzae* 692, e *Rhizopus boulard* 1891 ); do “International Mycological Institute” (*Cephalosporium aphidicola* 68689); do “Institute of Fermentation” (*Cercospora kaki* 9567) e da “University of Alberta Microfungus Collection and Herbaria” (*Fusarium oxysporum* v. *cubense* 9013).

Três cepas (# 44, #46 e #47) foram isoladas de amostras de requeijão bastante gorduroso, típico da região de Salinas, MG. As quarenta restantes foram isoladas a partir de amostras do solo originárias do norte do estado de Minas Gerais, coletadas de áreas sob as árvores do pequiheiro (*Caryocar brasiliensis* Camb) e do abacateiro (*Persea americana* Miller). No laboratório as amostras do solo muito ácido e pobre de nutrientes foram enriquecidas (NAKAYAMA, 1981), com raspas de sementes (oleaginosas) do barú (*Dipteryx alata* Vog.) e mantidas à temperatura ambiente (25 °C) durante sete dias.

Com as amostras de solo enriquecido, do requeijão contaminado e das culturas puras obtidas de banco de cepas foram preparadas suspensões em solução de Tween 80 (0,1 %; p/v), que foram empregadas como material de partida para inocular, pela

técnica de esgotamento em estrias, a superfície do meio de cultura de enriquecimento seletivo diferencial em placas de Petri

As cepas # 41 e # 42 foram identificadas pela Fundação André Tosello, Campinas, Brasil, como *Colletotrichum gloesporioides*, baseado na morfologia dos conídios (AXTER *et al.*, 1985; GUNNEL & GUBLER, 1992; BERNSTEIN *et al.*, 1995.) que eram hialinos, cilíndricos e levemente claviformes.

As culturas puras após serem crescidas em PDA a 30 °C durante sete dias foram mantidas a 4° C (com repiques mensais) e, também, em terra esterilizada contida em tubos de ensaio de rosca, segundo técnica descrita por HAWKSWORTH & KIRSOP (1988).

## 2.3 Condições de cultivo

### 2.3.1 Meios de cultura em placa

**2.3.1.1 Meio basal (Meio M)** – foi baseado em formulação empregada por WATANABE *et al.* (1977), para o isolamento de microorganismos produtores de lipase alcalina. O meio foi preparado em 1000 mL de tampão Tris-HCL 0,1 M pH 8,9, e tinha a composição seguinte (em g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 5; (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO - 2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 1; NaCl - 1; extrato de levedura - 0,5; ágar bacteriológico - 15.

**2.3.1.2 Meio C** – ao meio basal foi adicionada uma emulsão de óleo de oliva que era preparada em solução de goma arábica a 5% (p/v), numa concentração final de 10 g/L de óleo. A emulsão e o meio basal eram autoclavados separadamente.

**2.3.1.3 Meio W** – os ingredientes do meio basal eram dissolvidos em água destilada em substituição ao tampão, e após aquecimento para fusão do ágar, óleo de oliva era adicionado (10 g/L). Todo o conteúdo era homogeneizado em liquidificador por 1 min., obtendo-se uma emulsão estável, e, em seguida, o meio de cultura era esterilizado em autoclave.

**2.3.1.4 Meio com sais biliares (Meio WS)**– ao meio W, antes de fazer o aquecimento para fusão do ágar, foram adicionados os sais biliares para obterem-se concentrações finais de 1,2 e 2,0 g/L. Os procedimentos posteriores foram os mesmos, como descrito acima.

**2.3.1.5 Meio com azul Vitória B (Meio WV)** – uma solução alcoólica do corante era preparada e adicionada ao meio W, antes do plaqueamento, numa concentração final de 0,1 g/L.

Todos os meios foram distribuídos em placas de Petri de 100 mm x 10 mm, usando-se 20 mL por placa.

### **2.3.2 pH inicial**

Os valores de pH dos meios **WS** foram ajustados para 5,6, 7,0 e 8,9 e o pH do meio **W** para 7,0 com soluções de HCl ou NaOH 0,1 N, antes da adição do ágar. Meios preparados com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,9 também foram testados.

### **2.4 Inoculação e incubação**

Os inóculos para os testes foram preparados com cepas crescidas em PDA por sete dias a 30°C. Porções do micélio de cada cepa de fungo eram retiradas com auxílio de agulha de níquel-cromo e usadas para a inoculação pontual nos meios em placa. Cinco replicatas de inóculos de cada cepa foram feitos em cada placa. As placas foram incubadas a 30 °C durante cinco dias.

### **2.5 Crescimento fúngico e detecção de linhagens fúngicas lipolíticas**

O diâmetro das colônias isoladas na superfície dos meios sem corante e o diâmetro de zonas claras que as envolviam, resultantes da difusão e ação da lipase, foram medidas a intervalos de 24 h com auxílio de um paquímetro. Com o meio WV, contendo corante, a atividade lipolítica foi detectada pela formação de halo azul em volta da colônia em meio de cultura de coloração original violeta. Os aspectos morfológicos dos micélios e das hifas foram também observados e anotados.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As formulações de meios de cultura testadas tiveram como ponto de partida o meio em pH alcalino empregado por WATANABE *et al.* (1977) em programa de seleção



de microorganismos produtores de lipase alcalina. Com as condições empregadas os autores isolaram diversas bactérias mas não lograram sucesso no isolamento de fungos lipolíticos, provavelmente devido às condições de alcalinidade do meio de cultura.

Em ensaios preliminares (dados não apresentados), foram testadas as 57 cepas de fungos filamentosos de origens diversas crescidas no meio citado acima, mas com pH alterado para 6,8. Foram empregadas formulações nas quais o óleo de oliva foi usado tal qual e sob a forma de emulsões preparadas em soluções de Tween 80, de álcool polivinílico e de goma arábica, em diferentes concentrações. Os melhores resultados foram obtidos com emulsão do óleo em goma arábica (5%, p/v), verificando-se rápido crescimento dos fungos, mas poucas cepas apresentaram halo lipolítico em torno das colônias. Foi verificado, também, que as cepas de *Rhizopus* spp apresentaram crescimento luxuriante, ocupando o micélio fúngico toda a superfície do meio de cultura, decorridos apenas 48 h de incubação. Por isso novas alterações foram realizadas com o objetivo de desenvolver uma formulação que propiciasse um crescimento razoável, mas limitado ao entorno de colônias isoladas, bem como possibilitasse uma detecção clara do halo lipolítico.

Desta etapa em diante os experimentos passaram a ser conduzidos empregando-se apenas 11 cepas, dentre aquelas que mais se desenvolveram nos meios testados com emulsão preparada em solução de goma arábica. Em ensaios preliminares, foi verificado que a adição de óleo de oliva ao meio basal (meio M), mesmo em pH alcalino (pH 8,9), promovia o incremento do crescimento fúngico, independentemente do modo de dispersão do óleo de oliva. No meio basal (sem o óleo de oliva) as cepas que cresceram desenvolveram colônias achatadas e com pouco micélio que, ao microscópio ótico (MO) foi visto que era formado com hifas hialinas e delgadas. A adição do óleo ao meio basal propiciou bom crescimento, com colônias que apresentavam micélios densos, formados por hifas espessas (ao MO), pigmentadas em alguns casos.

Os efeitos da forma de dispersão do óleo de oliva quando adicionado ao meio basal (meio M) estão descritos na Tabela I.1.

**Tabela I.1- Influência da forma de dispersão do óleo de oliva como fonte principal de Carbono em meio de cultura em placa sobre o crescimento fúngico e produção da atividade lipolítica<sup>a</sup>.**

Cepa <sup>b</sup>	Diâmetro de colônia (mm)		Diâmetro de halo (mm)	
	Meio C <sup>c</sup>	Meio W <sup>d</sup>	Meio C <sup>c</sup>	Meio W <sup>d</sup>
23	nr	Conf.	nr	0
41	25,3 ± 5,0	24,3 ± 3,6	0	25,0 <sup>f</sup>
42	24,0 ± 4,6	25,0 ± 4,2	0	28,0 <sup>e</sup>
43	16,3 ± 5,3	14,2 ± 4,7	0	0
44	7,7 ± 1,5	8,2 ± 3,0	0	0
45	17,0 ± 3,0	26,1 ± 3,1	18,0 <sup>e</sup>	27,0 <sup>e</sup>
46	30,7 ± 7,5	18,0 ± 2,6	0	20,0 <sup>e</sup>
47	35,0 ± 0,0	19,5 ± 1,8	0	21,5 <sup>e</sup>
52	20,3 ± 7,6	23,8 ± 5,5	0	0
56	9,7 ± 0,6	9,5 ± 2,1	12,0 <sup>e</sup>	14,0 <sup>e</sup>
57	30,7 ± 7,5	19,0 ± 2,1	0	21,5 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>- meio de cultura basal (g/L): - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5,0);- (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (2,0);- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0);-NaCl (1,0);- extrato de levedura (0,5); ágar bacteriológico (15,0). pH 6,8. Incubação a 30 °C, durante 96 h; <sup>b</sup>- # 23 (*Rhizopus boulard* NRRL1891); # 41 e # 42 (*Colletotrichum gloeosporioides*); # 52 (*Fusarium oxysporum* UAMH 9013); <sup>c</sup>- 10 g/L de óleo de oliva sob a forma de emulsão em solução de goma arábica (1,25%; p/v); valores médios de triplicata, três repetições; <sup>d</sup>- 10 g/L de óleo de oliva emulsionado no próprio meio de cultura previamente fundido; <sup>e</sup>- halo detectado uma única vez, em três repetições; <sup>f</sup>- halo detectado apenas duas vezes, em três repetições; nr – não realizado; Conf. – confluenta.

Apesar de ter ocorrido variações importantes do crescimento de algumas cepas, não foi detectada diferença do crescimento nos meios com o óleo de oliva disperso no próprio meio de cultura (meio W) e emulsionado em solução de goma arábica (meio C), tendo ocorrido confluência das colônias nos dois meios com 96 h de incubação. O halo claro de lipólise foi detectado em volta de algumas colônias de cepas desenvolvidas no meio W (sete cepas) e apenas em duas no meio C. A variação do desenvolvimento de halo lipolítico foi bastante significativa entre as repetições do teste com uma mesma cepa, tendo sido detectado halo em apenas dois testes entre cinco realizados, não ocorrendo, portanto, a reprodutibilidade adequada.

Devido ao crescimento fúngico acentuado, como pode ser visto na Figura I.1, e à irregularidade do aparecimento do halo lipolítico, testou-se a incorporação ao meio W de substâncias que pudessem atuar sobre o crescimento e sobre a formação e detecção da atividade lipolítica. Preliminarmente, testou-se a adição de sais biliares, do

corante azul Victoria B e do corante rosa Bengala. Foram obtidos resultados promissores com sais biliares e com o corante azul Vitoria B, não ocorrendo o mesmo com rosa Bengala (dados não apresentados).



**Figura I.1** – Características do crescimento do fungo *Rhizopus boulard* NRRL 1891 cultivado em meio W (sem sais biliares) com ausência de halo lipolítico.

Em decorrência dos prováveis efeitos dos sais biliares sobre a produção e atividade da enzima lipolítica bem como pelo seu efeito inibitório do crescimento fúngico foram testadas concentrações de 0,1 a 2,0 g/L. Observou-se que a inibição do crescimento foi significativa somente a partir de 1,0 g/L mesmo em condições alcalinas e que o halo podia ser detectado, mas não se apresentava nítido.

Com o objetivo de estudar o efeito dos sais biliares na presença de solução tampão em pH alcalino foram testados meios de cultura com a formulação do meio W adicionado de maiores concentrações de sais biliares, e os resultados foram comparados com os obtidos com o meio W, também no mesmo tampão, usado como controle.

Na Tabela I.2 estão representados os resultados obtidos com 96 h de incubação. Como esperado, a inibição do crescimento foi variável entre as cepas, com efeito mais significativo no meio contendo 2,0 g/L. Além disso, apesar da grande variabilidade na detecção do halo de lipólise foi verificado que os sais biliares favoreceram o aparecimento do halo lipolítico o qual apresentava-se bastante nítido. Além do efeito de inibição sobre o desenvolvimento das colônias, foram percebidas alterações morfológicas significativas nos meios com sais biliares, principalmente com a cepa de *Rhizopus* spp. Os fungos crescem mais em pH ácido enquanto os sais biliares são solúveis em pH alcalino. Esses fatores atuando em conjunto podem explicar o

acentuado efeito inibidor que foi verificado no pH alcalino. Segundo CARLILE & WATKINSON (1997), fungos inferiores crescem e se espalham rapidamente porque suas hifas são grandes e a zona de crescimento periférico é abrangente. Isso propicia taxas rápidas de fluxo protoplasmático suficiente para suportar a intensa atividade metabólica no ápice da hifa. Nas condições testadas essa situação, de algum modo, pode ter sido alterada.

**Tabela I.2 – Efeito de sais biliares adicionados ao meio W tamponado em pH alcalino sobre o crescimento fúngico e sobre a detecção da atividade lipolítica**

Cepa <sup>a</sup> n <sup>o</sup>	Diâmetro de colônia (mm) <sup>b</sup>				Diâmetro de halo lipolítico (mm) <sup>c</sup>			
	Meio W <sup>d</sup>	Meio W e sais biliares (g/L)			Meio W <sup>d</sup>	Meio W e sais biliares (g/L)		
		1,2	1,6	2,0		1,2	1,6	2,0
23	Conf.	10,0±2,6	6,3±5,8	7,0±4,3	0/0/0	10/17/11	0/6/18	0/16/0
41	21,0±1,0	18,3±4,6	5,7±3,2	13,0±2,0	0/22/0	15/24/23	0/20/0	0/17/0
42	29,3±0,6	22,3±1,5	19,7±1,5	18,0±1,0	0/0/0	24/24/26	22/19/0	0/20/23
43	11,0±1,1	10,0±1,7	6,7±1,5	7,3±1,5	0/0/0	13/13/11	11/11/8	15/9/9
44	10,7±2,6	6,7±1,5	5,7±2,1	6,7±2,5	0/0/0	9/9/6	6/11/10	11/12/9
45	22,7±3,2	21,0±2,5	13,3±4,0	12,7±4,5	0/0/0	19/25/17	0/20/10	0/21/0
46	18,3±5,5	15,0±4,3	10,0±0,0	8,7±1,5	0/0/0	0/22/0	0/0/0	0/0/0
47	19,3±2,1	11,7±1,6	10,3±2,5	12,3±1,7	0/19/0	0/20/0	0/0/0	0/0/0
52	23,0±1,0	14,0±0,0	11,7±0,6	11,0±0,0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
56	9,7±2,6	4,7±1,1	4,3±0,6	3,7±0,6	0/0/0	0/8/0	0/6/0	0/6/0
57	21,3±3,0	16,7±2,3	11,3±0,6	10,3±0,6	0/20/0	0/20/0	0/12/0	0/11/0

<sup>a</sup> 23 (*Rhizopus boulard* NRLL 1891); 41-42 (*Colletotrichum gloesporioides*); 52 (*Fusarium oxysporum* UAMH 9013); <sup>b</sup> valores médios de cinco replicatas e três repetições; <sup>c</sup> valores médios de cinco replicatas de cada repetição; <sup>d</sup> composição (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-5; (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-1; NaCl-1; extrato de levedura- 0,5; ágar bacteriológico- 15,0; tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,9- 1000 mL; Conf.-confluente.

Verificou-se, também, o efeito dos sais biliares quando foram adicionados ao meio W, mas, desta vez, não tamponado em pH neutro. Os resultados podem ser vistos na Tabela I.3. Nos meios com pH inicial 7,0 os sais biliares inibiram o crescimento fúngico na concentração mais baixa sem que, praticamente, ocorresse aumento da inibição com concentrações maiores, resultados contrastantes com aqueles obtidos na presença de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,9 (dados da Tabela I.2). O

efeito inibidor foi, em geral, também menos acentuado, ocorrendo coalescência das colônias de algumas cepas (23, 45, 46, 47 e 57), em cultivos de 96 h, em alguns meios com sais biliares, inclusive. Por isso, os dados apresentados na Tabela I.3 referem-se aos cultivos de 72 h. A presença do halo lipolítico, apesar de ainda ter sido detectado com certa inconstância, foi verificado em maior número de cepas.

**Tabela I.3 . Efeito de sais biliares adicionados ao meio W não tamponado com pH inicial neutro sobre o crescimento fúngico e sobre a formação da atividade lipolítica**

Cepa <sup>a</sup>	Diâmetro de colônia (mm) <sup>b</sup>				Diâmetro de halo lipolítico (mm) <sup>c</sup>			
	Meio W <sup>d</sup>	Meio W e sais biliares (g/L)			Meio W <sup>d</sup>	Meio W e sais biliares (g/L)		
		1,2	1,6	2,0		1,2	1,6	2,0
23	Conf.	14,0	10,0	8,0	0/0	0/0	0/0	0/0
41	22,0±2,8	11,0±1,4	11,0±1,4	10,0±0,0	0/0	13/11	15/12	13/12
42	25,0±2,8	17,0±4,2	15,5±3,5	13,0±2,8	0/0	18/0	16/19	16/14
43	18,5±6,4	10,0±2,8	9,0±0,0	8,5±0,7	0/0	0/10	11/11	11/10
44	8,0±4,2	9,5±3,5	8,5±2,1	8,5±0,7	0/0	0/11	8/11	11/10
45	30,5±6,4	21,0±5,6	20,5±4,9	18,5±6,4	0/0	0/18	0/19	0/16
46	32,5±3,5	24,5±4,9	23,5±6,4	23,0±8,5	0/0	0/0	0/20	0/18
47	28,5±4,9	22,5±4,9	19,0±8,5	18,0±7,1	0/0	0/0	0/15	0/15
52	19,0±1,4	13,0±4,2	13,0±2,8	9,5±2,1	0/0	11/0	12/0	12/12
56	9,0±0,0	8,5±0,7	7,5±2,1	6,5±3,5	0/0	0/9	8/8	10/5
57	32,5±3,5	22,0±4,2	22,0±4,2	18,5±7,8	0/0	0/0	0/21	0/16

<sup>a</sup> 23 (*Rhizopus boulard* NRLL 1891); 41-42 (*Colletotricum gloesporioides*); 52 (*Fusarium oxysporum* UAMH 9013); <sup>b</sup> valores médios de cinco replicatas e duas repetições; <sup>c</sup> valores médios de cinco replicatas de cada repetição; <sup>d</sup> composição (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5); (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (2); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1); NaCl (1); extrato de levedura (0,5); óleo de oliva (10,0), emulsionado no próprio meio de cultura previamente fundido; água destilada-1000 mL; ágar bacteriológico (15,0); pH 7,0

Para esclarecer melhor o efeito da associação entre pH e sais biliares foi estudada, então, o desempenho de crescimento dos fungos e formação de lipase em meios de cultura contendo os sais biliares na concentração de 2,0 g/L em pH 5,6, 7,0, 8,9 e 8,9 tamponado (Tabela I.4). Apesar de o crescimento fúngico ter sido tênue com 24 h de cultivo pôde-se notar colônias de algumas cepas razoavelmente desenvolvidas nos meios de pH ácido (5,6).

**Tabela I.4. Efeito do pH inicial de meios de cultura contendo óleo de oliva (10,0 g/L) e sais biliares (2,0 g/L) sobre o crescimento fúngico e sobre a formação de halo lipolítico**

Cepa <sup>a</sup>	Diâmetro de colônia (mm) <sup>b</sup>				Diâmetro de halo lipolítico (mm) <sup>c</sup>			
	pH do meio de cultura <sup>d</sup>				pH do meio de cultura <sup>d</sup>			
	5,6	7,0	8,9	8,9T <sup>d</sup>	5,6	7,0	8,9	8,9T <sup>d</sup>
23	22,0 ± 10,7	7,3 ± 2,5	3,0 ± 3,6	4,7 ± 6,4	14 / 0 / 0	0 / 10 / 9	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
41	10,7 ± 7,0	10,0 ± 1,0	7,3 ± 2,3	6,7 ± 3,0	16 / 11 / 10	12 / 12 / 11	12 / 8 / 10	15 / 7 / 0
42	14,3 ± 0,6	11,7 ± 1,5	11,0 ± 1,0	9,0 ± 1,0	18 / 17 / 16	13 / 17 / 15	14 / 14 / 14	14 / 13 / 10
43	9,0 ± 1,0	7,0 ± 1,0	2,0 ± 0,0	1,7 ± 2,9	10 / 10 / 0	10 / 9 / 8	3 / 0 / 0	6 / 0 / 0
44	8,7 ± 1,1	5,3 ± 1,1	0,7 ± 1,1	1,3 ± 1,1	11 / 9 / 0	10 / 7 / 11	0 / 0 / 8	0 / 0 / 0
45	15,3 ± 2,5	10,3 ± 1,1	8,3 ± 2,3	5,7 ± 4,0	20 / 16 / 17	12 / 14 / 11	0 / 14 / 0	14 / 0 / 0
46	30,3 ± 8,1	12,7 ± 1,5	5,7 ± 2,3	3,0 ± 2,3	0 / 0 / 0	0 / 15 / 14	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
47	13,0 ± 0,0	10,0 ± 2,6	5,0 ± 0,0	2,7 ± 4,3	16 / 14 / 14	0 / 16 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
52	8,3 ± 1,5	8,7 ± 1,5	6,7 ± 1,5	15,0 ± 3,0	12 / 10 / 8	9 / 11 / 10	7 / 0 / 8	9 / 0 / 0
56	8,3 ± 1,1	3,7 ± 0,6	0,7 ± 1,1	0,7 ± 1,1	11 / 8 / 0	5 / 5 / 6	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
57	16,3 ± 2,5	10,0 ± 1,7	7,7 ± 2,5	4,0 ± 2,0	19 / 16 / 0	0 / 13 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0

<sup>a</sup> 23 (*Rhizopus boulard* 1891); 41-42 (*Colletotricum gloesporioides*); 52 (*Fusarium oxysporum* UAMH 9013); <sup>b</sup> valores médios de cinco replicatas, três repetições; <sup>c</sup> valores médios de cinco replicatas de cada ensaio; <sup>d</sup> composição do meio de cultura (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-5; (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O-1; extrato de levedura-0,5; ágar bacteriológico (15,0); óleo de oliva (10,0), emulsionado no próprio meio de cultura previamente fundido; pH 5,6, 7,0 e 8,9 com água destilada como diluente; pH 8,9T com solução tampão Tris-HCl 0,2 M como diluente; 72 h de cultivo.

Com 48 h foi detectada zona clara de lipólise em torno das colônias de algumas cepas desenvolvidas nos meios de pH ácido e neutro. Com 72 h de cultivo todas as cepas apresentaram crescimento adequado nos meios de pH ácido e neutro. Em condições alcalinas, como esperado, as cepas fúngicas cresceram menos como se pode notar com a forte redução do diâmetro das colônias, quando são comparados os valores das colônias crescidas em pH ácido e neutro com aqueles em pH alcalino. A cepa # 23 (*Rhizopus boulard*), com crescimento exuberante em pH ácido, apresentou diâmetro médio de 7,3 ± 2,5 mm em pH neutro, não ocorrendo o espalhamento do micélio fúngico, característica marcante do gênero *Rhizopus* spp.

A presença de halo lipolítico nítido foi detectada na totalidade das cepas e, com maior constância entre as repetições dos ensaios, no meio com pH neutro. A irregularidade na detecção do halo foi marcante nos meios de pH alcalino.

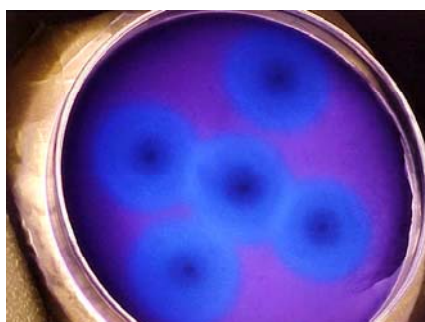
A opacidade do meio de cultura, associada à solubilidade parcial dos sais biliares no pH 7,0, forneceu as condições necessárias para a obtenção de colônias

isoladas e no tamanho adequado, assim como permitiu melhor difusão e ação da lipase, o que resultou em fácil detecção de halo lipolítico nítido (Figura I.2).



**Figura I.2** – Aspecto de colônias isoladas da cepa # 41 (*Colletotrichum gloesporioides*) cultivada em meio W no pH 7,0, adicionado de sais biliares (2,0 g/L), com seus respectivos halos lipolíticos.

O halo lipolítico, quando presente no meio com o corante, apresentou-se bastante nítido. Uma coloração levemente violeta foi observada no meio de cultura que aumentou de intensidade em pH alcalino. As colônias dos fungos lipolíticos apresentaram zona de coloração azul em sua volta (Figura I.3).



**Figura I.3** – Aspecto dos halos lipolíticos da cepa # 41 (*Colletotrichum gloesporioides*) cultivada em meio W no pH 7,0 adicionado de corante azul Vitória B (1,0 mg/L).

O efeito do azul Victoria B adicionado ao meio W com pH inicial ajustado para 7,0 também foi avaliado. Foi verificada inibição significativa das cepas fúngicas no meio que continha azul Victoria, como pode ser visto na Tabela I.5.

**Tabela I.5. Efeito do corante azul Vitória B adicionado ao meio W no pH 7,0 sobre o crescimento fúngico e sobre a formação de lipase**

Cepa <sup>a</sup>	Diâmetro de colônia (mm) <sup>b</sup>		Diâmetro de halo (mm) <sup>c</sup>	
	Meio W <sup>d</sup>	Meio W+ corante <sup>e</sup>	Meio W <sup>d</sup>	Meio W+ corante <sup>e</sup>
23	Conf	7,3 ± 12,7	0 / 0 / 0 / 0	0 / 23 / 0 / 0
41	25,7 ± 3,0	11,5 ± 3,4	0 / 0 / 27 / 0	16 / 15 / 8 / 14
42	31,7 ± 4,7	20,2 ± 4,6	0 / 0 / 28 / 0	16 / 21 / 21 / 25
43	24,2 ± 7,4	0,5 ± 1,0	0 / 0 / 0 / 0	0 / 0 / 0 / 0
44	8,0 ± 4,1	0,5 ± 1,0	0 / 0 / 0 / 0	0 / 0 / 0 / 0
45	31,5 ± 4,3	20,0 ± 5,1	0 / 0 / 27 / 0	15 / 0 / 24 / 22
46	29,5 ± 8,0	19,2 ± 9,7	0 / 0 / 20 / 0	0 / 31 / 27 / 22
47	30,5 ± 6,1	17,2 ± 9,0	0 / 0 / 24 / 0	5 / 27 / 25 / 24
52	25,5 ± 3,5	4,0 ± 3,5	0 / 0 / 0 / 0	4 / 0 / 0 / 0
56	10,7 ± 1,7	3,5 ± 1,7	0 / 14 / 0 / 0	0 / 0 / 4 / 0
57	29,7 ± 7,1	19,5 ± 7,7,	0 / 0 / 23 / 0	24 / 13 / 27 / 24

<sup>a</sup> 23 (*Rhizopus boulard* 1891); 41 e 42 (*Colletotricum gloesporioides*); 52 (*Fusarium oxysporum* UAMH 9013); <sup>b</sup> valores médios de cinco replicatas, quatro repetições; <sup>c</sup> valores médios de cinco replicatas de cada ensaio; <sup>d</sup> composição do meio de cultura (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5); (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (2); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1); extrato de levedura (0,5); ágar bacteriológico (15,0); óleo de oliva (10,0), emulsionado no próprio meio de cultura previamente fundido; pH 7,0 com água destilada como diluente; <sup>e</sup> 1,0 g/L de azul Victoria B; Conf. - confluenta

A lipólise libera ácidos graxos do óleo de oliva que provocam diminuição do pH, alterando a coloração para azul, ficando mais intensa com o aumento da concentração de ácidos graxos livres. Em meio com a mesma formulação mas no pH ácido a liberação de ácidos graxos leva à formação de halo da mesma cor do meio (azul), mas de tonalidade mais escura. Segundo THOMSON *et al.* (1999), os ácidos graxos livres quando são de cadeia longa apresentam solubilidade limitada em água, levando ao aparecimento de halo azul com tonalidade intensa e mais próxima da colônia enquanto os de cadeia curta em razão de se difundirem mais, formam halo de tonalidade mais débil e mais difusa.

A detecção de atividades enzimáticas, presentes em preparações brutas ou preparações de enzimas purificadas, pelo método da difusão em gel de ágar, e que se baseia na visualização e medição do diâmetro de zonas de hidrólise, é decorrente da concentração da enzima e das características de difusão dessas preparações (SHELLEY *et al.*, 1987). Além disso, a detecção da atividade de enzimas formadas e liberadas pelas colônias dos microrganismos desenvolvidas nos meios em placa é



influenciada, também, por outros fatores. A detecção eficiente de microrganismos lipolíticos depende de fatores que se relacionam entre si, como o crescimento da cepa, a produção e a liberação da(s) lipase(s), a atividade e a especificidade da enzima pelo substrato usado e a sensibilidade da técnica para detecção da atividade enzimática. Assim, as condições do teste devem ser otimizadas para que todos os fatores sejam contemplados (SHELLEY *et al.*, 1987; THOMSON *et al.*, 1999). Por outro lado as condições de cultivo influenciam fortemente a composição e desempenho metabólico das células microbianas (EGGLI & ZIN, 2003).

Foi demonstrado neste trabalho que o óleo de oliva e sua forma de dispersão, a presença e concentração de sais biliares, a presença do corante azul Vitória e o pH inicial do meio de cultura influenciaram significativamente a detecção de fungos lipolíticos. A descoberta do efeito satisfatório de uma mistura de sais biliares com alto grau de pureza (Bile salts # 3, da marca Difco) foi a contribuição marcante para o implemento de um método simples e eficiente para detecção de fungos filamentosos lipolíticos em placas de Petri. O meio basal M, adicionado de 2,0 g/L de sais biliares em pH neutro, seguido de aquecimento para fusão do agar; adição de 10 g/L de óleo de oliva, homogeneização em liquidificador por 1 min, autoclavação e distribuição de 20 mL em placa de Petri (100 mm x 10 mm), demonstraram ser procedimentos adequados para a detecção de fungos filamentosos que produzem lipases. Estas condições padronizadas, permitiram, como demonstrado, a fácil detecção de fungos lipolíticos devido à formação de colônias de tamanho adequado e devido à potencialização da atividade lipolítica, além de razoável repetitividade.

## I.2 ISOLAMENTO, SELEÇÃO PRIMÁRIA E SELEÇÃO SECUNDÁRIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASE EXTRACELULAR ATIVA EM pH ALCALINO

### RESUMO

Foi avaliada a capacidade de produção de lipase extracelular ativa em pH alcalino de 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de culturas e 59 outras, isoladas de amostras de solo, originárias do cerrado do norte do estado de Minas Gerais (Brasil) com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. Um meio de cultura com ágar, emulsão de óleo de oliva e sais biliares foi empregado para o isolamento dos fungos e para a seleção primária em placa, tendo sido medidos o diâmetro das colônias e do halo lipolítico em torno delas. O halo de lipólise foi detectado em 26 cepas (35,6%), mas apenas 21 foram selecionadas pela relação raio de halo lipolítico pelo raio da colônia, sendo consideradas produtoras em potencial. Em seguida, na seleção secundária, com o crescimento das cepas em condições de fermentação em substrato líquido e fermentação em substrato sólido, 10 cepas foram consideradas boas produtoras de lipase. A cepa melhor produtora, identificada como *Colletotricum gloesporioides*, produziu 27.700 U/L de lipase, empregando-se inóculo vegetativo, com cultivo submerso em frascos Erlenmeyer sob agitação em incubadora orbital (150 rpm), a 30 °C durante 96 h no meio de cultura a pH 7,0, com a composição seguinte: peptona bacteriológica (20,0 g/L); óleo de oliva (8,0 mL/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,0 g/L). A atividade de protease, não detectada neste meio, foi detectada quando o fungo foi cultivado em meio de composição similar mas contendo NaNO<sub>3</sub> em substituição ao NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. A preparação bruta da enzima foi capaz de hidrolisar amplo espectro de substratos incluindo gordura de porco, óleos vegetais e tributirina, apresentando um perfil hidrolítico diferente de outras lipases fúngicas, descritas na literatura, sobre substratos lipídicos de diferentes composições em ácidos graxos, com respeito à intensidade de hidrólise.

### ABSTRACT

The capacity of extracellular lipase production by 73 strains of filamentous fungi was measured. Fourteen strains were obtained from culture collections and 59 were isolated from savanna soil samples of the Minas Gerais state (Brazil). Selective

enrichment techniques were used to isolate the strains. Isolation and primary screening were made utilizing an agar culture medium containing bile salts and olive oil emulsion. The diameters of colonies and lipolytic halos around them were measured. The lipolytic halo was detected around colonies of 26 strains (35.6%) but only 21 were selected by the ratio of the lipolytic halo radius and the colonies radius. Next, under conditions of substrate liquid fermentation and solid substrate fermentation, 10 strains were considered good producers. The most productive strain, identified as *Colletotrichum gloesporioides*, produced 27,700 U/L of extracellular lipase in shaken Erlenmeyer flasks (150 rpm), at 30 °C after 96 h in the culture medium with initial pH 7.0 and the following composition: bacteriological peptone (20,0 g/L); olive oil (8,0 mL/L); MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (1,0 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L) e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,0 g/L). Protease activity was detected when the fungi was cultured in similar medium with NaNO<sub>3</sub>. The crude lipase preparation was able to hydrolyze a broad range of substrates including lard, natural oils and tributyrin but differently of others fungal lipases with respect to the intensity of hidrolisis.

Keywords: *Colletotrichum gloesporioides*, lipase-producing fungi, screening

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos têm sido usados para obtenção de alimentos tradicionais, bebidas (RUIZ-TERAN & OWENS, 1996; SPARRINGA & OWENS, 1999) e para a produção industrial de enzimas devido aos altos rendimentos (SHARMA *et al.*, 2001; IWASHITA, 2002).

