

FLÁVIA AUGUSTA GUILHERME GONÇALVES

PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR
LEVEDURAS EM CULTIVO SUBMERSO

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

FLÁVIA AUGUSTA GUILHERME GONÇALVES

PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR LEVEDURA EM CULTIVO SUBMERSO

Dissertação 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 Mestre em Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Gecernir Colen
Co-orientador: Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mestranda: _____

Flávia Augusta Guilherme Gonçalves

Orientador: _____

Prof. Dr. Gecernir Colen

Co-Orientador: _____

Prof. Dr. Tasso Moraes e Santos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mais uma etapa vencida em minha vida; ao professor doutor Gecernir Colen, pela orientação deste trabalho e ao professor doutor Tasso Moraes e Santos, pela co-orientação.

Gostaria de agradecer também a colaboração do Professor doutor Carlos Augusto Rosa e da colega Carol Lílian Coelho Silva, do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do ICB/UFMG, por terem cedido e identificado algumas leveduras do trabalho.

Também sou grata aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, por contribuírem com a minha formação científica; à CAPES e ao CNPq pelo financiamento do trabalho.

Agradeço, também, aos meus pais, irmão e namorado, pelo carinho, incentivo; apoio e paciência em todos os momentos; aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos; aos amigos da vida toda e aos familiares (em especial aos primos), por terem acompanhado todo esse processo; e a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
RESUMO.....	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Enzimas	14
2.2 Enzimas lipolíticas.....	15
2.3 Lipases.....	16
2.4 Lipases de origem microbiana	16
2.4.1 Lipases de leveduras.....	18
2.4.2 Aplicações tecnológicas das lipases	19
2.4.3 Reações catalisadas por lipases	20
2.4.4 Condições de cultivo e produção de lipases.....	21
2.4.4.1 Meio de cultura	21
2.5 Atividade lipolítica	29
2.5.1 Método titulométrico	29
2.5.2 Ensaio em placa de Petri (Difusão em gel).....	30
2.5.3 Análises espectrofotométrica e fluorimétrica	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material	32
3.2 Microrganismos.....	32
3.3 Meios de cultura para seleção primária de cepas potencialmente produtoras de lipase.....	33
3.4 Meios de cultura para seleção secundária das cepas mais promissoras.....	33
3.5 Metodologia	34
3.5.1 Seleção primária de cepas potencialmente produtoras de lipase	34
3.5.1.1 Fermentação em substrato líquido (FSL)	34
3.5.2 Seleção secundária de cepas potencialmente produtoras de lipase	35
3.5.3 Otimização da produção de lipase pela levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Seleção de cepas potencialmente produtoras, em placas de Petri.....	41
4.2 Capacidade de produção de lipase pelas cepas de levedura em condições de fermentação em substrato líquido (FSL)	42
4.3 Seleção da cepa mais promissora	44
4.4 Otimização da produção de lipase pela levedura <i>Y. lipolytica</i>	46

4.4.1 Ensaiois preliminares	46
5 CONCLUSÃO	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificação dos parâmetros, peptona de caseína, peptona de carne e pH, nos níveis basal, inferior e superior.....	37
Tabela 2 – Especificação dos parâmetros, peptona de caseína, peptona de carne e pH, nos níveis basal, inferior e superior.....	38
Tabela 3 – Planejamento fatorial completo 2 ³ utilizado para formulações de meios de cultura para cada ensaio.	38
Tabela 4 – Tamanho da colônia e de halo de lipólise em meio de cultura em placa, em função do tempo de cultivo.....	41
Tabela 5 – Detecção, em tampão fosfato pH 6,0, da atividade lipásica das preparações enzimáticas obtidas com os cultivos das leveduras em Meio I e Meio II.	42
Tabela 6 – Detecção, em tampão TRIS-HCl pH 8,0, da atividade lipásica das preparações enzimáticas obtidas com os cultivos das leveduras em Meio I e Meio II.....	43
Tabela 7 – Medida da atividade lipásica, presentes nas preparações enzimáticas das três cepas mais promissoras, por meio do diâmetro do halo e pelo método titulométrico, sob diferentes condições de análises.....	45
Tabela 8 – Produção e dosagem da atividade lipásica pela <i>Y. lipolytica</i> em Meio I em diferentes condições de reação quanto ao pH e temperatura de incubação	46
Tabela 9 – Produção e dosagem da atividade lipásica pela <i>Y. lipolytica</i> em Meio I adicionado de extrato de levedura em diferentes condições de reação quanto ao pH e temperatura de incubação.....	47
Tabela 10 – Atividade lipásica determinada pelo diâmetro de halo lipolítico (em pH 6,0 e pH 8,9) das preparações originárias dos meios com extrato de levedura (A) e sem extrato de levedura (B).....	48
Tabela 11 – Delineamento experimental de 1 ^a ordem e os rendimentos obtidos em duplicata, em cada combinação de níveis.....	49
Tabela 12 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes	50
Tabela 13 – Delineamento experimental de 1 ^a ordem e os rendimentos obtidos em duplicata, em cada combinação de níveis.....	52
Tabela 14 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes, segundo fatorial 2 ³ (matriz da tabela 13).....	52
Tabela 15 – Valores experimentais e valores estimados da produção de lipase pela <i>Y. lipolytica</i> na condição 3	54
Tabela 16 – ANOVA para o modelo ajustado.....	54
Tabela 17 – Matriz de planejamento 2 ³ com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 1 – tampão-fosfato pH 6,0.....	64
Tabela 19 – Matriz de planejamento 2 ³ com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 2 – tampão TRIS-HCl pH 8,0.....	65
Tabela 20 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes	65
Tabela 21 – Matriz de planejamento 2 ³ com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 2 – tampão TRIS-HCl pH 8,0.....	66
Tabela 22 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Atividade lipásica em relação aos ensaios.....	50
Figura 2 – Atividade lipásica em relação aos ensaios.....	53
Figura 3 – Comparação da produção de lipase nas condições 1 e 3.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AEP - Ágar Emulsão de Óleo de Oliva em Álcool Polivinílico
- AEPV - Ágar Emulsão de Óleo de Oliva em Álcool Polivinílico com Corante Azul Victoria
- ASDEL - Ágar Sabouraud Dextrosado com Extrato de Levedura
- AT - Ágar Tributirina
- ATV - Ágar Tributirina com Corante Azul Victoria
- AW - Atividade da água
- CG - Cromatografia Gasosa
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- FSL - Fermentação em Substrato Líquido
- ICB - Instituto de Ciências Biológicas
- LMI - Laboratório de Microbiologia Industrial
- RPM - Rotação Por Minuto

RESUMO

No presente estudo foi avaliada a capacidade de produção de 11 cepas de leveduras, previamente isoladas da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*) e de amostras de terra enriquecidas com partes do fruto do abacateiro. As cepas foram identificadas pelo Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do ICB/UFMG. A seleção primária foi realizada em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva ou tributirina, sais biliares e nutrientes. As cepas lipolíticas foram identificadas pela presença de halo ao redor das colônias. Três cepas foram consideradas produtoras em potencial pela capacidade de produção em condições de cultivo submerso (seleção secundária). Nesta etapa de seleção secundária dois meios de cultura líquidos (Meio I e Meio II) foram testados, e o Meio I foi selecionado, por ter sido mais eficaz, apresentando uma maior produção da enzima. Os ensaios de produção em cultivo submerso foram em frascos agitados a 150 rpm e 30°C, durante 72 horas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: óleo de oliva (5,0; 10,0 e 15,0 mL/L); peptona bacteriológica (30,0; 40,0; 50,0 g/L) e pH inicial (4,0; 5,0; 6,0), aplicando-se um planejamento fatorial completo. As interações das variáveis: peptona bacteriológica e pH; ou peptona, pH e óleo de oliva mostraram-se significativas em 90% de confiança. A cepa melhor produtora, identificada como *Yarrowia lipolytica*, produziu 3,0 U/mL de lipase nas melhores condições, nas quais a produção de lipase foi aumentada em cerca de 5 vezes mais quando comparado ao resultado obtido com o meio basal.

Palavras-chave: levedura; lipase; *Yarrowia lipolytica*; cultivo submerso.

ABSTRACT

This work aimed at evaluating the production capacity of 11 yeast strains, previously isolated from the pequi pulp (*Caryocar brasiliense*) as well as from soil samples enriched with parts of avocado fruit. The strains had been identified by the Yeasts Ecology and Biotechnology Laboratory of ICB/UFMG. The primary screening was made in agar culture medium containing emulsion of olive oil tributirin, bile salts and nutrients. The lipolytic strains were identified by a clear halo around the colonies. Three strains were considered potential producers due to their ability to produce extracellular lipase in submerge culture (secondary screening). On this secondary screening, two liquid culture media (1st Medium & 2nd Medium) were tested, of which the first medium was chosen because it proved more efficient due to its high enzymatic production. The production assays in liquid substrate fermentation were carried out in shake flasks (150 rpm) at 30°C for 72 hours. The following parameters were evaluated: olive oil (5,0; 10,0; 15,0 mL/L); bacteriological peptone (30,0; 40,0; 50,0 g/L) and initial pH (4,0; 5,0; 6,0). The best producing yeast, a *Yarrowia lipolytica* strain, produced 3,0 U/mL of extracellular lipase in the ideal conditions. The combined effects optimization were analyzed using the Response Surface Methodology (RSM). The interaction factors: bacteriological peptone and pH; or peptone, pH and olive oil showed a significant result of 90% of confiability, of which the lipase production increased 5 times as much as that of the previously achieved by basal medium.

Key-words: extracelullar lipase; yeast; *Yarrowia lipolytica*; submerge cultive

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. São muito ativas e versáteis, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido. Enzimas são inerentes à maioria das matérias-primas alimentares e podem influenciar o processamento dos alimentos de várias formas, desejáveis ou não. A grande vantagem das enzimas é que elas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, o que é comum em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Reed, 1975; Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003).

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) e as esterases (EC 3.1.1.1) fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídeos amplamente distribuídas na natureza. As lipases verdadeiras hidrolisam, total ou parcialmente o triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, agindo especificamente na interface óleo/água. Já as esterases agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídios (Reed, 1975; Jaeger & Eggert, 2002; Carvalho et al., 2003).

Atualmente, as lipases têm sido de grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de monoglicerídios, ácidos graxos, agentes biosensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídeos estruturados ou biomodificados (Oliveira, 2000).

A área da biotecnologia tem mostrado grande interesse pelas lipases de origem microbiana, sendo essas as mais estudadas atualmente. Este interesse é devido às características próprias das enzimas, como estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial, principalmente na indústria alimentícia, uma vez que permite maior controle dos parâmetros (pH, temperatura) e maior eficiência (Reed, 1975). No entanto, existem limitações para a utilização industrial da lipase microbiana, como o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima. Para contornar isso é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos pelo emprego de

microrganismos melhores produtores e pela otimização das condições de cultivo. (Hadeball, 1991).

Dentre os microrganismos produtores de lipases estão os fungos filamentosos, que atualmente são os mais utilizados nos processos biotecnológicos, as bactérias e as leveduras.

Leveduras são fungos unicelulares capazes de reproduzir-se vegetativamente por brotamento das células ou, mais raramente, por fissão celular. Essa característica confere às leveduras a capacidade de multiplicar-se rapidamente em ambientes líquidos, que favorecem a dispersão das células (Pitt & Hocking, 1999). Apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* e *Yarrowia*. (Hadeball, 1991).

As lipases agem nos alimentos gordurosos hidrolisando os lipídios quase que totalmente, o que resulta no aparecimento de sabores muitas vezes indesejáveis. Participam do processo de rancificação de derivados de leite, de carnes, de peixes e de outros produtos ricos em lipídeos (Reed, 1975; Zarevúcka et al., 1995; Jaeger & Reetz, 1998; Hiol et al., 2000). Mas também são responsáveis pelo aparecimento de características desejáveis em determinados produtos como o desenvolvimento de sabores específicos.

Os estudos sobre a aplicação de lipases para obtenção de biodiesel têm aumentado significativamente nos últimos anos (Ma et al. 1999; Shieh et al., 2003). No entanto, o campo mais importante de aplicação da lipase é a sua adição em detergentes (Jaeger & Reetz, 1998; Cardenas et al., 2001a). Outro campo de aplicação de crescente importância é o uso de lipases na indústria de papel. A lipase, neste caso, é utilizada para remover os componentes hidrofóbicos da madeira, que causam alguns problemas durante a fabricação do papel (Jaeger & Reetz, 1998).

Vários fatores influenciam a síntese de lipase pelos microrganismos. Os principais são: fonte de carbono; fonte de nitrogênio; presença de indutores, presença de estimuladores e inibidores; presença de agentes que afetam a interface óleo/água; temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo (Hadeball, 1991; Obradors et al., 1993; Montesino et al., 1996; Dominguez et al., 2003).

Devido à especificidade das lipases e sua ampla aplicação tecnológica, verifica-se que é necessário pesquisar novas cepas de microrganismos produtores. Percebeu-se a necessidade de avaliar leveduras com relação à atividade lipolítica, principalmente por apresentarem características específicas. Além de não existirem muitos estudos nessa área envolvendo leveduras.

