



OTIMIZAÇÃO DE LIPASES PELO FUNGO FILAMENTOSO *ASPERGILLUS SP. ARC3*

Ana Vitória M. Cunha^{1*}, Biatriz Vitória A. dos Santos¹, João Pedro A. Souza¹, Brenda K. L. de Paula¹, Raniere R. Lima¹, Vivian Machado Benassi¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina, Minas Gerais, Brasil, 39100-000.

*e-mail: moreira.vitoria@ufvjm.edu.br

Palavras-Chave: Enzimas; Biotecnologia; Condições de cultivo.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da busca por alternativas sustentáveis tem feito com que a produção de enzimas por microrganismos seja cada vez mais estudada. As lipases, em especial, chamam atenção por participarem de reações de hidrólise e síntese de ésteres, o que as torna úteis em diferentes áreas, como na indústria de alimentos, farmacêutica, de detergentes e na produção de biocombustíveis (Adetuji; Olaniran, 2021).

Fungos filamentosos são bastante utilizados nesse tipo de estudo por possuírem um rápido crescimento, baixo custo de cultivo e secretam enzimas para o meio, o que facilita sua utilização (Peixoto *et al.*, 2003; Peralta *et al.*, 1990). Dentro desse grupo, o gênero *Aspergillus* se destaca pela capacidade de se adaptar a diferentes condições de cultivo e pela produção de várias enzimas de interesse, incluindo as lipases (Khanna *et al.*, 1995).

A produção dessas enzimas, no entanto, não depende apenas do microrganismo, mas também das condições de cultivo, como o tipo de meio, o pH, a temperatura e o tempo de incubação. Entender como cada um desses fatores interfere é importante para conseguir melhorar o rendimento enzimático e, assim, abrir caminho para aplicações em maior escala.

Pensando nisso, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipases pelo *Aspergillus sp. ARC3* em fermentação submersa, analisando como diferentes meios de cultura, valores de pH, temperaturas e tempos de incubação influenciam na atividade enzimática.

2 METODOLOGIA

2.1 Análise de diferentes meios de cultura para produção enzimática

Foram testados diferentes meios de cultura submersos com o objetivo de selecionar aquele que proporcionasse as melhores condições para a produção enzimática. Os meios avaliados foram: (1) Meio CP (Peixoto *et al.*, 2003), composto por extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e óleo de soja como fonte de carbono; (2) Meio Khanna (Khanna, 1995), preparado a partir de uma solução de sais minerais contendo NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , ZnSO_4 , MnSO_4 , FeCl_3 e CuSO_4 , suplementado com extrato de levedura e óleo de soja; (3) Meio M5 modificado (Peralta, 1990), constituído por extrato de levedura, peptona, carbonato de cálcio, cloreto de sódio, acetato de amônio e óleo de soja. Em todos os ensaios o pH inicial foi ajustado para 5,0, e a incubação ocorreu em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, mantidos à 30 °C, durante seis dias, sendo retirados triplicatas de meio a cada 24 horas.



2.2 Avaliação da influência do pH inicial e da temperatura na produção enzimática

Com o meio de melhor desempenho, avaliou-se a influência do pH inicial do meio (5,0; 5,5; 6,0) e da temperatura de cultivo (30 °C, 35 °C e 40 °C) sobre o crescimento fúngico e a produção de lipases. Os ensaios foram conduzidos com óleo de soja como fonte de carbono, em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, incubados por cinco dias.

2.3 Dosagem Enzimática

A atividade lipolítica foi avaliada utilizando *p*-nitrofenilpalmitato como substrato, com reação à 50 °C. A reação foi interrompida com tetraborato de sódio e o *p*-nitrofenol liberado quantificado a 405 nm. Uma unidade enzimática (U) correspondeu à hidrólise de 1 μmol de substrato/minuto. Controles com enzima desnaturada verificaram a hidrólise espontânea, e o meio reacional foi preparado imediatamente antes dos ensaios para preservar a integridade do substrato.

2.4 Dosagem proteica pelo método de Bradford

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (0–100 μg.mL⁻¹). Para a reação, 50 μL do extrato enzimático diluído foram misturados a 200 μL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Bradford, incubados por 5 min em temperatura ambiente e protegidos da luz. O branco foi preparado com água destilada e reagente. As leituras foram realizadas a 595 nm em leitor de microplacas Locus LMR-96. As concentrações proteicas foram expressas em mg.mL⁻¹, calculadas pela Equação 2, considerando o fator do reagente, volume de enzima e diluição do extrato.

$$Proteína \left(\frac{mg}{mL} \right) = ABS \cdot \frac{l}{F} \cdot \frac{l}{v} \cdot D \quad (2)$$