Alguns fungos produtores de lipases comercialmente importantes pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Candida* e *Penicillium* (TAN *et al.*, 2003; ELLAIAH *et al.*, 2004; LARIOS *et al.*, 2004). A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características enzimáticas têm estimulado a procura de novas cepas de microrganismos lipolíticos, tanto entre as bactérias quanto entre os fungos (VARGAS *et al.*, 2004). No caso dos fungos filamentosos a produção de lipase varia de acordo com a cepa, de acordo com o meio de cultura e com as condições de cultivo (SHARMA *et al.*, 2001; CIHANGIR & SARIKAYA, 2004)

Em geral, a seleção começa com o estudo do crescimento das cepas em meio de cultura sólido em placas de Petri. É conhecido que o sucesso ou fracasso na seleção de microrganismos depende fundamentalmente da seleção primária. A detecção de colônias de fungos filamentosos lipolíticos, entretanto, tem apresentado dificuldades, usualmente, como conseqüência do crescimento exuberante de alguns

fungos (*Rhizopus* spp, por exemplo), da baixa atividade lipásica detectada ou da interferência dos corantes presentes no meio de cultura com metabólitos produzidos pelos fungos (JENSEN, 1983). O emprego de um meio de cultura sólido para detectar fungos produtores de lipase (em placa), eficientemente, torna-se, pois, imprescindível.

Segundo STEELE & STOWERS (1991) “a seleção primária é predominantemente um procedimento qualitativo no qual uma grande população de organismos é selecionada direta ou indiretamente, para um tipo específico de atividade”. Os aspectos a serem considerados para a escolha dos testes de seleção são simplicidade, custo, rapidez e especificidade, além da sensibilidade (NAKAYAMA, 1981). Os métodos para medição da atividade lipásica em cultivos tais como o titulométrico (WATANABE *et al.*, 1977) e o colorimétrico (STUER *et al.*, 1986) são consumidores de tempo e não podem ser usados em etapa inicial de seleção quando grande número de cepas é avaliado. Por outro lado, a seleção inicial via detecção da atividade lipásica em placas com meios de cultura contendo tributirina (ARIMA *et al.*, 1972) ou Tween (SAMAD *et al.*, 1989) também apresenta limitações visto que tais substâncias não são substratos adequados para detectar a atividade lipásica, porque, funcionam, também, como substratos para outras esterases (HOU & JOHNSTON, 1992).

É sabido que fatores tais como o crescimento da cepa de microrganismo, a produção e liberação da lipase, a atividade enzimática, a especificidade pelo substrato e a sensibilidade do teste empregado são importantes para uma eficiente detecção de microrganismos lipolíticos. De acordo com SHELLEY *et al.* (1987) testes em placa baseados na difusão em gel de ágar devem ser interpretados somente para se detectar a presença de uma enzima, e que não deveriam ser usados para comparar quantitativamente as atividades de enzimas produzidas por diferentes cepas. Apresentam como justificativas as interferências que podem ocorrer na difusão da proteína enzimática através do gel, na produção da enzima pelo microrganismo e na sua própria atividade. As variações decorrentes dessas interferências podem, entretanto, ser minimizadas com a padronização de materiais e das condições do teste.

A relação raio do halo lipolítico pelo raio da colônia microbiana foi usada por IONITA *et al.* (1997) em programa de seleção de microrganismos produtores de lipase, no qual classificou as cepas como boa, moderada ou fraca produtora. HOU & JOHNSTON (1992), entretanto, usaram um critério menos rigoroso quando agruparam as cepas apenas pelo tamanho do diâmetro do halo.

Após a seleção primária, é usual submeter as cepas ao cultivo em substratos líquidos (submersos) para avaliação da produção da enzima. Na natureza, entretanto, os fungos, de habitats terrestres, crescem aderidos a materiais formados por substratos sólidos, mas com características diferentes daquelas de cultivos desenvolvidos nas condições de laboratório, artificiais. Além disso, as condições experimentais que são distintas entre a fermentação em substrato sólido (FSS) e a fermentação em substrato líquido (FSL), podem alterar a expressão de genes, resultando em alterações dos fenótipos tais como crescimento, produção de metabólitos secundários e enzimas, de acordo com IWASHITA (2002) e HÖLKER *et al.* (2004). Por isso, as cepas fúngicas deveriam ser selecionadas após avaliação em ambas condições.

O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar cepas de fungos filamentosos potencialmente produtores de lipase que apresentasse alta atividade em pH na faixa alcalina. Assim, neste capítulo, estão incluídos: (a) a descrição das técnicas usadas para isolar e selecionar os fungos filamentosos; (b) a seleção de cepas potencialmente produtoras de lipase extracelular ativa em pH alcalino; (c) a avaliação da capacidade de produção da lipase pela cepa reconhecida como sendo a mais promissora; (d) a avaliação da produção de protease(s) extracelular(es) pela cepa maior produtora; (e) a avaliação da capacidade hidrolítica da preparação bruta da lipase sobre diferentes substratos. A estratégia seguida foi a seguinte: fazer um pré - enriquecimento para os fungos lipolíticos, incorporando iscas de sementes oleaginosas às amostras de terra; empregar na seleção primária em placa meio de cultura que continha na sua formulação sais biliares como inibidor parcial do crescimento fúngico e como fator de facilitação da ação lipolítica; efetuar a seleção secundária em condições de fermentação em substrato líquido e de fermentação em substrato sólido; acompanhar a fermentação em substrato líquido da cepa maior produtora com o tempo de cultivo; testar a capacidade de hidrólise da lipase produzida pela cepa maior produtora sobre substratos lipídicos de constituição diferente quanto às estruturas de ácidos graxos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

**2.1 Material** - Agar batata e dextrose (PDA), ágar bacteriológico, extrato de levedura, peptona bacteriológica e sais biliares  $\neq$  3, desidratados, eram da marca Difco (Detroit, MI, EUA) ou Acumedia (Baltimore, MD, EUA). Óleo de oliva foi adquirido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), corante azul Victoria B da Aldrich Chemical Co.

(Milwaukee, WI, EUA), tributirina e caseína da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes, obtidos de fontes comerciais, eram de grau analítico.

## 2.2 Métodos

**2.2.1 Microrganismos** - Cinquenta e nove cepas de fungos filamentosos foram isoladas das amostras de solo do norte do estado de Minas Gerais (Brasil), uma região de cerrado, de solo ácido e seco. As cepas restantes (14) foram adquiridas da “American Type Culture Collection” – ATCC - (*Aspergillus ochraceus* 1009; *Aspergillus niger* 9142; *Cunninghamella elegans* 100228a; *Helicostylum piriforme* 8992; *Penicillium citrinum* 28752; *Rhizopus oligosporus* 22959; e, *Wojmowicia graminis* 28348); da “Agriculture Research Service Culture Collection” – NRRL - (*Aspergillus awamori* 3112; *Aspergillus niger* 330; *Aspergillus oryzae* 692; *Rhizopus boulard* 1891); do “International Mycological Institute” - IMI- (*Cephalosporium aphidicola* 68689); do “Institute of Fermentation”- IF- (*Cercospora kaki* 9567); e, da “University of Alberta Microfungus Collection and Herbaria” (*Fusarium oxysporum* v. *cubense* 9013). As cepas isoladas # 41 e # 42 foram identificadas pelo serviço da coleção de cultura da Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brasil, com base na morfologia dos conídios. Os conídios de *C. gloesporioides* são hialinos, cilíndricos e claviformes (AXTER *et al.*, 1985; GUNNEL & GUBLER, 1992; BERNSTEIN *et al.*, 1995). As culturas foram desenvolvidas em PDA a 30 °C, e mantidas a 4 °C e também em terra esterilizada contida em tubo de ensaio com rosca, segundo técnica descrita por HAWKSWORTH & KIRSOP (1988).

**2.2.2 Isolamento de fungos filamentosos produtores de lipase** – Amostras de terra (500 g) foram coletadas de áreas debaixo de árvores do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb), árvore nativa do cerrado e de árvores do abacateiro (*Persea americana* Miller), ambas espécies vegetais produtoras de frutos oleaginosos. No laboratório, raspas das sementes oleaginosas do barú (*Dipteryx alata* Vog.), uma árvore também nativa da região, foram adicionadas às amostras do solo e mantidas em câmara úmida durante sete dias a 25-30 °C. De cada amostra foram retiradas 10 g e uma suspensão foi preparada em 90 mL de solução de Tween 80 (0,1%, p/v). Alíquotas de cada suspensão foram semeadas, por esgotamento em estrias, na superfície de meio de cultura seletivo indicador, desenvolvido nesse trabalho, contido em placas de Petri. O meio de cultura continha (em g/L): extrato de levedura (0,5); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0);

(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (1,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0); NaCl (1,0); óleo de oliva (10,0 mL); e ágar bacteriológico (15,0). O pH inicial foi ajustado para 7,0. Antes da adição do óleo de oliva a mistura foi aquecida para que o ágar fosse fundido e, então, agitada no liqüidificador para emulsionar o óleo. Após incubação a 30°C, em até sete dias, as colônias fúngicas isoladas foram transferidas para o meio de manutenção, sendo mantidas em culturas puras.

**2.2.3 Seleção primária** - parte de fragmentos de hifa da cultura pura de cada cepa foi inoculada, com auxílio de agulha de Níquel – Cromo, pontualmente, no meio de cultura em placa com a mesma composição daquele usado no isolamento, no pH 7,0. Foram realizadas 5 inoculações pontuais de cada cepa sendo as placas incubadas durante 96 h a 30 °C. Foram medidos, com auxílio de paquímetro ou régua milimetrada, os raios das colônias (r) e os raios dos respectivos halos lipolíticos, claros (R). As cepas que apresentaram relação R/r igual ou maior que 1,2 foram consideradas promissoras, sendo, portanto, submetidas à seleção secundária.

**2.2.4 Seleção secundária** - A produção de lipase pelas cepas selecionadas anteriormente foi avaliada tanto em condições de fermentação em substrato líquido quanto de fermentação em substrato sólido. Os filtrados obtidos como descrito abaixo foram analisados em géis de ágar-ágar alcalinos, em placas, e identificados como ATV e AEPV (veja descrição abaixo). As cepas (11) com diâmetro de halo de lipólise igual ou maior do que 2,0 mm foram analisadas, em seguida, pelo método titulométrico.

**2.2.4.1 Preparação do inóculo** - Uma suspensão de esporos (10<sup>6</sup> esporos/mL) foi preparada lavando-se o cultivo de cada cepa na superfície inclinada do meio PDA (“slant”) de sete dias com 10 mL de água esterilizada. Após ter sido feita a mistura de quatro suspensões e homogeneização, a suspensão resultante foi usada para propagação micelial.

**2.2.4.2 Fermentação em substrato líquido (FSL)** - Uma alíquota de 5,0 mL da suspensão de cada cepa foi semeada em 50,0 mL de meio de cultura, contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL, com a composição seguinte (g/L): peptona bacteriológica (20,0); óleo de oliva (8,0 mL); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,0). O pH inicial foi ajustado para 7,0. Os frascos foram então incubados a 30 °C e

agitados a 160 rpm, em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP). Após incubação durante 72 horas a massa micelial foi separada por filtração em gaze e papel de filtro Whatman # 1 e os filtrados foram usados como preparação enzimática para análise. Foram inoculados três frascos para cada cepa.

**2.2.4.3 Fermentação em substrato sólido (FSS)** - Uma alíquota de 2,5 mL de cada suspensão de inóculo foi semeada em meio de cultura contido em frasco de boca larga de 250 mL de capacidade, com a composição seguinte: peptona bacteriológica (30,0 g/L); emulsão de óleo de oliva (25%, v/v) em solução de goma arábica (1,25 %, p/v) (250 mL); solução salina concentrada 10 vezes (100 mL); água destilada (650 mL) e pH 7,0. A solução salina foi preparada com a composição seguinte (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (100,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,0); KCl (2,0). Em cada frasco, contendo 15,0 g de casca de arroz previamente lavada e seca, foram adicionados 10,0 mL do meio de cultura e em seguida a mistura foi autoclavada. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em repouso durante quatro dias à temperatura ambiente (25 °C), em câmara úmida. Para a extração da enzima foram adicionados 100 mL de água destilada à cada frasco. Após agitação branda (150 rpm) durante 60 min em agitador de frascos (MARCONI, Piracicaba, SP) todo o conteúdo foi filtrado em gaze e papel Whatman # 1, sendo o filtrado livre de células usado como preparação enzimática para análise. Foram inoculados três frascos para cada cepa.

## **2.2.5 Detecção da atividade lipásica**

**2.2.5.1 Ensaio em placa de Petri (difusão em gel)** - Os filtrados dos cultivos foram, primeiramente, analisados pela técnica de difusão em gel de ágar que contendo (por litro de 0,1 M Tris-HCl, pH 8,9): 15,0 g de ágar bacteriológico; 80,0 mg de corante azul Victoria B; 6,0 mL de tributirina (gel ATV) ou 15,0 mL de emulsão preparada pela dispersão de 25,0 mL de óleo de oliva em 100 mL de solução a 2% (v/v) de álcool polivinílico (gel AEPV), com auxílio de dispersor ultra turrax modelo T25 da marca IKA, EUA, sob agitação (13000 rpm) durante 5 min. Após aquecimento para fusão do ágar, foi feita a adição da tributirina ou da emulsão, sendo a mistura, em seguida, emulsionada em liquidificador por 1 min. Após a incorporação da solução do corante, a mistura foi distribuída dispensando-se 25 ml em cada placa de Petri (100 mmx20 mm). Após solidificação do ágar foram perfurados poços de 7 mm de diâmetro no gel com ajuda de cilindros de aço inox. Em cada poço, 50 µL de cada filtrado foram



dispensados, em triplicata, e as placas incubadas a 30 °C. Medidas dos diâmetros dos halos, de cor azul, no gel de coloração bonina, foram realizadas com 6, 18 e 24 h, descontando-se o diâmetro do poço. O uso de óleo de oliva e de tributirina está de acordo com JENSEN (1983) e SMITH & HAAS (1992) que recomendam o emprego de dois substratos diferentes para a detecção da atividade lipásica de microorganismos produtores.

**2.2.5.2 Método titulométrico** - Foi empregado o método usado por WATANABE *et al.* (1977). A mistura de reação continha: emulsão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico (2,5 mL), tampão TRIS-HCl 0,02 M pH 8,9 (2,5 mL) e preparação enzimática (1,0 mL). A reação foi desenvolvida em frasco Erlenmeyer de 125 mL de capacidade. Após incubação a 30 °C em banho-maria, sob agitação a 45 ciclos/min em agitador recíproco (marca Fanem, SP, Brasil) durante 10 min, a reação foi paralisada com 10,0 mL da mistura acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de NaOH 0,05 M, na presença de timolftaleína, até o aparecimento de cor azul clara. Usou-se como branco de amostra o filtrado de cada cultivo que fora previamente aquecido durante 10 min em banho-maria sob ebulição. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou um  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos por minuto, nas condições padronizadas do teste.

### Cálculo da atividade lipásica

$$\text{Atividade lipásica} = \frac{(V_{\text{enzima}} - V_{\text{controle}}) \times fc \times D \times 50}{t}$$

sendo,

$V_{\text{enzima}}$  = volume de solução de NaOH 0,05 N, de fator de correção conhecido, gasto para titular os ácidos graxos da reação enzimática

$V_{\text{controle}}$  = volume de solução de NaOH 0,05 N, de fator de correção conhecido, gasto para titular os ácidos graxos presentes no branco da amostra (controle)

fc = fator de correção da solução titulante de NaOH 0,05 N padronizada

D = fator de diluição

t = tempo de reação, em minutos

50 = fator aplicado para expressar o resultado em micromoles de ácido graxo por mL da amostra e representa o número de micromoles de NaOH por mL de solução 0,05 N

### 2.2.6 Detecção da atividade proteolítica

Esta atividade enzimática foi determinada pela técnica da difusão da enzima e formação de halo de proteólise em gel de ágar bacteriológico (1,5 g/L) preparado em tampão Tris - HCl 0,02 M pH 8,0, contendo azida sódica como conservante (0,02%; p/v). Leite em pó desnatado reconstituído no mesmo tampão foi incorporado ao ágar fundido, numa concentração final de 1,0% (p/v). Após homogeneização cuidadosa, evitando-se a formação de espuma, a mistura foi distribuída em placa de Petri e identificada como AL. Em prosseguimento, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos para determinação da atividade lipásica. O halo, quando presente, era transparente, tendo sido feitas medições com 24 h de incubação.

### 2.2.7 Produção de lipase

A cepa considerada mais promissora, identificada como *Colletotrichum gloesporioides*, foi cultivada em meio líquido de fermentação da mesma composição daquele que foi usado na seleção secundária (FSL). Avaliou-se a influência do tipo de inóculo sobre o crescimento fúngico e sobre a produção de lipase, empregando suspensão de esporos ou pré-cultivo de 24 h no mesmo meio de cultura (massa micelial, inóculo vegetativo). A concentração de esporos foi determinada segundo MALLETE (1969). Volumes de 1,0 mL de suspensão de esporos ( $10^6$  / mL) ou de 2,5 mL do pré-cultivo, preparados com a mistura das culturas de 24 h, foram inoculados em 50,0 mL do meio de cultura, contido em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. O cultivo foi conduzido a 30 °C, sob agitação a 160 rpm. A atividade lipásica nos filtrados foi determinada pelo método titulométrico e a massa celular foi calculada determinando-se a massa seca segundo COONEY (1981). A fermentação foi acompanhada durante 96 h, determinando-se nos filtrados dos cultivos os seguintes parâmetros fermentativos: pH final; biomassa (mg/mL); produção de lipase (U/L); rendimento  $Y^{P/X}$  (U/mg de massa micelial); produtividade  $Q_p$  (U/L/h) e velocidade específica de crescimento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ).

## **2.2.8 Produção de lipase e protease em meio de cultura com baixas concentrações de peptona e óleo de oliva.**

A cepa mais promissora foi cultivada, também, em meio com a seguinte composição (g/L): peptona bacteriológica (5,0); óleo de oliva (4,0); NaNO<sub>3</sub> (1,0); MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0). O pH inicial foi ajustado para 6,0. As atividades de lipase, de protease e pH foram determinadas a cada 12 h, durante 72 h de cultivo. A atividade lipásica foi determinada pelo método titulométrico e a proteolítica por difusão em gel de ágar contendo caseína solúvel Merck (1,0%, p/v) dissolvida em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, contendo NaN<sub>3</sub> (0,02%, p/v) como conservante. Alíquota de 50,0 µL dos filtrados foi dispensada em cada poço no gel (7 mm de diâmetro), com incubação a 30 °C durante 18 h. O halo proteolítico, claro, foi medido diretamente descontando-se o diâmetro do poço.

## **2.2.9 Hidrólise de óleos e gorduras naturais pela preparação bruta de lipase de *C. gloesporioides*.**

O cultivo de *C. gloesporioides* após ser filtrado foi usado como preparação bruta de lipase, em testes de hidrólise de óleos vegetais (oliva, gergelim, milho, girassol, abacate, amendoim, soja, linhaça, pequi e canola), de gordura de porco e de tributirina. Foram empregados volumes em dobro dos componentes da mistura de reação em relação ao ensaio enzimático descrito anteriormente (método titulométrico), com 30 min de incubação.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A incorporação de raspas da semente oleaginosa do baru às amostras de terra proveniente de um solo ácido e seco criou as condições de enriquecimento necessárias ao desenvolvimento de fungos com potencial ação lipolítica, tendo sido detectado bolores, aderidos à superfície das raspas das sementes com apenas três dias de incubação. Foram isoladas 59 cepas fúngicas sendo que 25 delas desenvolveram halo lipolítico em torno das colônias no meio de isolamento. Estas cepas juntamente com outra, de *Fusarium oxysporum* UAMH 9013 (única cepa originária de coleções de

culturas que apresentou halo), foram submetidas às condições definidas para a seleção primária. Os resultados estão mostrados na Tabela I.6. O meio de cultura sólido empregado para o isolamento e para a seleção primária foi desenvolvido como descrito anteriormente (Capítulo I.1). No meio em pH neutro, os sais biliares apresentam solubilidade parcial, permitindo a obtenção de colônias fúngicas bem isoladas e de tamanho adequado, inclusive, de cepas pertencentes ao gênero *Rhizopus* spp, cujo micélio em desenvolvimento usualmente espalha-se por toda a superfície dos meios de cultura. Nessas condições ocorreram a difusão e a ação enzimática adequadas que, em conjunto com a opacidade e homogeneidade do meio de cultura, propiciaram a detecção de halo lipolítico claro e nítido em torno das colônias.

**Tabela I.6. Seleção primária de cepas fúngicas produtoras de lipase<sup>a</sup>**

Cepa <sup>b</sup>	Raio (mm) <sup>c</sup>		R / r
	Colônia (r)	Halo Lipolítico (R)	
41	8,5	10,5	1,2
42	8,0	10,0	1,2
43	3,0	6,5	2,2
44	3,0	4,5	1,5
45	5,0	6,0	1,2
46	6,5	7,0	1,1
47	5,5	5,5	1,0
52 <sup>d</sup>	4,5	5,0	1,1
56	1,5	2,5	1,7
57	5,5	5,5	1,0
58	3,5	5,0	1,4
59	2,0	3,0	1,5
60	3,5	4,5	1,3
61	2,5	4,0	1,6
62	2,5	4,0	1,6
63	3,0	4,0	1,3
64	1,5	3,0	2,0
65	3,0	4,0	1,3
66	6,0	10,0	1,7
67	6,0	10,0	1,7
68	3,0	3,5	1,2
69	2,5	3,0	1,2
70	3,0	3,5	1,2
71	5,0	5,5	1,1
72	4,5	6,5	1,4
73	7,5	9,0	1,2

<sup>a</sup> resultados do crescimento das cepas fúngicas cultivadas em placas de Petri com meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva e sais biliares, pH7,0; <sup>b</sup> somente cepas cujas colônias apresentaram halo de lipólise no meio de cultura usado para isolamento; <sup>c</sup> valores médios de cinco replicatas, duas repetições; <sup>d</sup> *Fusarium oxysporum* UAMH 9013.

Das 25 cepas avaliadas 21 (84%) apresentaram relação R/r maior ou igual a 1,2, sendo, então, selecionadas para a avaliação mais apurada da capacidade de produção (seleção secundária), quando crescidas em condições de fermentação submersa (FSL) e fermentação em substrato sólido (FSS).

Neste trabalho, a medição dos raios de halos e de colônias foi realizada em condições padronizadas, após uma etapa preliminar, na qual somente as cepas que desenvolveram colônias com halo no meio de isolamento (25 cepas) foram submetidas à seleção secundária. Assim, nessas condições, apesar de ter sido adotado um critério pouco rigoroso ( $R/r \geq 1,2$ ), quatro delas foram excluídas, proporcionando redução do número delas para serem testadas (21 cepas) na etapa seguinte, mais laboriosa e conclusiva, de seleção secundária.

As enzimas microbianas têm sido produzidas no ocidente empregando-se, principalmente, processos de fermentação submersa. Entretanto, a aplicação da tecnologia de produção de lipases fúngicas por fermentação em substrato sólido tem sido impulsionada visto que em condições otimizadas são obtidas preparações brutas com maiores concentrações da enzima (GONZALEZ *et al.*, 2003).

Devido às possíveis diferentes respostas das cepas em teste, cultivadas nas condições de fermentação em substrato líquido e em substrato sólido, a produção de lipase pelas 21 cepas foi avaliada nas duas condições. Na tabela I.7 estão mostrados os resultados das cepas cujos cultivos, originários da FSL e da FSS, apresentaram, no mínimo, 2,5 U/mL ou 1,5 U/mL de lipase, respectivamente. É interessante notar que outras 10 cepas, cujas relações entre os diâmetros de halo lipolítico e da colônia correspondente (Tabela I.6) foram maiores do que 1,2, produziram pouca lipase, abaixo dos limites mínimos estabelecidos para os filtrados e extratos dos cultivos da FSL e FSS. Isso demonstra que nem sempre ocorre uma correspondência entre o tamanho de halo lipolítico detectado em placa e a quantidade de lipase que é produzida na FSL ou na FSS.

Os filtrados provenientes da fermentação em substrato líquido de 10 cepas (48% das cepas testadas) e apenas três filtrados (14% das cepas testadas) provenientes da fermentação em substrato sólido, apresentaram diâmetro de halo lipolítico igual ou maior do que 2,0 mm (Tabela I.7).

**Tabela I.7. Seleção secundária de fungos produtores de lipase em condições de fermentação em substrato líquido e fermentação em substrato sólido <sup>a</sup>**

Cepa n <sup>o</sup>	Substrato Submerso <sup>b</sup>			Substrato Sólido <sup>c</sup>		
	Diâmetro de halo em		Atividade lipásica (U / mL) <sup>e</sup>	Diâmetro de halo em		Atividade lipásica (U / mL) <sup>e</sup>
	géis de ágar (mm) <sup>d</sup>			géis de ágar (mm) <sup>d</sup>		
	Emulsão Tributirina	de óleo de oliva	Emulsão Tributirina	de óleo de oliva	Emulsão Tributirina	de óleo de oliva
41	13,0	7,0	25,0	7,0	2,0	3,5
42	10,0	3,0	13,0	1,0	1,0	2,5
44	6,0	0,0	0,0	4,0	1,0	1,5
45	7,0	2,0	11,0	0,0	0,0	Nr
58	3,0	6,0	5,0	1,0	1,0	1,0
62	2,0	6,0	3,5	0,0	0,0	Nr
66	12,0	4,0	4,0	0,0	0,0	Nr
67	1,0	2,0	2,0	3,0	1,0	1,0
68	0,0	3,0	0,0	0,0	1,0	1,5
69	0,0	0,0	Nr	0,0	1,0	2,0
70	0,0	0,0	Nr	0,0	1,0	0,5
73	9,0	8,0	7,0	1,0	1,0	4,0

<sup>a</sup> valores médios de triplicatas e duas repetições; cepas que produziram, no mínimo, 1,5 U/mL em condições de fermentação em substrato sólido ou 2,5 U/mL de fermentação em substrato submerso, foram consideradas boas produtoras; <sup>b</sup> 72 horas de cultivo, nas condições descritas em material e métodos; <sup>c</sup> 96 horas de cultivo nas condições descritas em material e métodos; <sup>d</sup> ensaios em condições alcalinas; 50 µ L de caldo por poço; incubação a 30°C, 18 horas; <sup>e</sup> determinada pelo método titulométrico descrito em material e métodos, usando suspensão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico, como substrato; Nr não realizado

Em ambas condições a cepa 41, identificada como *C. gloesporioides*, mostrou a maior atividade lipásica sendo, por isso, escolhida para os estudos posteriores de produção de lipase (25,0 U/mL, em fermentação em substrato líquido). Entre as cepas de coleções de cultura testadas, nenhuma foi considerada boa produtora.

Os parâmetros fermentativos mostrados na Tabela I.8 são resultados do estudo, em cultivo submerso, do efeito do tipo de inóculo, quando a cepa 41, de *Colletotrichum gloesporioides*, foi cultivada em meio de cultura líquido. Pode ser notado que a

produção de lipase é dependente do tempo de fermentação. Entretanto, a produção da biomassa decresceu de 72 para 96 h, mantendo-se a atividade lipásica. Como consequência o rendimento foi maior com 96 h de fermentação. Isso pode ser explicado pela perda ocorrida da biomassa, sem que a produção de lipase fosse afetada, assumindo-se que o micélio remanescente é mais eficiente na produção da enzima. Portanto, a produtividade decresceu em torno de 29% e a diferença do tempo foi de 25%, o que pode explicar a perda de apenas 5% da atividade lipásica. Esse raciocínio não contradiz a taxa específica de crescimento que decresceu com o tempo, como esperado. Entretanto, usando o inóculo vegetativo, a mais alta atividade foi alcançada com 48 h ocorrendo pouca perda de biomassa, mantendo-se o rendimento de produção. A produtividade decresceu de 48 h para 96 h de incubação e a explicação acima pode ser aplicada para este caso bem como para a velocidade específica de crescimento.

**Tabela I.8. Parâmetros fermentativos do cultivo submerso de *Colletotrichum gloesporioides* em frascos sob agitação<sup>a</sup>**

Tipo de Inóculo	Tempo de cultivo (horas)	pH final	Atividade de lipásica (U/L) <sup>b</sup>	Biomassa (mg/mL)	Rendimento $Y^{P/X}$ (U/mg)	Produtividade (U/L/h)	$\mu$ (1/h)
Suspensão de esporos	24	6,7	3500	9,2	0,4	145,8	0,09
	48	7,4	18800	14,9	1,2	391,7	0,06
	72	8,2	25700	12,5	2,1	356,9	0,03
	96	8,5	24300	8,1	3,0	253,1	0,02
Pré-cultivo <sup>c</sup>	24	6,2	18300	11,1	1,6	762,5	0,10
	48	7,4	27700	13,0	2,1	577,1	0,05
	72	8,1	26800	11,0	2,5	372,2	0,03
	96	8,4	27400	10,3	2,7	285,4	0,02

<sup>a</sup> valores médios de quatro ensaios, duas repetições; meio de cultura (g/L): peptona (20,0); óleo de oliva (8,0);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,6);  $KH_2PO_4$  (1,0);  $NH_4NO_3$  (1,0), pH 6,5; <sup>b</sup> atividade medida com o emprego do método titulométrico, como descrito em material e métodos, em condições alcalinas pH 8,0; <sup>c</sup> a massa micelial obtida com 24 horas de cultivo em meio de cultura de mesma composição do meio de fermentação foi usada como inóculo vegetativo

A maior produção de lipase, alcançada com ambos os tipos de inóculo é comparável àquela que foi obtida por TAN *et al.* (2004) para *Penicillium camemberti* cultivado em meio de cultura contendo peptona como fonte orgânica de N, em cultivo submerso (26.000 U/L).

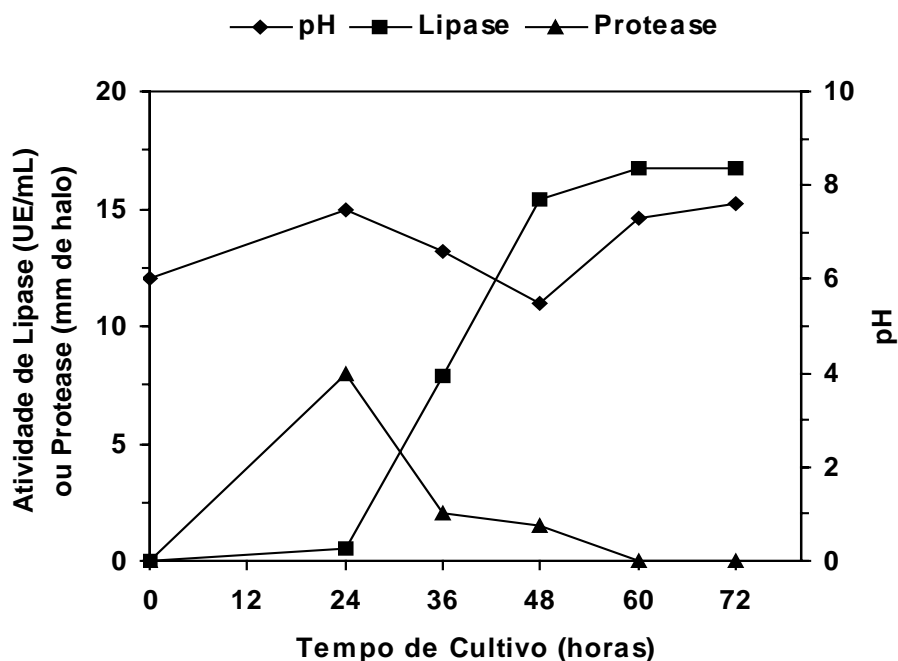
De acordo com PAPAGIANNI & MOO-YOUNG (2002) a fragmentação de hifas é comum em fermentações fúngicas e está associada à agitação intensa e ao aumento da vacuolização da hifa (“hyphal vacuolation”), podendo levar ao enfraquecimento dos filamentos e danos decorrentes. Durante o crescimento fúngico para produção de lipases, dependendo das condições de cultivo, podem ser formadas proteases extracelulares ou, no caso de rompimento da hifa, pode ocorrer liberação de proteases intracelulares. A presença delas na preparação enzimática bruta pode dificultar o processo seguinte de recuperação da lipase e interferir na sua estabilidade (GORDILLO *et al.*, 1995). Por isso, faz-se necessário obter preparações enzimáticas com nenhuma ou com baixa atividade proteolítica.

Detectou-se a atividade de protease nos cultivos de *C. gloesporioides* crescido em meios de cultura contendo peptona e NaNO<sub>3</sub> como fonte secundária de N. Foi verificado, também, que na presença de N inorgânico no mesmo meio mas sob a forma de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> não ocorria produção da protease. Além disso, foi verificado aumento significativo do pH que chegou a 8,7. Nessa situação, apesar da ausência da protease, ocorreu perda acentuada da atividade lipásica, após a sua produção ter alcançado o máximo.

Por outro lado, como demonstrado na Figura 1.4, em meio de cultura com baixa concentração da mesma peptona mas com N inorgânico como NaNO<sub>3</sub> foi verificado que, apesar da formação da protease, ela somente foi detectada durante as primeiras 48 h de incubação.

Foi verificado, também, que a atividade de lipase permaneceu estabilizada após ter sido alcançada sua produção máxima, com aumento menos acentuado do pH. Concluiu-se, portanto, que a preparação bruta obtida nestas condições, com 60-72 h de cultivo, apresentou as características adequadas para o início do processo de recuperação da lipase.