O presente estudo teve como objetivo geral estudar e otimizar a produção de lipases por levedura. Para atingir esse objetivo seguiram-se os seguintes passos: 1 – seleção, dentre as cepas de leveduras do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Industrial da Faculdade de Farmácia da UFMG, daquelas de maior potencial de produção; 2 – seleção da cepa da levedura mais promissora; 3 – estudo das condições de cultivo submerso em frascos agitados da cepa selecionada sobre a produção de lipase, tais como efeito das fontes de carbono e de nitrogênio; 4 – otimização da produção de lipase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Enzimas

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. Além de serem muito ativas e versáteis, elas executam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar o pH ou adicionar algum efetor. Além disso, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003).

Enzimas são inerentes à maioria das matérias-primas alimentares de origem vegetal e podem influenciar o processamento dos alimentos de várias formas. Em determinadas situações essa influência pode ser indesejável, como amolecimento do pepino em conserva pela ação de enzimas pécticas; ou desejável, como a presença de amilase na batata doce o que lhe confere uma melhor textura bem como a pectinase, presente na uva e na maçã, usada pra clarificar sucos de frutas. Existem diversas maneiras de se controlar a ação enzimática no alimento, sendo o branqueamento, um dos métodos de conservação mais utilizados na indústria (Reed, 1975).

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 (mistura de enzimas 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 do estômago de bezerros); e a catalase (extraída do fígado e sangue de animais, bem como microrganismos).

A enzima é classificada de acordo com sua especificidade. Até o século XIX,

muitas enzimas foram nomeadas empregando-se o sufixo “ina”, geralmente em seguida ao nome da fonte da tal enzima. Muitos desses nomes têm sido usados até hoje (bromelina, papaína, pancreatina, etc.). No final do século XIX, E. Duclaux sugeriu o uso do sufixo “ase”, precedido pelo nome do substrato da enzima (lipase, protease, etc.). Esse critério tem sido adotado até os dias atuais. Em 1956, a União Internacional de Bioquímica (IUB) propôs um programa para estabelecer a classificação e a nomenclatura de enzimas. Em 1961 a nova classificação foi adotada oficialmente (Reed, 1975).

2.2 Enzimas lipolíticas

As lipases e as esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (Reed, 1975; Oliveira, 2000). As enzimas lipolíticas, juntamente com as celulasas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (Jaeger & Eggert, 2002).

Essas enzimas têm grande importância fisiológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, essenciais aos processos metabólicos, como o transporte dos ácidos graxos e, sua oxidação e síntese de glicerídeos e fosfolipídios (Reed, 1975).

Ainda existe certa confusão em torno da definição exata dos termos lipases e esterases. As lipases (EC 3.1.1.3), denominadas verdadeiras, são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, apresentando a capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. As esterases (EC 3.1.1.1) são as enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídeos (acilhidrolases, colesterolesterase, tioesterases) (Reed, 1975; Carvalho et al., 2003).

2.3 Lipases

As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização (esterificação intramolecular), além de agirem sobre compostos que causam ranços. Essa flexibilidade aliada às diferentes lipases confere a essas enzimas um potencial enorme de aplicações (Levy et al., 2003; Pastore et al., 2003).

De acordo com a IUB, a lipase catalisa a reação hidrolítica seguinte:



Embora as lipases sejam estudadas há alguns anos e possam ser produzidas em larga escala, ainda têm sido relativamente pouco empregadas industrialmente (Carvalho et al, 2003). No entanto, o interesse pelas lipases de microrganismos, animais e plantas tem crescido na última década, já que podem ser aplicadas na área de química fina, em reações de biotransformações e sínteses orgânicas (Brush et al., 1999). Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases. Esses estudos incluem a imobilização da enzima, estudos cinéticos e desenvolvimento de biorreatores (Carvalho et al., 2003). A utilização das lipases como ferramenta tecnológica representa uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de monoglicerídios, ácidos graxos, agentes biotensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídeos estruturados ou biomodificados (Oliveira, 2000). Com essa perspectiva, percebe-se que essas enzimas possuem grande importância econômica e industrial.

2.4 Lipases de origem microbiana

As enzimas têm sido utilizadas pelo ser humano há milhares de anos de duas formas: direta, pelo emprego de extratos enzimáticos brutos de origem animal ou vegetal e, indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. A produção e o uso de enzimas de origem microbiana, sob uma forma controlada tem tido um maior enfoque

na indústria biotecnológica (Neidleman, 1991; Jaeger & Eggert, 2002).

As lipases de origem microbiana são muito estudadas devido à estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial, principalmente na indústria alimentícia, uma vez que permite maior controle e maior eficiência, o que é difícil de obter-se com lipases de outras fontes (Reed, 1975). Além disso, a produção de enzimas por microrganismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animais e vegetais (Jesus et al., 1999; Alves et al., 2002).

Para se obter elevado nível de produção de lipases microbianas, é necessário não somente uma eficiente expressão dos genes correspondentes, mas também a aplicação, pelo pesquisador, de conhecimentos sobre os mecanismos moleculares que controlam a secreção e produção dessas enzimas (Jaeger & Eggert, 2002).

Uma das limitações atuais para a utilização industrial extensiva das lipases de origem microbiana tem sido o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima. Portanto, é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos pelo emprego de novos microrganismos melhores produtores e pela otimização das condições de cultivo. Como a matéria-prima do meio de cultura contribui significativamente para o custo total da produção, a redução das quantidades de matéria-prima e o emprego de materiais mais baratos, poderia ser, também, uma estratégia adequada para aumentar a produtividade do processo (Dominguez et al., 2003). Os microrganismos produtores de lipases podem contaminar alimentos causando grandes prejuízos principalmente à indústria de laticínios e óleos vegetais (Hiol et al., 2000).

Muitos microrganismos são conhecidos por produzir diferentes tipos de lipases de acordo com as condições de cultivo tais como pH, composição do meio de cultura, temperatura e tempo de cultivo, além da ação da enzima em relação à especificidade do substrato (Hadeball, 1991).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases (Cardenas et al.; 2001b). As espécies de fungos filamentosos maiores produtoras de lipase são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (Oliveira, 2000). Dentre as leveduras a *Candida rugosa* é que mais tem sido empregada em processos industriais (Hadeball, 1991).

2.4.1 Lipases de leveduras

Leveduras são fungos unicelulares capazes de reproduzir-se assexuadamente através do brotamento das células e esporulação ou, mais raramente, por fissão celular. Essa característica confere às leveduras a capacidade de multiplicar-se rapidamente em ambientes líquidos, que favorecem a dispersão das células. Muitas leveduras crescem sob condições anaeróbias, o que também favorece o crescimento em líquidos. Por outro lado, a reprodução vegetativa das leveduras não favorece o espalhamento das colônias na superfície dos alimentos sólidos ou a sua penetração nesse tipo de produto, nos quais os fungos filamentosos são favorecidos (Pitt & Hocking, 1999).

Como todos os fungos filamentosos, as leveduras também crescem mais lentamente do que as bactérias, não multiplicando-se bem em ambientes que permitem o crescimento bacteriano, ou seja, condições de alta atividade de água, no pH próximo ao neutro e na temperaturas ótima de bactérias (Pitt & Hocking, 1999).

O primeiro registro de uma levedura produtora de lipase (*Mycotorula lipolítica*) aconteceu no século passado (Peters & Nelson, 1948). Apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lípases. São eles: *Candida*; *Saccharomyces*; *Saccharomycopsis* e *Yarrowia*. Enquanto as lipases de muitas espécies de fungos filamentosos e de bactérias são produzidas largamente em escala industrial, apenas a lipase da levedura *Candida rugosa* tem tido papel de destaque no cenário biotecnológico (Hadeball, 1991).

A produção de lipase por *C. rugosa* pode ser induzida pela adição de ácidos graxos ao meio de cultura, como o ácido oléico. A lipase dessa levedura apresenta-se sob várias isoformas com pequenas diferenças nas suas propriedades catalíticas (Obradors, et al., 1993; Sharma et al., 2001).

Tem sido demonstrado que as lipases produzidas pelo gênero *Candida* apresentam excelente capacidade de esterificação, sem demonstrar especificidade posicional para os triglicerídeos. Além de apresentarem aplicação potencial para a síntese de ésteres de cadeia curta que podem ser usados tanto como compostos flavorizantes ou aromatizantes, bem como combustíveis na forma de biodiesel. Nesse último caso, como ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (Nelson et al., 1996; Lee et al., 2002; Tan et al., 2003).

2.4.2 Aplicações tecnológicas das lipases

As lipases são responsáveis pelo aparecimento de características desejáveis, como o desenvolvimento de sabor característicos em alguns produtos, no caso dos queijos maturados do tipo Roquefort e Camembert e em diversos queijos italianos. Além de conferir sabor característico de chocolate quando presentes no leite, desde que empregadas em condições controladas. Entretanto, quando o processo não é bem controlado, a lipase atua sobre os lipídeos, hidrolisando-os quase que totalmente, o que resulta no aparecimento de sabores indesejáveis e no processo de rancificação de derivados de leite, de carnes, de peixes e de outros produtos ricos em lipídeos (Reed, 1975; Zarevúcka et al., 1995; Jaeger & Reetz, 1998; Hiol et al., 2000). A posição, o tamanho da cadeia e o grau de insaturação dos ácidos graxos influenciam não apenas as propriedades físicas, mas também o valor sensorial de um triglicerídeo (Jaeger & Reetz, 1998).

Os estudos sobre a aplicação de lipases para obtenção de biodiesel têm aumentado significativamente nos últimos anos. O crescente interesse em obter combustíveis alternativos é conseqüência da escassez de petróleo e do menor impacto ambiental provocado pelos biocombustíveis. Esses estudos iniciaram-se nos anos 30, quando óleos vegetais foram testados em máquinas nas quais se usava diesel como combustível (Lee et al., 2002).

O biodiesel é formado pelos ésteres monoalcil de óleos e gorduras e podem ser utilizados como misturas com os combustíveis derivados de petróleo, o diesel. Recentemente as pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos de girassol, colza, soja e gordura animal. Sabendo-se que várias matérias-primas agro-pecuárias são ricas em gorduras e óleos, o emprego delas como fontes de bio-combustíveis ganha uma notável importância tecnológica, social e econômica (Lee et al., 2002).

Atualmente, sob a ótica comercial, o campo mais importante de aplicação da lipase tem sido a sua adição em detergentes devido à sua capacidade de hidrolisar lipídios, com utilidade doméstica e industrial (Jaeger & Reetz, 1998; Cardenas et al., 2001a). Outro campo de aplicação de crescente importância é o uso de lipases na indústria de papel. A lipase, neste caso, é utilizada para remover os componentes hidrofóbicos (triglicerídeos e ceras) da madeira, que causam alguns problemas durante a fabricação do papel (Jaeger & Reetz, 1998).

Do ponto de vista tecnológico, as lipases produzidas por fungos filamentosos têm sido mais utilizadas, pois essas são, em geral, extracelulares, o que facilita sua extração do meio de fermentação (Maia et al., 1999; Jesus et al., 1999; Shirazi et al., 1998).

2.4.3 Reações catalisadas por lipases

As lipases são enzimas solúveis em água que catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis. Elas atuam somente na interface óleo-água, não obedecendo portanto, às equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, uma vez que essas são válidas apenas para reações catalíticas que ocorrem em uma fase homogênea. Assim, as reações catalisadas por lipases são analisadas, em geral, utilizando-se o substrato lipídico sob a forma de emulsão. Por outro lado, à medida que a reação se desenvolve (formação de produtos e a degradação do substrato), a composição da interface óleo-água na emulsão varia (Jaeger & Reetz, 1998; Oliveira, 2000).

A velocidade da reação não é determinada pela concentração de lipídeos na emulsão (triacilglicerol), mas sim pela área superficial da emulsão das partículas por unidade de volume. A atividade lipásica bem como a sua produção e, indiretamente, a taxa de crescimento do microrganismo produtor são influenciadas pelo tamanho das partículas da emulsão e sua estabilidade (Hadeball, 1991).

O tamanho das gotículas de óleo e a área da interface sofrem mudanças contínuas, e assim, a atividade lipásica varia não só em função da concentração do substrato, mas também, em função do tamanho da área da interface óleo-água. É importante que haja na emulsão do substrato uma interface ampla e estável de gotículas lipídicas, para o ensaio controlado da atividade lipásica. Somente em emulsões de óleo em água (O/A) perfeitamente dispersas, homogêneas e bem estabilizadas, as determinações da atividade lipásica fornecem resultados reprodutivos (Oliveira, 2000).

Qualquer tipo de modificação na interface reflete na atividade lipásica e sua síntese. Essas interferências podem ser causadas por proteínas, sais biliares, ácidos graxos, mono e diacilgliceróis, resultantes do triglicerol durante a ação da lipase (Hadeball, 1991).

2.4.4 Condições de cultivo e produção de lipases

Vários fatores influenciam na síntese de lipase pelos microrganismos. Os principais são: fonte de carbono; fonte de nitrogênio; presença de indutores, presença de estimuladores e inibidores, presença de agentes que afetam a interface óleo/água, temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo (Hadeball, 1991; Obradors et al., 1993; Montesino et al., 1996; Dominguez et al., 2003).