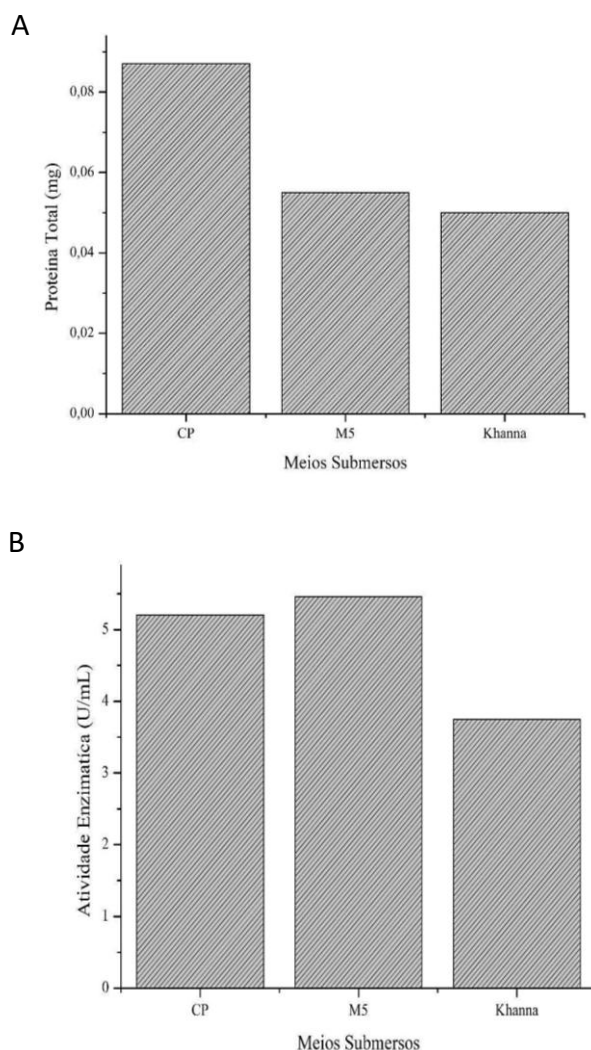
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do meio de cultura submerso para produção de lipases pelo *Aspergillus* sp. ARC3

O primeiro passo do estudo foi avaliar qual meio de cultura submerso proporcionava melhor crescimento e produção de lipases pelo *Aspergillus* sp. ARC3, sendo avaliados três meios distintos, todos contendo óleo de soja como fonte de carbono e incubados à 30 °C, por seis dias.

Os resultados demonstraram que, embora o meio CP tenha favorecido maior produção de proteínas totais (0,087 mg/mL), o meio M5 apresentou a melhor atividade lipolítica, atingindo 5,457 U/mL, superando os demais meios. Isso indicou que, mesmo que o crescimento fúngico não seja o mais intenso no M5, as condições deste meio favorecem significativamente a secreção de lipases (Figura 1). Com base nisso, o meio M5 foi selecionado para as etapas seguintes do estudo, servindo como base para otimização da produção enzimática.

Figura 1 - Determinação do meio de cultura do fungo *Aspergillus* sp. ARC3 para produção de lipases. (A) Proteínas totais (mg); (B) Atividade lipolítica (U/mL).



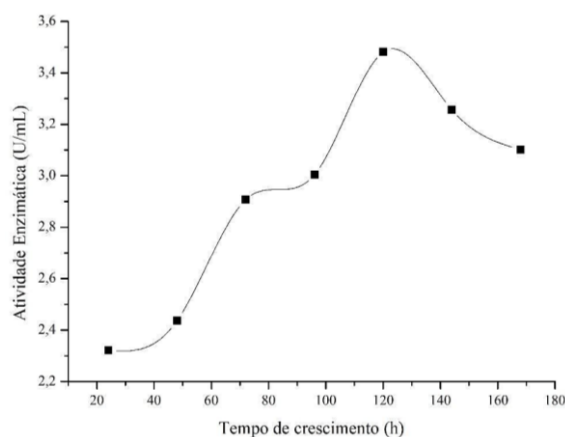
Fonte: Autoria própria.

3.2 Determinação do tempo de cultivo do fungo para maior produção de lipases

Em seguida, avaliou-se a produção de lipase ao longo de sete dias de incubação, considerando que períodos muito curtos limitam a produção devido à fase *lag* de crescimento dos microrganismos, enquanto períodos muito longos podem levar ao esgotamento de nutrientes e à redução da atividade enzimática.

O fungo foi cultivado em meio M5 à 30°C e amostras foram coletadas a cada 24 horas. A atividade lipolítica aumentou gradualmente até o quinto dia, atingindo o pico de 3,481 U/mL, e diminuiu nos dias subsequentes (Figura 2). Esses dados indicaram que cinco dias de incubação representou o tempo ideal para maximizar a produção de lipases, equilibrando crescimento celular e secreção enzimática.

Figura 2 - Determinação do tempo de crescimento do fungo *Aspergillus* sp. ARC3 para produção de lipases.