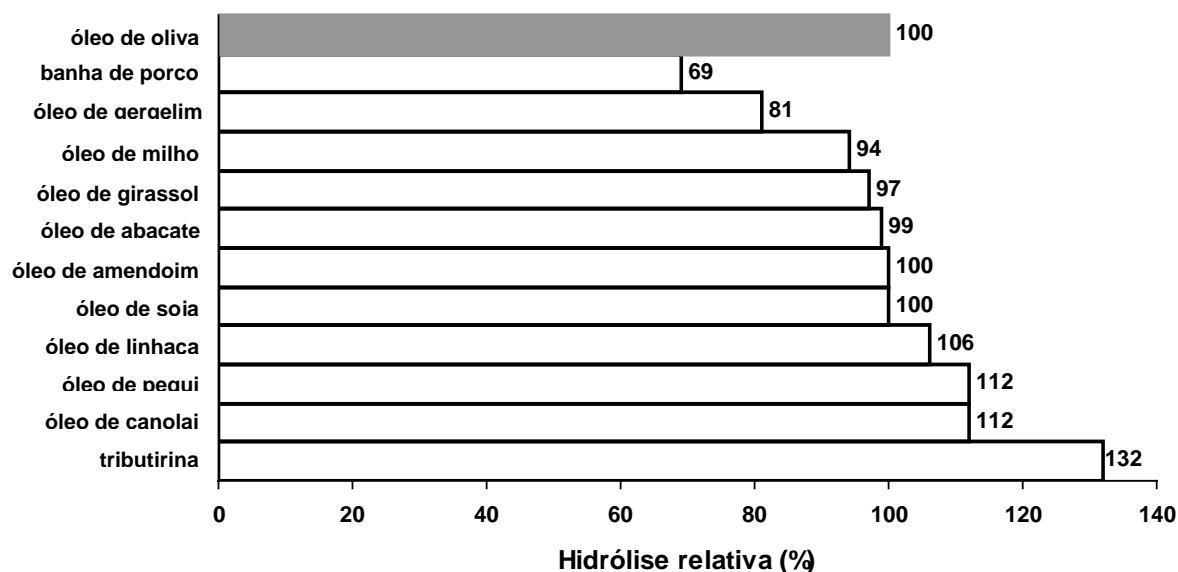


**Figura I.4.** Produção de lipase e protease em cultivo submerso de *C. gloesporioides* crescido em meio de cultura com baixas concentrações de peptona e óleo de oliva.

Meio de cultura (g/L): peptona (5,0); óleo de oliva (4,0); NaNO<sub>3</sub> (1,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0). pH- 6,0.

A Figura I.5 mostra a atividade hidrolítica da lipase bruta, obtida com o crescimento de *C. gloesporioides* em meio de cultura contendo peptona e NaNO<sub>3</sub>, sobre vários óleos vegetais, gordura de porco e tributirina. Considerando como 100% a ação sobre o óleo de oliva, pode-se verificar que o menor valor hidrolítico foi encontrado para a banha de porco e o maior para a tributirina. Pode-se concluir, portanto, que o fungo produtor de lipase isolado é eficiente para hidrolisar um amplo espectro de substratos, o que está de acordo com os resultados encontrados por outros pesquisadores, mas com perfil hidrolítico diferente daqueles registrados na literatura. OMAR *et al.* (1987) demonstraram que a lipase de *Humicola lanuginosa* apresentou hidrólise relativa em torno de 170% para os óleos de milho e de soja, de 110% para a gordura de porco e de 70% para o óleo de amendoim. Como foi demonstrado a lipase de *C. gloesporioides*, por outro lado, apresentou resultados bastante diferentes, ou seja: em torno de 100%, de 69% e de 100%, respectivamente, de hidrólise relativa sobre os substratos citados. Quando os resultados encontrados são comparados com os dados obtidos por RAPP *et al.* (1995) percebe-se diferença significativa com a tributirina: 71% para a lipase de *Fusarium oxysporum* e 132% para

a lipase de *C. gloesporioides* e diferença ainda maior para a lipase de *P. camemberti* (42% de lipase relativa) segundo TAN *et al.* (2004).



**Figura I.5.** Hidrólise relativa de diferentes substratos lipídicos pela enzima bruta de *C. gloesporioides*.

Os resultados são valores médios de duplicatas de ensaios realizados com 1 mL de cultivo contendo 16 U/mL de lipase. Óleo de pequi: óleo da polpa da fruta.

#### 4 CONCLUSÕES

Fungos produtores de lipase foram isolados do solo com sucesso. O enriquecimento das amostras do solo, com raspas da semente oleaginosa do barú, foi eficiente para o isolamento dos fungos. A presença dos sais biliares e do óleo de oliva, sob a forma de emulsão, facilitaram tanto a obtenção de colônias isoladas, condição necessária para a obtenção de culturas puras, quanto a avaliação em placa da atividade lipásica das colônias isoladas. Uma cepa de *C. gloesporioides* foi a maior produtora de uma lipase extracelular que apresentou excelente atividade em pH alcalino e que foi capaz de hidrolisar uma faixa ampla de substratos lipídicos, como óleos vegetais, banha de porco e tributirina. A seleção secundária em condições de fermentação em substrato líquido permitiu a produção da lipase por um maior número de cepas do que a seleção realizada em fermentação em substrato sólido. Isso reforça a estratégia que tem sido usada em programas de seleção, ou seja, de realizar a seleção secundária usando apenas as condições de fermentação em substrato líquido.

## **CAPÍTULO II**

**ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DE UMA  
LINHAGEM DE *Colletotrichum gloesporioides* SOBRE A PRODUÇÃO  
DE LIPASE EXTRACELULAR ATIVA EM pH ALCALINO**

## II.1 ENSAIOS PRELIMINARES: IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES IMPORTANTES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR DE *C. gloesporioides* EM CULTIVO SUBMERSO EM FRASCOS AGITADOS

### RESUMO

Neste trabalho estudou-se o cultivo submerso do fungo *Colletotricum gloesporioides* em frascos sob agitação a 30 °C em diferentes meios de cultura e o seu efeito sobre a produção de lipase. Preliminarmente foram estudados o efeito de 3 diferentes formulações de sais inorgânicos, o efeito de diferentes tipos de fontes de C (óleos vegetais, carboidratos, glicerol e Tween 80), o efeito de diferentes tipos de peptona como fontes de N (de caseína, de carne, de gelatina e mistura das peptonas de carne e de caseína), o efeito de diferentes concentrações de óleo de oliva e de peptona (mistura de peptonas de carne e de caseína), o efeito do tipo de inóculo (suspensão de esporos ou inóculo vegetativo) e em seguida, a cinética de fermentação em meio de cultura quimicamente definido e em meio de cultura complexo (com óleo de oliva e peptona) com valores de pH inicial de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Concluiu-se que a cepa produziu pouca lipase nos meios de cultura sem óleo vegetal e que a produção da enzima foi estimulada com a adição de peptona. Maior produção foi detectada nos meios de cultura com pH levemente ácido ou levemente alcalino, não tendo sido percebida diferença significativa entre os dois tipos de inóculo. Concluiu-se que o óleo de oliva, a peptona e o pH inicial do meio de cultura foram os fatores que mais influenciaram a produção de lipase. Com as condições padronizadas descritas a seguir foi conseguida uma produção regular de lipase. A composição do meio de cultura basal apresentava a formulação seguinte: óleo de oliva (10,0 mL/L); peptona (20,0 g/L); MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0,6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1,0 g/L) e pH 6,5. O inóculo era preparado com a suspensão de esporos ( 10<sup>6</sup> esporos/mL) e usava-se 50 mL de meio de cultura para cada frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Os cultivos eram realizados numa temperatura de incubação de 30 °C, sob agitação de 150 rpm durante 72 h.

## ABSTRACT

The effect of culture media on the production of lipase by *C. gloesporioides* was studied in submerged cultures at 30 °C in shaken Erlenmeyer flasks. Firstly, it was studied the effect of three formulations of inorganic salts mixtures, the effect of different substances as C sources (vegetal oils, carbohydrates, glycerol and Tween 80), the effect of different types of peptones (casein peptone, meat peptone, gelatin peptone and mixture of casein and meat peptones), the effect of different concentrations of olive oil and peptone and the effect of the inoculum (spores suspension or vegetative inoculum). Next, it was determined the fermentation kinetic in chemically defined culture medium and the fermentation kinetic in complex culture medium (with olive oil and peptone) at initial pH of 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; and 8.0. It was concluded that the strain produced little lipase in cultures media without vegetative oil and that the enzyme production was stimulated by peptone. Higher production was detected with initial pH lightly acidic or lightly alkaline. It was not detected differences between the spores suspensions and mycelia mass as inocula. The olive oil, the peptone and the initial pH were the factors that more influenced the lipase production. Regular lipase production was obtained with standardized conditions described as follow. The composition of the basal culture medium was: olive oil (10.0 mL/L); peptone (20.0 g/L); MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (0.6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1.0 g/L) and pH 6.5. The inocula were prepared with spores suspensions (10<sup>6</sup> spores/mL) and 50 mL of the culture medium were used per each 250 mL Erlenmeyer flask. The incubation was made at 30 °C in shaker (150 rpm) for 72 h.

## 1 INTRODUÇÃO

As esterases (EC 3.1.1.X) representam um grupo diversificado de hidrolases que catalisam a quebra e a formação da ligação éster. Estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas nos animais, nas plantas e nos microrganismos. Como muitas esterases são ativas sobre uma gama de substratos, supõe-se que elas facilitam o acesso de organismos às fontes de carbono e que participam do catabolismo. Estas enzimas apresentam alta especificidade espacial e/ou regional, propriedade que as tornam atrativas como catalisadores para a obtenção de compostos oticamente puros em reações de síntese da química fina (JAEGER & REETZ, 1998). Lipases (EC 3.1.1.1, triacilglicerol hidrolases) e as esterases “verdadeiras” (EC 3.1.1.3, carboxil ester hidrolases) são as duas maiores classes dessas hidrolases e apresentam

as mesmas estruturas tridimensionais - dobra característica  $\alpha/\beta$  das hidrolases. Apesar de apresentarem a mesma tríade catalítica das serino-hidrolases e o mecanismo de hidrólise ou formação de éster ser essencialmente igual, lipases e esterases diferem-se pelo fenômeno da ativação interfacial que é observado apenas com as lipases (BORNSCHEUER, 2002).

As lipases, portanto, são mais bem definidas como carboxiesterases que catalisam tanto a hidrólise como a síntese de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER *et al.*, 1999). Ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de cofatores para que possam atuar. A função biológica das lipases é hidrolisar triacilgliceróis para formar ácidos graxos livres, di e mono-acilgliceróis e glicerol.

A produção de exoenzimas é comum em muitas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais ocorrendo a expressão dos genes envolvidos e posterior secreção das enzimas formadas. Em geral isso acontece na natureza quando as enzimas são importantes para a patogênese ou para a manifestação da capacidade saprofítica do fungo de desenvolver-se em material orgânico inanimado. Os fungos secretam uma grande variedade de enzimas extracelulares como proteases, amilases, pectinases, celulases, ligninases, xilanases, lipases e outras. A síntese destas enzimas está sujeita a vários mecanismos regulatórios passíveis de indução e repressão, sendo a secreção direcionada por peptídeos sinal que fazem parte da proteína a ser exportada e que ao serem reconhecidos pela célula garantem a passagem pelo canal exportador (ARCHER & WOOD, 1995). Esta característica permite aos fungos colonizar amplo espectro de tecidos vivos (como patógenos) ou mortos (como saprófitas) de plantas e animais, produtos de madeira e papel e solos de composição diversa.

Segundo PAPAGIANNI (2004), o sucesso na obtenção de um produto fúngico requer um conhecimento detalhado das características do crescimento e da fisiologia da cepa produtora, sendo cada fungo, único no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico. As diferenças entre eles ocorrem devido a algum fator que ao interferir no seu desenvolvimento provoca alterações que se traduzem em diferentes respostas àquele fator e cada um responde diferentemente. Por isso, devem ser conhecidas e determinadas as condições precisas de cada fermentação e o correto estágio de desenvolvimento do fungo em estudo, para que possa ser obtida a maior produção da substância de interesse.

A produção de lipases por fungos filamentosos tem sido estudada empregando-se, principalmente, a fermentação submersa (FS) desenvolvida em frascos Erlenmeyer, com auxílio de incubadoras com controles de agitação e temperatura. De modo geral, os estudos sobre a produção de lipases divulgados na literatura têm como objetivo otimizar as condições nas quais a produção de lipase é máxima sem que haja entendimento do metabolismo e da fisiologia do microrganismo empregado, como resposta à composição do meio de cultura e às outras condições do cultivo (GULATI *et al.*, 1999; ELIBOL & OZER, 2002; TAN *et al.*, 2004).

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito de diversos fatores sobre a produção de lipase, ativa em pH alcalino, pelo fungo *C. gloesporioides*, sob condições de cultivo submerso em frascos Erlenmeyer sob agitação. O estudo do desempenho do fungo, quando é exposto às diferentes condições de cultivo, nos permite identificar os fatores importantes que influenciam a produção da lipase.

Como estratégia resolveu-se iniciar os estudos empregando meio de cultura líquido contendo óleo de oliva e peptona, dois nutrientes reconhecidamente importantes para a produção de lipases por alguns fungos filamentosos (SALLEH *et al.*, 1993; MAIA *et al.*, 1999; ELIBOL & OZER, 2001).

Os passos a serem seguidos foram:

1. avaliar três diferentes formulações de sais inorgânicos, com diferentes concentrações de peptona;
2. avaliar a produção de lipase em função do tempo de cultivo, em meio de cultura quimicamente definido e em meios de cultura complexos (similares ao anterior, mas adicionados de peptona em diferentes concentrações) e contendo uma das duas formulações de sais inorgânicos, segundo VOGEL (1964) ou SALLEH *et al.* (1993);
3. avaliar o efeito de diferentes concentrações de peptona e de óleo de oliva ;
4. avaliar o efeito do pH inicial do cultivo
5. avaliar o efeito do tipo de peptona
6. avaliar o efeito do tipo de óleo vegetal
7. avaliar o efeito do glicerol e do Tween 80 como fonte de C;
8. avaliar o efeito do tipo de inóculo.

Os estudos desenvolvidos nos passos 3 a 8 foram realizados empregando-se sais inorgânicos segundo SALLEH *et al.* (1993).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Ágar bacteriológico e peptonas: de caseína (hidrolisado pancreático); de gelatina (hidrolisado pancreático) e “bacteriológica” A (combinação de hidrolisado pancreático de caseína e hidrolisado péptico de carne) foram adquiridos da Biobrás (Montes Claros, MG, Brasil). Outro tipo de peptona “bacteriológica” B (combinação de hidrolisados pancreático e papaínico de proteínas animais) foi adquirido da Oxoid (Inglaterra). A peptona de carne (obtida por digestão péptica de proteína animal) foi adquirida da Micromed (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Óleos vegetais (de canola, de milho, de oliva, de arroz, de soja e de girassol), dentro do prazo de validade, foram adquiridos no comércio. O óleo de oliva empregado no ensaio enzimático para dosagem da atividade de lipase, de grau analítico, foi adquirido de Sigma (EUA). O corante azul Victoria B (C.I. 44045; azul básico 26) foi adquirido da Aldrich (EUA).

A glicose, a lactose e a sacarose da marca REAGEN foram adquiridas da QUIMIBRAS (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

A goma arábica ou goma acácia, de grau técnico, sob a forma de pó foi adquirida da Labsynth (Diadema, SP, Brasil) e o leite em pó desnatado da Itambé (Belo Horizonte, MG, Brasil).

O meio de cultura para manutenção do fungo – ágar batata e dextrose – foi adquirido da Biobrás (Montes Claros, Brasil) e da Acumedia (Baltimore, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (P.A.), adquiridos de fontes comerciais.

### 2.2 Métodos

**2.2.1 Microrganismo** – foi empregada uma cepa de *Colletotrichum gloesporioides* previamente isolada e selecionada. Esta cepa foi mantida em ágar batata e dextrose (PDA), sob óleo mineral esterilizado (“master stock”), com subculturas no mesmo meio, a cada 60 dias (“production stock”).

**2.2.2 Meios de cultura** – foram empregadas, em distintos experimentos, três formulações básicas de sais. Segundo SALLEH *et al.* (1993), com a composição



seguinte (em g/L):  $\text{NaNO}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,0);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5). Segundo VOGEL (1964), com a composição seguinte (em g/L): solução estoque de sais: citrato de sódio duplo hidratado (161);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (322);  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (129);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (13);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (6,5); solução de elementos traços: (6,5 mL); *solução uso*: solução estoque diluída 50 vezes. A solução estoque de elementos traços continha (em g/L): ácido cítrico monohidratado (5,0);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,0);  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,25);  $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  (0,05);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,05);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,05). A terceira formulação (identificada como “salina”) continha (em g/L):  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (12);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,02);  $\text{KCl}$  (0,02). As soluções eram conservadas adicionando-se  $\text{CHCl}_3$  (1,0 mL%).

As formulações de sais inorgânicos segundo VOGEL (1964) e SALLEH *et al.* (1993) foram empregadas na composição de meios de cultura quimicamente definidos e meios de cultura complexos (contendo peptona) para o estudo da produção de lipase em função do tempo de cultivo.

Com a formulação de SALLEH *et al.* (1993) foi estudado: o efeito do óleo de oliva nas concentrações de 10,0; 20,0 e 30,0 mL/L) e da peptona (nas concentrações de 10,0; 20,0 e 50,0 g/L); o efeito do pH do meio de cultura (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0); o efeito do tipo de peptona na concentração de 50,0 g/L em meio de cultura com 10,0 mL/L de óleo de oliva e pH 6,5; o efeito do tipo de óleo vegetal na concentração de 10,0 mL/L em meio de cultura com 20,0 g/L de peptona “bacteriológica” A e pH 6,5; o efeito do Tween 80 e do glicerol (nas concentrações de 2,0; 10,0; 15,0 e 30,0 g/L em substituição ao óleo de oliva em meios de cultura contendo 20,0 g/L de peptona bacteriológica A e pH 6,5; e o efeito de carboidratos como a glicose, a lactose e a sacarose nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10,0 g/L, em substituição ao óleo de oliva, em meios de cultura contendo 20,0 g/L de peptona bacteriológica A e pH 6,5.

**2.2.3 Preparo do inóculo** – o micélio do fungo, crescido na superfície inclinada do cultivo em PDA (“production stock”) com 7-14 dias de incubação, era suspenso em água destilada ou em solução de 0,01% (p/v) Tween 80, previamente esterilizadas. Foram empregados volumes correspondentes à cerca de 10% do volume do meio de cultura a ser inoculado, numa concentração aproximada de  $10^6$  a  $10^8$  esporos/mL. Em alguns experimentos, cultivos líquidos foram empregados como inóculo fazendo o fungo crescer durante 24 horas no mesmo meio usado para fermentação (inóculo vegetativo).

**2.2.4 Cultivos submersos** – as fermentações foram desenvolvidas em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio de cultura, sob agitação (150 rpm) em incubadora orbital modelo MA 830, da marca Marconi (Piracicaba, SP, Brasil), na temperatura de 30 °C. Decorrido o tempo de incubação planejado, o conteúdo de cada frasco era filtrado em gaze ou papel Watman n° 44, sendo a massa micelial separada e analisada quanto ao tipo de crescimento (amorfo ou em “pellet”) e, em alguns casos, era determinado a massa seca por secagem a 80 °C durante 24 h. Os resultados eram expressos em gramas de massa celular seca por litro de cultivo (COONEY, 1981). No filtrado livre de células, determinaram-se o pH, em potenciômetro da marca Quimis (Diadema, SP, Brasil), a cor e o aspecto bem como eram feitas as determinações analíticas.

## **2.2.5 Metodologias analíticas**

### **2.2.5.1 Determinação da atividade lipásica**

**2.2.5.1.1 Atividade lipásica pela difusão da enzima e formação de halo de lipólise em gel de ágar-ágar** – foram empregados quatro diferentes tipos de géis de ágar bacteriológico (1,5 g/L) preparados em tampão TRIS-HCl 0,02M pH 8,9, contendo o corante azul Victoria B (100 mg/L) e azida sódica como conservante (0,2 g/L). Nos géis identificados como AT (sem corante) e ATV (com o corante), utilizou-se tributirina (6 g/L) como substrato para a enzima, dispersa no ágar ainda fluido e sem a adição do corante, pela homogeneização em liquidificador por um minuto. No gel AEPV foi empregada emulsão de óleo de oliva (15,0 mL/L) a 25%, tendo sido o óleo disperso em solução a 2% (p/v) de álcool polivinílico. No gel AEVGA, entretanto, a emulsão foi preparada pela dispersão do óleo em solução de goma arábica a 1,25% (p/v). As duas emulsões foram preparadas com agitação (13000 rpm) em dispersor ultra turrax modelo T25 da IKA (EUA), durante cinco minutos. Após distribuição de 20 mL de cada gel em placa de Petri (100 mm x 20 mm) e solidificação, foram escavados poços de oito mm de diâmetro, com auxílio de cilindros de aço inoxidável. Em cada poço 20 microlitros de cada filtrado eram dispensados, em triplicata, e as placas foram incubadas a 30 °C. As leituras dos diâmetros dos halos hidrolíticos – transparente no caso de AT e de coloração azul nos géis de ATV, AEPV e AEVGA -, descontados os diâmetros dos poços, foram realizados com 24, 48 e 72 h.

**2.2.5.1.2 Dosagem pelo método titulométrico** – foi empregado o método usado por WATANABE *et al.* (1977) para a medida da atividade lipásica pelo método titulométrico. A mistura de reação continha: emulsão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico (5,0 mL); tampão TRIS-HCl 0,02 M pH 8,0 (5,0 mL); filtrado enzimático (1,0 mL). A reação foi desenvolvida em frascos Erlenmeyer sob agitação, em banho maria a 30 °C, durante 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 20 mL da solução acetona/álcool etílico (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de NaOH 0,05 M, na presença de timolftaleína como indicador. No branco da amostra, empregou-se a preparação enzimática previamente aquecida em banho com água em ebulição durante 10 min e adição à mistura de reação já tratada com a solução de solventes. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou um micromol de ácidos graxos por minuto, nas condições do ensaio.

**2.2.5.2 Determinação da atividade proteolítica** – esta atividade enzimática foi determinada pela técnica da difusão da enzima e formação de halo de proteólise em gel de ágar bacteriológico (1,5 g/L) preparado em tampão TRIS – HCl 0,02M pH 8,0, contendo azida sódica com conservante (0,02%; p/v). Leite em pó desnatado reconstituído no mesmo tampão foi incorporado ao ágar fundido, numa concentração final de 1,0% (p/v). Após homogeneização cuidadosa, evitando-se a formação de espuma, a mistura foi distribuída em placa de Petri e identificada como AL. Em prosseguimento, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos para determinação da atividade lipásica. O halo, quando presente, era transparente, tendo sido feitas medidas com 24 h de incubação.

**2.2.5.3 Perfil peptídico das peptonas** – os dois tipos de peptona bacteriológica foram analisados quanto à composição de peptídios em relação ao tamanho da cadeia carbônica, sendo os resultados expressos em percentuais, segundo técnica desenvolvida por SILVESTRE *et al.* (1994).

**2.2.5.4 Análise estatística** – para estudar a influência dos diversos fatores relacionados com as condições de cultivo do fungo empregou-se delineamento inteiramente casualizado. As médias dos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi avaliada a influência de três formulações básicas de sais inorgânicos sobre a produção de lipase: (a) segundo SALLEH *et al.* (1993); (b) segundo VOGEL (1964) e outra, (c) identificada como “solução salina” (Tabela II.1). Foi empregado óleo de oliva na concentração de 8,0 mL/L e testadas diferentes concentrações de peptona bacteriológica (0; 5,0; 10,0 e 20,0 g/L).

**Tabela II.1 – Efeito da composição de sais inorgânicos do meio de cultura usado para cultivo submerso de *C. gloesporioides* em frascos sob agitação sobre a produção de lipase <sup>a</sup>**

Sais <sup>b</sup>	Peptona (g/L)	pH final	Massa seca (mg/mL)	Atividade enzimática			
				Diâmetro de halo (mm) <sup>c</sup>			Lipase <sup>d</sup> (U/mL)
				Lipase		Protease	
AT	AEVGA	AL					
Salleh <i>et al.</i>	0,0	2,5	3,6	nd	nd	nd	0,0
	5,0	4,1	8,0	nd	nd	nd	2,2
	10,0	6,5	9,3	18,0	6,0	nd	16,2
	20,0	7,7	13,2	20,0	10,0	nd	24,0
Vogel	0,0	6,9	5,9	13,0	4,0	nd	2,4
	5,0	6,1	8,4	13,0	7,0	2,0	14,9
	10,0	6,4	11,2	23,0	15,0	nd	23,2
	20,0	7,1	14,2	20,0	11,0	nd	16,4
Salina	0,0	nr	nr	nr	nr	nr	nr
	5,0	2,9	nr	4,0	1,0	nd	0,6
	10,0	7,7	nr	10,0	6,0	nd	20,7
	20,0	8,2	nr	10,0	7,0	nd	18,3

<sup>a</sup> meio de cultura com 8,0 mL/L de óleo de oliva; resultados de nove ensaios, duas repetições; cultivo de 72 h; <sup>b</sup> composição descrita em materiais e métodos; <sup>c</sup> ensaio por difusão em gel de ágar; 50 µL de caldo/poço; 18 horas a 30°C; AT (com tributirina); AEVGA (com emulsão de óleo de oliva em solução de goma arábica e corante); <sup>d</sup> método titulométrico, como descrito em materiais e métodos; nd – não detectado; nr – não realizado.

A produção de lipase foi detectada na ausência de peptona quando foi utilizada a mistura de sais inorgânicos preparada segundo VOGEL (1964), o mesmo não acontecendo com sais da formulação usada por SALLEH *et al.* (1993). Pode ser notado

que a produção da lipase aumentou com o aumento da concentração da peptona, com as três composições de sais, não tendo sido detectada atividade proteolítica nos filtrados dos cultivos (apenas vestígio foi detectado no cultivo do meio à base dos sais de VOGEL com 5,0 g/L de peptona). Foi verificado que o crescimento do fungo nos meios à base das formulações de SALLEH e VOGEL foi similar, aumentando-se com maiores concentrações de peptona.

Foi avaliada a possível produção de lipase em meio de cultura quimicamente definido, isto é, na ausência de N orgânico (peptona) e contendo óleo de oliva, empregando-se o meio de cultura formulado com sais de VOGEL (1964), em função do tempo de cultivo, como mostrado na Tabela II.2.

**Tabela II.2 – Produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides* cultivado em meio de cultura formulado com sais de VOGEL contendo óleo de oliva e sem peptona, em função do tempo de cultivo <sup>a</sup>.**

Tempo de cultivo (h)	pH final	Massa seca (mg/mL)	Atividade enzimática			
			Diâmetro de halo (mm) <sup>b</sup>		U/mg de micélio <sup>c</sup>	U/mL <sup>c</sup>
			Lipase			
AT	AEVGA					
24	6,3	2,3	11,0	9,0	1,5	0,6
48	5,0	5,3	21,0	9,0	13,7	2,8
72	6,4	5,5	14,0	8,0	4,2	0,8
96	6,9	3,8	13,0	8,0	3,3	0,9

<sup>a</sup> resultados médios de triplicatas; meio com 8,0 mg/L de óleo de oliva; pH 6,5; <sup>b</sup> ensaio por difusão em gel de ágar com tributirina (AT) e emulsão de óleo de oliva em solução goma arábica a 1,25% e corante azul Victoria B (AEVGA); 50 µL/poço; incubação a 30°C durante 18 horas; <sup>c</sup> ensaio titulométrico, como descrito em material e métodos.

Como mostrado na Tabela II.2 ocorreu aumento significativo da produção de lipase até 48 h de cultivo, seguido, entretanto, de queda significativa tanto da atividade lipásica quanto da massa micelial (massa seca), situação que indica lise celular e provável ação de proteases.

Em decorrência dos resultados acima foi testada a incorporação de peptona (10,0 g/L) ao meio com formulação básica de sais segundo VOGEL e óleo de oliva (8,0 g/L). Esta estratégia foi usada como tentativa para obtenção de maior produção e sua estabilização após ter sido atingido o máximo de produção, sendo a produção de lipase acompanhada até 120 h de cultivo (Tabela II.3).

**Tabela II.3 – Produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides* cultivado em meio de cultura com sais de VOGEL adicionado de óleo de oliva (8,0 g/L) e de peptona (10,0 g/L) <sup>a</sup>.**

Tempo de cultivo	pH do cultivo	Massa seca (mg / mL)	Atividade enzimática				
			Diâmetro de halo (mm)			Lipase <sup>d</sup>	
			Proteo-Lítico <sup>b</sup>	Lipolítico <sup>c</sup>		U/mL	U/mg micélio
				AT	AEVGA		
12	6,6	2,4	8,0	5,0	0	1,2	0,5
24	6,8	7,4	8,0	9,0	9,0	2,5	0,4
36	6,2	10,2	5,0	19,0	17,0	13,8	1,3
48	6,0	9,8	4,0	20,	16,0	15,5	1,5
60	6,2	11,2	0	26,0	19,0	19,3	1,7
72	6,4	11,6	0	26,0	18,0	23,2	2,0
84	6,7	11,2	0	25,0	17,0	28,5	2,6
96	7,2	10,6	0	26,0	16,0	28,2	2,6
108	7,8	9,2	0	25,0	16,0	22,0	2,3
120	7,8	8,7	0	24,0	16,0	19,3	2,2

<sup>a</sup> resultados médios de triplicatas; <sup>b</sup> ensaio por difusão em gel de ágar contendo leite desnatado em pó, resuspendido em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0; 30°C, 48 horas de incubação <sup>c</sup> ensaios por difusão em gel de ágar contendo tributirina (AT) e emulsão de óleo de oliva em solução de goma arábica a 1,25% e corante azul Vitória (AEVGA); 50 µL/poço; 30 °C, 18 horas; <sup>d</sup> ensaio titulométrico, como descrito em materiais e métodos;.

Ocorreu crescimento razoável do fungo, obtendo-se cerca de 11,0 mg/mL de biomassa em massa seca com 60 h de cultivo, permanecendo aproximadamente constante até 96 horas. A produção de lipase foi significativa, atingindo o máximo (perto de 30,0 U/mL) com 84 h de incubação, ocorrendo decaimento após 96 horas. A atividade de proteinase foi detectada a partir de 12 h, mantendo-se no mesmo patamar até 24 horas de cultivo, não sendo mais detectada a partir de 60 h.

Foi avaliada, também, a possível produção de lipase em meio de cultura quimicamente definido, isto é, na ausência de N orgânico (peptona) e contendo óleo de oliva, empregando-se, neste caso, o meio de cultura formulado com sais segundo SALLEH *et al.* (1993), em função do tempo de cultivo, como mostrado na Tabela II.4.

**Tabela II.4 – Produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides* cultivado em meio de cultura com sais inorgânicos segundo SALLEH, contendo óleo de oliva e sem peptona, em função do tempo de cultivo <sup>a</sup>.**

Tempo de cultivo (h)	pH final do cultivo	Massa Seca (mg/mL)	Atividade Lipásica			
			Diâmetro de halo (mm) <sup>b</sup>		U/mL <sup>c</sup>	U/mg de micélio <sup>c</sup>
			AT	AEPV		
12	6,5	0,8	0,0	0,0	0,5	0,6
24	6,7	1,4	3,0	3,0	3,0	2,1
36	7,1	4,8	5,0	9,0	1,0	0,2
48	7,5	4,3	13,0	13,0	12,0	2,8
60	7,8	3,3	13,0	9,0	6,5	2,0
72	7,7	6,5	16,0	11,0	9,0	1,4
84	7,7	7,6	13,0	9,0	6,3	0,8
96	7,9	6,0	13,0	10,0	4,7	0,8

<sup>a</sup> resultados médios de triplicatas; solução de sais segundo SALLEH (1993), e óleo de oliva (8,0 mL/mL); pH 6,5; <sup>b</sup> ensaio por difusão em gel de ágar contendo tributirina (AT) e emulsão de óleo de oliva em álcool polivinílico e corante azul Victoria (AEPV); <sup>c</sup> ensaio pelo método titulométrico, como descrito em materiais e métodos; obs. A atividade proteolítica não foi detectada em qualquer tempo de cultivo.

Os resultados foram similares àqueles obtidos com o meio quimicamente definido empregando os sais minerais de VOGEL (1964).

Também foram realizados experimentos, nas mesmas condições anteriores, isto é, em meio de cultura, quimicamente definido, com formulação de sais de SALLEH, mas empregando o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> em substituição ao NaNO<sub>3</sub>. Os resultados obtidos foram bastante inferiores, com crescimento e produção de lipase em quantidades bastante baixas (3,0 mg/mL e 2,7 U/mL, respectivamente). Além disso foi verificada uma queda bastante acentuada do pH do cultivo, chegando a cerca de 2,5. O consumo do íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pelos microrganismos, como se sabe, gera H<sup>+</sup>, o que explica o abaixamento do pH, ocorrendo, por outro lado, consumo de H<sup>+</sup>, quando o NaNO<sub>3</sub> é consumido, o que promove o aumento de pH.

Concluiu-se, com as experiências anteriores, que a produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides*, quando cultivado em meio de cultura quimicamente definido, no caso, sem N orgânico na forma de peptona, não foi satisfatória, visto que foi muito baixa.

Verificou-se, também, que nos cultivos originários de meios de cultura com sais segundo VOGEL ocorreu formação de uma emulsão grosseira e viscosa que não se desfazia, resultando em filtrados dos cultivos bastante turvos, um problema para a etapa de purificação. Em razão disso, apesar de a produção de lipase em meios de cultura com peptona e sais de SALLEH ter sido aparentemente menor, decidiu-se continuar os estudos de produção de lipase com a formulação original, isso é, com  $\text{NaNO}_3$ .

Tem sido verificado que a produção de lipase é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de C e de N, pelo pH do cultivo, pela temperatura de incubação e pela concentração de oxigênio dissolvido (ELIBOL & OZER, 2001). Sabe-se, também, que muitas lipases somente são produzidas na presença de uma substância indutora, que pode ser tanto um triglicerídeo como um ácido graxo ou outro lipídio (TSUJISAKA *et al.*, 1973; SHIMADA *et al.*, 1992). Alguns microorganismos parecem não exigir lipídios ou ácidos graxos para sintetizar lípases, mas, a presença dessas substâncias no meio de cultura aumenta a quantidade da enzima produzida (YOSHIDA *et al.*, 1968; CHEN *et al.*, 1992). Além desses microorganismos, há aqueles que pertencem a outro grupo em que as lipases são produzidas constitutivamente (CHANDER & KLOSTERMEYER, 1983; SZTAJER *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 2001). Como exemplo, pode ser citado o trabalho de NAHAS *et al.* (1988) no qual se verificou que uma cepa de *Rhizopus oligosporus* era capaz de produzir lipase extracelular em alto rendimento quando cultivada em meios de cultura que continham Tweens como fonte de C enquanto a produção da enzima não era estimulada quando eram empregados carboidratos, óleos vegetais, proteínas ou ácidos graxos.