Para obter a condição ótima de produção da lipase é necessário estudar a influência desses fatores na biossíntese da lipase. Os efeitos desses fatores afetam todos os tipos de microrganismos produtores de lipase (Hadeball, 1991).

A utilização de uma intensa agitação mecânica nos biorreatores ajuda a fornecer uma área interfacial adequada. Agitação intensa e interfaces líquido-líquido são freqüentes durante a hidrólise de lipases (Rooney & Weatherley, 2001). Fatores físicos como pressão atmosférica e distribuição do lipídio também são determinantes para a manifestação da atividade lipásica (Jaeger et al., 1994).

A produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento (Zarevucka et al.; 2005). A atividade lipásica diminui rapidamente após alcançar o nível máximo, pois ocorre a sua proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (Dalmau et al., 2000).

2.4.4.1 Meio de cultura

Enzimas extracelulares podem ser produzidas em meio sólido ou líquido, que se diferenciam pela quantidade de água livre (*aw*). A produção de lipase microbiana pode ser obtida no processo de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) ou no processo de Fermentação em Substrato Líquido (FSL). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura adequado que tenha um baixo custo (Lin et al. 2006). Para obter uma preparação enzimática com alto grau de pureza, com propriedades específicas, é necessário conhecer e estabelecer parâmetros como pH e temperatura (Benjamin & Pandey, 2001).

2.4.4.1.1 Fonte de Carbono

O carbono é o principal componente da célula e algumas gorduras ou óleos têm

sido utilizados como fonte de carbono e indutores da produção da lipase por microrganismos (Tan et al., 2003). A presença da lipase permite ao microrganismo utilizar lipídeos de fonte animal e vegetal como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Hadeball, 1991).

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como substrato para a produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros álcoois e ácidos graxos (Hadeball, 1991).

Meios de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos têm sido empregados na obtenção de um rendimento elevado de lipase. A atividade lipásica tem sido detectada em meio de cultura que contém substratos lipídicos (óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja), o que sugere que a enzima seja induzida por esses substratos (Shirazi et al., 1998; Deive et al., 2003).

Substratos lipídicos e seus metabólicos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipase. Outros substratos, não relacionados à gorduras e óleos, como os carboidratos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para síntese de lipase, enquanto os substratos lipídicos, principalmente os ácidos graxos, são excelentes indutores de lipase (Lotti et al., 1998; Dalmau et al., 2000).

Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o microrganismo utiliza - o de modo seqüencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inóculo do microrganismo em glicerol e ácidos-graxos livres. Em seguida o microrganismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção da lipase. Finalmente, os ácidos graxos livres são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (Montesino et al., 1996).

A fonte de carbono pode estimular ou inibir a síntese de lipase. Além disso, existem outros compostos que podem influenciar a produção de lipase por leveduras (Hadeball, 1991). A levedura *C. rugosa* consegue sintetizar a lipase mesmo sem a presença de um indutor, mas em menor quantidade quando comparada à presença desta fonte de carbono como indutor (Lotti et al., 1998).

O ácido oléico é conhecido como indutor e a glicose como repressora da síntese de lipase. No estudo realizado por Obradors e colaboradores (1993), o ácido oléico foi selecionado entre outros ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica, já que se obteve eficiente rendimento de biomassa e de produção de lipase.

Foi detectada alta atividade da lipase extracelular quando *Fusarium solani* foi crescido em meio contendo peptona e óleo de oliva. Entretanto, a presença de glicose parece ter mascarado o efeito estimulador do óleo de oliva. Foi verificado que a concentração de peptona abaixo de 3% (p/v) reduziu a produção de lipase enquanto que o aumento na concentração de óleo de oliva acima de 0,5% (v/v) não estimulou a produção da enzima (Maia et al., 1999).

Shirazi et al. (1998) avaliaram sete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* quanto à produção de enzima com atividade lipásica, em placas de Petri contendo agar tributirina, verificou que a cepa DMS1848 apresentou maior atividade. Quando essa cepa foi crescida em frascos agitados contendo meio de cultura líquido com glicose ou substratos lipídicos como a principal fonte de carbono, não foi detectada atividade lipásica no meio com glicose. No entanto, em meios contendo substratos lipídicos, como óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja, houve produção da lipase, o que sugere que esses substratos induzem a formação da enzima. A produção máxima de lipase extracelular foi obtida com óleo de oliva.

Segundo Jesus et al. (1999) o fungo filamentoso *Penicillium restrictum* apresentou excelente produção de lipase (20 U/mL) quando crescido na presença de óleo de babaçu. Por outro lado, o baixo percentual de hidrólise obtido com o mesmo óleo foi uma indicação, segundo os autores, de provável inibição da lipase pelos ácidos graxos liberados, pois este óleo contém cerca de 45% de ácido láurico (C12:0), um ácido graxo de cadeia média. Os autores ainda observaram que a enzima também apresentou baixa atividade hidrolítica com triglicerídeos de cadeia curta.

O óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico (C18:1) e é comumente utilizado com um substrato padrão para determinação da atividade lipolítica. Montesino e seus colaboradores (1996) confirmaram que o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, é o principal indutor da produção de lipase.

Segundo Deive et al. (2003) meios de cultura que continham ácido oléico e tributirina propiciaram bom crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. O ácido oléico demonstrou ser boa fonte de carbono para a levedura, embora propiciasse aumento da biomassa, não promoveu a secreção da lipase, apesar de ter promovido o aparecimento de outras atividades enzimáticas. A tributirina, entretanto, apesar de não promover o crescimento do fungo, mostrou-se um indutor de produção da lipase. Isto foi explicado como possível preferência da enzima para triacilgliceróis formados com ácidos graxos de cadeia curta (Deive et al., 2003). Por outro lado, Montesino et al. (1966) observaram que a produção de lipase por *C. rugosa* estava associada ao

crescimento microbiano e que o ácido oléico mostrou-se melhor indutor do que o óleo de oliva, apesar de ter ocorrido maior crescimento com o óleo de oliva. Isso sugere um papel diferente da lipase nos dois casos. Utilizando-se um substrato insolúvel como fonte de carbono, a lipase produzida facilita a associação da célula do fungo com esse substrato, permitindo assim o maior crescimento. Estes autores ainda afirmaram que leveduras acumulam lipídeos quando existe carência de algum nutriente em particular, normalmente o nitrogênio, e um excesso de carbono. Quando um determinado nutriente acaba, o crescimento celular cessa e o excesso de carbono continua sendo assimilado pela célula e transformado em lipídeo.

Pastore et al (2003) encontraram resultados diferentes para o extrato bruto enzimático obtido de *Rhizopus* sp. que apresentou maiores valores de hidrólise para gordura de coco em comparação com outros substratos (óleo de oliva e gordura do leite de cabra). Isso indicou boa afinidade para ácidos graxos saturados de cadeia média, como o ácido láurico.

Dentre os vários óleos, triglicerídeos e ácidos graxos testados, a trioleína permitiu uma produção máxima de lipase por uma cepa de *Geotrichum*. Entretanto, os óleos de colza, de soja e de oliva também demonstraram ser efetivos para produção da lipase. Na presença de triacilglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia curta (tributirina e tricaprillina) a cepa de *Geotrichum* produziu pouca lipase (Ginalska, 2004).

Segundo Obradors et al. (1993), o ácido caprílico, em altas concentrações, mostrou-se tóxico para *C. rugosa*, já que a levedura não conseguiu metabolizá-lo.

Ácidos graxos insaturados (ácido oléico, ácido linoléico e ácido elaídico) apresentaram um efeito positivo na síntese de lipase pela *Candida lipolytica*. Mas em contrapartida, os ácidos graxos saturados não apresentaram efeitos significativos (Hadeball, 1991).

A produção de lipase pela *C. rugosa* tem sido realizada, em geral, com misturas de fontes de carbono diferentes, geralmente açúcares (sacarose e glicose) e lipídeos (óleos vegetais, ácidos graxos), para se obter bom crescimento microbiano e a indução de produção da enzima (Montesino et al., 1996).

Ginalska et al. (2004) não conseguiram bons resultados empregando carboidratos simples (maltose, galactose, xilose, frutose, lactose e sacarose) como fonte de carbono única, apesar da atividade ter sido detectada. A cepa *Geotrichium*-like R59 cresceu e produziu lipase em todos os meios testados, sendo a inibição da produção de lipase por alguns açúcares, explicada pela capacidade dos

microrganismos de metabolizar rapidamente tais carboidratos ou pela formação de certos metabólitos lipídicos inclusive durante o metabolismo.

A adição de gorduras e óleos (0,2%) ao meio de cultura, aumentou a produção da lipase pela levedura *Torulopsis ernobii* de 18% para 97%, em 40 horas. A maior produção foi obtida com o óleo de oliva, no entanto, quantidades de óleo de oliva maiores que 0,8% conferiram um menor aumento (60%). Triglicerídeos e ácidos graxos de peso molecular elevado (ácidos esteárico, palmítico e oléico) também aumentaram a atividade lipásica, enquanto os ácidos graxos de baixo peso molecular (ácido láurico) inibiram a produção de lipase. Já o glicerol não apresentou nenhum efeito na produção de lipase (Yoshida et al., 1968).

2.4.4.1.2 Fonte de Nitrogênio

A fonte de nitrogênio é um fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas lipolíticas. Tanto o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico, apresentam um importante papel na síntese da enzima (Tan et al.; 2003). Dentre os compostos nitrogenados usados para produção de lipase, as fontes de nitrogênio mais comuns empregadas têm sido: hidrolisados ácidos de proteínas; água de maceração de milho; farinha de soja; hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas); aminoácidos; uréia; nitrato e sais de amônia (Hadeball, 1991; Montesinos et al., 1996). A seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do microrganismo usado e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (Montesinos et al., 1996).

Tan e colaboradores (2003) mostraram que a soja e a caseína foram as melhores fontes de nitrogênio orgânico para produção de lipase pela levedura *Candida* sp. A soja contém além da proteína o óleo que favorece a síntese de lipase. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico testadas o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou o melhor resultado. No entanto, os trabalhos de Ginalska et al. (2004) e Shirazi et al. (1998) mostraram que fontes inorgânicas de nitrogênio tais como nitrato de amônio e sulfato de amônio apresentaram efeito inibitório para a produção de lipase.

Geralmente os microrganismos apresentam alta produção de lipase quando se utiliza fonte orgânica de nitrogênio e a uréia foi considerada a melhor fonte de nitrogênio para a produção da lipase por *Geotrichium*. (Ginalska et al., 2004).

Shirazi et al. (1998) testaram várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, como peptonas, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, uréia, sulfato

de amônio e nitrato de amônio, em meios contendo 1% de óleo de oliva como fonte de carbono. O extrato de levedura propiciou a maior produção de lipase.

Para verificar a influência sobre o crescimento da *Y. lipolytica* e a produção de lipase, várias fontes de nitrogênio (mineral e orgânica) foram testadas por Shirazi et al. (1998). As fontes de nitrogênio mineral não demonstraram efeito significativo tanto no crescimento da levedura quanto na produção de lipase. No entanto, observou-se um aumento da produção de lipase em meios contendo determinadas fontes de nitrogênio orgânico. Maior produção de lipase foi obtida na presença de hidrolisado de caseína, mais especificamente com triptona N1 (um hidrolisado tríptico de caseína, rico em amino-ácidos livres e peptídios pequenos), que se sobressaiu em relação aos outros substratos de nitrogênio orgânico e mineral. Desse modo, a utilização da triptona N1 pode ser considerada interessante do ponto de vista tecnológico mas, infelizmente, é de custo alto. (Fickers et al., 2004).

Dentre todas as fontes de nitrogênio orgânico testadas, o hidrolisado ácido, exclusivamente composto por aminoácidos livres, mas, pobre em triptofano, rendeu baixa produção de lipase, enquanto os outros hidrolisados de caseína, mas, enzimáticos, propiciaram alto rendimento de produção. Fickers e colaboradores (2004) sugerem que peptídeos específicos presentes nos hidrolisados enzimáticos podem regular a produção lipásica.

2.4.4.1.3 Relação carbono – nitrogênio

A produção de enzimas microbianas depende da relação carbono – nitrogênio (Hiol et al., 1999). Um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação 10:1 garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior, como 50:1, favorece a acumulação de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares. Dessa maneira, deve-se tomar o devido cuidado e atenção com a relação carbono – nitrogênio durante o cultivo em processos fermentativos (Carlile & Watkinson, 1997).

2.4.4.1.4 Quantidade de água disponível (atividade de água)

Muitos estudos da produção de enzimas lipolíticas por bactérias, fungos e

leveduras têm sido realizados em culturas submersas, isto é, em meios de culturas líquidos, ou seja, com alta atividade de água (Dominguez et al., 2003), identificada como Fermentação em Substrato Líquido (FSL).