Fonte: Autoria própria

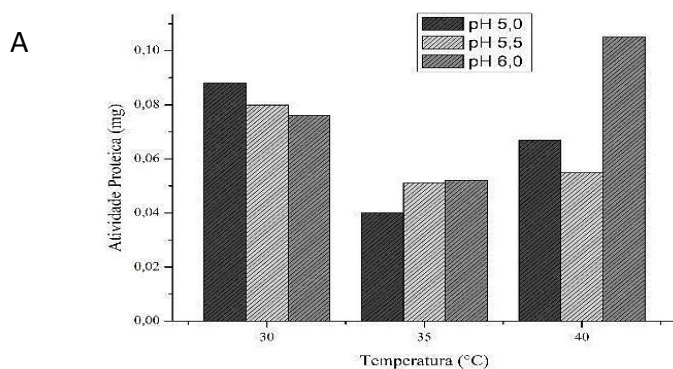
3.3 Análise do efeito do pH inicial do meio e da temperatura na produção de lipases pelo microrganismo em estudo

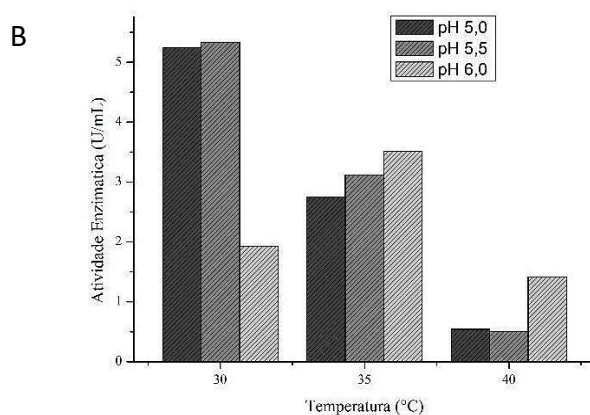
O pH e a temperatura do meio são fatores determinantes tanto para a estabilidade da enzima quanto para o crescimento do fungo, sendo avaliadas combinações de pH (5,0; 5,5; 6,0) e temperatura (30, 35 e 40 °C) em meio M5 com óleo de soja como fonte de carbono.

Os resultados mostraram que a maior atividade lipolítica ocorreu em pH 5,5 e 30 °C, com 5,331 U/mL, indicando preferência do *Aspergillus* sp. ARC3 por condições levemente ácidas e temperatura moderada (Figura 3). Enquanto que temperaturas acima de 35 °C reduziram a atividade, mesmo com variações de pH (Figura 3).

Em relação à produção de proteínas, pH 6,0 à 30 °C e pH 5,0 à 40 °C mostraram maior secreção proteica, demonstrando que o crescimento celular e a produção de lipases nem sempre ocorrem de forma paralela, reforçando a importância de priorizar as condições que favoreçam a atividade enzimática.

Figura 3 - Determinação do efeito do pH inicial do meio e da temperatura de crescimento do fungo *Aspergillus* sp. ARC3 na produção de lipases. (A) Proteínas totais (mg); (B) Atividade lipolítica (U/mL).





Fonte: Autoria própria

Essas três etapas mostraram que a escolha do meio de cultura, o tempo de incubação e as condições de pH e temperatura estão intimamente ligadas à produção de lipases pelo *Aspergillus* sp. ARC3. O meio M5 favoreceu a secreção enzimática após cinco dias de incubação, obtendo atingir a atividade máxima da enzima; e um pH levemente ácido à 30 °C ofereceu as condições ideais para o crescimento e produção lipolítica. Estes parâmetros servirão como base para as próximas otimizações, incluindo ajustes em fontes de nitrogênio, sais e quantidade de inóculo.

4 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que o *Aspergillus* sp. ARC3 possuiu potencial para a produção de lipases, entretanto, essa produção dependeu muito das condições de cultivo. Entre os meios testados, o M5 modificado se destacou, proporcionando a melhor produção enzimática.

A análise do tempo de incubação mostrou que cinco dias foram suficientes para alcançar a máxima produção de lipases, equilibrando o crescimento do microrganismo e a secreção da enzima. Além disso, observou-se que o pH de 5,5, junto com a temperatura de 30 °C, ofereceu as condições ideais para a atividade lipolítica.

Esses resultados indicaram que pequenos ajustes nas condições de cultivo, como pH, temperatura, tempo de incubação e escolha do meio, podem fazer grande diferença na produção de lipases. Assim, este estudo forneceu uma base importante para futuras otimizações e mostrou o potencial do *Aspergillus* sp. ARC3 para aplicações biotecnológicas.

AGRADECIMENTOS

UFVJM, ICT. Apoio financeiro CAPES, FAPEMIG e CNPq. O microrganismo foi cadastrado no SisGen número A64AD93.

REFERÊNCIAS

ADETUJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production strategies and biotechnological relevance of microbial lipases: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1257-1269, 2021.

KHANNA, P.; SUNDARI, S.S. et al. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p 242- 243, 1995.



64º Congresso Brasileiro de Química
04 a 07 de novembro de 2025
Belo Horizonte - MG

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J. A. et al. *Rhizopus microsporus* var. *Rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**. v. 6, n. 4, p. 269-273, 2003

PERALTA, R. M.; TERENCE, H. F. et al. "β-D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme". **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990