Os estudos até esta etapa, realizados qualitativamente, mostraram que a cepa de *C. gloesporioides*, apesar de ter produzido lipase na ausência da peptona (em meio quimicamente definido), a produziu em maiores quantidades quando a peptona foi adicionada ao meio de cultura. A partir desta etapa os estudos desenvolvidos passaram a ser realizados quantitativamente a fim de se obter maior detalhamento dos fatores que interferem na produção de lipase. Assim sendo, testou-se primeiramente, o efeito de diferentes concentrações da peptona em combinação com diferentes concentrações de óleo de oliva (Tabela II.5)



**Tabela II.5 – Efeito da combinação de diferentes concentrações de peptona bacteriológica e de óleo de oliva sobre a produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides* em cultivo submerso em frascos sob agitação <sup>a</sup>.**

Óleo de oliva (mL/L)	Peptona bacteriológica (g/L)	pH final do cultivo	Atividade lipásica <sup>b</sup>		
			Diâmetro de halo (mm) <sup>c</sup>		U/mL <sup>d, e</sup>
			AT	AEVGA	
10,0	10,0	6,5 ± 0,9	10,5 ± 2,7	10,3 ± 0,5	22,0 ± 3,3
	20,0	7,8 ± 0,4	11,7 ± 1,0	11,0 ± 0,6	25,7 ± 1,4
	50,0	7,9 ± 0,2	12,0 ± 0,8	12,0 ± 0,5	28,9 ± 0,4
20,0	10,0	5,8 ± 0,4	8,3 ± 1,0	10,0 ± 1,0	27,3 ± 3,3
	20,0	5,9 ± 0,1	10,2 ± 0,4	10,0 ± 0,6	30,8 ± 2,0
	50,0	6,3 ± 0,1	10,3 ± 0,5	11,3 ± 1,2	23,6 ± 2,7
30,0	10,0	6,0 ± 0,3	10,8 ± 1,6	9,2 ± 0,4	21,7 ± 0,2
	20,0	5,8 ± 0,1	9,0 ± 0,0	10,0 ± 0,4	25,9 ± 2,2
	50,0	6,2 ± 0,1	10,2 ± 1,0	11,0 ± 1,4	19,5 ± 5,9

<sup>a</sup> meio de cultura com sais segundo SALLEH *et al.* (1993); pH 6,5; 72 h de incubação; <sup>b</sup> valores médios de seis replicatas, duas repetições; <sup>c</sup> ensaio de difusão em gel de ágar, contendo tributirina (AT); contendo emulsão de óleo de oliva em solução de goma arábica e corante azul Vitória B (AEVGA), pH alcalino; <sup>d</sup> ensaio enzimático de lipase pelo método titulométrico, como descrito em materiais e métodos; <sup>e</sup> médias não diferiram entre si pelo teste de F ( $p > 0,05$ ), aplicado para delineamento inteiramente casualizado.

Verificou-se que os filtrados dos cultivos apresentavam-se cada vez mais turvos com o aumento da concentração do óleo de oliva no meio de cultura, podendo-se perceber, facilmente, a presença de gotículas do óleo, a partir da concentração de 20,0 mL/L, indicando, portanto, que o óleo não foi totalmente utilizado. Por outro lado, com a concentração de 50,0 g/L da peptona, foi verificado a presença de pigmento de coloração salmão, que se tornava mais intenso com o aumento da concentração do óleo de oliva. A presença de pigmento salmão em culturas de *C. gloesporioides* está relacionada com o processo de esporulação do fungo, com pigmentação mais intensa com o aumento da massa conidial (CARVALHO *et al.*, 2000). Também foi verificado que a massa micelial dos cultivos tinham aspecto amorfo, não ocorrendo formação de “pellets”. Tanto a presença de óleo como a presença de pigmento nas preparações brutas de enzimas pode ser indesejável, principalmente quando há necessidade de essas preparações serem submetidas aos procedimentos de purificação da enzima.

Os resultados mostrados até aqui indicam que o fungo *C. gloesporioides* produziu pouca lipase em meios de cultura sem óleo de oliva e que a produção da enzima foi estimulada com a adição da peptona. Verificou-se, também, que aumento das concentrações do óleo de oliva e da peptona acima de 10,0 mL/L e de 10,0g/L, respectivamente, não influenciou a produção da lipase.

O efeito do pH do meio de cultura, que corresponde ao pH inicial do cultivo, também foi estudado, empregando-se meio de cultura contendo óleo de oliva e peptona (Tabela II.6).

**Tabela II.6 – Efeito do pH inicial do cultivo de *C. gloesporioides* sobre a produção de lipase, em frascos sob agitação.**

pH do cultivo <sup>a</sup>		Atividade lipásica <sup>b</sup>		
		Diâmetro de halo (mm) <sup>c</sup>		U/mL <sup>d</sup>
Inicial	Final <sup>b</sup>	ATV	AEPV	
5,0	6,4 ± 0,7	6,7 ± 0,8	8,3 ± 0,5	17,7 ± 0,9 <sup>yz</sup>
5,5	6,5 ± 0,4	6,5 ± 1,0	8,2 ± 1,0	14,2 ± 4,2 <sup>z</sup>
6,0	6,5 ± 0,3	7,2 ± 0,7	8,8 ± 0,7	20,3 ± 4,2 <sup>yz</sup>
6,5	7,0 ± 0,4	7,0 ± 0,6	9,7 ± 1,1	21,5 ± 5,4 <sup>xyz</sup>
7,0	7,3 ± 0,4	8,0 ± 2,8	11,8 ± 1,9	22,9 ± 4,5 <sup>xyz</sup>
7,5	7,9 ± 0,3	9,7 ± 0,8	13,2 ± 1,0	37,0 ± 6,1 <sup>x</sup>
8,0	8,1 ± 0,2	10,2 ± 1,3	13,7 ± 1,0	34,1 ± 0,1 <sup>xy</sup>

<sup>a</sup> meio de cultura: óleo de oliva (10,0 mL/L); peptona (20,0 g/L); sais inorgânicos segundo SALLEH *et al.* (1993); cultivos de 72 h; <sup>b</sup> valores médios de seis replicatas, duas repetições; <sup>c</sup> ensaio por difusão em gel de ágar, contendo tributirina e azul Victoria (ATV) ou emulsão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico e azul Victoria (AEPV), pH 8,9; 50 µL de cada filtrado/poço; 30 °C durante 72 h; <sup>d</sup> ensaio da lipase pelo método titulométrico, atividade expressa em unidades de µmoles de ácido graxos liberados por minuto, em condições padronizadas; tratamentos indicados com letras diferentes (x,y,z) diferem entre si (p < 0,05), pela comparação de médias pelo teste de Tukey, após análise de variância, com delineamento inteiramente casualizado.

Verificou-se que o pH inicial influenciou a produção de lipase, ocorrendo maior produção em faixa menos ácida e até mesmo alcalina. Após a filtração para a separação da massa micelial, os caldos fermentados apresentaram-se com coloração âmbar e levemente turvos. O micélio apresentou-se com coloração palha, aspecto amorfo e abundante, até pH 7,5, enquanto que em pH 8,0 apresentou-se sob a forma de “pellet”.

Em geral as fontes nitrogenadas inorgânicas são consumidas rapidamente enquanto as orgânicas mais lentamente, sendo que as fontes orgânicas funcionam

como suprimentos de aminoácidos e fatores de crescimento. As peptonas, provavelmente as fontes de N orgânico mais usadas, são obtidas pela hidrólise enzimática de proteínas da carne, de caseína, de gelatina e de soja. As proteinases empregadas podem ser de vários tipos como pepsina, pancreatina, tripsina e papaína. Dependendo do tipo de proteína usada como substrato, e da enzima empregada, o produto resultante de proteólise apresentará composição diferenciada não apenas quanto ao tamanho da cadeia carbônica (polipeptídeos, peptídeos menores e aminoácidos), mas, também, quanto ao tipo e quantidade dos aminoácidos, apresentando os produtos, portanto, variações de composição tanto de natureza quantitativa como qualitativa. A fim de estudar o efeito do tipo de peptona sobre a produção de lipase por *C. gloesporioides*, foram realizados alguns experimentos, cujos resultados estão na Tabela II.7.

**Tabela II.7 – Efeito do tipo de peptona empregada como fonte nitrogenada na formulação de meio de cultura líquido para a produção de lipase pelo *C. gloesporioides*, em frascos sob agitação <sup>a</sup>**

Tipo de peptona <sup>b</sup>	pH final do cultivo	Atividade lipásica <sup>c</sup>		
		Diâmetro de halo (mm)		U/mL
		AT	AEVGA	
de caseína	7,6 ± 0,5	20,0 ± 1,1	10,5 ± 0,5	17,6 ± 3,7 <sup>xy</sup>
de carne	7,4 ± 0,4	21,1 ± 0,5	11,5 ± 0,5	23,9 ± 3,4 <sup>xy</sup>
de gelatina	7,5 ± 0,5	16,0 ± 1,1	9,5 ± 0,5	13,1 ± 2,0 <sup>y</sup>
bacteriológica A	7,7 ± 0,5	22,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	26,9 ± 2,6 <sup>x</sup>
bacteriológica B	7,5 ± 0,4	17,5 ± 0,5	10,5 ± 0,5	15,6 ± 1,3 <sup>y</sup>

<sup>a</sup> meio de cultura: peptona (50,0 g/L); óleo de oliva (10,0 mL/L); sais segundo SALLEH *et al.* (1993), pH 6,5; <sup>b</sup> caseína/pepsina; carne/pepsina; gelatina/pancreatina; bacteriológica A: combinação de caseína/tripsina com carne/pepsina; bacteriológica B: combinação de carne/pancreatina com carne/papaína; <sup>c</sup> valores médios de seis amostras, duas repetições; <sup>d</sup> ensaio por difusão em gel de ágar, contendo tributirina (AT) e emulsão de óleo de oliva em solução de goma arábica (1,25%, p/v) e azul Vitória B, pH 8,9; 50 µL de cada filtrado/poço; 30 °C, durante 72 horas; <sup>e</sup> ensaio enzimático titulométrico, como descrito em materiais e métodos; tratamentos indicados com letras diferentes (x,y) diferem entre si (p < 0,05) pela comparação de médias pelo teste de Tukey, após análise de variância, com delineamento de experimentos inteiramente casualizados.

A peptona de gelatina propiciou o pior resultado e a peptona bacteriológica A mostrou-se a melhor fonte de nitrogênio orgânico. O aspecto do crescimento do fungo pareceu bastante similar com todas as peptonas.

Considerando que peptona estimula a produção de lipase e que, também, pode estimular a formação de proteases, e considerando que houve diferença significativa na produção de lipase com as duas peptonas identificadas como “bacteriológica” (A e B), resolveu-se efetuar análise da composição dessas peptonas quanto ao percentual de aminoácidos livres e de peptídeos segundo o tamanho da cadeia carbônica (Tabela II.8).

**Tabela II.8 – Perfil peptídico das peptonas bacteriológicas A e B**

Tipo de peptona	Composição das frações (% em nmoles) <sup>a</sup>			
	F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>c</sup>	F3 <sup>d</sup>	F4 <sup>e</sup>
A	25,14	40,81	8,45	25,60
B	43,76	31,30	5,94	19,00

<sup>a</sup> determinada pela técnica desenvolvida por SILVESTRE *et al.* (1994); <sup>b</sup> peptídeos com mais de sete resíduos de aminoácidos; <sup>c</sup> peptídeos contendo entre quatro e sete resíduos de aminoácidos; <sup>d</sup> di e tripéptídeos; <sup>e</sup> aminoácidos livres

Verificou-se diferença marcante entre elas uma vez que a peptona A apresentou na sua composição menor quantidade relativa de peptídeos maiores e maior de peptídeos menores bem como de aminoácidos livres. A quantidade de substâncias que são assimiladas mais facilmente em associação com melhor qualidade nutricional da peptona A (mistura de hidrolisados de caseína e de carne; anexo C) explicam o maior estímulo dessa peptona sobre a produção da lipase.

A fim de se descobrir um óleo vegetal de menor custo que substituísse o óleo de oliva como fonte de C foram testados vários tipos de óleos vegetais (Tabela II.9).

Os óleos de arroz e de soja apresentaram os piores resultados e os óleos de oliva, de milho, de girassol e de canola estimularam a produção de lipase, não ocorrendo diferença significativa entre os últimos. A diferença de produção entre os dois grupos de óleos vegetais talvez possa ser explicada pela maior composição em ácidos graxos insaturados do último grupo (anexo B). Em paralelo ao teste do tipo de óleo, foi testado, também, meio de cultura sem óleo, isto é, contendo como fonte única de C, além de fonte de N, a peptona. Foi verificado que o fungo foi capaz de crescer normalmente, mas foi incapaz de produzir a lipase, confirmando a necessidade do óleo de oliva para induzir a produção da enzima.

**Tabela II.9 – Efeito do tipo de óleo vegetal como fonte de C em meio de cultura líquido sobre a produção de lipase pelo *C. gloesporioides*, em frascos sob agitação <sup>a</sup>.**

Tipo de óleo vegetal <sup>b</sup>	pH final do cultivo <sup>c</sup>	Atividade lipásica <sup>c</sup>		
		Diâmetro de halo (mm) <sup>d</sup>		U/mL <sup>e</sup>
		AT	AEVGA	
de oliva	7,7 ± 0,4	23,5 ± 2,8	3,5 ± 0,5	25,3 ± 1,8 <sup>x</sup>
de canola	7,6 ± 0,3	13,3 ± 3,1	3,5 ± 0,5	25,2 ± 1,2 <sup>x</sup>
de girassol	7,6 ± 0,2	22,7 ± 3,1	3,0 ± 0,0	24,2 ± 1,2 <sup>x</sup>
de milho	7,7 ± 0,2	22,5 ± 2,8	3,0 ± 0,0	24,8 ± 0,4 <sup>x</sup>
de soja	7,7 ± 0,3	21,3 ± 4,2	2,8 ± 1,4	16,5 ± 4,9 <sup>xy</sup>
de arroz	7,5 ± 0,4	16,8 ± 3,2	2,0 ± 0,0	14,0 ± 0,7 <sup>y</sup>

<sup>a</sup> meio de cultura segundo SALLEH *et al.* (1993), com 10,0 mL/L de óleo de oliva e 20,0 g/L de peptona bacteriológica A; pH 6,5; cultivos de 72 horas; <sup>b</sup> óleos comerciais, dentro do prazo de validade estipulado pelo fabricante; <sup>c</sup> valores médios de seis amostras, duas repetições; <sup>d</sup> ensaio de difusão em gel de ágar, contendo tributirina (AT) ou emulsão de óleo de oliva em solução de goma arábica (1,25%) e azul Vitória; pH 8,9; 20 µL de cada amostra/poço; 30 °C, durante 72 h; <sup>e</sup> ensaio enzimático titulométrico nas condições padronizadas, descritas em materiais e métodos; tratamentos indicados com letras diferentes diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pela comparação de médias pelo teste de Tukey, após análise de variância, com delineamento inteiramente casualizado.

O efeito do Tween 80 e do glicerol como fonte de C, também em substituição ao óleo de oliva, foi avaliado, conseguindo-se bons resultados (Tabela II.10). O crescimento do fungo foi excelente, como percebido visualmente, independentemente, portanto, do tipo de fonte de carbono (Tween 80 ou glicerol) e da sua concentração. Os filtrados dos cultivos apresentaram características diferentes quanto ao cheiro e quanto ao aspecto. Alguns apresentaram cheiro amoniacal forte, nos cultivos com 2,0 g/L de Tween 80 ou glicerol e leve, nos cultivos com 10,0 g/L de Tween 80. O filtrado proveniente do cultivo que continha 30,0 g/L de glicerol apresentou cheiro levemente adocicado de ésteres. Não se detectou qualquer cheiro nos outros cultivos. O aspecto também era diferente: levemente turvo nos meios com Tween 80 e límpido nos meios com glicerol (neste caso, levemente de coloração âmbar).

**Tabela II.10 – Efeito do Tween 80 e do glicerol, em substituição do óleo vegetal, como fonte de C principal, em cultivo submerso, sobre a produção de lipase pelo *C. gloesporioides*, em frascos sob agitação <sup>a</sup>.**

Fonte de C		pH final <sup>b</sup>	Atividade lipásica <sup>b</sup>		
Tipo	g/L		Diâmetro de halo (mm) <sup>c</sup>		U / mL <sup>d</sup>
			ATV	AEPV	
Tween 80	2,0	8,8 ± 0,4	5,2 ± 0,7	5,5 ± 1,6	8,2 ± 3,6 <sup>z</sup>
	10,0	8,8 ± 0,1	9,2 ± 0,7	10,2 ± 0,4	29,6 ± 3,3 <sup>xy</sup>
	15,0	8,5 ± 0,1	9,5 ± 0,3	10,2 ± 0,7	33,4 ± 0,2 <sup>x</sup>
	30,0	7,3 ± 0,6	9,3 ± 0,5	7,2 ± 1,5	15,8 ± 6,4 <sup>yz</sup>
glicerol	2,0	8,8 ± 0,1	4,0 ± 0,8	4,7 ± 0,5	7,0 ± 1,9
	10,0	7,5 ± 0,3	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,5	3,4 ± 0,7
	15,0	5,3 ± 0,1	3,5 ± 1,0	3,2 ± 0,5	7,0 ± 4,1
	30,0	6,7 ± 0,2	5,0 ± 0,4	4,0 ± 0,7	6,4 ± 3,4
Óleo de oliva	10,0	7,5 ± 0,3	7,4 ± 1,1	8,2 ± 1,1	26,3 ± 6,5

<sup>a</sup> meio basal segundo SALLEH *et al.* (1993), com peptona bacteriológica (20,0 g/L); pH 6,5; cultivos de 72 h; <sup>b</sup> valores médios de seis determinações, duas repetições; <sup>c</sup> ensaio por difusão em gel de ágar, contendo tributirina e azul Vitória (ATV) ou emulsão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico (2,0 %; V/V), pH 8,9 (AEPV); 20,0 µL/poço; 30 °C, durante 72 h; <sup>d</sup> ensaio enzimático titulométrico, em condições padronizadas, como descrito em materiais e métodos; µ moles de ácidos graxos liberados por minuto; tratamentos indicados com letras diferentes (x,y,z) diferem entre si (p < 0,05) pela comparação de médias pelo teste de Tukey, após análise de variância, com delineamento inteiramente casualizado.

O emprego de carboidratos simples como a glicose, a lactose e a sacarose, nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10,0 g/L, também foram testados como fonte de C primária, em substituição ao óleo de oliva (dados não apresentados). Apesar do fungo ter crescido bem em todos os meios de cultura, não foi detectada a atividade lipásica em nenhum filtrado resultante dos respectivos cultivos. Portanto, pode-se concluir que a síntese de lipase foi inibida pelos carboidratos testados. Foi notado que o pH final de todos os cultivos chegou a 9,0.

Os resultados mostrados acima demonstram a necessidade do meio de cultura ter na sua composição óleo vegetal ou Tween 80 como indutores da síntese da lipase e que carboidratos simples reprimem a formação da enzima.

Os dados encontrados na literatura mostram claramente como as respostas aos diversos tipos de fontes de C e de N, quanto à produção da lipase pelos fungos, são diferentes. RAPP (1995) detectou a presença de lipase quando cultivou uma

cepa de *Fusarium oxysporum* em meio de cultura basal contendo apenas peptona, extrato de levedura e sais inorgânicos e mesmo em todos os meios que foram adicionados de glicose, de glicerol, de ácidos graxos, de óleo de oliva ou de glicerol. Entretanto, verificou que a produção era diminuída pela glicose e pelo glicerol. Verificou, também, que a produção da lipase em meios que continham óleo de oliva e de glicose juntos, somente era aumentada quando a glicose era totalmente consumida, isto é, em maiores tempos de incubação. Por outro lado, os resultados encontrados por PETROVIC *et al.* (1990) com uma cepa de *Penicillium roqueforti*, isolada do respectivo queijo maturado, mostraram efeitos contrários, ou seja, uma produção significativa de lipase em meio de cultura com glicose (20,0 g/L) e inibição da formação da enzima quando empregou óleo de oliva como fonte de carbono (20,0 g/L).

Estudando o efeito de alguns componentes de meios de cultura sobre a produção de lipase por algumas cepas de bolores (*Rhizomucor mihei*, *Galactomyces geotrichum* e *Aspergillus niger*) e leveduras (*Yarrowia lipolytica*, duas cepas), RAPP & BACKAUS (1992) verificaram que a atividade lipásica de lipases extracelulares foi maior do que as lipases intracelulares com todas as cepas, demonstrando a característica extracelular das lipases sintetizadas pelos fungos. Também verificaram que a atividade das lipases intracelular e extracelular aumentou com adição de lipídios ao meio de cultura, exceto com a cepa de *R. mihei* que produziu mais enzima no meio sem lipídios. Detectaram diminuição significativa da produção de lipase pelo fungo *G. geotrichum* quando este era crescido na presença de Tween 80 e, também, mostraram que todas cepas testadas produziram quantidades significativas da enzima em meios contendo glicose ou sacarose como fonte de C única. Esses resultados foram obtidos com cultivos de quatro dias em frascos agitados no caso dos bolores e de dois dias no caso das leveduras.

SILVA *et al.* (2005) testaram várias fontes de lipídios e tipos diferentes de surfactantes sobre a produção de lipase, trabalhando com uma cepa de *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico isolado por eles. Conseguiram melhores resultados com óleo de oliva e em meio adicionado de SDS (duodecil sulfato de sódio) ou Tween 80, após ter sido decorrido 50 h de cultivo.

Em conclusão, em decorrência dos resultados obtidos com os experimentos realizados e, mostrados acima, decidiu-se empregar o meio de cultura com a formulação basal de composição seguinte: óleo de oliva (8,0 mL/L); peptona

bacteriológica A (20,0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1,0 g/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L) e pH 6,5 nos estudos de produção de lipase por *C. gloesporioides*.

O efeito do tipo de inóculo em função do tempo de cultivo foi estudado no meio de cultura definido acima (Tabela II.11).

**Tabela II.11 – Efeito do tipo de inóculo sobre o crescimento de *C. gloesporioides* e produção de lipase, em cultivo submerso, em frascos sob agitação, em função do tempo de cultivo <sup>a</sup>.**

Tipo de inóculo	Tempo de cultivo (h)	pH final do cultivo	Biomassa (mg/mL) <sup>b</sup>	Lipase (U/mL) <sup>c</sup>
Esporos	24	6,7	9,2 ± 1,2 <sup>y</sup>	2,7 ± 1,3 <sup>z</sup>
	48	7,4	14,9 ± 0,7 <sup>x</sup>	18,8 ± 1,8 <sup>y</sup>
	72	8,2	12,4 ± 0,2 <sup>x</sup>	25,7 ± 1,7 <sup>x</sup>
	96	8,0	8,1 ± 0,7 <sup>y</sup>	24,3 ± 1,3 <sup>xy</sup>
Vegetativo <sup>d</sup>	24	6,2	11,1 ± 4,3	18,3 ± 1,9
	48	7,4	13,0 ± 0,8	27,7 ± 3,5
	72	8,1	11,0 ± 0,6	26,8 ± 1,3
	96	8,4	10,3 ± 0,2	27,4 ± 2,4

<sup>a</sup> meio de cultura: óleo de oliva (10,0 mL/L); peptona bacteriológica (20,0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1,0 g/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L); pH 6,5; <sup>b</sup> obtida pela determinação de massa seca, a 80 °C; <sup>c</sup> ensaio titulométrico, como descrito em materiais e métodos; uma unidade corresponde à quantidade em μmoles de ácidos graxos liberados por minuto, em condições padronizadas; <sup>d</sup> cultivo de 24 h no mesmo meio de cultura usado na fermentação; tratamentos indicados com letras diferentes (x,y) diferem entre si (p < 0,05) pela comparação de médias pelo teste de Tukey, com delineamento inteiramente casualizado.

Não se percebeu diferença entre os rendimentos de produção de lipase com os dois tipos de inóculo, sendo a produção máxima alcançada com o mesmo tempo total de fermentação. Foi escolhido o inóculo com suspensão de esporos juntamente com o meio basal descrito acima como as condições de partida para os estudos de maximização de produção da lipase que serão descritos a seguir.



## II.2 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, QUANTO AOS FATORES ÓLEO DE OLIVA, PEPTONA E pH INICIAL DO CULTIVO, VISANDO A PRODUÇÃO MÁXIMA DE LIPASE EXTRACELULAR, ATIVA EM pH ALCALINO, PELO FUNGO *C. gloesporioides*.

### RESUMO

A determinação das melhores condições para a produção máxima de lipase extra - celular pelo fungo *C. gloesporioides* foi realizada em três etapas. Inicialmente foram identificados os fatores mais importantes que influenciaram a produção da lipase. Em seguida foram selecionados os fatores cujos efeitos foram considerados significativos, ou seja, a peptona “bacteriológica” A, o óleo de oliva e o pH inicial do cultivo, aplicando-se um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^3$ ), a partir do meio de cultura de composição basal, contendo: peptona (20,0 g/L); óleo de oliva (8,0 mL/L); e sais inorgânicos, no pH 7,0. Em condições de cultivo submerso neste meio de cultura, contido em frascos Erlenmeyer sob agitação (150 rpm) a 30 °C, o fungo *C. gloesporioides* produziu, regularmente, 27.700 U/L de lipase, aproximadamente. Os estudos efetuados em seguida, para se determinar as condições otimizadas para a produção máxima da lipase, foram realizados aplicando-se a metodologia de superfícies de respostas, empregando-se um planejamento fatorial  $2^3$  com cinco pontos centrais. Foi demonstrado que o modelo estatístico linear que indicou a variação da produção da enzima, em função da concentração da peptona (na faixa de 10,0 a 30,0 g/L), do óleo de oliva (na faixa de 4,0 a 16,0 mL/L) e do pH (na faixa de 6,0 a 7,0), foi representado pela equação ajustada  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$ , sendo que  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam as variáveis codificadas para os fatores peptona, óleo de oliva e pH, respectivamente. A equação foi simplificada para  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$ , porque o efeito do pH não se confirmou como significativo e, também, porque os efeitos das possíveis interações entre os fatores não foram significativas. Desse modo, foi verificado que a representação bidimensional da superfície de resposta do referido modelo foi um plano inclinado obliquamente em relação aos eixos cartesianos, com direção ascendente indo da direita para a esquerda. Concluiu-se, portanto, que para serem conseguidos

maiores rendimentos de produção da lipase dever-se-ia deslocar a região experimental para menores valores de  $x_1$  (peptona) e de  $x_2$  (óleo de oliva), ao mesmo tempo. Seguindo essa orientação conseguiu-se que a cepa fúngica produzisse cerca de 36.000 U/L de lipase.

Palavras-chave: *C. gloesporioides*; lipase; condições de produção; otimização

## ABSTRACT

The determination of the best conditions to obtain the maximum production of extracellular lipase by the fungus *C. gloesporioides* was carried out in three steps. Firstly, it was identified the more important factors that influence lipase production. Olive oil, "bacteriological" A peptone and initial pH of the culture medium were selected as significant variables by applying complete factorial design of two levels. The statistical studies realized started with the basal medium that contained: olive oil (8.0 mL/L); peptone (20.0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1.0 g/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.0 g/L); pH 6.5. In conditions of liquid substrate fermentation in shaken Erlenmeyer flasks (150 rpm) at 30 °C with the basal medium the fungal strain of *C. gloesporioides* produced, regularly, 27,700 U/L of lipase, approximately. It was employed a factorial design (2<sup>3</sup>), that created 8 experimental assays with different combinations of the important factors. It was concluded that the olive oil (studied at the range 4.0 to 10.0 mL/L) was more significant than peptone (studied at the range 10.0 to 30.0 g/L) and that the initial pH (range 6.0 to 7.0) had little influence on the lipase production. Lastly, using the Response Surface Methodology, studies were made to optimize the culture medium to reach the maximum lipase production. It was employed a complete factorial design 2<sup>3</sup> with central composite: three factors (olive oil, peptone and pH) and five replicates of the central point created 13 runs. It was obtained the fitted first-order model  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$ . The codified variables  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  represent the peptone, the olive oil and the initial pH. The equation was simplified for  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$ , because the little influence of pH and the interactions effects between the factors were not significant. The equation was described geometrically as a plane and explains the relationship between the factors in the intervals studied. As a consequence the direction of the steep ascent, perpendicular to the contour lines, should be obtained by decreasing the basal olive oil and peptone

concentrations. Following this orientation it was obtained the production of 36,000 U/L of lipase.

Key-words: *C. gloesporioides*; lipase; production conditions optimization.

## 1 INTRODUÇÃO

A determinação das condições ótimas para a produção de alguma substância microbiana é efetuada, usualmente, estudando-se a variação de um fator interferente no processo de produção, de cada vez, enquanto os outros fatores são mantidos constantes (estratégia OFAT: “One Factor A Time”). Esse método, entretanto, tem mostrado ser ineficiente em muitas situações. Por outro lado, a otimização de processos de produção, com a aplicação da metodologia de delineamento fatorial em conjunto com análise de superfícies de respostas (RSM: “Response Surface Methodology”) têm sido realizados com maior eficiência. Essas metodologias, além de demandarem um menor número de experimentos, ao avaliarem as respostas às alterações simultâneas de vários fatores, permitem que as mesmas sejam avaliadas na forma de uma superfície sobre aquele espaço experimental formado pelas variáveis estudadas.

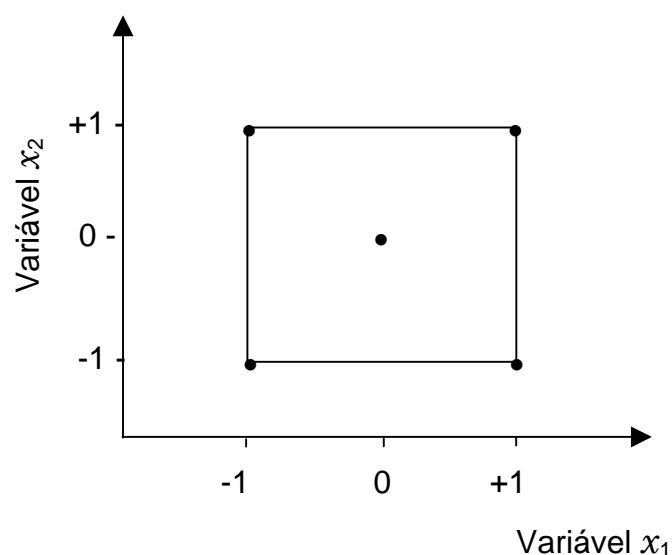
A metodologia de superfície (ou superfícies) de resposta consiste de um grupo de técnicas usadas no estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas e um número de variáveis controláveis. Alterando tais variáveis ao mesmo tempo, a dependência entre elas pode ser mostrada graficamente num diagrama de contornos das respostas ou, também denominado, gráfico de superfície de resposta. Assim, a região próxima ao rendimento máximo de produção é vista como um “morro”, considerando a resposta como uma superfície do “solo”, em que o “cume” representa a região desenhada pelas variáveis em estudo na qual a resposta conseguida é máxima. As respostas, no caso, são representadas por linhas de contorno, do mesmo modo como os “morros” são mostrados em mapas geográficos. Trata-se de técnicas de otimização de processos introduzidas na década de 50 por BOX e colaboradores (BOX *et al.*, 1951, BOX, 1954; BOX & YOUNG, 1955) e que, desde então, têm sido empregada na modelagem de diversos processos industriais.

A metodologia da superfície de resposta é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quanto

necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. Em geral, a modelagem é feita ajustando-se modelos lineares (de primeira ordem) ou quadráticos (de segunda ordem) aos resultados experimentais obtidos, a partir da aplicação de planejamentos fatoriais. Em seguida, a partir do ponto central, o deslocamento é realizado ao longo do caminho de inclinação máxima de um determinado modelo, que representa a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

A aplicação da metodologia se inicia a partir das condições experimentais que usualmente têm sido usadas, levando em consideração o nível da resposta às condições empregadas para as variáveis interferentes. No ponto de partida uma pergunta é feita. É possível melhorar o rendimento (de uma reação química ou de produção de uma substância, por exemplo), empregando-se outros valores para as variáveis em questão?

Para ser dada a resposta satisfatória a essa pergunta é necessário investigar a superfície de resposta em torno das condições que são usualmente empregadas. A investigação se inicia com a aplicação de um planejamento fatorial de dois níveis com ponto central que, no caso de duas variáveis apenas, adquire o aspecto mostrado na Figura II.1, sendo  $x_1$  e  $x_2$  as variáveis codificadas.



**Figura II.1** Representação gráfica de um planejamento fatorial de duas variáveis e dois níveis com ponto central

Esse planejamento cobre, portanto, três níveis de cada variável e não apenas dois, o que nos permite verificar se há, ou não, falta de ajuste para um modelo linear.

O rendimento médio de produção de lipase pelo fungo *C. gloesporioides* tem-se mostrado, regularmente, em torno de 27.700 U/L de filtrado de cultivo, após o crescimento do fungo no meio de cultura basal com a formulação seguinte: peptona “bacteriológica” A (20,0 g/L); óleo de oliva (10,0 mL/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0 g/L); NaNO<sub>3</sub> (1,0 g/L); pH 6,5. E a pergunta que se faz é: pode-se melhorar o rendimento de produção da enzima empregando outras condições experimentais tais como outras concentrações de ingredientes ou outro valor de pH?

Para tentar dar a resposta a essa pergunta foi empregado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com ponto central, composto, portanto, de três fatores, e, de cinco repetições do ponto central, o que gerou um conjunto de 13 experimentos.