Nos estudos de Deive e colaboradores (2003), a levedura *K. marxianus*, muito utilizada na produção comercial de enzimas, foi cultivada em um meio líquido suplementado de compostos essenciais, para obtenção de alta concentração de lipase.

A produção de enzimas microbianas pelo processo de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) tem aumentado bastante nos últimos anos. Uma cultura em estado sólido pode ser definida como aquela em que há crescimento microbiano em materiais sólidos, com baixa quantidade de água livre (Dominguez et al., 2003). A utilização do meio sólido faz com que haja um rápido crescimento da população de fungos filamentosos, permitindo a detecção de enzimas específicas (Alves et al., 2002).

Recentemente tem havido grande interesse da indústria em utilizar subprodutos gerados no processamento de alimentos, para a produção de lipase por fungos cultivados em meio de cultura semi-sólido. Várias pesquisas têm sido destinadas a investigar a síntese de lipase por leveduras, usando este tipo de cultura. Com o cultivo semi-sólido o tipo de substrato utilizado pode incrementar a produção de lipases, podendo ser empregado alimentos não utilizados e sobras agrícolas, ricos em ácidos graxos, triacilgliceróis e/ou açúcares (Dominguez et al., 2003). Utilizando-se essa matéria-prima barata o custo do processo fica mais baixo fazendo com que o total de capital investido na produção de lipase seja significativamente menor em culturas sólidas do que em submersas.

Na fermentação em substrato sólido o microrganismo não apenas cresce na superfície ou próximo a ela, como também penetra profundamente nos espaços intercelular e intracelular do suporte, havendo contato muito próximo entre o suporte e o microrganismo (Dominguez et al., 2003).

A adição de diferentes substratos lipídicos (óleos de girassol, de milho e de oliva) ao meio de cultura aumentou a produção de lipase em quantidades que variaram de acordo com o substrato empregado (Dominguez et al., 2003).

2.4.4.1.5 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. O carbono, o hidrogênio e o oxigênio são fornecidos sob a forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular, e de água. Já o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica). Os outros elementos (S, P, Mg e K) são fornecidos sob a forma de sais (Colen, 2006).

2.4.4.2 Temperatura

Os fungos, na sua maioria, são mesofílicos, isto é, apresentam faixa ótima de temperatura de crescimento entre 25-40°C. Alguns toleraram temperaturas próximas ao congelamento da água e outros temperaturas acima de 40°C (termotolerantes). A temperatura afeta os diferentemente parâmetros de crescimento microbiano, como, o tempo de adaptação (fase lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento em células, bem como influencia tanto o metabolismo primário quanto o secundário de vários modos (Carlile & Watkinson, 1997).

2.4.4.3 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 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 de ser obtido, pois as próprias substâncias usadas como tampões podem ser assimiladas ou podem ser tóxicas naquelas quantidades que seriam necessárias para se conseguir efetivo tamponamento. Apenas em bioreatores do tipo fermentadores o pH pode ser mantido constante durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio em um meio de cultura pode afetar o crescimento microbiano indiretamente, pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou, diretamente, pela sua ação nas superfícies celulares (Carlile & Watkinson, 1997).

2.5 Atividade lipolítica

A lipase libera ácidos graxos do substrato devido à sua ação hidrolítica. Assim como em qualquer reação enzimática, a atividade lipásica pode ser determinada direta ou indiretamente, pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos, ou seja, liberação de ácidos graxos.

Geralmente, a atividade lipásica é determinada pela dosagem do produto formado (ácido graxo) durante um tempo de incubação definido da enzima com o substrato. Os ácidos graxos produzidos pela hidrólise dos triglicerídeos podem ser quantificados por métodos titulométricos, colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos (Oliveira, 2000).

O método mais comum de determinação da atividade de lipases em um ensaio enzimático é pela titulação de ácidos graxos, liberados pela hidrólise de triglicerídeos de um óleo sob a forma de uma emulsão, obtida com goma arábica, carboximetil celulose ou álcool polivinílico como emulsificantes (Schmidt et al., 2005). A atividade enzimática da lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 micromol de ácido graxo livre da emulsão de óleo por minuto, nas condições do teste (concentração de substrato, em excesso; pH tamponado; temperatura e tempo de reação) (Hadeball, 1991).

2.5.1 Método titulométrico

Segundo Reed (1975), uma unidade de lipase fúngica pode ser definida como a quantidade de enzima que produz ácidos graxos equivalentes a 1 mL de solução de KOH 0,05M, dadas as condições experimentais (óleo de oliva, como substrato; concentração do substrato de 15%; tempo de reação 150 minutos; pH 5,6; temperatura, 30°C). Essa definição é arbitrária, podendo ser escolhidas diferentes condições da reação e diferente molaridade da solução alcalina tituladora. Na maioria das vezes um autor padroniza as condições de seus experimentos que podem diferir bastante de um autor para outro.

Lipases podem ser determinadas com vários substratos (óleo de oliva, glicerídeos sintéticos), com óleos emulsionados ou não emulsionados, em vários valores de pH, e diferentes tempos. Algumas vezes metodologias similares são usadas, mas com pequenas variações que interferem na determinação do resultado (Reed,

1975). A atividade lipásica também depende da solução tampão a ser usada. Maiores atividades foram observadas quando se utilizou tampão fosfato ao invés de tampão fosfato citrato ou Tris-HCl (Lima et al., 2004).

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).

2.5.2 Ensaio em placa de Petri (Difusão em gel)

A atividade lipásica pode ser detectada em placas de Petri, empregando-se um substrato lipídico incorporado ao gel de agar-agar que contenha um corante indicador (que reage com os ácidos graxos formados) ou em meio que permita visualizar halo transparente de lipólise (meio opaco). A atividade pode ser detectada em meios de cultura onde colônias de microrganismos produtores de lipase se desenvolvem ou em gel de agar, contendo, apenas, o substrato na presença de tampão apropriado e em condições de detecção do halo. No último caso, após a solidificação do gel, fura-se pequenos poços, onde é adicionada uma certa quantidade da preparação enzimática. Após incubação na temperatura desejada a lipólise faz com que seja formado um halo, região mais clara, ao redor do poço, devido aos ácidos graxos livres (Reed, 1975).

Segundo Sandoval & Marty (2007), ensaios em placa de Petri são mais sensíveis e permitem que seja realizada uma dosagem quantitativa e direta, mesmo que haja uma baixa quantidade de lipase.

Os óleos vegetais emulsionados são os substratos de escolha para as lipases, apesar da tributirina também ser utilizada, já que é substrato para outras esterases, sendo mais empregadas em programas de seleção de microrganismos produtores de lipases (Cardenas et al., 2001a)

2.5.3 Análises espectrofotométrica e fluorimétrica

Métodos cromatográficos como a cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são geralmente usados para caracterização de enzimas, mas não são aplicados como métodos de determinação (Schmidt et al., 2005). Segundo os mesmos autores, as análises por fluorescências apresentam vantagens, tais como a alta sensibilidade e a menor susceptibilidade em relação aos compostos formados por outras reações. No entanto, para a utilização de tais

métodos é necessário a utilização de substratos não naturais e um grande volume de reagentes, fazendo com que a margem de erro aumente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial da Faculdade de Farmácia da UFMG.

3.1 Material

Agar Sabouraud Dextrosado, ágar bacteriológico, extrato de levedura, extrato de malte e peptona bacteriológica, todos desidratados, eram das marcas Difco (Detroit, MI, EUA) ou Biobrás (Montes Claros, MG, Brasil). Óleo de oliva, da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA); os reagentes empregados eram de grau analítico, adquiridos de fornecedores diversos.

3.2 Microrganismos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas onze cepas de leveduras, sendo nove isoladas da polpa do pequi (*Caryocar brasiliense*) e cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Biologia da UNIMONTES / Montes Claros; uma cepa isolada a partir de amostras de terra enriquecidas com partes do fruto do abacateiro, pelo Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) da Faculdade de Farmácia/ UFMG; e uma cepa cedida pelo Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras. As cepas foram identificadas pelo Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do ICB/UFMG, empregando-se metodologia padrão descrita em Kurtzman & Fell (1998).

As leveduras foram mantidas no laboratório em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrosado adicionado de 0,5 g/L de extrato de levedura (ASDEL) a 4°C, com repiques a cada dois meses.

3.3 Meios de cultura para seleção primária de cepas potencialmente produtoras de lipase

3.3.1 Meios de cultura líquidos para fermentação em substrato líquido (FSL)

Para avaliação da produção de lipase pelas cepas de levedura foi realizado uma seleção primária, realizando a Fermentação em Substrato Líquido (FSL) e um ensaio em placa de Petri por difusão em gel de ágar. Na Fermentação em Substrato Líquido foram testados dois meios de cultura com composições diferentes, denominados Meio I e Meio II.

A composição do Meio I foi basicamente a descrita por Shirazi *et al* (1998), com adição de 0,5mL/L de óleo de oliva em pH 5,5. O Meio II foi desenvolvido por Muralidhar *et al* (2001), que se diferencia do Meio I basicamente, por apresentar Tween 80 em sua formulação. A glicose foi substituída pelo óleo de oliva, pH 5,5.

3.3.2 Meio de cultura sólido para ensaio em placa de Petri

No ensaio em placa de Petri por difusão em gel de ágar, o meio de cultura utilizado foi desenvolvido por Colen (2006), com a composição seguinte: 0,5g/L de extrato de levedura; 2,0g/L de sais biliares nº 3; 10mL/L de óleo de oliva; 5,0g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0g/L de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$; 1,0g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0g/L de NaCl; 20,0g/L de ágar bacteriológico; pH 7,0.

3.4 Meios de cultura para seleção secundária das cepas mais promissoras

Na seleção secundária, a fase de otimização da produção de lipase pela linhagem de levedura mais promissora, utilizou-se a mesma formulação básica de sais inorgânicos, de acordo com Shirazi *et al.* (1998), variando-se as quantidades de peptona e óleo de oliva e o valor do pH inicial do meio de cultura.

3.5 Metodologia

3.5.1 Seleção primária de cepas potencialmente produtoras de lipase

3.5.1.1 Fermentação em substrato líquido (FSL)

Cultivos de 72 h, de cada linhagem, desenvolvidos na superfície inclinada do meio ASDEL, foram recuperados com 5 mL de água destilada estéril, obtendo-se uma suspensão da levedura. Dessa suspensão, utilizou-se uma alíquota de 2 mL para inocular 50 mL dos meios descritos anteriormente (item 3.4), contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Esse procedimento foi realizado em duplicata, para cada linhagem testada.

Os frascos foram incubados por 24 horas a 30°C em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP), a 160 rpm. Em seguida a massa celular foi separada por centrifugação e o sobrenadante, livre de células, foi usado como preparação enzimática a ser analisada.

A dosagem lipásica foi feita utilizando-se o método titulométrico, realizado de acordo com o método empregado por Watanabe et al. (1977).

A reação enzimática foi desenvolvida em frascos Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, em banho-maria a 30°C, sob agitação (150 ciclos/min) durante 10 minutos, e em duas condições de pH. A mistura da reação continha: emulsão de óleo de oliva (25 %, V/V) em solução de álcool polivinílico a 2 % p/V (5,0 mL); solução-tampão TRIS-HCl 0,02M pH 8,0 (4,0 mL) ou solução-tampão fosfato pH 6,0 (4,0 mL); preparação enzimática (1,0 mL). A reação foi paralisada pela adição de 20 mL de solução acetona/álcool etílico (1:1). Em paralelo empregou-se como controle (branco), a enzima inativada, ou seja, a preparação enzimática foi previamente, colocada em banho-maria fervente durante 10 minutos.

Em seguida, adicionou-se 5 gotas de solução indicadora de timolftaleína a 0,2%. Após homogeneização da mistura em reação, fez-se a titulação dos ácidos graxos liberados com uma solução padronizada de hidróxido de sódio 0,05 M, até o ponto de viragem, caracterizada pelo aparecimento da coloração azul clara, sendo registrado o volume de hidróxido de sódio gasto em cada titulação. A atividade lipásica foi expressa em micro moles de ácidos graxos liberados por minuto (em ácido oléico), por mililitro, nas condições do ensaio.

A atividade (em U/mL) foi calculada multiplicando-se a diferença de volumes gastos (mL) (reação e controle) de solução de hidróxido de sódio pelo fator de diluição, dividido pelo tempo de incubação. O resultado foi multiplicado por 50 (fator aplicado para expressar o resultado em micro moles de ácido graxo por mL da amostra). Foram feitas 2 repetições em cada meio e cada repetição foi analisada em duplicata.

3.5.1.2 Ensaio em placa de Petri

Uma pequena fração do cultivo de cada cepa de levedura foi transferida para o meio de cultura em placa descrito anteriormente (item 3.3). Foram realizadas cinco inoculações pontuais de cada cepa. As placas foram incubadas em estufa a 30°C e foram realizadas leituras em 24, 48 e 72 horas. Com o auxílio de um paquímetro os raios das colônias desenvolvidas (r) e os raios dos respectivos halos lipolíticos (R), foram medidos. As cepas que apresentaram relação R/r igual ou maior que 1,0 foram consideradas promissoras, tendo sido submetidas ao procedimento de seleção secundária, quando cultivadas em meios de cultura líquidos, em cultivos aerados.