A determinação das melhores condições para a produção máxima de lipase extracelular pelo fungo *C. gloesporioides* foi realizada em três etapas. Inicialmente foram identificados os fatores mais importantes que influenciaram a produção da lipase. Em seguida foram selecionados os fatores cujos efeitos foram considerados significativos, ou seja, a peptona “bacteriológica” A, o óleo de oliva e o pH inicial do cultivo. Finalmente foram realizados os estudos para se determinar as condições otimizadas para a produção máxima da lipase, variando as concentrações de peptona e do óleo de oliva bem como do valor do pH, tudo ao mesmo tempo, a partir da formulação basal do meio de cultura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Ágar bacteriológico e peptona “bacteriológica” A (combinação de hidrolisado pancreático de caseína e hidrolisado péptico de carne) foram adquiridos da Biobrás (Montes Claros, MG, Brasil). O meio de cultura para manutenção do fungo – ágar batata e dextrose - foi adquirido da Biobrás (Montes Claros, Brasil) e da Acumedia (Baltimore, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (P.A.), adquiridos de fontes comerciais.

## 2.2 Métodos

**2.2.1 Microrganismo** – foi empregada uma cepa de *Colletotrichum gloesporioides* previamente isolada e selecionada. Esta cepa foi mantida em ágar batata e dextrose (PDA), sob óleo mineral esterilizado (“master stock”), com subculturas no mesmo meio, a cada 60 dias (“production stock”).

**2.2.2 Meios de cultura** – os meios de cultura tinham a mesma formulação básica de sais inorgânicos (segundo SALLEH *et al.*, 1993) com a composição seguinte (g/L): NaNO<sub>3</sub> (1,0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5). Foram testadas 9 diferentes formulações de meios de cultura quanto às combinações de concentrações de peptona e de óleo de oliva e de valores de pH – 8 com combinações dos valores mínimo e máximo (codificados -1 e +1, respectivamente) e 1 combinação dos valores basais (codificados 0) em 5 repetições.

**2.2.3 Delineamento Experimental e Metodologia da Superfície de Resposta** – previamente foi usado o teste convencional “um fator de cada vez” para selecionar os fatores efetivos e a faixa de teste inicial para cada uma das três variáveis: concentração de peptona (A), concentração de óleo de oliva (B) e valor de pH (C) As especificações dos níveis para cada fator estão na Tabela II.12.

**Tabela II.12. Especificação dos níveis para cada fator (variável)**

Código do fator	Parâmetro	Unidade	Base (0)	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)	Variação
A	peptona	g/L	20,0	10,0	30,0	10,0
B	óleo de oliva	mL/L	10,0	4,0	16,0	6,0
C	pH	Unidade	6,5	6,0	7,0	0,5

Os efeitos combinados das concentrações iniciais de óleo de oliva, de peptona bacteriológica com o pH inicial do meio de cultura sobre a produção de lipase foram investigados empregando-se, primeiramente, o planejamento fatorial completo  $2^3$  para identificar os fatores significativos. Isso resultou em 8 diferentes formulações de meios de cultura, correspondendo, cada uma a um ensaio experimental (Tabela II.13), realizado em três repetições, que serviu para os cálculos dos efeitos principais e suas possíveis interações.

**Tabela II.13. Matriz (X) do planejamento  $2^3$  com a combinação dos fatores peptona bacteriológica (Fator A), óleo de oliva (Fator B) e pH (Fator C)**

Ensaio	Fator A	Fator B	Fator C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Para a modelagem e o deslocamento foram acrescentados 5 replicatas do ponto central ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , iguais ao valor codificado 0) o que resultou em mais 5 ensaios. Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para a construção do modelo estatístico ajustado às condições experimentais descritas e, então, otimizar as condições para a produção de lipase. Foram seguidos as diretrizes e os procedimentos preconizados por BARROS NETO *et al.* (1996) e por RODRIGUES & IEMMA (2005).

O valor médio da atividade máxima de lipase foi considerado como a variável dependente com os dados obtidos. Os resultados do planejamento fatorial com ponto central foram usados para ajustar uma equação polinomial de primeira ordem representada por  $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3$ , sendo  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  as variáveis codificadas dos fatores principais,  $\hat{y}$  a resposta estimada;  $\beta_0$  o coeficiente linear,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os coeficientes dos fatores principais e  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$   $\beta_{23}$  e

$\beta_{123}$ , os coeficientes das interações. A proporção da variância explicada pelo modelo obtido foi dada pelo coeficiente múltiplo de determinação,  $R^2$ .

**2.2.4 Preparo do inóculo** – o micélio do fungo, crescido na superfície inclinada do cultivo em PDA (“production stock”) com 7 a 14 dias de incubação, era suspenso em água destilada. Foram empregados volumes correspondentes à cerca de 10% do volume do meio de cultura a ser inoculado, numa concentração aproximada de  $10^6$  a  $10^8$  esporos/mL.

**2.2.5 Cultivos submersos** – os cultivos foram desenvolvidos em frascos Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio de cultura, sob agitação (150 rpm) em incubadora orbital modelo MA 830, da marca Marconi (Piracicaba, SP, Brasil), na temperatura de 30 °C. Decorrido o tempo de incubação planejado (72 h), o conteúdo de cada frasco era filtrado em gaze e papel Watman n° 44, sendo a massa micelial separada. No filtrado livre de células, determinaram-se o pH, em potenciômetro da marca Quimis (Diadema, SP, Brasil), a cor e o aspecto bem como eram feitas as determinações analíticas.

## **2.2.6 Determinação da atividade lipásica**

**2.2.6.1 Dosagem pelo método titulométrico** – foi empregado o método usado por WATANABE *et al.* (1977) para a medida da atividade lipásica pelo método titulométrico. A mistura de reação continha: emulsão de óleo de oliva em solução de álcool polivinílico (5,0 mL); tampão TRIS-HCl 0,02 M pH 8,0 (5,0 mL); filtrado enzimático (1,0 mL). A reação foi desenvolvida em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, sob agitação em banho maria a 30 °C, durante 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 20,0 mL da solução acetona/álcool etílico (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de NaOH 0,05 M, na presença de timolftaleína como indicador. No branco da amostra, empregou-se a preparação enzimática previamente aquecida em banho com água em ebulição durante 10 min e adição à mistura de reação já tratada com a solução de solventes. Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou um micromol de ácidos graxos por minuto, nas condições do ensaio.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz do planejamento e os rendimentos obtidos experimentalmente, em triplicata, em cada combinação de níveis, estão mostrados na Tabela II.14.

**Tabela II.14. Matriz de planejamento  $2^3$  com ponto central e correspondente resultados experimentais. Delineamento de primeira ordem.**

Ensaio n <sup>o</sup>	Variáveis (unidades originais)			Variáveis Codificadas <sup>a</sup>			Lipase (U/mL)			
	Pep- tona (g/L)	óleo de oliva (mg/L)	pH	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$y_1$	$y_2$	$y_3$	$\bar{y}$
1	10,0	4,0	6	-1	-1	-1	30,5	41,0	36,0	35,8
2	30,0	4,0	6	+1	-1	-1	33,0	25,0	24,0	27,3
3	10,0	16,0	6	-1	+1	-1	22,0	29,5	27,0	26,2
4	30,0	16,0	6	+1	+1	-1	17,0	19,5	19,5	18,7
5	10,0	4,0	7	-1	-1	+1	33,0	32,5	27,5	31,0
6	30,0	4,0	7	+1	-1	+1	34,0	36,0	30,0	33,3
7	10,0	16,0	7	-1	+1	+1	30,0	35,0	29,5	31,5
8	30,0	16,0	7	+1	+1	+1	20,0	15,0	19,5	18,2
9	20,0	10,0	6,5	0	0	0	25,3	25,7	25,5	25,5
10	20,0	10,0	6,5	0	0	0	26,7	23,8	25,3	25,3
11	20,0	10,0	6,5	0	0	0	24,8	29,3	27,0	27,0
12	20,0	10,0	6,5	0	0	0	29,8	29,8	29,8	29,8
13	20,0	10,0	6,5	0	0	0	23,8	25,5	24,7	24,7

<sup>a</sup>  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam os valores das variáveis codificadas pelas equações:

$$x_1 = (\text{g/L de peptona} - 20) / 30 - 10 / 2, \text{ por exemplo, } x_1 = (10 - 20) / 30 - 10 / 2 = -1;$$

$$x_2 = (\text{mL de óleo de oliva} - 10) / 16 - 4 / 2, \text{ por exemplo, } x_2 = 16 - 10 / 16 - 4 / 2 = +1;$$

$$x_3 = (\text{unidade de pH} - 6,5) / 7 - 6 / 2, \text{ por exemplo, } x_3 = 7 - 6,5 / 7 - 6 / 2 = +1.$$

Os efeitos principais e suas interações foram calculados após obtenção dos sinais algébricos para os coeficientes de contrastes (Tabela II.15).

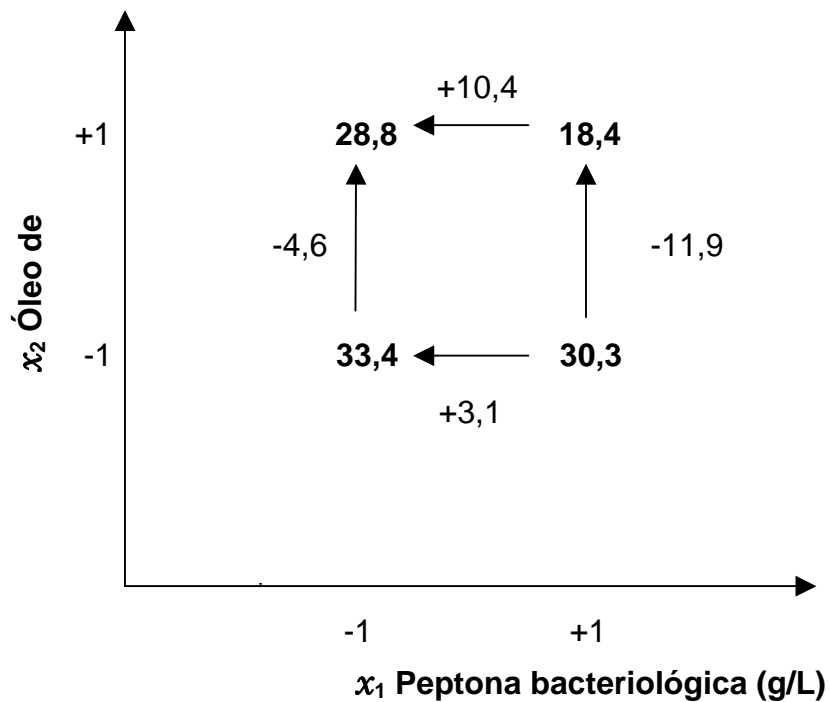
**Tabela II.15. Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes.**

Média	27,75 ± 1,14
Efeitos principais	
A: peptona bacteriológica	- 6,75 ± 2,28
B: óleo de oliva	- 8,20 ± 2,28
C: pH inicial	+ 1,50 ± 2,28
Interações	
AB	- 3,65 ± 2,28
AC	+ 1,25 ± 2,28
BC	+ 1,25 ± 2,28
ABC	- 4,15 ± 2,28

Para que seja tomada a decisão de que os efeitos calculados sejam significativamente diferentes de zero, é necessário que as médias sejam comparadas pelo teste de hipóteses, empregando, por exemplo, o teste de t. No nível de 95% de confiança o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade, segundo a tabela de “percentis da distribuição de t”, é igual a 2,3. Isso significa que apenas o efeito com valor absoluto acima de  $(= 0 + t_{\text{crítico}} * EP_{\text{efeito}} = 0 + 2,3 * 2,28 = 5,24)$  é significativo. Aplicando tal critério aos valores da Tabela II.15, pode-se notar que apenas os efeitos do óleo de oliva e da peptona são significativos. A inexistência de efeito de interação significativo indica que os efeitos principais podem ser interpretados isoladamente, praticamente como se pertencessem a um planejamento  $2^2$ .

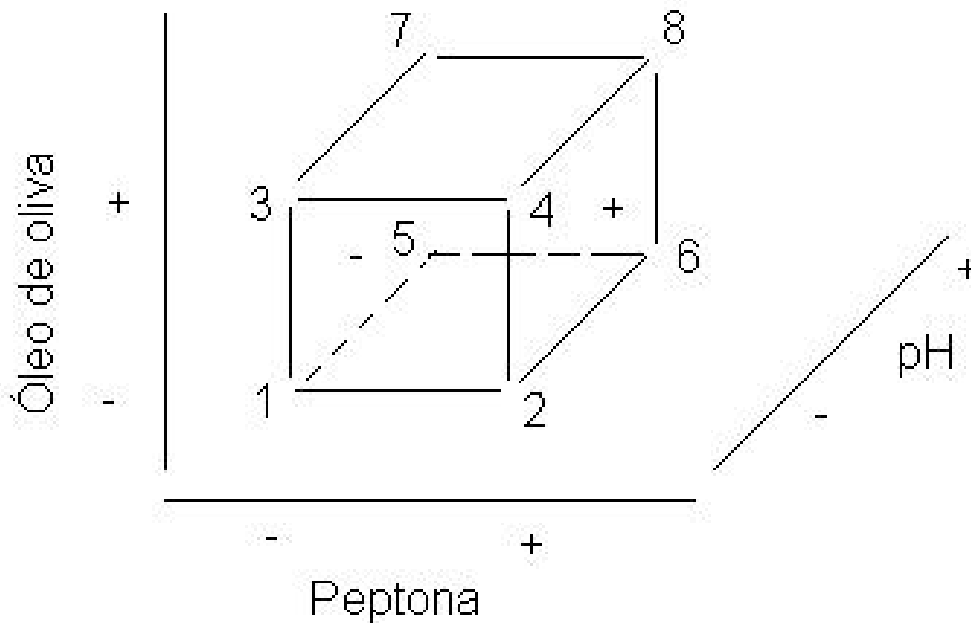
Os efeitos principais da peptona bacteriológica e do óleo de oliva podem, então, ser interpretados a partir dos valores médios de produção de lipase, obtidos com as combinações de concentrações de óleo de oliva ( $x_1$ ) e de peptona ( $x_2$ ), ou seja:  $(-1;+1) = 26,2+31,5/2 = 28,85$ ;  $(+1;+1) = 18,7+18,2/2 = 18,45$ ;  $(-1;-1) = 35,8+31,0/2 = 33,4$ ;  $(+1;-1) = 27,3+33,3/2 = 30,3$ . Como demonstrado na Figura II.2, pode-se concluir que: a - a elevação da concentração de peptona diminui a produção de lipase; b - a elevação da concentração de óleo de oliva provoca, também, a diminuição da produção da enzima e que este efeito é muito mais pronunciado em concentração mais alta da

peptona; c - os maiores rendimentos de produção foram conseguidos com 10,0 g/L e de 4,0 mL/L de peptona e óleo de oliva, respectivamente.



**Figura II.2.** Efeito das combinações de concentrações de óleo de oliva e de peptona sobre os valores médios de produção de lipase.

Os efeitos calculados num fatorial  $2^3$  podem ser interpretados como contrastes geométricos, sendo o cubo a figura geométrica básica, no qual os oito ensaios da matriz de planeamento correspondem aos vértices do cubo (Fig.II.3).



**Figura II.3-** Figura geométrica básica que representa os efeitos calculados de um planejamento fatorial  $2^3$ .

Os efeitos principais e as interações de dois fatores são contrastes entre dois planos, que podem ser identificados examinando-se os coeficientes de contraste. Por exemplo, no cálculo do efeito principal do fator A (peptona), os ensaios 2, 4, 6 e 8 entram com o sinal positivo, e os demais entram com o sinal negativo. No cubo, os sinais negativos ficam todos numa das faces, aquela que é perpendicular ao eixo do fator A (peptona) e está situada no nível inferior desse fator. Os outros ensaios (2, 4, 6 e 8) de sinais positivos estão na face oposta, que corresponde ao nível superior. O efeito principal do fator A (peptona) pode ser considerado, portanto, como o contraste entre essas duas faces do cubo. Em geral um efeito principal num planejamento  $2^3$  é um contraste entre faces opostas, e perpendiculares ao eixo da variável correspondente, enquanto as interações de dois fatores são contrastes entre dois planos diagonais, perpendiculares a um terceiro plano definido pelo eixo das duas variáveis envolvidas na interação (BARROS NETO *et al.*, 1996).

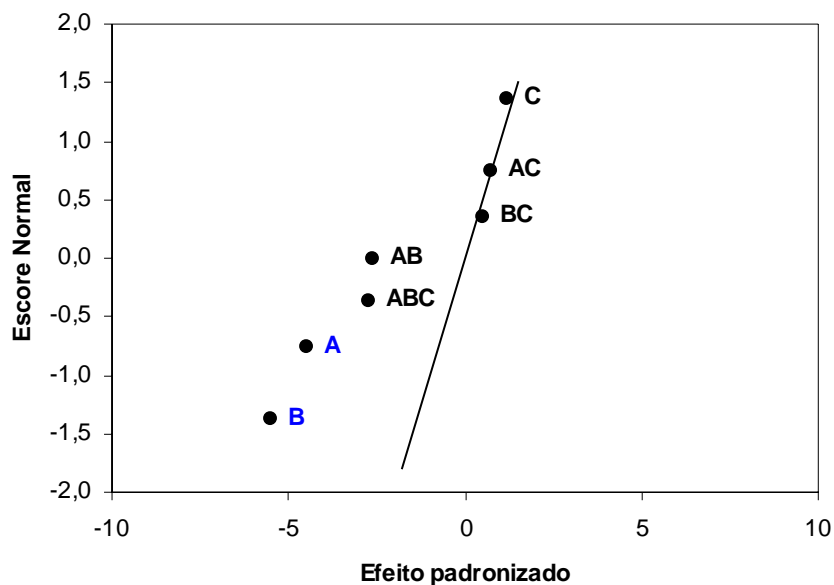
Supondo que nenhum dos sete efeitos calculados anteriormente exista de fato, isto é, que o verdadeiro valor de cada um deles seja zero e, portanto, que os valores numéricos obtidos sejam apenas decorrentes de erros aleatórios, teremos a hipótese nula ( $H_0 = 0$ ), cuja veracidade pode ser avaliada. Sendo verdadeira, o teorema central do limite, em conjunto com a aleatoriedade dos experimentos, permite considerar os sete resultados como uma amostra aleatória retirada de uma distribuição normal, com

média populacional zero. Assim, cada valor representa a fração 1/7 (14,28%) da área total da distribuição. Elaborando um gráfico no qual os efeitos são colocados em *papel de probabilidade normal* (anexo A) pode-se testar se os efeitos não são significativos (teste da hipótese nula). Os dados necessários para essa análise estão mostrados na Tabela II.16, em que cada efeito está associado a um valor de probabilidade acumulada.

**Tabela II.16. Correspondência entre os efeitos dos fatores, segundo o planejamento 2<sup>3</sup>, e os valores de probabilidade acumulada.**

Ordem	Código	Valor do efeito	Área de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central
1	B	- 8,20	0,00 - 14,28	7,14
2	A	- 6,75	14,28 - 28,56	21,42
3	ABC	- 4,15	28,56 – 42,84	35,70
4	AB	- 3,65	42,84 – 57,12	49,98
5	BC	+ 0,90	57,12 – 71,40	64,26
6	AC	+ 1,25	71,40 – 85,68	78,54
7	C	+ 1,50	85,68 – 99,96	92,82

Alternativamente, o gráfico pode ser construído representando-se o escore normal no eixo das ordenadas e o efeito padronizado no eixo das abcissas (Figura II.4). Os efeitos cujos pontos correspondentes que não se situarem na reta são significativos – mais significativos quando estiverem mais afastados, seja à esquerda seja à direita. Portanto, a peptona (efeito A) e o óleo de oliva (efeito B), foram considerados como os mais significativos. As interações AB e ABC que, no gráfico, apesar de aparecem fora da reta, não foram significativos ( $p = 0,057$  e  $p = 0,053$ , respectivamente). Cada escore normal corresponde à área sob a curva normal, compreendida entre  $-\infty$  e o ponto  $(i-0,5) / n$ , em que  $i$  representa o  $i$ -ésimo ponto e  $n$  o número de pontos experimentais.



**Figura II.4.** Gráfico de probabilidade Normal dos efeitos padronizados.

A: Peptona ( $p = 0,011$ ); B: Óleo de Oliva ( $p = 0,005$ ); C: pH ( $p = 0,306$ ). Interações: AB ( $p = 0,057$ ); AC ( $p = 0,509$ ); BC ( $p = 0,654$ ); ABC ( $p = 0,053$ ).

A fim de se ter melhor entendimento do comportamento fisiológico da cepa (# 41) de *C. gloesporioides* alguns fatos foram constatados com os cultivos nas oito diferentes condições. De modo geral foi detectada menor atividade lipásica nas preparações enzimáticas obtidas a partir dos cultivos em meios de cultura com as maiores concentrações de óleo de oliva, sendo esses resultados mais perceptíveis nos meios com pH inicial igual a seis, como pode ser visto na Tabela II.17. Como se pode notar as maiores produções de lipase ocorreram nos meios de cultura cujo pH final, encontrava-se na faixa alcalina em patamar relativamente alto, isto é, naqueles meios com formulações contendo uma relação C:N relativamente baixa. Por outro lado, as menores produções foram detectadas em meios com relação C:N altas, nos quais o pH final encontrava-se mais baixo, ocorrendo as menores produções da enzima nos meios com menor quantidade de peptona. Sabe-se que o pH de um cultivo microbiano aumenta com o tempo de incubação em duas situações: quando há consumo de  $\text{NO}_3^-$  e de aminoácido, pois ocorre, como decorrência, consumo de  $\text{H}^+$  e quando ocorre exaustão da fonte de C primária na presença de aminoácidos. O aumento significativo do pH no caso em questão poderia ter ocorrido devido à exaustão do óleo de oliva fazendo com que o esqueleto de carbono de aminoácidos fosse consumido, ocasionando o acúmulo do íon amônio com conseqüente aumento de pH. Nessa

situação, o aspecto do caldo fermentado resultante foi bastante característico: límpido, com ausência de gotículas do óleo. Quanto ao crescimento fúngico, apesar de ter sido aparentemente similar em todos os meios testados, formado por uma massa micelial amorfa, naqueles meios de alta relação C:N, a presença do óleo foi significativa, apresentando-se o caldo fermentado, mesmo após filtração, com aspecto de “café com leite, claro” ou seja, sob forma de emulsão.

**Tabela II.17. Análise sobre a influência da concentração de óleo de oliva, da concentração de peptona e do pH inicial sobre a produção de lipase extracelular por *C. gloesporioides*.**

pH inicial	Óleo de oliva (mL/L)	Peptona (g/L)	Relação C:N	pH final <sup>a</sup>	Atividade lipásica <sup>a</sup>	
					Diâmetro de halo (mm) <sup>b</sup>	U / mL <sup>c</sup>
6,0	4,0	10,0	0,40	8,6	10,0	35,8
	4,0	30,0	0,13	8,7	7,3	27,3
	16,0	10,0	1,30	5,3	3,5	26,2
	16,0	30,0	0,53	6,2	7,7	18,7
7,0	4,0	10,0	0,40	8,6	10,3	31,0
	4,0	30,0	0,13	8,7	10,5	33,3
	16,0	10,0	1,60	5,5	3,5	31,5
	16,0	30,0	0,53	6,4	6,7	18,2

<sup>a</sup> valores médios, obtidos de triplicatas; <sup>b</sup> formado em gel AEPV, preparado como descrito em material e métodos, capítulo 2; <sup>c</sup> micromoles de ácidos graxos liberados por minuto nas condições descritas em metodologia; obs: meio basal, em g/L: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,0); NaNO<sub>3</sub> (1,0).

A atividade proteolítica não foi detectada em qualquer meio, nas condições testadas. Neste caso, é temerário afirmar que o fungo não tenha produzido proteinases, visto que esta atividade enzimática é, em geral, de suma importância fisiológica para os fungos filamentosos, e a sua pesquisa foi realizada, no caso, apenas em cultivos de 72 h de incubação.

Pela aplicação de análise de regressão múltipla aos dados experimentais, a equação polinomial de primeira ordem obtida para a produção de lipase foi

$$\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$$

equação (1)

Os valores estimados pela equação (1) ajustada e os valores observados da produção de lipase estão mostrados na Tabela II.18.

**Tabela II.18. Valores experimentais e valores estimados de produção de lipase pela cepa de *C. gloesporioides***

Ensaio n <sup>o</sup>	Produção de Lipase (U/mL)				
	Estimada <sup>a</sup> ( $\hat{y}$ )	Observada (Y)			
		$\bar{y}$	$y_1$	$y_2$	$y_3$
1	35,6	35,8	30,5	41,0	36,0
2	27,0	27,3	33,0	25,0	24,0
3	25,4	26,2	22,0	29,5	27,0
4	18,0	18,7	17,0	19,5	19,5
5	30,2	31,0	33,0	32,5	27,5
6	32,4	33,3	34,0	36,0	30,0
7	31,2	31,5	30,0	35,0	29,5
8	17,8	18,2	20,0	15,0	19,5
9	27,2	25,5	25,3	25,7	25,5
10	27,2	25,3	26,7	23,8	25,3
11	27,2	27,0	24,8	29,3	27,0
12	27,2	29,8	29,8	29,8	29,8
13	27,2	24,7	25,5	24,7	24,7

<sup>a</sup> coeficiente de determinação múltiplo do ajuste  $R^2 = 0,9903$ .

O coeficiente de determinação múltiplo ( $R^2$ ), implica que 99,03% da produção de lipase foram atribuídos às variáveis independentes peptona, óleo de oliva e pH inicial do cultivo. A ANOVA correspondente está apresentada na Tabela II.19.



**Tabela II.19. ANOVA para o modelo ajustado**

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de graus de liberdade (g.l.)	Média Quadrática (MQ)	F
Regressão (R)	303,23	p - 1 = 3	101,07	
Resíduos (r)	2,96	n - p = 9	0,33	306,3
Total	306,19	n - 1 = 12		

% de variação explicada = 99% (  $R^2 = SQR/SQT = 0,99$ ).

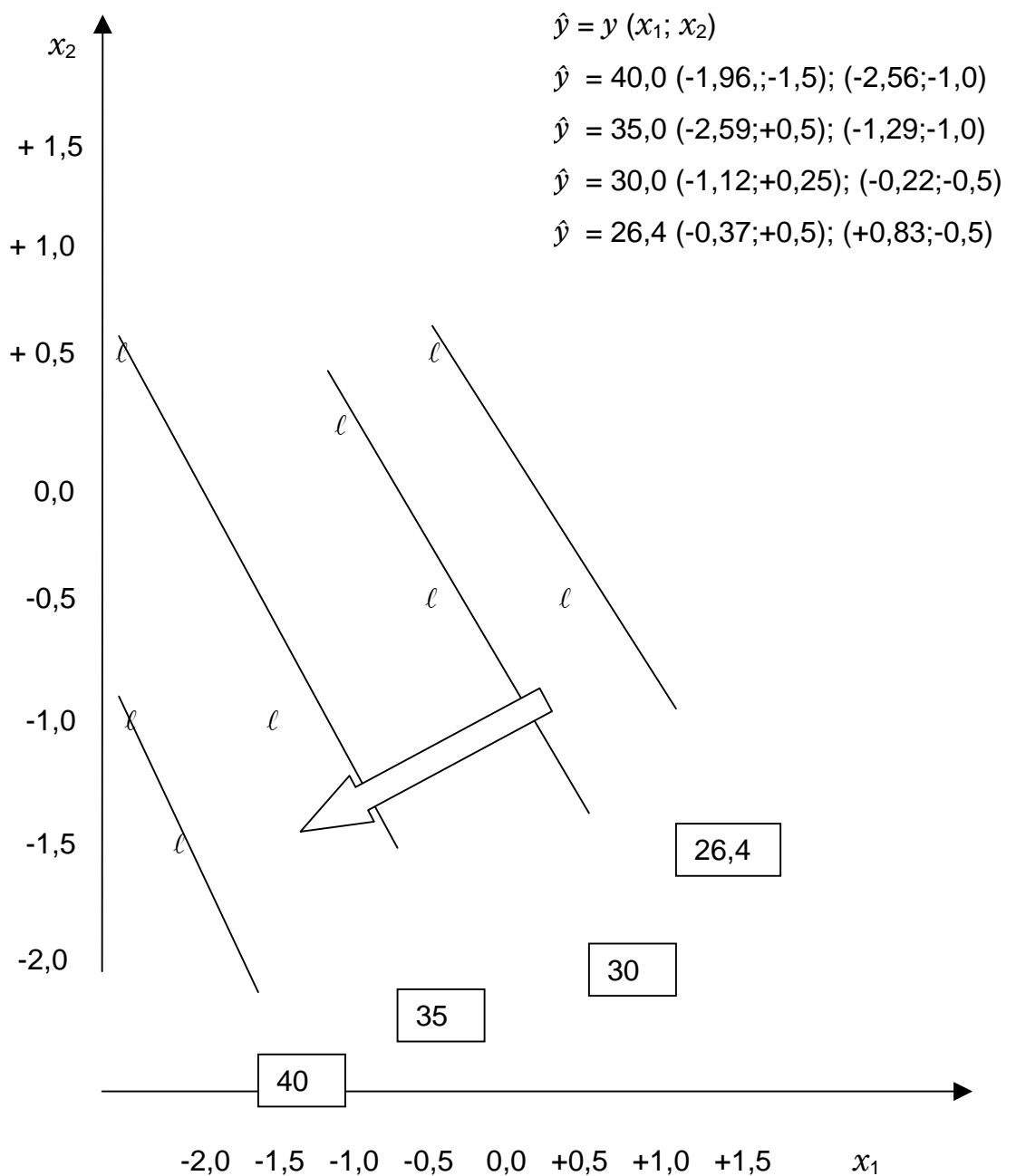
A análise estatística mostrou, também, que apenas a peptona e o óleo de oliva foram os fatores significativos. Assim, a equação (1) pôde ser simplificada para

$$\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 \quad \text{equação (2).}$$

Dando valores para a produção de lipase, como, p.ex.,  $\hat{y} = 40$ , chegaremos a expressões que permitem relacionar  $x_2$  com  $x_1$ . No caso,  $x_1 = -3,76 - 1,2 x_2$ . Esta equação representa uma reta e, em qualquer ponto dela, o valor de  $\hat{y}$  deve ser igual a 40, estando, assim, de acordo com o modelo ajustado. Repetindo com outros valores de  $\hat{y}$ , obteremos outras curvas de nível, que, em conjunto, darão uma imagem da superfície de resposta na região investigada, como pode ser visto na Figura II.5.

Podemos ver que se trata de um plano inclinado obliquamente em relação aos eixos e, com direção descendente indo da direita para a esquerda. Portanto, para serem conseguidos maiores rendimentos devemos deslocar a região experimental para menores valores de  $x_1$  e menores valores de  $x_2$ . O progresso será mais rápido se esse deslocamento for realizado ao longo de uma trajetória perpendicular às curvas de nível, isto é, se for seguido um caminho de inclinação máxima da superfície ajustada, saindo do ponto central do planejamento.

A inclinação máxima é dada pela proporção  $b_2/b_1$ , ou seja,  $-3,41/-4,31 = 0,79$  ou 0,8, o que significa que os deslocamentos ao longo dos eixos  $x_2$  e  $x_1$  devem ser realizados do seguinte modo: para cada unidade recuada no eixo  $x_1$  devem ser recuados 0,8 unidades ao longo do eixo  $x_2$  (ou de 0,5 e 0,4 ou de 0,25 e 0,2, etc.).



**Figura II.5-** Curvas de nível do plano descrito pela equação  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2$

Dando continuidade à otimização, o deslocamento deveria ser realizado para uma nova região experimental, tendo como ponto central as concentrações de peptona e de óleo de oliva em que foi alcançada maior produção de lipase, ou seja, 10,0 g/L e 4,0 mL/L de peptona e óleo de oliva, respectivamente. Assim, com a proporção 0,5:0,4, a mais viável experimentalmente, seriam obtidas apenas a formulação contendo 5,0 g/L de peptona e 2,4 mL/L de óleo de oliva. Por outro lado isso criaria um problema de

natureza prática, visto que quando se prepara o meio de cultura o óleo de oliva deve ser acrescentado diretamente no frasco Erlenmeyer contendo 50,0 mL do restante do meio de cultura. Nesse caso, um volume de apenas 0,12 mL do óleo deveria ser adicionado, o que acarretaria grande possibilidade de cometimento de erro experimental. Assim sendo, optou-se parar com o deslocamento e considerar as concentrações de 10,0 g/L e de 4,0 mL/L de peptona e de óleo de oliva, respectivamente, como condições muito próximas das condições experimentais ótimas, que permitiram a obtenção de 35.800 U/L de lipase extracelular, ativa em pH alcalino, correspondendo a um aumento de 29,2% em relação à produção nas condições iniciais do estudo (com 20,0 g/L de peptona e 10,0 mL/L de óleo de oliva).

Na hipótese de que as concentrações das duas variáveis fossem grandes o suficiente para se testar novas formulações os possíveis resultados seguiriam um dos comportamentos seguintes: aumentarem de modo continuado com a diminuição proporcional da peptona e do óleo de oliva ou aumentarem até certo ponto e depois começarem a cair. No primeiro caso indica que deveríamos prosseguir com os deslocamentos a partir do mesmo ponto central até então utilizado. No segundo caso, até o último ponto onde ocorreu aumento de produção de lipase, esses valores iniciais indicam que, de fato, ocorreu deslocamento “morro” acima, mas que, ao ser ultrapassado o último ponto (de resultado crescente), foi ultrapassado o “cume do morro” e que começou a descida do outro lado. Neste momento, portanto, é hora dos deslocamentos serem paralisados e a nova região que apresenta os melhores resultados deve ser investigada. Para isso, entretanto, novo planejamento é elaborado, idêntico ao primeiro, mas centrado em torno do ponto correspondente àquele que propiciou o melhor resultado. Enfim, tudo é repetido, e novo modelo estatístico é elaborado. Se a análise de variância apontar baixa percentagem de explicação da variação, isto é, baixo percentual de pontos explicados pelo modelo linear, então este modelo não mais demonstra ser adequado para descrever a superfície de resposta na nova região investigada.

Assim sendo, um modelo quadrático deve ser proposto e no caso de duas variáveis (dos dois efeitos principais, significativos), apresenta a expressão geral:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Neste caso, o modelo apresenta seis parâmetros e se o planejamento apresentar cinco níveis (cinco diferentes combinações de valores de concentrações de

peptona e de óleo de oliva), as estimativas não poderão ser calculadas visto que há mais parâmetros do que níveis (combinações). Nessa situação o planejamento necessitará ser ampliado, como, por exemplo, fazendo-se a construção do “planejamento em estrela”. Isso se faz, acrescentando ao planejamento já existente um planejamento idêntico, porém girado de ângulo de 45 graus em relação à orientação de partida. Como consequência é obtida uma distribuição octogonal em que os novos pontos ficam localizados a uma distância de  $2^{1/2}$  do ponto central (em variáveis codificadas), como afirmado por BARROS NETO *et al.* (1996). Após a realização dos novos ensaios, faz-se a verificação estatística. Se o novo modelo proposto apresentar-se adequado e, estando a região localizada no máximo, conclui-se que o ápice do “morro” foi atingido, isto é, as condições ótimas de produção de lipase pela cepa em questão foram determinadas.

## **CONCLUSÕES INTEGRADAS**

## CONCLUSÕES INTEGRADAS

Um método simples e sensível foi desenvolvido para detectar colônias fúngicas com atividade lipolítica em placas de Petri. Dentre as formulações de meios de cultura testados aquela que possuía o óleo de oliva, emulsionado no próprio meio enquanto fluido (após a fusão do ágar), e sais biliares, tanto em pH ácido quanto neutro, foi considerada adequada, apresentando razoável reprodutibilidade e sensibilidade. Nessas condições, a intensidade do efeito inibitório das espécies fúngicas que apresentam crescimento exuberante sobre a superfície do meio foi, também, considerada satisfatória.

Cinqüenta e nove cepas fúngicas foram isoladas de amostras do solo do cerrado da região norte do estado de Minas Gerais. O enriquecimento prévio, conseguido com a incorporação de raspas da semente do barú (*Dipteryx alata* Vog) às amostras de terra serviu como “iscas” e favoreceu o desenvolvimento rápido do micélio fúngico. Na fase seguinte, em condições de enriquecimento seletivo no meio em placa de Petri, foram isoladas as cepas fúngicas potencialmente produtoras da enzima com atividade lipolítica.

Setenta e três cepas, 14 obtidas de coleções de cultura, juntamente com as 59 isoladas, foram submetidas ao processo de seleção quanto à capacidade de produção de lipase extracelular ativa em pH alcalino. Na seleção primária (em placa de Petri) apenas 21 foram consideradas boas produtoras em potencial. Em etapa seguinte, de seleção secundária, em condições de fermentação em substrato líquido e de fermentação em substrato sólido, apenas 11 delas foram selecionadas como boas produtoras, correspondendo a 15% das cepas iniciais e a 52% daquelas selecionadas inicialmente (seleção primária).

A cepa melhor produtora, identificada como *Colletotrichum gloesporioides* produziu 27.700 U/L de lipase extracelular ativa em pH alcalino, em fermentação submersa em frascos agitados, no meio de cultura que continha óleo de oliva e peptona bacteriológica.

A produção da lipase pelo *Colletotrichum gloesporioides* foi estudada, a seguir, detalhadamente. Inicialmente, em estudos qualitativos, foi confirmado que o fungo produziu pouca lipase nos meios de cultura sem óleo de oliva e que a produção da enzima foi estimulada pela presença da peptona no meio de cultura. Foi verificado, também, maior produção nos meios com pH inicial na faixa pouca ácida e mesmo

alcalina, não tendo sido percebida diferença significativa entre os inóculos preparados com suspensão de esporos e biomassa (vegetativo).

Em estudos de natureza quantitativa foi verificado que o óleo de oliva, a peptona e o pH foram as variáveis controláveis importantes para a produção da lipase extracelular ativa em pH alcalino pela cepa fúngica testada.

Finalmente, os estudos de otimização das condições experimentais, isto é, a otimização do meio de cultura para a obtenção de produção máxima da enzima, levaram à elaboração da equação ajustada que explicou a variação da produção da lipase em função da variação simultânea das concentrações da peptona (faixa de 10,0 a 30,0 g/L), do óleo de oliva (faixa de 4,0 a 16,0 mL/L), e do pH (faixa de 6,0 a 7,0):  $Y = 27,2 - 3,41x_1 - 4,1x_2 + 0,7x_3 - 1,8x_1x_2 + 0,6x_1x_3 + 0,7x_2x_3 - 2,1x_1x_2x_3$ . Verificou-se que o pH do meio de cultura e as interações entre os fatores não foram significativos, pouco influenciando a produção de lipase nas faixas estudadas, sendo, então, a equação simplificada para  $Y = 27,2 - 3,41x_1 - 4,1x_2$ .

Concluiu-se que, com este modelo, o aumento significativo da produção da lipase extracelular, ativa em pH alcalino, pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*, em cultivo submerso em frascos agitados, pôde ser conseguido fazendo-se a diminuição conjunta do óleo de oliva e da peptona bacteriológica, em relação à formulação basal inicial (10,0 mL/L e 20,0 g/L, respectivamente). Conseguiu-se alcançar com a concentração de 10,0 g/L de peptona e com 4,0 mL/L de óleo de oliva a produção de 35.800 U/L de lipase extracelular, ativa em pH alcalino, correspondendo a um aumento de 29,2% em relação à produção nas condições iniciais do estudo. Em conclusão, essas concentrações da peptona e do óleo de oliva foram consideradas como bastante próximas das condições experimentais ótimas para a produção da lipase.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBACK, T.; REESLEV, M.; JENSEN, B.; ERIKSEN, S.H. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 30, p.410-415, 2002.
- ACUNA-ARGUELES, M.E.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.43, p. 808-814, 1995.
- AKTAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; CHUGHAI, M.I.D. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.40, p.257-263, 1980.
- AKTAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; NAWAZISH, M.N.; CHUGHAI, M.I.D.. Effect of triglycerides on the production of lipids and lipase by *Mucor hiemalis*. *Can. J. Microbiol.*, v.29, p. 664-669, 1983.
- ALFORD, J.A.; STEINLE, E.E. Improved plating method for the determination of microbial lipolysis. *Bacteriol. Proc.*, v. 66, p. 14-19, 1966.
- ARCHER, D.B.; WOOD, D.A. Fungal exoenzymes .In: GROW, N.A.R. and GADD, G.M. (Eds.). *The growing fungus*. London: Chapman & Hall. 1995. p. 137-162.
- ARCOS, J.A.; OTERO, C. Enzyme, medium and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoyl glycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 673-682, 1996.
- ARIMA, K.; LIU, W.H.; BEPPU, T. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. *Agri. Biol. Chem.*, v.36, p.1913-1917, 1972.
- ASTHER, M.; CORRIEU, G. Effect of tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v.9, p. 245-249, 1987.
- AXTER, A.P.; Van Der WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophilatica*, v. 17, p. 15-18, 1985.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299 p.
- ERNSTEIN, B.; ZEHR, E.I.; DEAM, R.A.; SHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple and other hosts. *Plant Dis.*, v. 79, p. 478-482, 1995.

- BERTO, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Production and purification of a novel extracellular lipase from *Alternaria brassicicola*. *Biotechnol. Lett.*, v. 19, p. 533-536, 1997.
- BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 26, p. 73-81, 2002.
- BORNSCHEUER, U.T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.*, v. 20, p. 433- 437, 2002.
- BORNSCHEUER, U.T; POHL, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Cur. Opinion Chem. Biol.*, v. 5, p. 137-143, 2001.
- BOX, G.E.P. The exploration and exploitation of response surfaces: some considerations and examples. *Biometrics*, v. 10, p. 16-60, 1954.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley, 1978. 320 p.
- BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc., Ser. B*, v. 13, p. 1-38, 1951.
- BOX, G.E.P.; YOULE, P.V. The exploration and exploitation of response surfaces: an example of the link between the fitted surface and the basic mechanism of the system. *Biometrics*, v. 11, p. 287-323, 1955.
- BREUIL, C.; KUSHNER, D.J. Lipase and esterase formation by psychrophilic and mesophilic *Acinetobacter* species. *Can. J. Microbiol.*, v. 21, p. 423-433, 1975.
- BROCKMAN, H.;MONSEN, W.E.;TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes and effects on lipase binding to surfaces. *J. Am. Oil. Chem.*, v.65, p.891-896, 1988.
- BRUNK, S.D.; SWANSON, J.R. Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. *Clin. Chem.*, v.27, p.924-926, 1981.
- BU<sup>Y</sup>LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Basic Biotechnology*. London:Academic Press, 1987. 561 p.
- BRUSHAN, B.;DOSANJH, N.S.; KUMAR, K.;HOONDAL, G.S. Lipase production from an alkalophilic yeast species by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.*, v.16,p.841-842,1994.
- CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.;SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic

- activity in reactions in organic media. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 28, p.145-154, 2001.
- CARLILE, M.;J.; WATKINSON, S.C. *The fungi*. London: Academic Press, 1997. 460 p.
- CARVALHO, F.M.S.; LEITE Jr., R.P.; VENO, B. Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. *Fitopatol. Bras.*, v. 25, p. 72-78, 2000.
- CERNIA, E.; PALOCCI, C. Lipases in supercritical fluids. *Methods Enzymol.*, v. 296 (B), p. 495-508, 1997.
- CHANDER, H.; KLOSTERMEYER, H. Production of lipase by *Fusarium solani* under various growth conditions. *Sciences Des Aliments*, v.3, p. 279-285, 1983.
- CHEN, J.; SHIMURA, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Lipase production by *Trichosporum fermentans* WU-C12, a newly isolated yeast. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 73, p. 412-414, 1992.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; TZALAS, B.; MAMMA, D.; STAMATIS, H.; LIADAKIS, G.N.; TZIA, C.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; MACRIS, B.J. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reactions in organic solvents. *Process Biochem.*, v. 33, p. 729-733, 1998.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,v.38, p.194-197,1992.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E.; Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 193-197, 2004.
- COONEY, C.L. Growth of microorganisms.In: Rehm H.j.; Reed, G.,(Editors). *Microbial Fundamentals* Weinheim: Verlag Chemie, v.1, p.73-112, 1981.(Collection Biotechnology, 4v.)
- DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 21, p. 29-42, 1997.
- DALBOGE, H; LANGE, L. Using molecular techniques to identify new microbial biocatalysts. *Trends Biotechnol.*, v. 16, p. 265-272, 1998.
- DANIEL, W.W. Biostatistics: a foundation for analysis in the health science. New York: John Wiley. 1999.
- DE LABORDE DE MONPEZAT,T.; DE JESO, B.; BUTOUR, J.L.; CHAVANT, L.; SANCHOLLE,M. A fluorimetric method for measuring lipase activity based on umbelliferyl esters. *Lipids*, v. 25, p. 661-664, 1990.

- DEMAIN, A.L. Cellular and environmental factors affecting synthesis and excretion of metabolites. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* v. 22, p. 345-362, 1972.
- DESNUELLE, P.; CONSTANTIN, M.J.; BALDY, J. Potentiometric technique for measuring the activity of pancreatic lipase. *Bul.Soc.Chim.Biol.*, v. 37, p. 285-290, 1955.
- DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M.A.; RÚA, M.L.; SANROMAN, M.A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, v.26, p. 95-99, 2005.
- DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalysts for food processes. *Food Technol.*, v. 45, p. 78-85, 1991.
- EGLI, T.; ZIN, M. The concept of multiple nutrient limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, p. 35-43, 2003.
- EITENMILLER, R.R.; VAKIL, J.R.; SHAHANI, K.M. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sc.*, v. 35, p. 130-133, 1970.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, v. 36, p. 219-223, 2000.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Bioch.*, v. 36, p. 325-329, 2001.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, v. 38, p. 367-372, 2002.
- ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, v. 39, p. 525-528, 2004.
- ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnol. Lett.*, v. 12, p. 209-214, 1990.
- FAITH, W.T.; NEUBECK, C.E.; REESE, E.T. Production and applications of enzymes. *Adv. Biochem. Eng.*, v. 1, p. 77-111, 1971.
- FOX, P.F.; STEPANIAK, L. Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT 36. *J. Dairy Res.*, v.50, p. 77-89, 1983.
- FREYER, T.F.; LAWRENCE, R.C.; REITER, B. Methods for isolation and enumeration of lipolytic organisms. *J. Dairy Sci.*, v. 50, p. 477-484, 1967.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 42, p. 405-416, 2001.

- GADEN, Jr. E.L. Global biotechnology: prospects and problems. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 15, p. 9-21, 1985.
- GAO, Y.; BREUIL G. Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiosma piceae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 11, p. 638-642, 1995.
- GARGOURI, Y.;PIÉRON, G.;RIVIÈRE, C.; SAUNIÈRE, J.F.; LOWE, P.A.; SARDA, L.; VERGER, R. Kinetic assay of human gastric lipase on short and long chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterol.*, v. 91, p. 919-925, 1986.
- GLANTS, S. A. Primer of biostatistics. New York: McGraw-Hill. 1997.
- GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KOWALSKA, T.K. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R. 59. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 31, p. 177-182, 2004.
- GOLDSTEIN, W.E. Enzymes as bulk products. In: BU'LOCK J. and KRISTIANSEN, B. (Eds.). Basic Biotechnology. London: Academic Press, 1987. p. 385-405.
- GONZALEZ, G.W.; TORRES, E.F.; AGUILAR, C.N.; GOMEZ, S. J. R.; GODINEZ, G.D.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.*, 13, p. 157-167, 2003.
- GORDILO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFOENTE, J.; SOLA, C. Stability studies and effect on the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 43, p. 38-41, 1995.
- GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPS, J.D.; MUIR,D.D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 50, p. 289-303, 1981.
- GRIMM, L.H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D.C. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 69, p. 375-384, 2005.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, W.S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochem.*, v. 35, p. 459-464, 1999.
- GUNNEL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, v. 84, p. 147-156, 1992.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p. 763-781, 2004.
- HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.*, v. 50, p. 163-173, 1972.

- HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnol.*, v. 11, p. 159-167, 1991.
- HAFKENSCHIED, J.C.M.; HESSELS, M.;VAN DER HOEK, E.W. Determination of  $\alpha$  amylase, trypsin and lipase in duodenal fluid:comparison of methods. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, v. 21, p. 167-174, 1983.
- HANDELSMAN, J.; WACKETT, L. Ecology and industrial microbiology. Microbial diversity- sustaining the earth and industry. *Cur. Opinion Microbiol.*, v. 5, p. 237-239, 2002.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRSOP, B.E. *Living resources for biotechnology*. Filamentous fungi. Cambridge: University Press. 1988. 209 p.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Letters*, v. 10, p. 637-642, 1988.
- HEMACHANDER, C.; BOSE, N.; PUVANAKRISHNAN, R. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem.*, v. 36, 629-633, 2001.
- HENDRICKSON, H.S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases and other lipolytic enzymes. *Anal.Biochem.*, v. 219, p. 1-8, 1994.
- HILLS, M.J.; MURPHY, D.J. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucid acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledones. *Biochem. J.*, v. 249, p. 687-693, 1988.
- HÖFELMANN, M.; HARTMAN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Isolation, purification and characterization of a lipase from technical *Aspergillus niger* enzyme. *J. Food Sci.* , v. 50, p. 1721-1731, 1985.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 64, p. 175-186, 2004.
- HOPPE, A.;THEIMER, R.R. Titrimetric test for lipase activity using triolein emulsions. *Phytochemistry*, v. 42, p. 973-978, 1995.
- HOU, C. T.; JOHNSTON, T.M. Screening of lipase activities with cultures from the Agricultural Research Service Culture Collection. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 69, p. 1088-1097, 1992.
- HRON, W.T.; MENAHAN, L.A. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *J. Lipid Res.*, v. 22, p. 377-381, 1981.
- IONITA, A.; MOSCOVICI, M.; POPA, C.; VAMANU,A.; POPA, O.; DINU, L. Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potencial and determination of some biochemical properties of microbial lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, v. 3, p.147-151, 1997.

- IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosc. Bioeng.*, v. 94, p. 530-535, 2002.
- JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32, p.256-261, 1989a.
- JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microbiol. Technol.* , v. 11, p. 90-95, 1989b.
- JAEGER, K. E.; KHARAZMI, A.; HOIBY N. Extracellular lipase of *P. aeruginosa*: biochemical characterization and effects on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb. Pathog.*, v. 10, p. 173-182, 1991.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. and MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol.Rev.*, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K.E.;REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* , v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAMES, J.; SIMPSON, B.K. Application of enzymes in food processing. *Crit. Rev. Food Sc. Nut.*, v. 36, p. 437-463, 1996.
- JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, vol. 18, p. 650-657, 1983.
- KAMINISHI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochem.*, v. 33, p. 505-511, 1998.
- KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Production and characterization of amylase from *Calvatia gigantea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 45, p. 935-941, 1983.
- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Cur. Opi. Biotechnol.*, v. 13, p. 345-351, 2002.
- KNAYSI, G. On the use of basic dyes for the demonstration of the hydrolysis of fat. *J. Bacteriol.*, v. 42, p. 587-589, 1941.
- KÖLLER, W. The plant cuticle. A barrier to be overcome by fungal plant pathogens. In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Eds.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press, 1991. p. 219-246.

- KOLOSSVÁRY, G.J. Optimization of lipase activity from *Rhizopus* sp in triglyceride hydrolysis using a modified simplex method. *Process Biochem.*, v. 31, p. 595-600, 1966.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWEL, V.R.; SOMMERS, H.M. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Toronto: J.B. LIPPINCOTT, 1997. 475 p.
- KOSUGI, Y.; SUZUKI, H.; FUNADA, T. Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 31, p. 349-356, 1988.
- KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 53, p. 211-213, 1987.
- LARGE, K.P.; MIRJALILI, N.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L.M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M.E.; LEADLAY, P.F.; ISON, A.P. Lipase activity in *Streptomyces*. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 25, p. 569-575, 1999.
- LARIOS, A.; GARCIA, H.S.; OLIART, R.M.; VALERIO-ALFARO, G. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 65, p. 373-376, 2004.
- LAWRENCE, R.C.; FRYER, T.F.; REITER, B. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*, v. 213, p. 1264-1265, 1967.
- LEE, B.; POMETTO III, A.L.; DEMIRCI A.; HINZ, P.N. Media evaluation for the production of microbial enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, p. 4775-4778, 1998.
- LEE, K.T.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K.S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractioned lard and restaurant grease. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 79, p. 191-195, 2002.
- LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. *Biochem. Eng. J.*, v. 19, p. 25-31, 2004.
- LI, C.Y.; CHEN, S.J.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter* lipase with repeated fed-batch culture. *Biochem. Eng. J.*, v. 25, p. 195-199, 2005.
- LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Deep agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. *J. Microbiol. Methods*, v. 14, p. 193-200, 1991.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Eds.). *Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, 593 p. (Coleção Biotecnologia industrial, 4 v.)
- LINFIELD, W.M.; SEROTA, S.; SIVIERI, L. Lipid – lipase interactions. 2. a new method for the assay of lipase activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 62, p. 1152-1154, 1985.



- LIPPI, U.; STEVANATO, G.; GUIDI, G. A rapid photometric method for serum lipase determination. *Clin. Chem. Acta*, v. 37, p. 199-202, 1972.
- LITTMAN, M.L. A culture medium for the primary isolation of fungi. *Science*, v. 106, p. 109-111, 1947.
- LOWRY, R.R.; TINSLEY, I.J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 53, p. 470-472, 1976.
- MACRIS, J.B.; KOURENTZI, E.; HATZINIKOLAOU, D.G. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, v. 31, p. 807-812, 1996.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GORHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Process Biochem.*, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MAIA, M.M.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS Jr., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA, F.J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Rev. Microbiol.*, v. 30, p. 304-309, 1999.
- MAKHSUMKHANOV, A.A.; YAKUBOV, I.T.; DAVRANOV, K. Conditions for cultivation of the fungus *Penicillium melinii* UzLM-4 and its biosynthesis of lipases. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 39, p. 40-43, 2003.
- MALISZEWSKA, I.; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 14, p. 190-193, 1992.
- MALLETE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. *Methods Microbiol.*, v. 1, p. 521-566, 1969.
- MAREK, A.; BEDNARSKI, W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.*, v. 18, p. 1155-1160, 1996.
- MARGOLIN, A.L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 15, p. 266-280, 1993.
- MARGOLIN, A.L.; KLIBANOV, A.M. Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 109, p. 3802-3804, 1987.
- MARTINEZ, C.; DE GEUS, P.; LAUWEREYS, M.; MATTHYSSENS, G.; CABBILLAU, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, v. 356, p. 616-618, 1992.
- MARTINEZ, C.; NICOLAS, A.; VAN TILBEURGH, H.; EGLOFF, M.P.; CUDREY, C.; VERGER, R.; CABBILLAU, C. Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry*, v. 33, p. 83-89, 1994.

- MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopath.*, v. 34, p. 367-386, 1996.
- MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 68, p. 927-931, 1988.
- MITSUDA, S.; UMEMURA, T.; HIROHARA, H. Preparation of an optically pure secondary alcohol of synthetic pyrethroids using microbial lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, p. 310-315, 1988.
- MOZAFFAR, Z.; WEETE, J.D. Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Lipids*, v. 28, p. 377-382, 1993.
- MOZAFFAR, Z.; WEETE, J.D. Invert emulsion as a medium for fungal lipase activity. *LAOCS*, v. 72, p. 1361-1366, 1995.
- NAESSENS, M.; VANDAMME, E.J. Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnol. Lett.*, v. 25, p. 715-721, 2002.
- NAHAS, E. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.*, v. 134, p. 227-233, 1988.
- NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Effect of solvent on lipase-catalysed transesterification in organic media. *Tetrahed. Lett.*, v. 50, p. 4681-4690, 1994.
- NAKAYAMA, K. Sources of industrial microorganisms. In: Rehm, H.J.; Reed, G., (Eds.). *Microbial fundamentals*. Weinheim: Verlag Chemie, v. 1, p. 147-151, 1981(Colection Biotechnology, 4v.)
- NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technol.*, v. 45, p. 88-91, 1991.
- NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Lipase-catalysed production of biodiesel. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 73, p. 1191-1195, 1996.
- NESBIT, E.A.; GUNASEKARAN, M. Influence of cultural conditions on growth and lipolytic activity in *Nocardia asteroides*. *Folia Microbiol.*, v. 38, p. 451-455, 1993.
- NICOLAS, A.; EGMOND, M.; VERRIPS, C.T.; VIEG, J.; LONGHI, S.; CABBILLAU, C.; MARTINEZ, C. Contribution of cutinase serine 42 side chain to the stabilization of the oxyanion transition state. *Biochemistry*, v. 35, p. 398-410, 1996.
- OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLA, C.; Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnol. Lett.*, v. 15, p. 357-360, 1993.

- OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends Biotechnol.*, v. 17, p. 13-21, 1999.
- OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 13, p. 1-9, 2002.
- OKEKE, C.N.; OKOLO, B.N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnol. Letters*, v. 12, p. 747-750, 1990.
- OLIVEIRA, D.T.M. *Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais*. Belo horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2000. 149 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências dos Alimentos)
- OLSON, G.R.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.*, v. 176, p. 1-6, 1994.
- OMAR, I.C.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agr. Biol. Chem.*, v. 51, p. 2145-2151, 1987.
- OTERHOLM, A.; ORDAL, Z. J. Improved method for detection of microbial lipolysis. *J. Dairy Sci.*, v. 49, p. 1281-1284, 1965.
- PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B.S. Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 67, p. 160-169, 2005.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.*, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glycoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochem.*, v. 37, p. 1271-1278, 2002.
- PAPAPASKEVAS, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.*, v. 14, p. 397-402, 1992.
- PAREKH, S.; VINCI, V.A.; STROBEL, R.J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 54, p. 287-301, 2000.
- PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 9, p. 163-171, 1989.
- PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enz. Microbiol Technol.* v. 31, p. 804-826, 2002.
- PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R. KILARA, A. Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipid reverse micellar media. *J. Food Sci.*, v. 61, p. 33-38, 1996.

- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 31, p. 833-841, 2002.
- PETERS, I.I.; NELSON, F.E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.*, v. 55, p. 581-591, 1948.
- PETROVIC, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial lipases biosynthesis. *Biotechnol. Lett.*, v. 12, p. 299-304, 1990.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochem.*, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, v. 27, p. 287-294, 2006.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Fitopatologia. In: PUTZKE J. & PUTZKE, M.T.L. (Eds.). *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. v. I, p. 489-546.
- RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 17, p. 832-838, 1995.
- RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 14, p. 938-943, 1992.
- RATHI, P.; GOSWAMI, V.K.; SAHAL, V.; GUPTA, R.; Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *J. Appl. Microbiol.*, v. 93, p. 930-936, 2002.
- RIBET, A.; BALAS, D.; BOMMELAER, G.; PRADAYROL, L.; VARIGNON, M. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, v. 3, p. 515-520, 1979.
- ROBERTS, S.M.; TURNER, N.J.; WILLETS, A.J.; TURNER, M.K. *Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 195 p.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Casa do Pão Editora. 2005. 326 p.
- ROLLOF, J.; BRACONIER, J.H.; SÖDERSTRÖM, C.; NILSSON-EHLE, P. Interference of *S. aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur.J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 7, p. 505-510, 1988.
- RUIZ-TERAN, F.; OWENS, J.D. Chemical and enzymic changes during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. *J. Sci. Food Agric.*, v. 71, p. 523-530, 1996.

- SALLEH,A.B.; MUSANI,R.;BASRI, M.;AMPON, K.; YUNUS, W.M.Z.; RAZAK,C.N.A. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.*, v. 39, p. 978-981, 1993.
- SAMAD, M.Y.A.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B.; YUNUS, W.M.Z.W.; AMPON, K.; BASRI.M. A plate assay for primary screening of lipase activity. *J. Microbiol. Meth.*, v. 9, p.51-56, 1989.
- SANT'ANNA Jr., G.L. Produção de Enzimas Microbianas. In: BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Eds.). *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Ed. Edgar Blücher, 2001. p. 351-362.
- SANT'ANNA Jr., G.L.; FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BOM, E.P.S. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Rev. Microbiol.*, v. 28, p. 6-12, 1997.
- SAVITA, J.; RATLEDGE, C. Na inducible, intracellular alkalophilic lipase in *Aspergillus flavipes* grown on triacylglycerols. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 8, p. 129-131, 1992.
- SCHMIDT, F.R. Optimization and scale-up of industrial fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , v. 68, p. 425-435, 2005.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MACRAE, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *J. Microbiol. Methods*, v. 6, p. 127-137, 1987.
- SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. *J. Ferment. Bioeng.*, v. 74, p. 77-80, 1992.
- SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; TSUNASAWA, S. Purification and characterization of a novel solvent-tolerante lipase from *Fusarium heterosporium*. *J.Ferment. Bioeng.*,v. 75, p. 349-352, 1993.
- SHIMIZU, S.; OGAWA, J.; KATAOKA, M.; KOBAYASHI, M. Screening of novel microbial enzymes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 58, p. 45-87, 1997.
- SILVA, W.O.B.; MITIDIERI, S.; SCHANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.*, v. 40, p. 321-326, 2005.

- SILVESTRE, M.P.C.; HAMON, M.; YVON, M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2783-2789, 1994.
- SMELTZER, M.S.; HART, M.E.; IANDOLO, J.L. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 58, p. 2815-2819, 1992.
- SMITH, J.L.; HASS, M.J. Lipolytic microorganisms. In: SPECK, M.L. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F.; APHA, 1992. p. 183-191.
- SMITH, L.J. On the simultaneous staining of neutral fat and fatty acids by oxazine dyes. *J. Path. Bacteriol.*, v. 12, p. 1-4, 1907.
- SPARRINGA, R.A.; OWENS, J.D. Causes of alkalinization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 25, p. 677-681, 1999.
- STCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SHIMID, R. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1168, p. 181-189, 1993.
- STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.*, v. 53, p. 481-505, 1986.
- STEELE, D.B.; STOWERS, M.D. Techniques for selection of industrially important microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 45, p. 89-106, 1991.
- STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U. Purification of extracelular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, v. 168, p. 1070-1074, 1986.
- SZTAJER, H.; MALISWESKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnol. Lett.*, v. 11, p. 895-898, 1989.
- SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 10, p. 492-497, 1988.
- SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplissimum*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1124, p. 253-261, 1992.
- TAIPA, M.A.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of lipases. *J. Biotechnol.*, v. 26, p. 111-142, 1992.
- TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. *Process Biochem.*, v. 39, p. 459-465, 2003.

- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochem.*, v. 49, p. 1495-1502, 2004.
- THOMSON, C.A.; DELAQUIS P.J.; MAZZA, G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, v. 39, p. 165-187, 1999.
- THORPE, J.F. A reaction of certain colouring matters of the oxazine series. *J. Chem. Soc. Trans.*, v. 91, p. 324-336, 1907.
- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKAMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link. *Agri. Biol. Chem.*, v. 37, p. 837-842, 1973.
- TURNER, R.H. The action of bacteria on fat. 1. Relative merits of various differential plating media for lipase-producing organisms. *J. Infect. Dis.*, v. 44, p. 126-134, 1929.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: APHA, 1992. 1219 p.
- VARGAS, V.A.; DELGADO, O.D.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnol. Letters*, v. 26, p. 1565-1568, 2004.
- VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. *Foodborn pathogens: an illustrated text*. London: Wolfe, 1991. 557 p.
- VEEARARAGAVAN, K.; COLPIST, T.; GIBBS, B.F. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1044, p. 26-33, 1990.
- VERGER, R. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, v. 15, p. 32-38, 1997.
- VOGEL, H.J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Amer. Nat.*, v. 98, p. 435-446, 1964.
- VULFSON, E.N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 4, p. 209-215, 1993.
- WALTON, J.D. Deconstructing the cell wall. *Plant Phys.*, v. 104, p. 1113-1118, 1994.
- WASSERMAN, B. Evolution of enzyme technology: progress and prospects. *Food Technol.*, v. 44, p. 118, 1990.
- WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, v. 41, p. 1353-1358, 1977.
- WELSH, F.W.; WILLIAMS, R.E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. *J. Food Sci.*, v. 54, p. 1565-1568, 1989.

- WHITAKER, J.R. New and future uses of enzyme in food processing. *Food Biotechnol.*, v. 4, p. 669-697, 1990.
- YAMADA H.; SHIMIZU, S. Microbial and enzymatic processes for the production of biologically and chemically useful compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 27, p. 622-642, 1988.
- YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. Purification and some properties of a castor-oil hydrolysing lipase from *Pseudomonas sp.* *Agric.Biol.Chem.*, v. 52, p. 3015-3021, 1988.
- YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. *Appl. Microbiol.*, v. 16, p. 845-847, 1968.
- .



## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A: MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.5.**

**DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS**

Repetição (r)	Tratamentos (óleo:peptona)								
	1(1:1)	2(1:2)	3(1:5)	4(2:1)	5(2:2)	6(2:5)	7(3:1)	8(3:2)	9(3:5)
1	19,67	24,67	28,67	25,00	32,17	21,67	21,83	27,50	23,67
2	24,33	26,67	29,17	29,67	29,33	25,50	21,50	24,33	15,33
Total	44,00	51,34	57,84	54,67	61,50	47,17	43,33	51,83	39,00
Média	22,00	25,67	28,92	27,33	30,75	23,58	21,67	25,92	19,50

**GRAUS DE LIBERDADE**

Tratamentos (k) = k - 1 = 9 - 1 = 8

Total (k.r) - 1 = (9.2) - 1 = 17

Resíduo (Total - Trat.) = 17 - 8 = 9

**SOMAS DE QUADRADOS**

$SQG = \sum X^2 - C = 290,1689$

$SQTrat. = \sum T^2/r - C = 215,0588$

$C = G^2/N$

$G = \sum X$  e  $N = k.r$

$\sum X^2 = 11574,1946$

$C = (\sum X)^2/N = 11284,0257$

$\sum T^2/r = 11499,0834$

$SQR = SQG - SQTrat. = 75,1112$

**QUADRO ANOVA**

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	9	215,0588	26,8822	3,221	3,230	5,467	0,0504
Resíduo	8	75,1112	8,3457				
Total	17	290,1689					

**CONCLUSÃO**

Fcalc. é menor do que Ftab a 5%. Logo, não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos.

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$   
 $q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 9; 9) = 5,60$

DMS (5%) =  $5,60 \cdot \sqrt{(8,3457/2)} = 11,44$

A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS.