3.5.2 Seleção secundária de cepas potencialmente produtoras de lipase

3.5.2.1 Cultivo em meio de cultura líquido

O cultivo das cepas foi feito em meio líquido, como o realizado na seleção primária, descrito no item 3.5.1.1. O meio de cultura utilizado nesta etapa da seleção da linhagem mais promissora foi o Meio I, proposto por Shirazi et al. (1998).

3.5.2.2 Dosagem da atividade lipásica

3.5.2.2.1 Método titulométrico

O procedimento analítico foi realizado de acordo com o método empregado por Watanabe et al. (1977), já descrito no item 3.5.1.1.

3.5.2.2.2 Ensaio em placa de Petri

Difusão em gel - A atividade lipásica das preparações enzimáticas foi determinada, também, pela medida do halo de hidrólise de um substrato lipídico, pela difusão da enzima em gel de ágar bacteriológico. As preparações foram analisadas nos géis identificados como AT, ATV, AEP e AEPV no pH 8,9 e pH 6,0. O gel AT tinha a composição seguinte (em 100 mL): 0,6 mL de tributirina; 100 mL de tampão fosfato pH 6,0; 1,5 g de ágar bacteriológico. O gel ATV diferenciava-se do gel AT pela adição de 1,0 mL de solução do corante azul Vitória (10 mg/mL) e a solução – tampão era de TRIS-HCl 0,02 M pH 8,9.

Os géis AEP e AEPV continham a emulsão de óleo de oliva (25 %, V/V) em solução de álcool polivinílico a 2 % (p/V) em substituição à tributirina e tampão TRIS-HCl 0,02 M pH 8,9. Após fusão do ágar na respectiva solução tampão, o substrato foi adicionado e a suspensão agitada em liquidificador durante um minuto. No caso dos géis ATV e AEPV, a solução do corante era incorporada após a obtenção da emulsão final.

Alíquota (40 µL) de cada amostra foi depositada em poço de 8 mm de diâmetro escavado no gel (com auxílio de cilindro de aço inoxidável), em quintuplicatas. Após incubação durante 18 horas a 30°C, mediou-se o diâmetro do halo com um paquímetro. As cepas com diâmetro do halo de lipólise igual ou maior do que 2,0 mm foram consideradas promissoras.

3.5.3 Otimização da produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica*

3.5.3.1 Microrganismo

A cepa 77, previamente selecionada como maior produtora de lipase nas condições testadas, e identificada como *Y. lipolytica*, foi mantida em Ágar Sabouraud Dextrosado, adicionado de 0,5g/L de extrato de levedura e 0,1 mL de óleo de oliva a 4°C, após crescimento a 30 °C durante 48 h.

3.5.3.2 Planejamento Experimental

Numa primeira fase foram investigados os efeitos combinados das concentrações iniciais de peptona de carne, de peptona de caseína e do pH inicial do

meio de cultura sobre a produção de lipase. Foram testadas duas condições diferentes quanto aos valores das variáveis, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificação dos parâmetros, peptona de caseína, peptona de carne e pH, nos níveis basal, inferior e superior.

Condição 1

Código do fator	Parâmetro	Unidade	Níveis			Variação
			Base (0)	Inferior (-1)	Superior (+1)	
A	peptona de caseína	g/L	25,0	20,0	30,0	5,0
B	peptona de carne	g/L	25,0	20,0	30,0	5,0
C	pH	unidade	5,5	4,5	6,5	1,0

Condição 2

Código do fator	Parâmetro	Unidade	Níveis			Variação
			Base (0)	Inferior (-1)	Superior (+1)	
A	peptona de caseína	g/L	30,0	20,0	40,0	10,0
B	peptona de carne	g/L	30,0	20,0	40,0	10,0
C	pH	Unidade	6,0	5,0	7,0	1,0

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi empregado para identificar os fatores significativos. Isso resultou em 8 diferentes formulações de meios de cultura, correspondendo, cada uma a um ensaio experimental que serviram para os cálculos dos efeitos principais e suas possíveis interações (Colen, 2006).

Ao analisar os resultados dos ensaios experimentais segundo os delineamentos das condições 1 e 2, resolveu-se avaliar a produção da lipase em condições diferentes. Neste caso, investigar os efeitos combinados das concentrações iniciais de peptona bacteriológica (mistura a 50% das peptonas de carne e de caseína), o pH inicial do meio de cultura e a concentração de óleo de oliva, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Especificação dos parâmetros, peptona de caseína, peptona de carne e pH, nos níveis basal, inferior e superior.

Condição 3

Código do fator	Parâmetro	Unidade	Níveis			Variação
			Base (0)	Inferior (-1)	Superior (+1)	
A	mistura de peptonas	g/L	40,0	30,0	50,0	10,0
B	pH	unidade	5,0	4,0	6,0	1,0
C	óleo de oliva	mL/L	10,0	5,0	15,0	5,0

Também neste caso, foi empregado um 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, que serviram para os cálculos dos efeitos principais e suas possíveis interações (Colen, 2006), segundo a matriz mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento fatorial completo 2^3 utilizado para formulações de meios de cultura para cada ensaio.

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
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Para a modelagem e o deslocamento foram acrescentados 3 replicatas do ponto central (x_1 ; x_2 ; x_3 , no valor codificado 0), que resultou em mais 3 ensaios (além dos 8 iniciais). Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta para a construção do modelo estatístico, que foi ajustado às condições experimentais descritas para otimizar as condições de produção da lipase. Para isso, seguiu-se Barros Neto et al. (1996) e Rodrigues & lemma (2005).

O valor médio da atividade máxima de lipase foi considerado como a variável dependente dos valores obtidos. Os resultados do planejamento fatorial com ponto central foram usados para ajustar uma equação polinomial de primeira ordem representada por $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$, sendo x_1, x_2, x_3 as variáveis codificadas dos fatores principais, \hat{y} a resposta estimada; β_0 o coeficiente linear, β_1, β_2 e β_3 os coeficientes dos fatores principais e $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ e β_{123} os coeficientes das interações. A proporção da variância explicada pelo modelo foi dada pelo coeficiente múltiplo de determinação, R^2 (Colen, 2006).

3.5.3.3 Meios de cultura

Na situação 2 foram testadas 9 diferentes formulações de meios de cultura, sendo 8 ensaios com combinações dos valores mínimo e máximo (codificados -1 e +1, respectivamente) e uma combinação dos valores basais (codificados 0) em três repetições como ponto central, como o seguido por Colen (2006). Na fase de otimização foram testadas 9 diferentes formulações de meios de cultura, em um total de 11 ensaios (8 ensaios com combinações - 1 e + 1, e 3 repetições com combinação 0).

3.5.3.4 Preparo do inóculo

A levedura *Y. lipolytica* (cepa 77) foi cultivada na superfície inclinada do meio de manutenção, durante 72 horas de incubação. O cultivo foi resuspenso em água destilada esterilizada. 5 mL da suspensão foram inoculados em 50 mL de meio de cultura segundo formulação definida pelo delineamento experimental.

3.5.3.5 Produção de lipase e obtenção da preparação enzimática

Os meios de cultura inoculados foram incubados por 72 horas a 30°C em incubadora orbital MARCONI (Piracicaba, SP, BR), a 160 rpm. A massa celular foi separada por centrifugação (3000 rpm) e o sobrenadante, livre de células, foi usado como preparação enzimática.

3.5.3.6 Determinação da atividade lipásica

Para a medida da atividade lipásica, foi empregado o método titulométrico usado por Watanabe et al. (1977). O procedimento foi o mesmo realizado nas etapas de seleção de cepas produtoras de lipase descrito anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de cepas potencialmente produtoras, em placas de Petri

Os resultados do crescimento das leveduras mais promissoras em meio de cultura (descrito em 3.3.2) em placa de Petri, medido pelo halo das colônias desenvolvidas, e os resultados da detecção de colônias lipolíticas, através do halo claro da atividade enzimática, podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 – Tamanho da colônia e de halo de lipólise em meio de cultura em placa, em função do tempo de cultivo.

Tempo de incubação (h)	Cepa n ^o	Raio ^a (mm)		R/r
		Colônia (r)	Halo lipolítico (R)	
24 h	77	5,4	8,4	1,56
	82	3,9	8,4	1,00
	88	3,0	3,0	1,00
48 h	77	7,3	10,4	1,42
	82	4,7	4,7	1,00
	88	4,4	4,4	1,00
72 h	77	8,3	11,7	1,41
	82	5,0	5,0	1,00
	88	4,5	4,5	1,00

^a valores médios de cinco replicatas, duas repetições.

Em trabalho realizado por Colen et al. (2005), os autores empregaram a relação R/r maior do que 1,2, considerando as cepas que apresentaram essa relação as mais promissoras. No caso do nosso trabalho, a relação estabelecida foi $r/R > 1,0$. Dessa forma, a cepa 77 foi como a mais promissora, já que as cepas 82 e 88 apresentaram a relação r/R igual a 1, em qualquer tempo de incubação. Também pode ser percebida uma diminuição relativa do halo de lipólise das colônias da cepa 77 com o aumento da incubação, provavelmente devido à uma maior taxa de crescimento radial da colônia do

que a taxa de difusão da enzima no meio de cultura. Não foram detectados halos de lipólise com as outras cepas.

4.2 Capacidade de produção de lipase pelas cepas de levedura em condições de fermentação em substrato líquido (FSL)

A produção de lipase extracelular foi testada com o cultivo das onze cepas de leveduras em dois meios de cultura líquidos, denominados Meio I e Meio II, de formulações diferentes, como descrito em material e métodos. Os resultados obtidos, quando as preparações enzimáticas foram analisadas em condições de reação em pH ácido e pH alcalino, são mostrados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Detecção, em tampão fosfato pH 6,0, da atividade lipásica das preparações enzimáticas obtidas com os cultivos das leveduras em Meio I e Meio II.

Cepa n ^o	Meio I	Meio II
	Lipase (U/mL) ^a	Lipase (U/mL) ^a
77	0,77 ± 0,83	0,13 ± 0,23
79	0,65 ± 1,13	0,22 ± 0,29
80	0,48 ± 0,53	0,0
81	0,28 ± 0,49	0,0
82	1,72 ± 0,60	0,53 ± 0,32
83	1,08 ± 0,96	0,27 ± 0,16
85	1,37 ± 0,91	0,53 ± 0,61
87	0,90 ± 0,87	0,20 ± 0,26
88	0,92 ± 0,15	0,22 ± 0,33
89	1,07 ± 0,80	0,72 ± 1,24
90	0,78 ± 0,64	0,43 ± 0,49

^a valores médios de duplicadas, três repetições

Tabela 6 – Detecção, em tampão TRIS-HCl pH 8,0, da atividade lipásica das preparações enzimáticas obtidas com os cultivos das leveduras em Meio I e Meio II.

Cepa N ^o	Meio I	Meio II
	Lipase (U/mL) ^a	Lipase (U/mL) ^a
77	1,20 ± 0,44	0,25 ± 0,25
79	0,72 ± 0,33	0,52 ± 0,50
80	1,00 ± 0,35	0,40 ± 0,20
81	0,75 ± 0,51	0,48 ± 0,45
82	0,40 ± 0,26	0,23 ± 0,23
83	0,37 ± 0,38	0,38 ± 0,24
85	0,50 ± 0,50	0,28 ± 0,18
87	0,68 ± 0,29	0,22 ± 0,12
88	0,83 ± 0,30	0,15 ± 0,15
89	0,52 ± 0,20	0,18 ± 0,32
90	0,65 ± 0,38	0,43 ± 0,49

^a Valores Médios de duplicatas de três repetições

Nesses resultados observa-se que a produção da lipase no Meio I foi superior àquela obtida com o Meio II, tanto no ensaio realizado com tampão fosfato pH 6,0 quanto naquele com tampão TRIS-HCl 0,2M pH 8,0. Por isso, o Meio I foi o escolhido para dar continuidade aos estudos

Segundo Li et al. (2001), o efeito do Tween 80 em alta concentração diminuiu a produção de lipase pela bactéria *Acinobacter*, porque reprimiu a síntese enzimática, o que pode ser visto como uma hipótese pela baixa produção lipásica quando se utilizou o Meio II, cuja formulação continha Tween 80 (4,0 mL/L). Entretanto, Muralidhar et al. (2001) empregaram óleo de oliva e Tween 80 juntos no meio de cultura, exatamente como neste trabalho, e perceberam que o Tween 80 aumentou a produção de lipase.

Outra explicação para a baixa produção enzimática observada com o Meio II é que os surfactantes podem causar desnaturação da enzima pela quebra da estrutura terciária (Lima et al., 2004). No entanto, segundo os mesmos autores, surfactantes têm a capacidade de interação de enzimas, podendo aumentar, conseqüentemente, a atividade lipásica.

Montesinos et al. (1996) mostraram em estudos preliminares, que os ácidos graxos livres, principalmente o ácido oléico resultante da hidrólise do óleo de oliva, são indutores da produção de lipase, provável situação apresentada pelo Meio I no qual obteve melhor resultado.