Trat.	Média	T5	T3	T4	T8	T2	T6	T1	T7	Discrim.
T5	30,75	-	-	-	-	-	-	-	-	x
T3	28,92	1,83	-	-	-	-	-	-	-	X
T4	27,34	3,42	1,59	-	-	-	-	-	-	x
T8	25,92	4,84	3,01	1,42	-	-	-	-	-	x
T2	25,67	5,08	3,25	1,67	0,24	-	-	-	-	x
T6	23,59	7,17	5,34	3,75	2,33	2,09	-	-	-	x
T1	22,00	8,75	6,92	5,34	3,92	3,67	1,59	-	-	x
T7	21,67	9,09	7,26	5,67	4,25	4,01	1,92	0,34	-	x
T9	19,50	11,25	9,42	7,84	6,42	6,17	4,09	2,50	2,17	x

## APÊNDICE B: MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.6.

### DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS

Repetição (r)	1 pH 5	2 pH 5,5	3 pH 6	4 pH 6,5	5 pH 7	6 pH 7,5	7 pH 8
1	18,3	11,2	17,3	17,7	19,7	41,3	34,0
2	17,0	17,2	23,2	25,3	26,0	32,7	34,2
Total	35,3	28,4	40,5	43,0	45,7	74,0	68,2
Média	17,6	14,2	20,2	21,5	22,8	37,0	34,1

### GRAUS DE LIBERDADE

$$\text{Tratamentos (k)} = k - 1 = 7 - 1 = 6$$

$$\text{Total (k.r) - 1} = (7.2) - 1 = 13$$

$$\text{Resíduo (Total - Trat.)} = 13 - 6 = 7$$

### SOMAS DE QUADRADOS

$$\text{SQG} = \sum X^2 - C = 979,9321$$

$$\text{SQTrat.} = \sum T^2/r - C = 857,9571$$

$$C = G^2/N \quad G = \sum X \text{ e } N = k.r$$

$$\sum X^2 = 9000,79 \quad C = (\sum X)^2/N = 8020,8579$$

$$\sum T^2/r = 8878,815$$

$$\text{SQR} = \text{SQG} - \text{SQTrat.} = 121,9750$$

### QUADRO ANOVA

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	6	857,9571	142,9929	8,206	3,866	7,191	0,00687
Resíduo	7	121,9750	17,4250				
Total	13	979,9321					

### CONCLUSÃO

Fcalc. é maior do que Ftab. a 1%. Logo, pelo menos uma média é diferente das demais a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 7; 7) = 5,59$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,59 \cdot \sqrt{(17,4250/2)} = 16,50$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>	<i>T5</i>	<i>T4</i>	<i>T3</i>	<i>T1</i>	<i>discrim.</i>
T6	37,00	-	-	-	-	-	-	x
T7	34,10	2,90	-	-	-	-	-	xy
T5	22,85	14,15	11,25	-	-	-	-	xyz
T4	21,50	15,50	12,60	1,35	-	-	-	xyz
T3	20,25	<b>16,75</b>	13,85	2,60	1,25	-	-	yz
T1	17,65	<b>19,35</b>	16,45	5,20	3,85	2,60	-	yz
T2	14,20	<b>22,80</b>	<b>19,90</b>	8,65	7,30	6,05	3,45	z

## APÊNDICE C- MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.7.

### DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS

Repetição (r)	1 caseína	2 carne	3 gelatina	4 Bac. A	5 Bac. B
1	20,2	21,5	14,5	25,0	14,7
2	15,0	26,3	11,7	28,7	16,5
Total	35,2	47,8	26,2	53,7	31,2
Média	17,60	23,90	13,10	26,85	15,60

### GRAUS DE LIBERDADE

$$\text{Tratamentos (k)} = k - 1 = 5 - 1 = 4$$

$$\text{Total (k.r)} - 1 = (5.2) - 1 = 9$$

$$\text{Resíduo (Total - Trat.)} = 9 - 4 = 5$$

### SOMAS DE QUADRADOS

$$\text{SQG} = \sum X^2 - C = 303,669$$

$$\text{SQTrat.} = \sum T^2/r - C = 266,244$$

$$C = G^2/N$$

$$G = \sum X \text{ e } N = k.r$$

$$\sum X^2 = 4071,15 \quad C = (\sum X)^2/N = 3767,481$$

$$\sum T^2/r = 4033,725$$

$$\text{SQR} = \text{SQG} - \text{SQTrat.} = 37,425$$

### QUADRO ANOVA

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	4	266,2440	66,5610	8,893	5,192	11,392	0,01701
Resíduo	5	37,4250	7,4850				
Total	9	303,6690					

### CONCLUSÃO

Fcalc. é maior do que Ftab. a 5%. Logo, pelo menos uma média é diferente das demais a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 5; 5) = 5,64$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,64 \cdot \sqrt{(7,4850/2)} = 10,91$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T4</i>	<i>T2</i>	<i>T1</i>	<i>T5</i>	<i>discrim.</i>
T4	26,85	-	-	-	-	x
T2	23,90	2,95	-	-	-	xy
T1	17,60	9,25	6,30	-	-	xy
T5	15,60	<b>11,25</b>	8,30	2,00	-	y
T3	13,1	13,75	10,8	4,5	2,5	y

## APÊNDICE D- MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.9

### DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS

Repetição (r)	1 oliva	2 arroz	3 milho	4 soja	5 girassol	6 canola
1	26,5	14,5	24,5	13,0	25,0	24,3
2	24,0	13,5	25,0	20,0	23,3	26,0
Total	35,2	47,8	26,2		53,7	31,2
Média	17,60	23,90	13,10		26,85	15,60

### GRAUS DE LIBERDADE

$$\text{Tratamentos (k)} = k - 1 = 6 - 1 = 5$$

$$\text{Total (k.r)} - 1 = (6.2) - 1 = 11$$

$$\text{Resíduo (Total - Trat.)} = 11 - 5 = 6$$

### SOMAS DE QUADRADOS

$$\text{SQG} = \sum X^2 - C = 283,3667$$

$$\text{SQTrat.} = \sum T^2/r - C = 252,2267$$

$$C = G^2/N$$

$$G = \sum X \text{ e } N = k.r$$

$$\sum X^2 = 5899,3800$$

$$C = (\sum X)^2/N = 5616,0133$$

$$\sum T^2/r = 5868,2400$$

$$\text{SQR} = \text{SQG} - \text{SQTrat.} = 31,1400$$

### QUADRO ANOVA

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	5	252,2267	50,4453	9,720	4,387	8,746	0,00766
Resíduo	6	31,1400	5,190				
Total	11	283,3667					

### CONCLUSÃO

Fcalc. é maior do que Ftab. a 1%. Logo, pelo menos uma média é diferente das demais a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).



## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 6; 6) = 5,63$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,63 \cdot \sqrt{(5,190/2)} = 9,085$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T1</i>	<i>T6</i>	<i>T3</i>	<i>T5</i>	<i>T4</i>	<i>discrim.</i>
T1	25,25	-	-	-	-	-	x
T6	25,15	0,10	-	-	-	-	x
T3	24,75	0,50	0,40	-	-	-	x
T5	24,15	1,10	1,00	0,60	-	-	x
T4	16,50	8,75	8,65	8,25	7,65	-	xy
T2	14,00	<b>11,25</b>	<b>11,15</b>	<b>10,75</b>	<b>10,15</b>	2,50	y

## APÊNDICE E- MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.10

### DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS

Repetição (r)	1	2	3	4
	0,2%	1,0%	1,5%	3,0%
1	10,7	27,2	33,5	20,3
2	5,6	31,9	33,2	11,3
Total	16,3	59,1	66,7	31,6
Média	8,15	29,55	33,35	15,80

### GRAUS DE LIBERDADE

$$\text{Tratamentos (k)} = k - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$\text{Total (k.r)} - 1 = (4.2) - 1 = 7$$

$$\text{Resíduo (Total - Trat.)} = 7 - 3 = 4$$

### SOMAS DE QUADRADOS

$$\text{SQG} = \sum X^2 - C = 896,1088$$

$$\text{SQTrat.} = \sum T^2/r - C = 831,5138$$

$$C = G^2/N$$

$$G = \sum X \text{ e } N = k.r$$

$$\sum X^2 = 4667,5700$$

$$C = (\sum X)^2/N = 3771,4613$$

$$\sum T^2/r = 4602,9750$$

$$\text{SQR} = \text{SQG} - \text{SQTrat.} = 64,5950$$

### QUADRO ANOVA

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	3	831,5138	277,1713	17,164	6,591	16,694	0,00951
Resíduo	4	64,5950	16,14875				
Total	7	896,1088					

### CONCLUSÃO

Fcalc. é maior do que Ftab. a 1%. Logo, pelo menos uma média é diferente a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 4; 4) = 5,76$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,76 \cdot \sqrt{(16,1488/2)} = 16,37$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T3</i>	<i>T2</i>	<i>T4</i>	<i>discrim.</i>
T3	33,35	-	-	-	x
T2	29,55	3,80	-	-	xy
T4	15,80	<b>17,55</b>	13,75	-	yz
T1	8,15	<b>25,20</b>	<b>21,40</b>	7,65	z

**APÊNDICE F- MEMÓRIA DE CÁLCULO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA DADOS DA TABELA II.11.**

**A- ESPOROS / MASSA SECA (BIOMASSA)**

**DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS**

Repetição (r)	1 24 h	2 48 h	3 72 h	4 96 h
1	10,0	14,4	12,6	7,6
2	8,3	15,4	12,3	8,6
Total	18,30	29,80	24,90	16,20
Média	9,15	14,90	12,45	8,10

**GRAUS DE LIBERDADE**

Tratamentos (k) = k - 1 = 4 - 1 = 3

Total (k.r) - 1 = (4.2) - 1 = 7

Resíduo (Total - Trat.) = 7 - 3 = 4

**SOMAS DE QUADRADOS**

$SQG = \sum X^2 - C = 60,60$

$SQTrat. = \sum T^2/r - C = 58,11$

$C = G^2/N$

$G = \sum X$  e  $N = k.r$

$\sum X^2 = 1055,18$

$C = (\sum X)^2/N = 994,58$

$\sum T^2/r = 1052,69$

$SQR = SQG - SQTrat. = 2,49$

**QUADRO ANOVA (ESPOROS / MASSA SECA)**

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	3	58,11	19,3700	31,116	6,591	16,694	0,00312
Resíduo	4	2,49	0,6225				
Total	7	60,60					

**CONCLUSÃO**

Fcalc. é maior do que Ftab. a 1%. Logo, pelo menos uma média é diferente das demais a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 4; 4) = 5,76$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,76 \cdot \sqrt{(16,1488/2)} = 16,37$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T1</i>	<i>discrim.</i>
T2	14,90	-	-	-	x
T3	12,45	2,45	-	-	x
T1	9,15	<b>5,75</b>	<b>3,30</b>	-	y
T4	8,10	<b>6,80</b>	<b>4,35</b>	1,05	y

## B- ESPOROS / ATIVIDADE LIPÁSICA (U/mL)

### DELINEAMENTO: EXPERIMENTOS INTEIRAMENTE CASUALIZADOS

Repetição (r)	1 24 h	2 48 h	3 72 h	4 96 h
1	3,6	17,5	24,5	25,2
2	1,7	20,0	26,9	23,4
Total	5,30	37,50	51,40	48,60
Média	2,65	18,75	25,70	24,30

### GRAUS DE LIBERDADE

$$\text{Tratamentos (k)} = k - 1 = 4 - 1 = 3$$

$$\text{Total (k.r)} - 1 = (4.2) - 1 = 7$$

$$\text{Resíduo (Total - Trat.)} = 7 - 3 = 4$$

### SOMAS DE QUADRADOS

$$\text{SQG} = \sum X^2 - C = 679,58$$

$$\text{SQTrat.} = \sum T^2/r - C = 670,15$$

$$C = G^2/N$$

$$G = \sum X \text{ e } N = k.r$$

$$\sum X^2 = 3228,56$$

$$C = (\sum X)^2/N = 2548,98$$

$$\sum T^2/r = 3219,13$$

$$\text{SQR} = \text{SQG} - \text{SQTrat.} = 9,43$$

### QUADRO ANOVA (ESPOROS / ATIVIDADE LIPÁSICA)

Fator de variação	g.l.	SQ	QM.	Fcalc.	F5%	F1%	Valor p
Tratamento	3	670,15	223,3833	94,754	6,591	16,694	0,00036
Resíduo	4	9,43	2,3575				
Total	7	679,58					

### CONCLUSÃO

Fcalc. é maior do que Ftab. a 1%. Logo, pelo menos uma média é diferente das demais a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

## COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO TESTE DE TUKEY

DMS = Diferença Mínima Significativa =  $q \cdot \sqrt{(QMR/r)}$

$q(\alpha; k; g.l.R.)$ , portanto:  $q(0,05; 4; 4) = 5,76$

$q$  = coeficiente de confiabilidade

DMS (5%) =  $5,76 \cdot \sqrt{(2,3575/2)} = 6,25$

“A diferença entre duas médias é significativa quando é maior do que a DMS”

<i>Trat.</i>	<i>Média</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T2</i>	<i>discrim.</i>
T3	25,70	-	-	-	x
T4	24,30	1,40	-	-	xy
T2	18,75	<b>6,95</b>	5,55	-	y
T1	2,65	<b>23,05</b>	<b>21,65</b>	<b>16,10</b>	z

## APÊNDICE G- MÊMÓRIA DE CÁLCULO PARA DADOS DA TABELA II.19.

Análise de Variância (ANOVA) para o ajuste de um modelo linear com quatro parâmetros ( $n = 13$ ;  $p = 4$ ).

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de graus de liberdade (g.l.)	Média Quadrática (MQ)	F
Regressão (R)	$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1 = 3$	SQR / g.l.R	
Resíduos (r)	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p = 9$	SQr / g.l. r	MQR / MQR
Total	$\sum (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1 = 12$		

$$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 = 303,23$$

$\hat{y}_i$  = VALOR ESTIMADO PELA EQUAÇÃO AJUSTADA

$$\bar{y} = 26,46(\text{VALOR MÉDIO})$$

$$\hat{y}_1 = 35,6$$

$$\hat{y}_2 = 27,0$$

$$\hat{y}_3 = 25,4$$

$$\hat{y}_4 = 18,0$$

$$\hat{y}_5 = 30,2$$

$$\hat{y}_6 = 32,4$$

$$\hat{y}_7 = 31,2$$

$$\hat{y}_8 = 17,8$$

$$\sum (Y_i - Y_i)^2 = 2,96$$

$Y_i$  = VALOR REAL (EXPERIMENTAL)

$$(Y_1 - Y_1)^2 = 0,04$$

$$(Y_2 - Y_2)^2 = 0,09$$

$$(Y_3 - Y_3)^2 = 0,64$$

$$(Y_4 - Y_4)^2 = 0,49$$

$$(Y_5 - Y_5)^2 = 0,64$$

$$(Y_6 - Y_6)^2 = 0,81$$

$$(Y_7 - Y_7)^2 = 0,09$$

$$(Y_8 - Y_8)^2 = 0,16$$

$$\sum (Y_i - \bar{y})^2 = 306,19 = (35,8 - 26,46)^2 + (27,3 - 26,46)^2 + (26,2 - 26,46)^2 + (18,7 - 26,46)^2 + (31,0 - 26,46)^2 + (33,3 - 26,46)^2 + (31,5 - 26,46)^2 + (18,2 - 26,46)^2 = 306,19$$



## APÊNDICE H: DESCRIÇÃO “PASSO A PASSO” DOS “ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO -----“ DO CAPÍTULO II “

Para efetuar os cálculos dos efeitos, fez-se necessário elaborar uma tabela contendo os coeficientes de contraste. Para tanto, os sinais algébricos necessários foram obtidos multiplicando-se elemento a elemento das colunas da matriz de planejamento (X). O conjunto completo pode ser visto na Tabela IH.

**Tabela IH. Coeficientes de contraste para um fatorial 2<sup>3</sup>, segundo os dados da Tabela III.13, e os valores médios da produção de lipase, obtidos com os ensaios experimentais correspondentes.**

M	Efeitos e Interações							$\bar{y}$ * (U/mL)
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
+	-	-	-	+	+	+	-	35,8
+	+	-	-	-	-	+	+	27,3
+	-	+	-	-	+	-	+	26,2
+	+	+	-	+	-	-	-	18,7
+	-	-	+	+	-	-	+	31,0
+	+	-	+	-	+	-	-	33,3
+	-	+	+	-	-	+	-	31,5
+	+	+	+	+	+	+	+	18,2

\* rendimento médio por ensaio

O cálculo de cada efeito foi realizado pela diferença dos rendimentos médios do nível superior (+1) e do nível inferior (-1). Cada efeito, portanto, pode ser interpretado como sendo a diferença entre duas médias, cada uma das quais contendo metade das observações, isto é, Efeito =  $\bar{y}_+ - \bar{y}_-$ . O divisor é 8 para a média e quatro para cada um dos efeitos.

Logo:

$$\text{Efeito A} = (27,3 + 18,7 + 33,3 + 18,2) - (35,8 + 26,2 + 31,0 + 31,5) \text{ A } 4 = - 6,75$$

$$\text{Efeito B} = (26,2 + 18,7 + 31,5 + 18,2) - (35,8 + 27,3 + 31,0 + 33,3) \text{ A } 4 = - 8,20$$

$$\text{Efeito C} = (31,0 + 33,3 + 31,5 + 18,2) - (35,8 + 27,3 + 26,2 + 18,7) \text{ A } 4 = + 1,50$$

$$\text{Inter. AB} = (35,8 + 18,7 + 31,0 + 18,2) - (27,3 + 26,2 + 33,3 + 31,5) \text{ A } 4 = - 3,65$$

$$\text{Inter. AC} = (35,8 + 26,2 + 33,3 + 18,2) - (27,3 + 18,7 + 31,0 + 31,5) \text{ A } 4 = + 1,25$$

$$\text{Inter. BC} = (35,8 + 27,3 + 31,5 + 18,2) - (26,2 + 18,7 + 31,0 + 33,3) \text{ A } 4 = + 0,90$$

$$\text{Inter. ABC} = (27,3 + 26,2 + 31,0 + 18,2) - (35,8 + 18,7 + 33,3 + 31,5) \text{ A } 4 = - 4,15$$

$$\text{Média} = (35,8 + 27,3 + 26,2 + 18,7 + 31,0 + 33,3 + 31,5 + 18,2) \text{ A } 8 = + 27,75$$

O erro experimental de cada efeito foi calculado a partir dos ensaios experimentais que foram realizados em triplicata (Tabela II.H), para, então, ser avaliada a significância estatística dos efeitos.

**Tabela II.H- Matriz (X) do planejamento  $2^3$  com a combinação dos fatores peptona bacteriológica (Fator A), óleo de oliva (Fator B) e pH (Fator C) e resultados (produção de lipase) dos ensaios experimentais correspondentes.**

Ensaio	Fator A	Fator B	Fator C	Resposta (U/mL)*			
				$y_1$	$y_2$	$y_3$	$\bar{y}$
1	-1	-1	-1	30,5	41,0	36,0	35,8
2	+1	-1	-1	33,0	25,0	24,0	27,3
3	-1	+1	-1	22,0	29,5	27,0	26,2
4	+1	+1	-1	17,0	19,5	19,5	18,7
5	-1	-1	+1	33,0	32,5	27,5	31,0
6	+1	-1	+1	34,0	36,0	30,0	33,3
7	-1	+1	+1	30,0	35,0	29,5	31,5
8	+1	+1	+1	20,0	15,0	19,5	18,2

\* produção de lipase expressa em  $\mu$ moles de ácidos graxos liberados por minuto nas condições padronizadas descritas na etapa 1 deste capítulo, pelo método titulométrico.

Primeiramente, foi calculada a variância conjunta com 8 graus de liberdade para uma observação individual, com a fórmula  $v(\gamma) = s^2 = \sum d_i^2 / 3N$ , onde  $d_i$  é igual à soma das diferenças entre os três resultados correspondentes ao  $i$ -ésimo ensaio. Resolvendo a equação, teremos:

$$S^2 = (30,5-41,0)^2 + (30,5-36,0)^2 + (41,0-36,0)^2 + (33,0-25,0)^2 + (33,0-24,0)^2 + (25,0-24,0)^2 + (22,0-29,5)^2 + (22,0-27,0)^2 + (29,5-27,0)^2 \times 3 \times 8 = 31,54$$

Num planejamento fatorial  $2^3$  cada efeito é uma combinação linear de 8 valores, com coeficientes  $\pm 1/4$ . Admitindo que estes valores sejam independentes podemos aplicar a equação  $\delta_y^2 = \sum a_i^2 \cdot \delta_i^2$  para obter uma estimativa da variância de um efeito. Fazendo, portanto,  $a_i^2 = (1/4)^2 = 1/16$ , para  $i = 1, 2, 3, \dots, 8$ . Assim, cada um dos oito valores da combinação é a média de três outros, porque os ensaios foram feitos em triplicata.

Neste caso, em que a variância foi estimada em 31,54, a variância da média de três observações será  $31,54/3 = 10,5$ . Juntando tudo, chega-se à estimativa para cada efeito, isto é:

$$v(\text{efeito}) = (1/16) \times 8 \times (31,54/3) = 5,2$$

Portanto, o erro padrão de cada efeito será a raiz quadrada de 5,2 que é igual a  $\pm 2,28$ . O erro padrão do rendimento médio global será a metade disso ( $\pm 1,14$ ), porque os coeficientes da combinação linear nesse caso são todos iguais a  $1/8$ , ao invés de  $\pm 1/4$ . Assim sendo, os valores calculados para todos os efeitos com o correspondente erro padrão podem ser agrupados, como mostrado na Tabela II.15( no texto do capítulo II.2).

## MODELAGEM

A matriz do planejamento e os rendimentos obtidos experimentalmente, em triplicata, em cada combinação de níveis, estão mostrados na Tabela II.I.

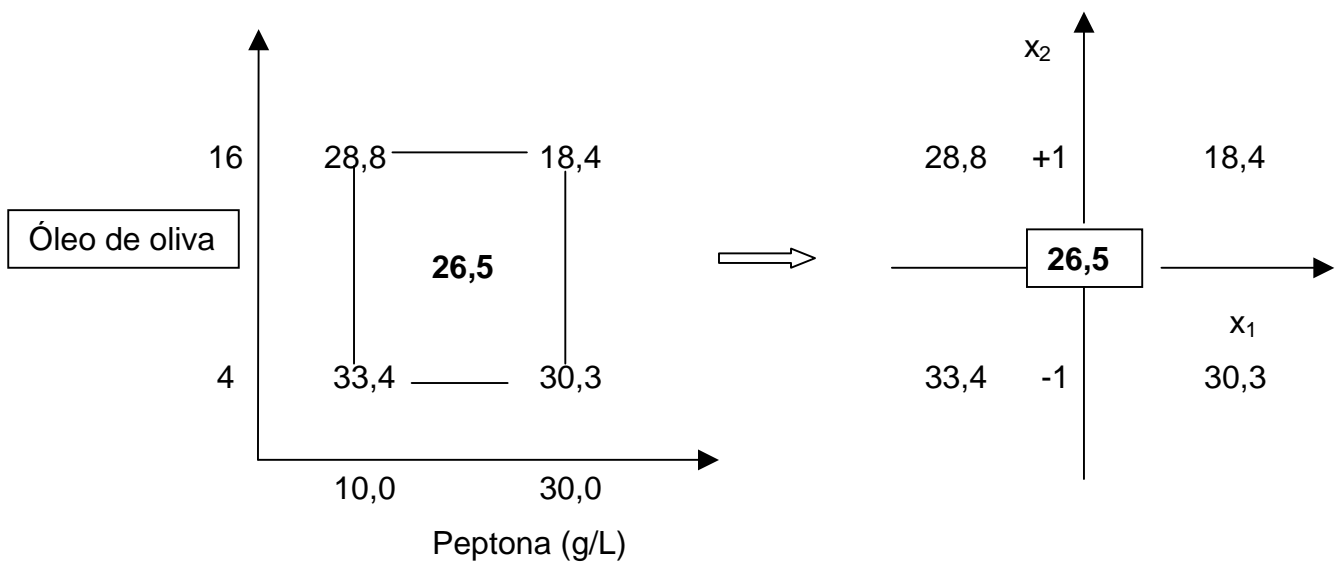
**Tabela II.I- Matriz de planejamento  $2^3$  com ponto central e correspondente resultados experimentais. Delineamento de primeira ordem.**

En sa io n <sup>o</sup>	Variáveis (unidades originais)			Variáveis Codificadas <sup>a</sup>			Rendimento de produção			
	Pep tona (g/L)	Óleo de oliva (mg/L)	pH (un.)	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$y_1$	$y_2$	$y_3$	$\bar{y}$
1	10,0	4,0	6	-1	-1	-1	30,5	41,0	36,0	35
2	30,0	4,0	6	+1	-1	-1	33,0	25,0	24,0	27,3
3	10,0	16,0	6	-1	+1	-1	22,0	29,5	27,0	26,2
4	30,0	16,0	6	+1	+1	-1	17,0	19,5	19,5	18,7
5	10,0	4,0	7	-1	-1	+1	33,0	32,5	27,5	31,0
6	30,0	4,0	7	+1	-1	+1	34,0	36,0	30,0	33,3
7	10,0	16,0	7	-1	+1	+1	30,0	35,0	29,5	31,5
8	30,0	16,0	7	+1	+1	+1	20,0	15,0	19,5	18,2
9	20,0	10,0	6,5	0	0	0	25,3	25,7	25,5	25,5
10	20,0	10,0	6,5	0	0	0	26,7	23,8	25,3	25,3
11	20,0	10,0	6,5	0	0	0	24,8	29,3	27,0	27,0
12	20,0	10,0	6,5	0	0	0	29,8	29,8	29,8	29,8
13	20,0	10,0	6,5	0	0	0	23,8	25,5	24,7	24,7

<sup>a</sup>  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  representam os valores das variáveis codificadas pelas equações:  $x_1 = (g/L \text{ de peptona} - 20) / 30 - 10 / 2$  Exemplo:  $10 - 20 / 30 - 10 / 2 = -1$ ;  $x_2 = (mL \text{ de óleo de oliva} - 10) / 16 - 4 / 2$  Exemplo:  $16 - 10 / 16 - 4 / 2 = +1$ ;  $x_3 = (\text{unidade de pH} - 6,5) / 7 - 6 / 2$  Exemplo:  $7 - 6,5 / 7 - 6 / 2 = +1$ .

No algoritmo usado para calcular os efeitos, os verdadeiros níveis dos fatores foram substituídos por +1 e -1. Isso corresponde a uma codificação das variáveis originais. Para transformar os valores de 10 g/L e de 30 g/L de peptona, por exemplo, em -1 e +1, basta subtrair de cada um deles o valor médio 20 g/L, e dividir o resultado pela metade da diferença entre o valor superior e o valor inferior. Como consequência,

a origem do eixo da concentração da peptona passa a ser 20 g/L, com nova escala, em que cada unidade corresponde a 10 g/L. O mesmo acontece com a origem do eixo da concentração do óleo de oliva que ficará, com a codificação, a meio caminho das concentrações 4,0 mL/L e 16,0 mL/L, numa espécie de “nível zero” sem significado físico mas que pode, também, ser tratado algébricamente. Essa transformação pode ser notada na Figura I.H em que as variáveis peptona e óleo de oliva passam a ser chamadas, depois de codificadas, de  $x_1$  e de  $x_2$ , respectivamente, sendo que a resposta sob hipótese correspondente à origem do novo sistema, localizada no centro do planejamento, é a média de todas as respostas determinadas, isto é, 26,5 U/mL de lipase.



**Figura - I.H.** Codificação das variáveis peptona e óleo de oliva

Com a codificação, cada efeito passa a corresponder sempre à variação de duas unidades do fator correspondente. Isso significa que os efeitos por unidade de  $x_1$  e  $x_2$  são a metade dos efeitos que foram calculados na etapa 2, isto é: peptona bacteriológica  $(- 6,75/2 =)$  - 3,38; óleo de oliva  $(- 8,2/2 =)$  - 4,1 e pH  $(+ 1,5/2 =)$  + 0,75. Será na forma por unidade de  $x_1$  e  $x_2$  que os efeitos serão utilizados na especificação do modelo estatístico, base para a análise dos dados do planejamento.

Assim, no modelo estatístico com três variáveis, a resposta observada no nível  $(x_1, x_2, x_3)$  é considerada como sendo uma variável aleatória  $y(x_1, x_2, x_3)$ , com distribuição normal em torno da média populacional  $\mu(x_1, x_2, x_3)$  e variância populacional  $\sigma^2(x_1, x_2, x_3)$ . Portanto,

$Y(x_1, x_2, x_3) = \mu(x_1, x_2, x_3) + E(x_1, x_2, x_3)$ , onde  $E(x_1, x_2, x_3)$  é o erro aleatório com que as observações flutuam em torno da média populacional correspondente à combinação de níveis definida pelos valores de  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ .

Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata (Tabela II.I). Assim, com o ensaio de # 3 foram obtidas as respostas de 22,0; 29,5 e 27,0, valores que são considerados uma amostra da população de todos os possíveis rendimentos de produção na combinação de níveis  $(x_1, x_2, x_3) = (-1, +1, -1)$ . A média populacional dos rendimentos nesta combinação de níveis é um certo valor, dado por  $\mu = \mu(-1, +1, -1)$  desconhecido, mas que pode ser estimado com os valores das três observações cujo valor  $\bar{y} = (1/3)(22,0 + 29,5 + 27,0) = 26,2$ .

A variância desconhecida pode ser estimada fazendo-se ensaios repetitivos. O modelo estatístico especifica ainda que os erros aleatórios  $E(x_1, x_2, x_3)$  são distribuídos independentemente, com média zero e com a mesma variância em todas as combinações de níveis.

Foi empregado um delineamento fatorial  $2^3$ , com cinco pontos centrais, chamado de "Delineamento de primeira ordem", porque ele possibilita um ajustamento eficiente e a checagem do modelo polinomial de primeira ordem:

$$\hat{y}(x_1, x_2, x_3) = \mu_0 + \mu_1 x_1 + \mu_2 x_2 + \mu_3 x_3 + E.$$

Neste estágio da análise de superfície de resposta este modelo foi escolhido porque se acreditou, mas, sem certeza, que o rendimento de produção estava em algum ponto da ladeira que representa a superfície de resposta, ainda distante do topo, ou seja, da resposta máxima. Assim, seria provável que aquele local da superfície poderia ser representado pelo modelo planar citado, sendo  $\mu_1$  a inclinação na direção  $x_1$ ;  $\mu_2$  a inclinação na direção  $x_2$ ; e  $\mu_3$  a inclinação na direção  $x_3$ .  $\mu_0$ , bem como  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ , e  $\mu_3$  são valores populacionais da média das respostas e dos efeitos principais, respectivamente. Isso pode ser dito de outro modo, ou seja,  $\mu_1$  é a mudança que ocorre na resposta quando  $x_1$  é alterado de uma unidade. O principal efeito linear num delineamento fatorial é a alteração na resposta quando  $x_1$  é mudado de  $-1$  para  $+1$ , isto é, de duas unidades. Conseqüentemente  $b_1$ , que é a estimativa de  $\mu_1$ , é a metade do efeito principal linear obtido da diferença de médias da menor e da maior concentração da peptona;  $b_2$  é a metade do efeito principal linear obtido da diferença de médias da menor e da maior concentração do óleo de oliva e  $b_3$ , obtido do menor e do maior valor do pH.

Os valores de  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  podem ser estimados e usados como coeficientes da equação do modelo estatístico linear, ou seja:

$$\hat{y}(x_1, x_2, x_3) = \hat{u}(x_1, x_2, x_3) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3.$$

Os coeficientes podem ser obtidos aplicando-se o método dos Quadrados Mínimos (QM). Assim sendo, podemos calculá-los, como se segue.

$$b_0 = 1/13(35,8+27,3+26,2+18,7+31,0+33,3+31,5+18,2+25,5+25,3+27,0+29,8+24,7) = 27,2 \text{ (média global de todos os resultados)}$$

$$b_1 = 1/8(-1*35,8) + (+1*27,3) + (-1*26,2) + (+1*18,7) + (-1*31,0) + (+1*33,3) + (-1*31,5) + (+1*18,2) = -3,4$$

$$b_2 = 1/8(-1*35,8) + (-1*27,3) + (+1*26,2) + (+1*18,7) + (-1*31,0) + (-1*33,3) + (+1*31,5) + (+1*18,2) = -4,1$$

$$b_3 = 1/8(-1*35,8) + (-1*27,3) + (-1*26,2) + (-1*18,7) + (+1*31,0) + (+1*33,3) + (+1*31,5) + (+1*18,2) = +0,7$$

Do mesmo modo podemos calcular os coeficientes das interações entre os efeitos, obtendo-se os resultados seguintes:  $b_{12} = -1,8$ ;  $b_{13} = +0,6$ ;  $b_{23} = +0,7$ ;  $b_{123} = -2,1$ .

Deste modo a equação completa fica sendo:

$$\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$$

*OBS: Os coeficientes também podem ser calculados resolvendo-se a equação matricial  $b = (X^t X)^{-1} X^t Y$ .*

Dos cinco ensaios repetidos no ponto central podemos estimar a variância ( $s^2$ ). Portanto,

$$S^2_{m=V(l)} = s^2 / n = \sum d_i^2 / n - 1 = \sum (X_i - l)^2 / n - 1 \\ = (25,5 - 26,46)^2 + (25,3 - 26,46)^2 + (27,0 - 26,46)^2 + (29,8 - 26,46)^2 + (24,7 - 26,46)^2 = 4,20.$$

Logo, o desvio padrão (DP) será a raiz quadrada de 4,2, isto é, ! 2,05

Num planejamento fatorial  $2^3$  cada efeito é uma combinação linear de oito valores, com coeficientes (contrastes) de !  $1/4$ . Admitindo que estes valores sejam independentes podemos obter uma estimativa da variância de um efeito aplicando a fórmula  $\sum^2 y = \sum a_i^2 \sum_i^2$ . Portanto,  $a_i^2 = (1/4)^2 = 1/16$ , para  $i = 1, 2, 3, \dots, 8$ .

Cada um dos oito valores da combinação é um valor médio de três outros (triplicata). Portanto, se a variância de uma observação individual é estimada em 4,20, a variância da média de três observações será 4,2/3. Juntando tudo, chegamos à estimativa da variância do efeito, assim calculado:  $\sigma^2$  (efeito) = (1/16) x 8 x (4,2/3) = 0,7. Logo, o erro padrão de um efeito será EP =  $\sqrt{0,7}$  e o erro padrão da média global será a metade disso, ou seja,  $\sqrt{0,7}/2$ , porque os coeficientes de combinação linear nesse caso são todos iguais a 1/8, ao invés de 1/4.