Quando o óleo de oliva é utilizado como única fonte de carbono, os microrganismos usam seqüencialmente o glicerol e os ácidos graxos presentes. Em um primeiro momento, o óleo de oliva é hidrolisado por um baixo teor de lipase proveniente do inóculo. Em seguida, os microrganismos consomem o glicerol, não ocorrendo produção de lipase. E por fim, os ácidos graxos livres são consumidos simultaneamente com formação de lipase.

Outra explicação se encontra na solubilidade dos substratos, sendo o Tween 80 solúvel em água e o óleo de oliva, como já se sabe, insolúvel. Em relação a essa característica, Montesinos et al. (1996) afirmam que substratos insolúveis facilitam a associação de células, permitindo um rápido crescimento celular na presença de ácidos graxos e conseqüentemente uma maior atividade lipásica, quando esse crescimento cessa. Li et al. (2001) observaram que o óleo de oliva apresenta uma maior taxa de hidrólise do que o Tween 80, porque as lipases apresentam maior atividade em superfície de óleo – água do que em solução aquosa, fenômeno conhecido como ativação interfacial.

Os resultados encontrados neste experimento, condizem com o de Hiol et al. (1999), que não detectaram nenhuma atividade com Tween 80. Analisando a atividade das cepas no Meio I, observa-se que, quando o ensaio foi realizado com tampão fosfato pH 6,0, a maior produção foi obtida com as cepas 82; 85; 83; 89 e 88, enquanto no ensaio com tampão TRIS-HCl pH 8,0, os melhores resultados foram obtidos com as cepas 77; 80; 88; 81; 79 e a 87. Desta maneira, as seguintes cepas foram escolhidas: cepa n° 77, por ter sido a mais produtiva no pH 8,0; cepa n° 82 pela produtividade apresentada no pH 6,0 e a cepa n° 88, que se destacou tanto no pH 6,0 como no pH 8,0. Assim, as cepas consideradas mais promissoras para dar seguimento aos estudos foram aquelas identificadas pelos números 77; 82 e 88. De modo geral, pôde-se perceber a detecção de lipases com maior atividade em pH ácido do que em pH alcalino.

4.3 Seleção da cepa mais promissora

As três cepas selecionadas, números 77, 82 e 88, foram cultivadas novamente no meio I a fim de que a cepa mais promissora fosse, em seguida, submetida ao estudo estatístico de otimização das condições de produção de lipase. As

preparações enzimáticas resultantes, contendo a atividade lipásica, foram analisadas pelo método titulométrico e pelo método de difusão em gel de agar, tanto em pH ácido quanto em pH alcalino, como descrito em material e método. Os resultados estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Medida da atividade lipásica, presentes nas preparações enzimáticas das três cepas mais promissoras, por meio do diâmetro do halo e pelo método titulométrico, sob diferentes condições de análises.

Cepa N ^o	Diâmetro de halo (mm)		Faixa de atividade lipásica (U/mL) ^b		Diâmetro de halo (mm)	
	Gel de ágar, pH 6,0 ^a				Gel de ágar, pH 8,9 ^a	
	Tributirina	Emulsão de óleo de oliva	pH 6,0	pH 8,0	Tributirina	Emulsão de óleo de oliva
77	2,4 ± 0,9	0,2 ± 0,4	0 - 2,3	0 - 1,9	0,6 ± 0,9	0,6 ± 0,9
82	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0 - 1,5	0 - 0,8	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5
88	2,5 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0 - 1,0	0 - 0,3	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,5

^a valores médios de duplicatas e cinco repetições, procedimento descrito em materiais e métodos, 40 µL de caldo por poço, leitura em 18 horas; ^b valores médios de cinco repetições e determinada pelo método titulométrico descrito em materiais e métodos, usando suspensão de álcool polivinílico e óleo de oliva, como substrato.

Pode-se notar que a detecção da atividade lipásica em gel de ágar foi influenciada pelo pH / tampão usado, não ocorrendo diferenças em pH alcalino entre os efeitos sobre os substratos, e que ocorreu o contrário com a detecção em pH ácido, especificamente com as cepas de n^o 77 e n^o 88. De acordo com Lima et al. (2004), a atividade depende não apenas do pH, mas também do tipo de tampão usado. Os autores obtiveram melhores atividades com o tampão fosfato, quando compararam os resultados com os tampões citrato-fosfato e TRIS-HCl. Os tampões possuíam valores de pH diferentes. Entretanto, Abbas et al. (2002) observaram uma maior produção pelo *Mucor* sp., quando empregou-se o tampão TRIS-HCl do que com o tampão fosfato.

A cepa 77 mostrou-se superior quanto à produção da lipase detectada pela medida da atividade no ensaio titulométrico nos dois valores de pH, enquanto as duas outras apresentaram maior atividade no pH ácido. A cepa 82, interessante, apresentou baixa atividade quando esta foi medida pelo método de difusão em gel, no qual os halos correspondentes apresentaram pequenos diâmetros, demonstrando

baixa capacidade de difusão, apesar de ter apresentado boa atividade que foi detectada pelo ensaio titulométrico. Provavelmente, a difusão tenha ocorrido devido ao tamanho maior da molécula da enzima. Essa hipótese pode ser confirmada, em estudos a serem desenvolvidos posteriormente. A cepa de nº77 foi a escolhida para os estudos de otimização das condições experimentais, objetivando conseguir-se maior produção da lipase.

4.4 Otimização da produção de lipase pela levedura *Y. lipolytica*

4.4.1 Ensaio preliminares

A cepa 77, como mostrado em material e métodos, foi identificada como *Yarrowia lipolytica*. Para otimizar a produção de lipase a levedura foi previamente submetida a uma série de ensaios, em que se manteve a mesma composição do meio de cultura líquido anteriormente selecionado (Meio I). Adicionou-se ao Meio I extrato de levedura (0,1%), com o objetivo de se avaliar a necessidade de se empregar um meio de cultura mais enriquecido para que houvesse uma maior produção da lipase, fazendo-se, então, 4 experimentos.

No experimento nº1, fez-se dois cultivos, um sem adição de extrato de levedura ao meio de cultura, representado por A, e o outro com adição de extrato de levedura, representado por B. A reação, para a dosagem da atividade pelo método titulométrico nas preparações enzimáticas, foi conduzida em duas temperaturas, a 30°C e a 40°C e, em dois valores de pH (6,0 e 8,0, como descrito em material e métodos). Os resultados obtidos estão representados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Produção e dosagem da atividade lipásica pela *Y. lipolytica* em Meio I em diferentes condições de reação quanto ao pH e temperatura de incubação

Ensaio	pH final do cultivo ^a	Lipase ^a (U/mL)			
		pH 8,0/30 ⁰ C	pH 6,0/30 ⁰ C	pH 8,0/40 ⁰ C	pH 6,0/40 ⁰ C
A1	7,4	2,0 ± 0,3	0,7 ± 1,2	0,2 ± 0,3	0,5 ± 0,4
A2	7,3	3,6 ± 0,5	3,6 ± 3,1	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,4
A3	7,2	1,4 ± 0,7	0,5 ± 0,8	0,2 ± 0,8	0,8 ± 0,7

^a média de triplicatas

Tabela 9 – Produção e dosagem da atividade lipásica pela *Y. lipolytica* em Meio I adicionado de extrato de levedura em diferentes condições de reação quanto ao pH e temperatura de incubação

Ensaio	pH final do cultivo ^a	Lipase ^a (U/mL)			
		pH 8,0/30 °C	pH 6,0/30 °C	pH 8,0/40 °C	pH 6,0/40 °C
B1	7,6	2,0 ± 1,6	5,2 ± 3,4	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,4
B2	7,2	5,7 ± 0,2	5,7 ± 2,9	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,5
B3	7,4	0,6 ± 0,8	2,8 ± 1,8	0,9 ± 0,9	0,9 ± 0,2

^a média de triplicatas

Pôde-se verificar que detecção da atividade lipásica é maior na temperatura de 30°C do que 40°C, independentemente do pH da reação. Pastore et al. (2003) em estudos realizados com *Rhizopus* sp., verificaram que a lipase produzida apresentou atividade em temperatura ótima próxima de 40°C. Esses diferentes dados mostram a diversidade que pode ser encontrada entre microrganismos. No caso deste trabalho, empregou-se levedura, enquanto Pastore e colaboradores utilizaram fungo filamentosos.

Na temperatura de detecção da atividade lipolítica a 30°C, os resultados encontrados da produção de lipase mostraram-se muito semelhantes nos dois valores de pH da reação e o pH dos cultivos variou pouco entre os dois meios de cultura, tornando-se mais alto no meio com extrato levedura. Resultados semelhantes foram encontrados por Fickers et al. (2004), que também verificaram que a adição do extrato de levedura não levou à obtenção de uma atividade expressiva. Entretanto, Shirazi et al. (1998) obtiveram atividade máxima de lipase utilizando o extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

Foi feita também, a determinação da atividade lipásica das preparações enzimáticas pelo método da difusão em gel (substrato, tampão e ágar), tanto para aquelas originárias do meio sem extrato de levedura (A), quanto para aquelas do meio com extrato de levedura (B). Os resultados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade lipásica determinada pelo diâmetro de halo lipolítico (em pH 6,0 e pH 8,9) das preparações originárias dos meios com extrato de levedura (A) e sem extrato de levedura (B)

Ensaio	Diâmetro de halo lipolítico (mm)			
	AT / pH 6,0 ^a	AEP / pH 6,0 ^a	ATV / pH 8,9 ^a	AEPV / pH 8,9 ^a
A1	3,8	nd	Nd	1,0
A2	3,7	nd	0,6	0,5
A3	2,7	nd	Nd	nd
B1	3,7	nd	Nd	0,7
B2	2,6	nd	Nd	0,7
B3	5,2	nd	Nd	Nd

^a média de triplicatas

Os resultados entre as preparações enzimáticas obtidas com os dois meios de cultura foram semelhantes, tendo sido detectada uma maior atividade no gel de tributirina (AT), em tampão fosfato pH 6,0. Com esses resultados, percebe-se que a atividade foi de detecção difícil em gel de emulsão de óleo de oliva quando não possuía o corante indicador (AEP), mas sendo facilmente detectada no gel com tributirina (AT) no pH 6,0. Estes resultados estão de com Cardenas e colaboradores (2001b) que também utilizaram ágar contendo tributirina e óleo de oliva para a detecção da atividade. Em seus experimentos os autores observaram que das 2000 cepas testadas, 450 apresentaram halo com tributirina, enquanto apenas 92 com óleo de oliva. Segundo os autores, a formação de halo nas placas contendo óleo de oliva indica a presença de lipases que atuam sobre os triglicerídeos de cadeia longa. Enquanto a detecção em gel de tributirina indica que trata-se, apenas, de ação de esterase (e não de lipase verdadeira). Gopinath et al. (2003) empregaram, também, o filtrado enzimático do *Geotrichum candidum* em placas contendo tributirina e detectaram formação de halo.

O ensaio em placa de Petri em pH alcalino foi realizado em pH 8,9 para facilitar a detecção do halo formado (de colocação azul). Em pH 8,0, essa detecção era dificultada, porque quando se adicionou o corante azul Victória, a placa adquiriu coloração azul, da mesma cor do halo. Já em pH 8,9, a placa fica violeta e o halo azul, facilitando sua visualização.

Pelo método da difusão em gel não foi percebida diferenças entre os dois meios de cultura. Avaliando os dados obtidos de atividade lipásica, percebeu-se que os

resultados foram melhores com adição de extrato de leveduras. Entretanto para os estudos de planejamento experimental, visando a otimização das condições para produção da lipase foram empregadas as condições seguintes: meio de cultura I (sem extrato de levedura) e dosagem da atividade lipásica pelo método titulométrico no pH 8,0.

4.4.2 Estudos de otimização

Na primeira fase foram investigados os efeitos combinados das concentrações iniciais de peptona de caseína, peptona de carne e de pH do meio de cultura sobre a produção de lipase. A matriz do planejamento e os rendimentos obtidos experimentalmente, em duplicata, em cada combinação de níveis, de acordo com os dados descritos em material e métodos, situação 1, e os rendimentos em U/mL de lipase (método titulométrico, tampão TRIS - HCl pH 8,0) estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Delineamento experimental de 1ª ordem e os rendimentos obtidos em duplicata, em cada combinação de níveis.