Enfim, podemos escrever a equação ajustada do modelo para a superfície de resposta, isto é, a variação da produção da lipase alcalina em função da peptona bacteriológica (na faixa de 10 a 30 g/L), do óleo de oliva (na faixa de 4 -16 mL/L) e do pH (na faixa de 6-7) que será:

$$\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$$

(± 0,8) (± 0,7) (± 0,7) (± 0,7) (± 0,7) (± 0,7) (± 0,7) (± 0,7)

O tamanho relativamente baixo dos erros, em relação aos efeitos significativos, no caso, os efeitos principais  $x_1$  e  $x_2$ , indica que esse modelo é significativo. Entretanto, qualquer que seja o plano escolhido para representar o modelo acima proposto, deixará resíduos em relação, a pelo menos, algumas das observações. Esse resíduo é dado pela diferença entre o valor observado e o valor previsto pelo modelo ( $e_i = y_i - \hat{y}_i$ ), podendo ser positivo ou negativo. De qualquer modo, a melhor reta será aquela que passar mais perto dos pontos experimentais. Passar mais perto significa minimizar a distância global dos pontos em relação à reta. Em geral isso é feito localizando a reta de tal maneira que a soma dos quadrados desses resíduos seja mínima, ou seja, fazendo-se o ajuste pelos quadrados mínimos ou análise de regressão.

Inicia-se a análise de regressão pela análise dos desvios das observações em relação à média global. O desvio de um valor observado em relação à média de todas as observações ( $y_i - \bar{y}$ ) pode ser decomposto em duas parcelas:

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i), \text{ (equação a), sendo que}$$

$(\hat{y}_i - \bar{y})$  representa o afastamento da previsão do modelo para o ponto em questão ( $\hat{y}_i$ ), em relação à média global

$(y_i - \hat{y}_i)$  representa a diferença entre o valor observado e o valor previsto (que deve ser pequena num modelo bem ajustado).

Elevando a equação a ao quadrado, e, em seguida, fazendo o somatório sobre todos os pontos, teremos:



$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 + 2 \sum (\hat{y}_i - \bar{y})(y_i - \hat{y}_i)$$

como  $\sum (\hat{y}_i - \bar{y})(y_i - \hat{y}_i) = 0$ , temos:

$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$  = soma de quadrados de desvios ou SQ, que pode, assim, ser traduzido: SQ em torno da média = SQ devida à regressão + SQ residual (SQT = SQR + SQR).

Dito de outra forma, isso quer dizer que uma parte da variação total das observações é descrita pela equação de regressão, e o restante é devido aos resíduos. Portanto, o melhor ajuste do modelo acontece quanto maior for a fração descrita pela regressão, que é dado pela equação:

$R^2 = SQR / SQT = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 / \sum (y_i - \bar{y})^2$ ;  $R^2$  será igual a 1 quando não houver resíduo algum.

Cada soma de quadrados tem associada a si um certo número de graus de liberdade, que indica quantos valores independentes que envolvem as  $n$  observações  $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$  são necessários para determiná-la. Assim sendo:

SQT =  $n-1$  graus de liberdade

SQR =  $p-1$  graus de liberdade

SQR =  $n-p$  graus de liberdade, sendo  $p$  igual ao número de parâmetros que, neste caso, é igual a 4 ( $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ ).

Segundo este direcionamento, os resultados da ANOVA (Análise de Variância) para os quatro parâmetros são mostrados na Tabela III.H.

**Tabela III.H. Análise de Variância (ANOVA) para o ajuste de um modelo linear com quatro parâmetros ( $n = 13$ ;  $p = 4$ ).**

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Nº de graus de liberdade (g.l.)	Média Quadrática (MQ)	F
Regressão (R)	$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1 = 3$	$SQR / g.l.R$	
Resíduos (r)	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p = 9$	$SQR / g.l. r$	$MQR / MQR$
Total	$\sum (y_i - \bar{y})^2$	$n - 1 = 12$		

Fazendo os cálculos segundo as informações da Tabela III.H, a ANOVA para o ajuste do modelo  $\hat{y} = 27,2 - 3,4 x_1 - 4,1 x_2 + 0,7 x_3 - 1,8 x_1 x_2 + 0,6 x_1 x_3 + 0,7 x_2 x_3 - 2,1 x_1 x_2 x_3$  aos dados dos resultados experimentais da Tabela II.14 é mostrada na Tabela II.19 (vide página 137, capítulo II.2).

## TESTES DE SIGNIFICÂNCIA DOS COEFICIENTES

### COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO ( $R^2$ )

É o coeficiente de correlação entre as respostas observadas e os valores previstos pelo modelo ajustado,  $R = r(y, \hat{y})$ .

$R^2 = SQR/SQT = 303,23/306,19 = 0,99$ . Portanto, 99% dos pontos são explicados pela equação de regressão linear.

#### 3.3.3.1.1.2 COEFICIENTES LINEARES

$t_{\text{crítico}}$  (para  $1-0,05/2 = 0,975$ ; bilateral; g.l. = 9) = 2,262

$t_{\text{calculado}} = b/EP_b - \mu_0$ , logo:

$$b_1 = 3,4/0,7 - 0 = 4,86$$

$$b_2 = 4,1/0,7 - 0 = 5,86$$

$$b_3 = 0,7/0,7 - 0 = 1,0$$

$$b_4 = 1,8/0,7 - 0 = 2,57$$

$$b_5 = 0,6/0,7 - 0 = 0,86$$

$$b_6 = 0,7/0,7 - 0 = 1,0$$

$$b_7 = 2,1/0,7 - 0 = 3,0$$

É significativo quando  $t_{\text{cal.}} > t_{\text{crítico}}$ . Assim sendo, são significativos os coeficientes angulares:  $b_1$ ;  $b_2$ ;  $b_4$  e  $b_7$ . OBS: para os dois últimos coeficientes, os valores de  $t$  são bastante próximos e, distantes de  $b_1$  e  $b_2$ .

#### 3.3.3.1.1.3 COEFICIENTE ANGULAR

$t = a - \mu_0/EP_{(a)} = 27,2/0,8 - 0 = 34,0$ . Para  $t_{\text{crít.}}$  de 2,26, é bastante significativo.

Conclui-se, portanto, que o modelo linear mostrou-se adequado. Isso significa, então, que essa região da superfície de resposta estudada é descrita satisfatoriamente pela equação de um plano, como demonstrado.

*alkaline lipase-producing fungi*

APÊNDICE I: TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (EM 23/12/2005) NO PERIÓDICO “*World Journal of Microbiology and Biotechnology*”.

Running title: **Alkaline lipase-producing fungi**

**Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil**

Gecernir Colen\*, Roberto Gonçalves Junqueira and Tasso Moraes-Santos

Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos, 6627. Pampulha. Campus UFMG. Zip code 31270-901. Belo Horizonte, MG. Brazil

Tel + 31-3499-6912, Fax +31- 3499-6988

Email address: [gcolen@farmacia.ufmg.br](mailto:gcolen@farmacia.ufmg.br)

## **Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil**

### **Abstract**

Fifty-nine lipase-producing fungal strains were isolated from Brazilian savanna soil by employing enrichment culture techniques. An agar plate medium containing bile salts and olive oil emulsion was employed for isolating and growing fungi in primary screening assay. Twenty-one strains were selected by the ratio of the lipolytic halo radius and the colonies radius. Eleven strains were considered good producers under conditions of submerged liquid fermentation (shaken cultures) and solid-state fermentation. The most productive strain, identified as *Colletotrichum gloesporioides*, produced 27700 U/l of lipase under optimized conditions and the crude lipase preparation was capable of hydrolysing a broad range of substrates including lard, natural oils and tributyrin.

**Keywords:** alkaline lipase, *Colletotrichum gloesporioides*, lipolytic-producing fungi

## **Introduction**

Some of the commercially important lipase-producing fungi are of the genera *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Candida* and *Penicillium* (Tan *et al.* 2003; Larios *et al.* 2004; Ellaiah *et al.* 2004). The industrial demand for new sources of lipases with different enzymatic characteristics stimulate the isolation and selection of new strains of lipolytic microorganisms (Vargas *et al.* 2004). However, lipase production by filamentous fungi varies according to the strain, the composition of the growth medium and cultivation conditions such as the carbon and nitrogen sources, pH and temperature (Sharma *et al.* 2001; Cihangir & Sarikaya 2004).

In general, the selection begins with microbial growth on agar plates. It is known that the success or failure in selecting microorganisms depends on the primary selection. The difficulties in selecting lipolytic fungi on agar plates are related to the exuberant growth, low lipolytic activity and interference of dyes with fungal metabolites (Jensen 1983). After the primary selection procedures it is usual to submit the strains to a submerged culture for evaluation of the enzyme production. In nature, soil habitat fungi grow attached to solid substrates, but with different characteristics from those growing in *in vitro* conditions. The distinct *in vitro* experimental conditions of submerged liquid fermentation and solid-state fermentation can alter gene expression, changing phenotypes such as growth, production of secondary metabolites and enzymes (Iwashita 2002; Hölker *et al.* 2004); therefore, the strains could be selected under both submerged liquid fermentation (SLF) and solid-state fermentation (SSF) conditions, simultaneously.

The objective of this study was to screen fungi for significant lipase production. This report includes: (a) a description of the techniques used to isolate and to select lipase-producing fungi from samples of Brazilian savanna soil; (b) the screening of alkaline

### *alkaline lipase-producing fungi*

lipase-producing strains; (c) the evaluation of some fermentation parameters related to the best lipase-producing fungus.

## **Materials and methods**

### *Isolation of filamentous fungi*

Savanna soil samples (500 g) from the north of the Minas Gerais state, Brazil, were collected under the “pequizeiro” tree (*Caryocar brasiliense* Camb) and under the avocado tree (*Persea americana* Miller), both producing oleaginous fruits. Shavings (10 g) of the oleaginous seeds of the barú (*Dipteryx alata* Vog.), a native Brazilian savanna tree, were added to the soil samples, and they were kept in a humid chamber at 25-30 °C for seven days. Ten grams of each sample were resuspended in 90 ml of a 0.1 % (v/v) solution of Tween 80 in distilled water. The suspensions were used to inoculate a selective agar medium that contained (per litre): 0.5 g yeast extract, 5.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 g (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, 1.0 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.0 g NaCl, 2.0 g bile salts, 10.0 ml olive oil, 20.0 g bacteriological agar, pH 7.0. Before adding the oil, the mixture was heated to melt the agar and then emulsified using a Waring blender.

From the 59 isolated strains numbers 41 and 42 were identified as *Colletotrichum gloesporioides* by the Andre Tosello Foundation, Campinas, São Paulo, Brazil, based on conidial morphology. The conidia of *C. gloesporioides* were hyaline and cylindrical and obclavate in shape (Baxter *et al.* 1985, Bernstein *et al.* 1995). All stock cultures were cultivated in potato dextrose agar (PDA) at 30 °C and stored at 4 °C.

### *Screening of lipolytic fungi*

The first screening was carried out on the same plate medium as was used for isolation, as described above. Culture plates inoculated with the 59 fungal strains were

*alkaline lipase-producing fungi*

incubated at 30 °C for 72 h and the radius ( $r$ ) of the colonies and the radius ( $R$ ) of the clear hydrolytic halos around them were measured. Twenty-five strains with the ratio  $R/r$  equal to or higher than 1.2 were selected and grown both in submerged liquid fermentation (SLF) and in solid-state fermentation (SSF) conditions. The filtrates as described below were assayed in ATV or AEPV plates (see description below) and the strains (11) with a halo diameter equal to or greater than 2 mm were titrimetrically analysed.

*Submerged liquid fermentation.* A five-milliliter spores suspension ( $10^6$  spores/ml), prepared by washing 7-10 day-old PDA slants with sterile distilled water, was used to provide an inoculum for each 250-ml shake-flask containing 50 ml of the liquid growth medium (per litre): 20.0 g bacteriological peptone, 8.0 ml olive oil, 0.6 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . The initial pH was adjusted to 7.0. After 72 h of incubation, at 30 °C in a rotatory shaker (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) operating at 160 rev/min, the biomass was separated by filtration through a Whatman filter paper, and the culture filtrates were used as the enzyme sources. The results were expressed as the mean of at least three independent measurements.

*Solid-state fermentation.* The basal fermentation medium contained: 30.0 g bacteriological peptone, 250 ml olive oil emulsion (25.0 ml olive oil in 100 ml of solution containing 1.25 g of arabic gum), 100 ml saline solution, 650 ml distilled water. The initial pH was adjusted to 7.0. The saline solution in distilled water contained (per litre): 100.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0 g KCL. A sample (15.0 g) of washed and dried rice hulls was added to a series of 250 ml flasks, moistened with 10.0 ml of the fermentation medium and sterilized at 121 °C for 20 min. After cooling, three flasks were inoculated with each strain using 2.5 ml of the spore suspension (as prepared above) and incubated at 30 °C for 4 days. Enzyme extraction was performed by adding 100 ml of distilled water to

### *alkaline lipase-producing fungi*

the solid mouldy medium and shaking the mixture in a rotatory shaker (100 rev/min) for 60 min. The extracts were then squeezed through a cloth and clarified by centrifugation at 10,000 x g for 5 min. The supernatants were assayed for lipase activity.

#### *Lipase production*

Lipase production by strain 41 of *Colletotrichum gloesporioides* was carried out at 30 °C in 250-ml shake flasks with 50 ml of the medium using a rotatory shaker (150 rev/min) for 96 h. The flasks were inoculated with 1 ml of a spore suspension or 5 ml of a vegetative inoculum (see explanation in Table 2 footnote). The following parameters were determined: biomass, lipolytic activity, yield, productivity and specific growth rate.

#### *Assay of lipolytic activity*

*Plate assay.* The culture filtrates (from SLF and SSF) were first submitted to diffusion into agar gel that contained (per litre of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.9): 15.0 g bacteriological agar, 80.0 mg Victoria blue B, 6.0 ml tributyrin (ATV) or 15.0 ml of a emulsion prepared by dispersion of 25.0 ml of olive oil in 100.0 ml of 2 % (v/v) polyvinyl alcohol solution (AEPV). After agar solidification, wells of 7.0 mm diameter were prepared and 50 µl samples of the filtrate were added to each well in triplicate and incubated at 30 °C for 18 hours. Lipolytic activity was identified by a deep blue color halo and the diameter was measured. The use of olive oil and tributyrin follows Jensen (1983) and Smith & Hass (1992) who recommend the use of two different substrates for screening of lipase-producing microorganisms.

*Titrimetric assay.* Lipolytic activity was measured according to Watanabe *et al.* (1977). The reaction mixture contained: 2.5 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0; 2.5 ml of 25 % (v/v) olive oil emulsion in 2 % (v/v) polyvinyl alcohol solution; 1.0 ml of the enzyme filtrate. The olive oil emulsion was formed using an ultra-turrax dispersor T25 (Ika, Wilmington,



### *alkaline lipase-producing fungi*

NC, USA). The reaction mixture was incubated at 30 °C on a reciprocal shaker (Fanem, SP, Brazil) at 45 cycles/min. After 10 min, 10 ml of an acetone/ethanol (1:1, v/v) solution was added to stop the reaction and the free fatty acid released was determined by titration with 0.05 N NaOH using thymolphthalein as indicator. Culture filtrate boiled for 10 min was used as control. One unit of lipase was defined as the amount of enzyme required to release one  $\mu\text{mol}$  of fatty acid per minute under the specified conditions.

#### *Biomass dry weight*

The mycelia were separated by filtration, washed twice with a butanol-ethanol mixture (1:1, v/v) and then washed with deionized water. The biomass was dried to constant weight at 80 °C.

#### *Hydrolysis of lipidic substrates by C. gloesporioides crude lipase*

The hydrolysis of various natural oils, lard and tributyrin by the fermentation broth (crude enzyme) was carried out using the same procedure for titrimetric assay, but adding double the volume of the reaction mixture and incubated for 30 min.

## **Results and Discussion**

The oleaginous seed shavings from baru were essential to isolate fungi since they create the necessary enrichment conditions for fungal isolation. The fungal mycelia attached to the oleaginous seed shavings added to the soil samples were noted after three days and 59 fungus strains were isolated. From these 59 strains, lipolytic halos around colonies were observed in 25 of them (21 with  $R/r$  ratio equal to or higher than 1.2). The opacity of the agar plate medium developed in the present work, in which the bile salts

### *alkaline lipase-producing fungi*

present partial solubility (pH 7.0), created the conditions for obtaining isolated colonies of adequate size with better diffusion and lipase action.

Table 1 shows the lipolytic activity results from 11 alkaline lipase-producing fungi cultured in submerged and solid-state fermentation conditions. In both conditions strain 41, identified as *C. gloesporioides*, showed the highest lipolytic activity, therefore it was chosen for further studies on lipase production.

The fermentation parameters related to lipase production by the *C. gloesporioides* cultivated using spores and vegetative inocula are shown in Table 2. It may be noted that lipase activity is dependent on fermentation time. However, the biomass production decreased from 72 to 96 h with lipase activity practically the same. As a consequence the yield was higher at 96 h of fermentation. This could be explained by the lost biomass, without affecting the production of lipase if it is assumed that the remaining mycelia are more efficient in producing the enzyme. This explanation does not mean that the speed of enzyme production should be kept the same, since the time spent for enzyme production. Therefore the decreased productivity was around 29 % and the time difference was 25 %, which can explain why the only 5 % lipase activity was lost. This reasoning does not contradict the specific growth rate that was shown to decrease with time. However, using vegetative inoculum the highest activity was reached at 48 h without practically losing biomass and preserving the yield. The productivity decreased from 48 h to 96 h incubation time, and the above explanation fits to this case as well the specific growth rate. The highest lipase activity obtained with both inocula is comparable of that (26000 U/l) of Tan *et al.* (2004) using peptone as organic N source for *Penicillium camemberti*.

Figure 1 shows the hydrolytic activity of the *C. gloesporioides* crude lipase on several oils, lard, and tributyrin. Taking olive oil as a 100%, the lowest value was found for

### *alkaline lipase-producing fungi*

lard and the highest for tributyrin. It can be concluded therefore that the isolated lipase-producing fungus is effective for hydrolysing a broad spectrum of substrates, which agrees with other researcher (Tan *et al.* 2004).

### **Conclusions**

Lipase-producing fungi were successfully isolated from soil. Enrichment of the soil with oleaginous seed shavings (baru seed) was essential for fungi isolation. Bile salts and a dispersed form of olive oil were essential for isolation and evaluation of lipolytic activity.

A strain of *C. gloesporioides* was the best in producing alkaline lipase, which was able to hydrolyse a broad range of oils and lard.

### **Acknowledgment**

The authors greatly appreciate the financial support from the Brazilian agencies: FAPEMIG, CNPq and CAPES. We thank Dr. D.L. Nelson for helping in preparing the manuscript.

### **References**

- Baxter, A.P. & Van Der Westhuizen, G.C.A. 1985 A review of literature on the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophilatica* **17**, 15-18.
- Bernstein, B., Zehr, E.T., Deam, R.A. & Shabi, E. 1995 Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple and other hosts. *Plant Disease* **79**, 478-482.
- Cihangir, N. & Sarikaya, E. 2004 Investigation of lipase producing by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**, 193-197.

*alkaline lipase-producing fungi*

- Ellaiyah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Taleb, A.T. & Adinarayana, K. 2004 Production of lipase by immobilised cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* **39**, 525-528.
- Hölker, U.; Hölfner, M. & Lenz, J. 2004 Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 175-186.
- Iwashita, K. 2002 Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 530-535.
- Jensen, R.G. 1983 Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids* **18**, 650-657.
- Larios, A., Garcia, H.S., Oliart, R.M. & Valerio-Alfaro, G. 2004 Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**, 373-376.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, V.C. 2001 Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19**, 627-662.
- Smith, J.L. & Haas, M.J. 1992 Lipolytic microorganisms. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 3rd. ed., eds. Vanderzant, C. & Splittstoesser, D.F. pp.183-191. Washington. DC: American Public Health Association. ISBN 087553173-8.
- Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C. & Deng, L. 2003 Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry* **39**, 459-465.

*alkaline lipase-producing fungi*

- Tan, T., Zhang, Mu, Xu, J. & Zhang, J. 2004 Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry* **39**, 1495-1502.
- Vargas, V.A., Delgado, O.D., Hatti-Kaul, R. & Mattiasson, B. 2004 Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters* **26**, 81-86.
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. & Yamada, K. 1977 Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry* **41**, 1353-1358.

*alkaline lipase-producing fungi*

*Table 1.* Screening of alkaline lipase producing fungi growing under conditions of submerged liquid fermentation and solid-state fermentation.

Strain number	Submerged fermentation <sup>a</sup>			Solid-state fermentation <sup>b</sup>		
	Halo diameter in agar		Lipolytic activity	Halo diameter in agar		Lipolytic activity
	gel plates (mm) <sup>c</sup>			gel plates (mm) <sup>c</sup>		
	Olive oil		(U/ml) <sup>d</sup>	Olive oil		(U/ml) <sup>d</sup>
Tributirin	emulsion	Tributirin		emulsion		
41	14.0	6.0	18.8	7.0	2.0	3.5
42	12.5	5.0	14.0	1.0	1.0	2.5
44	6.0	0.0	1.0	4.0	1.0	1.5
45	7.0	2.0	11.0	0.0	0.0	nr
47	0.0	5.0	3.0	2.0	1.0	2.0
58	3.0	6.0	5.0	1.0	1.0	1.0
62	2.0	6.0	3.5	0.0	0.0	nr
66	12.0	4.0	4.0	0.0	0.0	nr
67	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	1.0
68	0.0	3.0	0.0	0.0	1.0	1.5
73	9.0	8.0	7.0	1.0	1.0	4.0

<sup>a</sup>72 h of incubation; <sup>b</sup>96 h of incubation; <sup>c</sup>50 µl of each broth per well and incubation at 30 °C for 18 h;

<sup>d</sup>The activity was measured by titrimetric assay, in alkaline conditions, using olive oil emulsion as substrate; means of triplicate runs, 2 repetitions. Strains that produced at least 1.5 U/ml on solid-state fermentation or 2.5 U/ml on submerged fermentation were considered good producers. nr – not realised.

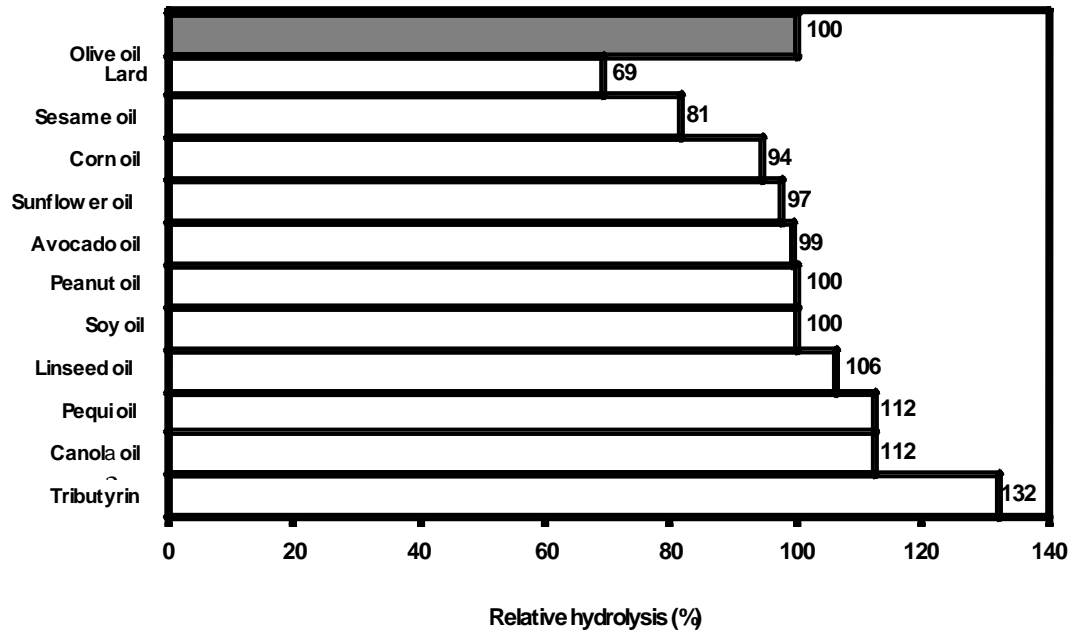
*alkaline lipase-producing fungi*

*Table 2.* Fermentation parameters of a batch culture of *C. gloesporioides* growing in shaken liquid medium in Erlenmeyer flasks<sup>a</sup>.

Inoculum	Fermen- tation time (h)	Final pH	Lipase <sup>b</sup> (U/l)	Biomass (mg/ml)	Yield $Y_{p/x}$ (U/mg)	Produc- tivity (U l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific growth $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
Spores	24	6.7	3500	9.2	0.4	145.8	0.09
	48	7.4	18800	14.9	1.2	391.7	0.06
	72	8.2	25700	12.5	2.1	356.9	0.03
	96	8.0	24300	8.1	3.0	253.1	0.02
Vegeta- tive <sup>c</sup>	24	6.2	18300	11.1	1.6	762.5	0.10
	48	7.4	27700	13.0	2.1	577.1	0.05
	72	8.1	26800	11.0	2.5	372.2	0.03
	96	8.4	27400	10.3	2.7	285.4	0.02

<sup>a</sup>The culture medium contained (g/l): 20.0 peptone; 8.0 ml olive oil; 0.6 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.0 NaNO<sub>3</sub>; pH 6.5. The results are means of four replicates repeated twice. <sup>b</sup>The lipolytic activity was measured by titrimetric assay. The reaction was carried out in 0.1 M Tris-HCl pH 8.9 buffer. <sup>c</sup>The mycelial mass obtained after 24 h of incubation in the same culture medium for fermentation was used as vegetative inoculum.

*alkaline lipase-producing fungi*



*Figure 1.* Relative hydrolysis of different lipidic substrate by *C. gloesporioides* crude lipase. The results are mean values of duplicate assays carried out with 1 ml of fermentation broth containing 16 U/ml of lipase. Pequi oil: *Caryocar brasiliense* Camb fruit pulp oil.



## **ANEXOS**

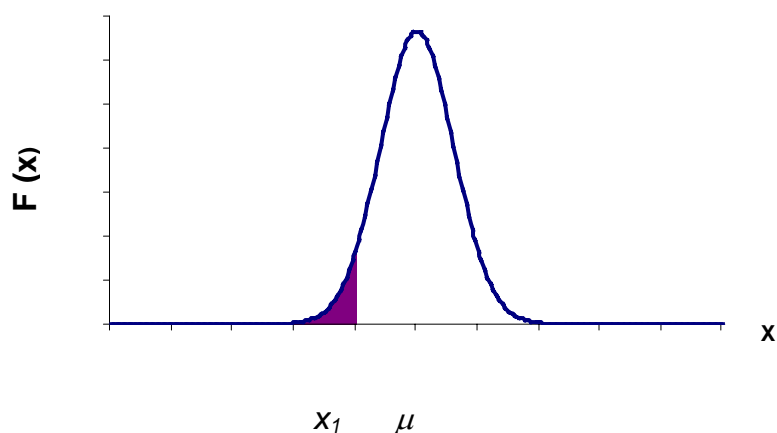
## ANEXO A - ANÁLISE DOS EFEITOS POR MEIO DE GRÁFICOS NORMAIS

Com os dados da Tabela II-16 (capítulo II-2) pode-se construir o gráfico das probabilidades acumuladas frente aos efeitos correspondentes, em papel milimetrado comum, segundo o procedimento descrito a seguir. No eixo das abcissas deverá ser traçada uma escala linear na qual poderão ser acomodados todos os valores dos efeitos, isto é, desde -8,20 a +1,50. No eixo das ordenadas será copiada a escala correspondente a  $N = 7$ , na tabela E do apêndice da referência de Box, Hunter & Hunter (1978), a qual indicará a localização, em papel de probabilidade normal, das probabilidades acumuladas, correspondentes aos sete efeitos. Os pontos que se ajustam bem à uma reta, cuja interseção com a probabilidade acumulada de 50 % ocorre em torno do ponto zero do eixo das abcissas, confirmam que esses pontos são originários de uma população normal de média zero, isto é, são efeitos sem significado estatístico.

Um gráfico normal é aquele cuja escala é feita em papel de probabilidade normal. A análise por meio de gráficos normais é uma técnica alternativa para se tentar distinguir os efeitos significativos daqueles de pouca importância.

Para entender o seu funcionamento é necessário que tenhamos a noção de probabilidade cumulativa.

Uma variável aleatória  $x$  cuja distribuição é normal obedece à equação  $F(x)dx = [1/(2\pi)^{1/2}\delta] e^{-(x-\mu)^2/2\delta^2} dx$ , cuja representação gráfica é uma curva em forma de sino do tipo mostrado na Figura A.



**Figura A** Representação de uma distribuição normal de uma variável aleatória  $x$

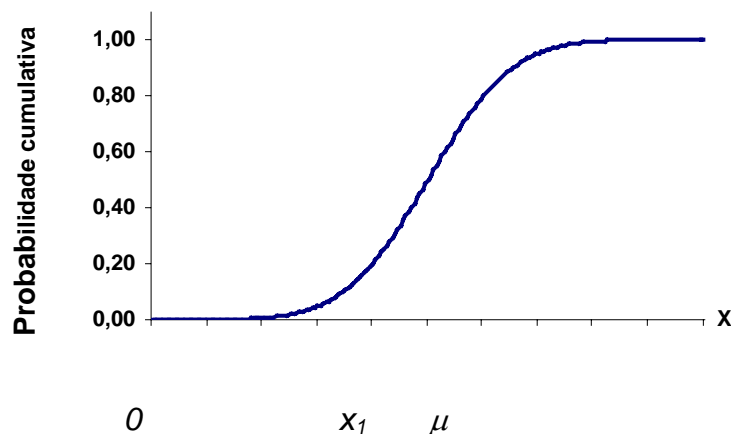
sendo,

$f(x)$  = densidade de probabilidade

$f(x)dx$  = probabilidade de ocorrência de um valor da variável aleatória no intervalo de largura  $dx$  em torno de  $x$

$x_1$  = valor numérico, específico; a área da cauda à esquerda de  $x_1$  (hachurada) é a **probabilidade acumulada** do valor  $x_1$ , isto é, corresponde à probabilidade de se observar um valor de  $x$  menor ou igual a  $x_1$ . A probabilidade acumulada (ou cumulativa) é uma função monoticamente crescente de  $x$ , que tende para 1 (valor total da área sob a curva), quando  $x$  tende para  $+\infty$ .

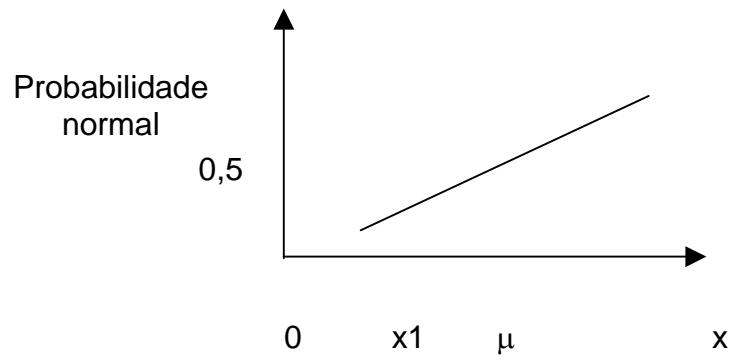
Ao fazer um gráfico de probabilidade cumulativa numa distribuição normal, obtém-se uma sigmóide (forma de S) que tende assintoticamente para zero à esquerda e para 1 à direita, como mostrado na Figura B abaixo.



**Figura B** Gráfico de probabilidade cumulativa numa distribuição normal

A curva sigmóide da Figura B pode ser transformada numa reta, por meio de uma modificação na escala do eixo das ordenadas. Essa modificação consiste em expandir a escala simetricamente em torno do ponto que representa 0,5, isto é, 50% de probabilidade acumulada, de modo a “esticar” as duas pontas do S. Diz-se que é um gráfico em escala de probabilidade normal, que pode ser visto na Figura C.

“Se  $x$  apresenta uma distribuição normal o gráfico de suas probabilidades acumuladas será uma sigmóide num papel comum e uma reta em papel de probabilidade normal”



**Figura C.** Gráfico da Figura B num papel de probabilidade normal.

## ANEXO B – COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS (G/100G) DOS ÓLEOS VEGETAIS

**FONTE: BRASIL.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 3 482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. *Diário Oficial*, Brasília, 13 out.1999, seção 1, p. 82-87.

Ácido Graxo	Óleo vegetal							
	Oliva	Gergelim	Soja	Amendoim	Arroz	Canola	Girassol	Milho
C16:0	7,5-20	7-20	7-14	6-16	12-18	2,5-6,5	3-10	9-14
C16:1	0,3-3,5	< 0,5	< 0,5	< 1,0	0,2-0,4	< 0,6	< 1,0	< 0,5
C18:0	0,5-5,0	3,5-6	1,4-5,5	1,3-6,5	1-3	0,8-8	1-10	0,5-4
C18:1	55-83	35-50	19-30	35-72	40-50	53-70	14-35	24-42
C18:2	3,5-21	35-50	44-62	13-45	29-42	15-30	55-75	34-62
C18:3	< 0,9	< 1,0	4-11	< 0,3	< 1,0	5-13	< 0,3	< 2,0
C22:0	< 0,2	< 0,5	< 0,5	1-5	< 1,0	< 0,6	< 1,0	< 0,5

-ACIDEZ (g/100g): menor do que 0,3 (oliva, refinado: menor do que 0,5)

-C < 14 : menor do que 0,4 g/100g

-canola: menor nível de saturados

**FONTE: FABRICANTES** (Óleos comerciais)

Óleo vegetal	Ácidos Graxos (g/100g)		
	Saturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
oliva	16	72	12
girassol	11	23	58
canola	5	60	27
milho	15	33	44
soja	15	22	55

## ANEXO C- COMPOSIÇÃO DAS PEPTONAS SEGUNDO FABRICANTES

### Peptona de caseína / Biobrás

-obtida pela digestão pancreática de caseína, rica em triptofano

### Peptona de carne / Micromed

-obtida pela digestão péptica de proteína animal (carne?)

-N total-13,3%; N alfa-amino-3,4%

### Peptona de gelatina / Biobrás

-hidrolisado pancreático de gelatina, com baixo conteúdo de cistina, triptofano e ausência de carboidratos

N total-16,45%; N alfa amino-2,63%

### Peptona bacteriológica:

**Biobrás:** combinação de peptonas de caseína e de carne

**Oxoid:** combinação de peptonas de carne, hidrolisado pancreático e hidrolisado papaínico.

N total- 14%; N alfa amino - 2,6%