Ensaio Nº	Variáveis Reais			Variáveis codificadas			Rendimento (U/mL)		
	Peptona de caseína (g/L)	Peptona de carne (g/L)	pH	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	\hat{y}
1	20,0	20,0	4,5	-1	-1	-1	0,0	0,2	0,1
2	30,0	20,0	4,5	+1	-1	-1	1,5	1,1	1,3
3	20,0	30,0	4,5	-1	+1	-1	2,6	2,2	2,4
4	30,0	30,0	4,5	+1	+1	-1	1,2	0,7	0,9
5	20,0	20,0	6,5	-1	-1	+1	1,2	0,8	1,0
6	30,0	20,0	6,5	+1	-1	+1	0,5	0,5	0,5
7	20,0	30,0	6,5	-1	+1	+1	0,0	0,0	0,0
8	30,0	30,0	6,5	+1	+1	+1	0,5	0,3	0,4
9	25,0	25,0	5,5	0	0	0	0,1	0,1	0,1
10	25,0	25,0	5,5	0	0	0	0,0	2,4	1,2
11	25,0	25,0	5,5	0	0	0	0,5	0,1	0,3

^a y_1 , y_2 e \hat{y} representam os valores das variáveis codificadas pelas equações:

$$x_1 = (\text{g/L de pep. caseína} - 25) / 30 - 20 / 2, \text{ por exemplo, } x_1 = (20 - 25) / 30 - 20 / 2 = -1;$$

$$x_2 = (\text{g/L de pep. carne} - 25) / 30 - 20 / 2, \text{ por exemplo, } x_2 = 30 - 25 / 30 - 20 / 2 = +1;$$

$$x_3 = (\text{unidade de pH} - 5,5) / 6,5 - 4,5 / 2, \text{ por exemplo, } x_3 = 6,5 - 5,5 / 6,5 - 4,5 / 2 = +1.$$

Os efeitos principais e suas interações foram calculados após obtenção dos sinais algébricos para os coeficientes de contrastes (Tabela 12).

Tabela 12 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes

Média	0,83125 ± 0,0795
Efeitos principais	
A: peptona de caseína	-0,0875 ± 0,16
B: peptona de carne	+0,2125 ± 0,16
C: pH inicial	-0,7125 ± 0,16
Interações dos Efeitos	
AB:	-0,4375 ± 0,16
AC:	+0,0375 ± 0,16
BC:	-0,7625 ± 0,16
ABC:	+0,8875 ± 0,16

A figura abaixo mostra a atividade lipásica em ensaios com formulações diferentes, cujas interações e variáveis foram demonstradas acima.

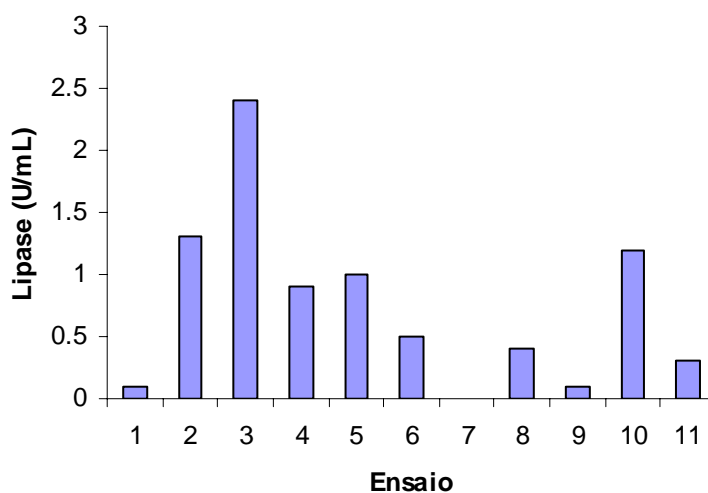


Figura 1 – Atividade lipásica em relação aos ensaios.

Analisando a figura 1 percebe-se que o ensaio 3 obteve-se uma maior produção de lipase, enquanto no ensaio 7, esta produção foi nula.

No entanto, 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. Apenas o efeito que apresentar um valor absoluto superior ao valor de t crítico é significativo. Os efeitos e as suas interações, segundo os ensaios do experimento anterior, não se mostraram ser significativos, ao nível de 95% de confiança.

A mesma análise foi realizada com os dados do mesmo delineamento experimental, mas, neste caso, os rendimentos (U/mL de lipase) foram obtidos pelo método titulométrico em que foi empregado o tampão fosfato pH 6,0. Os resultados foram bastante baixos, tendo sido obtidos valores nulos (0,0 U/mL) em cinco combinações das variáveis (entre onze), prejudicando a análise (Anexos, Tabela 15). Ginalska et al. (2004) observaram que a produção de lipase pelo *Geotrichum like* R59 foi menor em pH 8,0 do que em pH 7,0.

Novo delineamento foi realizado, então, empregando-se as mesmas variáveis (peptona de caseína, peptona de carne e pH), mas, em combinações de novos níveis, isto é: no caso das peptonas 20,0; 30,0 e 40,0 g/L e, para o pH os valores 5,0; 6,0 e 7,0 (-1; 0 e +1, respectivamente), como descrito em material e métodos (situação 2). Mais uma vez os resultados (produção de lipase, em U/mL) foram baixos e não conclusivos (ver em Anexos).

Em razão dos resultados obtidos anteriormente, numa tentativa de melhor caracterização de efeitos (variáveis) e suas interações, novos ensaios foram realizados para novo delineamento experimental, em que foram estudadas as combinações das variáveis peptona bacteriológica (mistura a 50% das peptonas de caseína e de carne), pH e óleo de oliva. A matriz do planejamento e os rendimentos obtidos experimentalmente, em duplicata, em cada combinação de níveis, empregando-se as variáveis peptona bacteriológica, pH e óleo de oliva bem como os rendimentos em U/mL de lipase determinados pelo método titulométrico, usando o tampão TRIS - HCl pH 8,0, e os efeitos e erros padrões correspondentes, estão mostrados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13 – Delineamento experimental de 1ª ordem e os rendimentos obtidos em duplicata, em cada combinação de níveis.

Ensaio Nº	Variáveis Reais			Variáveis Codificadas			Rendimento (U/mL)		
	Peptona bacterio lógica (g/L)	pH	Óleo De oliva (mL/L)	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	\bar{y}
1	30,0	4,0	5,0	-1	-1	-1	1,5	3,1	2,3
2	50,0	4,0	5,0	+1	-1	-1	2,4	1,0	1,7
3	30,0	6,0	5,0	-1	+1	-1	2,3	1,6	1,9
4	50,0	6,0	5,0	+1	+1	-1	1,9	4,0	2,9
5	30,0	4,0	15,0	-1	-1	+1	1,9	2,5	2,2
6	50,0	4,0	15,0	+1	-1	+1	2,3	1,8	2,0
7	30,0	6,0	15,0	-1	+1	+1	1,8	2,0	1,9
8	50,0	6,0	15,0	+1	+1	+1	1,5	2,1	1,8
9	40,0	5,0	10,0	0	0	0	0,2	1,2	0,7
10	40,0	5,0	10,0	0	0	0	0,7	0,9	0,8
11	40,0	5,0	10,0	0	0	0	0,5	0,1	0,3

Tabela 14 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes, segundo fatorial 2^3 (matriz da tabela 13)

Média	2,1 ± 0,2
Efeitos principais	
A: Mistura de peptonas	+ 0,02 ± 0,4
B: pH inicial	+ 0,07 ± 0,4
C: Óleo de oliva	- 0,2 ± 0,4
Interações dos Efeitos	
AB:	+ 0,4 ± 0,4
AC:	- 0,2 ± 0,4
BC:	- 0,3 ± 0,4
ABC:	- 0,4 ± 0,4

A figura 2, abaixo, representa a atividade lipásica da *Y. lipolytica* em cada uma dos 11 ensaios, previamente determinados pelo planejamento fatorial.

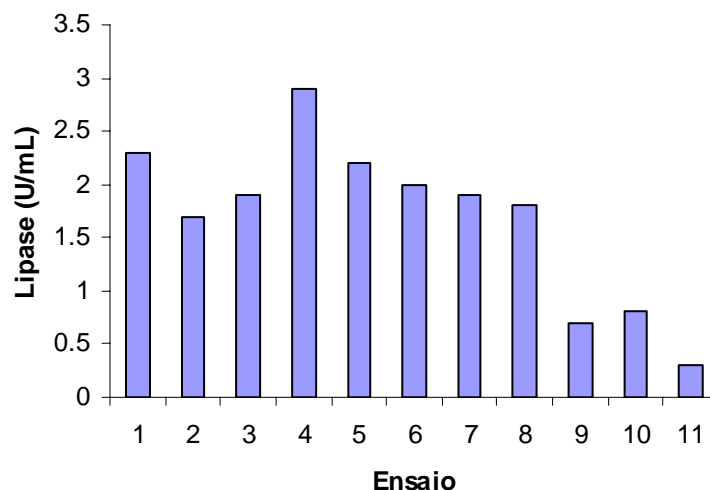


Figura 2 - Atividade lipásica em relação aos ensaios.

De acordo com a figura 2, percebe-se que o ensaio 4 apresentou uma atividade maior do que as demais, mas todas em todos os ensaios houve produção da lipase.

A figura 3, representado abaixo, compara os resultados obtidos nos ensaios mostrados anteriormente nas figuras 1 e 2. Pode-se perceber nitidamente que nos ensaios onde as variáveis peptona bacteriológica; pH e óleo de oliva, grupo 2 de variáveis, o rendimento, ou seja, a produção de lipase, foi maior do que no grupo 1, em que as variáveis estudadas foram peptonas de carne e caseína em conjunto com o pH.

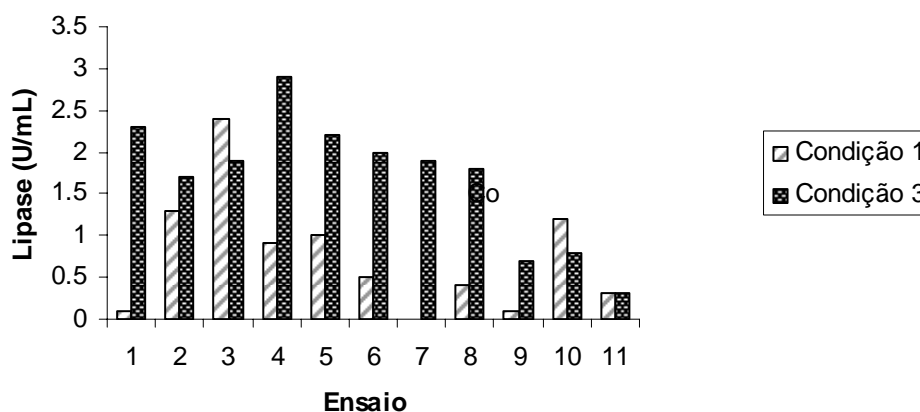


Figura 3 – Comparação da produção de lipase nas condições 1 e 3.

Ao analisar os ensaios estudados com a condição 3, pelo planejamento fatorial completo, fez-se a análise de regressão múltipla aos dados experimentais, a equação polinomial de primeira ordem obtida para a produção de lipase foi

$$\hat{y} = 1,68 + 0,01 x_1 + 0,04 x_2 + 0,01 x_3 + 0,21 x_1 x_2 - 0,87 x_1 x_3 - 0,17 x_2 x_3 - 0,19 x_1 x_2 x_3$$

equação (1)

Os valores estimados pela equação (1) ajustada e os valores observados da produção de lipase estão demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15 – Valores experimentais e valores estimados da produção de lipase pela *Y. lipolytica* na condição 3

Ensaio No	Valor Estimado (\hat{y})	Valor Observado (Y)		
		\hat{y}	y_1	y_2
1	1,0	2,3	1,5	3,1
2	1,9	1,7	2,4	1,0
3	0,6	1,9	2,3	1,6
4	3,2	2,9	1,9	4,0
5	2,7	2,2	1,9	2,5
6	0,9	2,0	2,3	1,8
7	2,4	1,9	1,8	2,0
8	0,7	1,8	1,5	2,1
9	1,7	0,7	0,2	1,2
10	1,7	0,8	0,7	0,9
11	1,7	0,3	0,5	0,1

A tabela abaixo mostra a análise de regressão pela ANOVA.

Tabela 16 – ANOVA para o modelo ajustado

Fonte de variação	SQ	Grau de liberdade	MQ	F
Regressão (R)	7,12	3	2,37	1,62
Resíduo (r)	10,2	7	1,46	
Total		10		

F calculado < F crítico , F calculado < 4,35

Apenas para a interação $x_1 x_3$ (peptona bacteriológica e óleo de oliva) o erro do efeito mostrou-se relativamente baixo, mostrando que o modelo parece significativo. Entretanto, qualquer que seja a reta escolhida 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, podendo ser positivo ou negativo.

Com este estudo foi possível conseguir produção de lipase aproximadamente de 3,0 U / mL, cerca de cinco vezes o rendimento alcançado nas condições basais (ponto central). Resultados similares aos obtidos foram, também, obtidos por Shirazi et al. (1998), empregando *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de cultura contendo óleo de oliva como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Para Tan et al. (2003) e Gopinath et al. (2003), a escolha da fonte de nitrogênio, seja orgânico ou inorgânico, é de suma importância para síntese enzimática.

As fontes de nitrogênio mais comumente usadas para o crescimento microbiano são: farinha de soja, peptona, uréia, nitrato e sais de amônio. A literatura reporta diferentes efeitos com relação à produção de lipases, dependendo da fonte de nitrogênio utilizada (Hadeball, 1991).

Rapp (1995) sugeriu que a peptona é essencial para que a produção de lipase fúngica seja significativa. O uso de uma mistura de peptonas (hidrolisado enzimático de proteínas), como o empregado neste trabalho, pode conter componentes (aminoácidos ou peptídeos) capazes de induzir a síntese da enzima lipolítica. Diversos autores como Ginalska et al. (2004) defendem o emprego de nitrogênio orgânico como substrato essencial para uma produção expressiva de lipase, segundo eles, o nitrogênio inorgânico inibe a atividade. No entanto, Tan e colaboradores (2003) são discordantes quanto a afirmação de que nitrogênio orgânico sejam as melhores fontes, já que em seus experimentos, a melhor atividade ocorreu quando empregou-se o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uma fonte inorgânica.

Maia et al. (1999) observaram que concentrações de peptona abaixo de 3% (p/v), reduziram a produção de lipase, enquanto que o aumento da concentração de óleo de oliva acima de 0,5% (v/v), também não estimulou a produção de enzima. A otimização da atividade lipásica foi alcançada em pH 8,6 e 30°C. Uma boa estabilidade enzimática foi observada em pH entre 7,6 e 8,6. Os autores ainda conseguiram aumentar significativamente (8 vezes) a produção lipásica pelo *Fusarium solani*, quando adicionaram 1% de óleo de oliva, em relação ao meio basal, além de ter

aumentado também a biomassa. A peptona na concentração de 3% (p/v) juntamente com o óleo de oliva (0,5% p/v), também aumentou a atividade lipásica.

5 CONCLUSÃO

Na seleção primária, os ensaios realizados em placa de Petri foram ideais para uma seleção e rastreamento rápidos de cepas produtoras de lipase.. Na fermentação em substrato líquido (FSL), detectou-se atividade em todas as 11 cepas testadas. O meio de cultura líquido M1 apresentou melhores condições para a produção de lipase.

Na seleção secundária foram feitos testes em fermentação em substrato líquido (FSL) e em placas de Petri por difusão em gel, utilizando as cepas de leveduras números 77, 82 e 88, que foram as escolhidas para dar continuidade aos experimentos, por apresentarem boa atividade. A partir dos resultados obtidos nessa etapa, a cepa 77, identificada como *Yarrowia lipolytica*, destacou-se como a maior produtora de lipase.

Para a otimização da atividade lipásica da *Y. lipolytica*, utilizou-se o planejamento experimental, variando-se as concentrações da mistura de peptonas, pH e óleo de oliva. Mas não foi alcançado as melhores condições para otimização da produção da lipase, no entanto, conseguiu-se um aumento de cerca de 5 vezes do obtido com o meio basal (de partida). Com estes resultados, concluiu-ser que o modelo linear proposto não foi satisfatório para explicar os efeitos alcançados com a combinação das variáveis: concentrações de peptona (mistura), óleo de oliva e pH inicial do cultivo.

Dessa forma, sugere-se a continuidade dos estudos, efetuando um novo delineamento do tipo Composto Central Rotacional (DCCR) para propor uma nova modelagem em que um modelo quadrático (2^a. ordem) possa explicar melhor as respostas às variáveis em estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS., H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase form *Mucor sp* strains isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, 2002.
- ALVES, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. Screenig of *Mucor spp.* for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: UNICAMP, 1996.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology ad Technology*, v. 44, p. 213-221, 2001.
- BRUSH, T. S.; CHAPMAN, R. KURZMAN, R. WILLIAMS, D.P. Purification and Characterization of extracelullar lipases from *Ophiostoma piliferum*. *Bioorganic & Medical Chemistry*, v. 7, p. 2131-2138, 1999.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*. V. 14, p. 111-123, 2001a.
- 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. *Enzymes and Microbial Technology*, v. 28, p. 145-154, 2001b.
- CARLILE, M.; WATKINSON, S.C. *The fungi*. London: Academic Press, 1997. 460 p.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMUZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, 2003.
- COENEN, T.M.M.; AUGHTON, P.; VERHAGENS, H. Safety evaluation of lipase derived fom *Rhizopus oryzae*: summary of toxicological data. *Food and Chemical Toxicology*, v. 35, p. 315-322, 1997.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lípase-production fungi from Brazil savanna soil. *World Journal of*

- Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 881-885, 2005.
- COLEN, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG, 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Ciências de Alimentos).
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 657-663, 2000.
- DEIVE, F.J.; COSTAS, M.; LONGO, M.A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology letters*, v. 25, p. 1403-1406, 2003.
- DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, v. 25, p. 1225-1229, 2003.
- DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyses for food processes. *Food technology.*, v. 45, p. 78-85, 1991.
- FICKERS, P.; NICAUD, J.M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 742-749, 2004.
- GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KORNILLOWICZ-KOWASLKA, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 31, p. 177-182, 2004.
- GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMI PRIYA, T.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p. 681-689, 2003.
- HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnology*, v. 11, p. 159-167, 1991.
- HIOL, A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 80-87, 1999.
- HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 421-430, 2000.

- 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.
- JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DJISKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbial. Rev.*, v.15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v.16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K.E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT'ANA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA JR., J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 16, 1999.
- KURTZMAN, C.P.; FEEL, J.W. The yeast: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1035 p.
- LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. *JAOCs*, v. 79, p. 191-195, 2002.
- LEVY, L.M.; DEHLI, J.R; GOTOR, V. Lipase-catalysed resolution of cyclic *cis*- and *trans*- β -hidroxy esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, v.14, p. 2053-2058, 2003.
- LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresintens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, v.29, p. 258-263, 2001.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriserum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, p. 65-71, 2004.
- LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible *Basidiomycete Antrodia cinnemamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 98-102, 2006.
- LINFIELD, W.M.; O'BRIEN, D.J.; SEROTA, S.; BARAUSKAS, R.A. Lipid-lipase interactions. I. fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 61, p.1067-1071, 1984.
- LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J.L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Cândida rugosa* lipase. *Chemistry and physics of lipids*, v. 93, p. 143-148, 1998.

- MA, F. & HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p.1-15, 1999.
- MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 304-309, 1999.
- MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 59, p. 25-37, 1996.
- MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILA, R.R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 9. p, 17-23, 2001.
- NEIDLEMAN, S.L. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*, v.45, p. 88-91, 1991.
- NELSON, L.A.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Lipase-catalysed production of biodiesel. *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 73, p. 1191-1195, 1996.
- OSBRADORS N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLÀ, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology letters*. v. 15, p. 357-360, 1993.
- OLIVEIRA, D.T.M. *Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000. 152 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- PASTORE, G.M.; COSTA, V. S.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial da lipase extracelular produzida por nova cepa de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PATEL, R.N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enz. Microbial Technol.*, v. 31, p. 804-826, 2002.
- PETERS, I.I.; NELSON, F. E. Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.*, v. 55, p. 581-591, 1948.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. 2. ed. Maryland: Aspen, 1999. 593 p.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v.38, p. 1077-1082, 2003.

- RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 832-838, 1995.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573 p.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Casa do Pão Editora. 2005. 326 p.
- ROONEY, D.; WEATHERLEY, L.R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 947-953, 2001.
- RÚA, M.S.; DIAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V.M.; OTERO, C.; BALLESTERO, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindraceae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1156, p. 181-189, 1993.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 390-393, 2007.
- SCHMIDT, M.; BORNSCHEUER, U.T. High-throughput assays of lipases and esterases. *Biomolecular Engineering*, v. 22, p. 51-56, 2005.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SHIEH, C.J.; LIAO, H.f.; LEE, C.C. Optimization of lipase-catalysed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 88, p. 103-106, 2003.
- SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. Short communication: production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, p. 595-597, 1998.
- TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 459-465, 2003.
- ZAREVÚCKA, M.; ZALSKÁ, Z.; REJZEK, M.; STREINZ, L.; WIMMER, Z.; MACKOVÁ, M.; DEMNEROVÁ, K. Lipase-mediated hydrolyses and esterification. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 866-869, 1995.
- ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, p. 481-486, 2005.
- WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganismos, cultural conditions and some properties. *Agric. Biol.chem.*, v. 41, p. 1353-1358, 1977.

YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. *Applied Microbiology*. v. 16, p. 845-847, 1968.

ANEXOS

Os resultados abaixo são referentes aos experimentos realizados na primeira fase dos estudos da otimização. Foram investigados os efeitos combinados das concentrações iniciais de peptona de carne, de peptona de caseína e do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de lipase.

As tabelas 15 e 16 são referentes aos resultados obtidos na situação 1, descritas anteriormente em material e métodos, utilizando-se o tampão-fosfato pH 6,0.

Tabela 17 – Matriz de planejamento 2^3 com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 1 – tampão-fosfato pH 6,0

Ensaio n°	Variáveis (unidades originais)			Variáveis codificadas			Lipase (U/mL)		
	Peptona caseína (g/L)	Peptona carne (g/L)	pH (unidade)	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	\hat{y}
1	20	20	4,5	-1	-1	-1	3,4	0,1	1,75
2	30	20	4,5	+1	-1	-1	0,3	0	0,15
3	20	30	4,5	-1	+1	-1	0,9	0	0,45
4	30	30	4,5	+1	+1	-1	0,4	0	0,2
5	20	20	6,5	-1	-1	+1	0	4	2
6	30	20	6,5	+1	-1	+1	0	0,7	0,35
7	20	30	6,5	-1	+1	+1	0	0	0
8	30	30	6,5	+1	+1	+1	0	1,5	0,8
9	25	25	5,5	0	0	0	0,2	0,3	0,25
10	25	25	5,5	0	0	0	0,3	0,7	0,5
11	25	25	5,5	0	0	0	0	0	0

Tabela 18 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes

Média	0,7063 ± 0,4897
Efeitos principais	
A: peptona de caseína	-0,688 ± 0,98
B: peptona de carne	-0,713 ± 0,98
C: pH inicial	+0,138 ± 0,98
Interações dos Efeitos	
AB	+0,938 ± 0,98
AC	+0,238 ± 0,98
BC	-0,088 ± 0,98
ABC	+0,263 ± 0,98

As tabelas 17 e 19 são correspondentes aos resultados obtidos no experimento da situação 2, utilizando-se os tampões TRIS-HCl pH 8,0, e fosfato pH 6,0, onde concentrações iniciais de peptona de carne, de peptona de caseína e do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de lipase.

Tabela 19 – Matriz de planejamento 2^3 com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 2 – tampão TRIS-HCl pH 8,0

Ensaio n°	Variáveis (unidades originais)			Variáveis codificadas			Lipase (U/mL)		
	Peptona caseína (g/L)	Peptona carne (g/L)	pH (unidade)	x_1	x_2	x_3	y_1	Y_2	\tilde{y}
1	20	20	5	-1	-1	-1	1,1	1	1,05
2	40	20	5	+1	-1	-1	0,9	1,9	1,4
3	20	40	5	-1	+1	-1	1,2	1,8	1,5
4	40	40	5	+1	+1	-1	0,1	0,1	0,1
5	20	20	7	-1	-1	+1	0	0	0
6	40	20	7	+1	-1	+1	0,7	0,5	0,6
7	20	40	7	-1	+1	+1	0,2	1,4	0,8
8	40	40	7	+1	+1	+1	0,4	0,7	0,6
9	30	30	6	0	0	0	0,4	1,2	0,8
10	30	30	6	0	0	0	0,6	1	0,8
11	30	30	6	0	0	0	0,5	0,1	0,3

Tabela 20 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes

Média	0,75 ± 0,15
Efeitos principais	
peptona de	
A: caseína	-0,175 ± 0,30
B: Peptona de carne	-0,025 ± 0,30
C: pH inicial	-0,525 ± 0,30
Interações dos Efeitos	
AB:	-0,65 ± 0,30
AC:	+0,35 ± 0,30
BC:	+0,4 ± 0,30
ABC:	+0,225 ± 0,30

Tabela 21 – Matriz de planejamento 2^3 com ponto central e correspondente resultados experimentais da situação 2 – tampão TRIS-HCl pH 8,0

Ensaio n°	Variáveis (unidades originais)			Variáveis codificadas			Lipase (U/mL)		
	Peptona caseína (g/L)	Peptona carne (g/L)	pH (unidade)	x_1	x_2	x_3	y_1	y_2	\tilde{y}
	1	20	20	5	-1	-1	-1	0	0
2	40	20	5	+1	-1	-1	0,35	0	0,175
3	20	40	5	-1	+1	-1	0,15	0,15	0,15
4	40	40	5	+1	+1	-1	0,25	1,6	0,925
5	20	20	7	-1	-1	+1	0,2	0,6	0,4
6	40	20	7	+1	-1	+1	0	1,1	0,55
7	20	40	7	-1	+1	+1	0,3	0	0,15
8	40	40	7	+1	+1	+1	0	0	0,0
9	30	30	6	0	0	0	0	0,15	0,075
10	30	30	6	0	0	0	2,2	1,55	1,875
11	30	30	6	0	0	0	0	0,3	0,15

Tabela 22 – Efeitos calculados para os fatores e os erros padrão correspondentes

Média	0,2938 ± 0,1631
Efeitos principais	
peptona de	
A: caseína	+0,238 ± 0,33
B: peptona de carne	+0,025 ± 0,33
C: pH inicial	-0,038 ± 0,33
Interações dos Efeitos	
AB:	+0,075 ± 0,33
AC:	-0,238 ± 0,33
BC:	-0,425 ± 0,33
ABC:	-0,225 ± 0,33