

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

Ana Vitória M. Cunha<sup>1\*</sup>, Biatriz Vitória A. dos Santos<sup>1</sup>, João Pedro A. Souza<sup>1</sup>, Brenda K. L. de Paula<sup>1</sup>, Raniere R. Lima<sup>1</sup>, Vivian Machado Benassi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade 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 (Adetuju; 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{CuSO}_4$ , 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<sup>-1</sup>). 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 Loccus LMR-96. As concentrações proteicas foram expressas em mg·mL<sup>-1</sup>, calculadas pela Equação 2, considerando o fator do reagente, volume de enzima e diluição do extrato.

$$\text{Proteína} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = ABS \cdot \frac{I}{F} \cdot \frac{1}{v} \cdot D \quad (2)$$

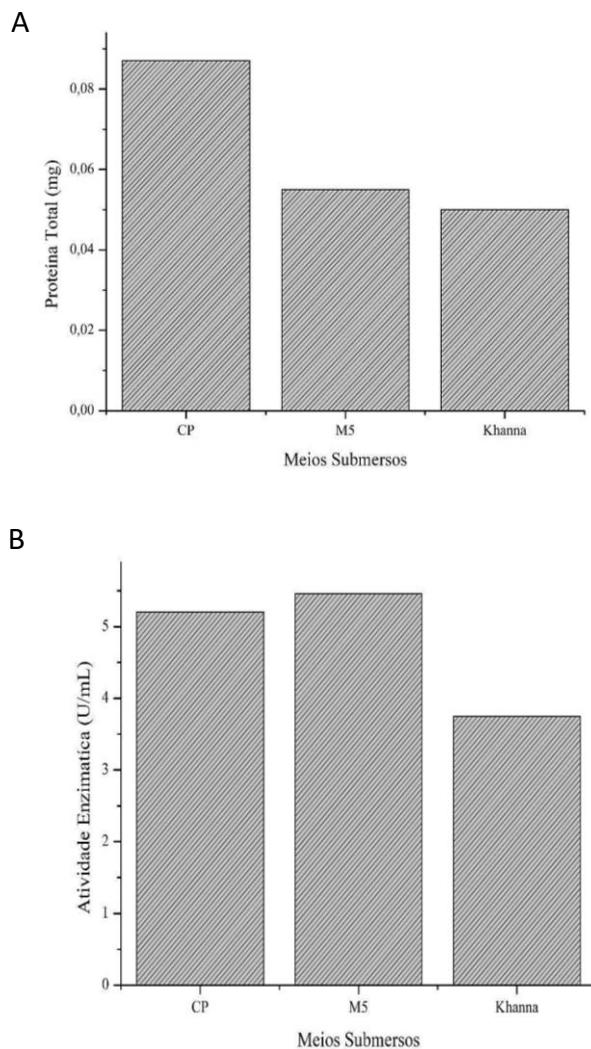
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 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).**



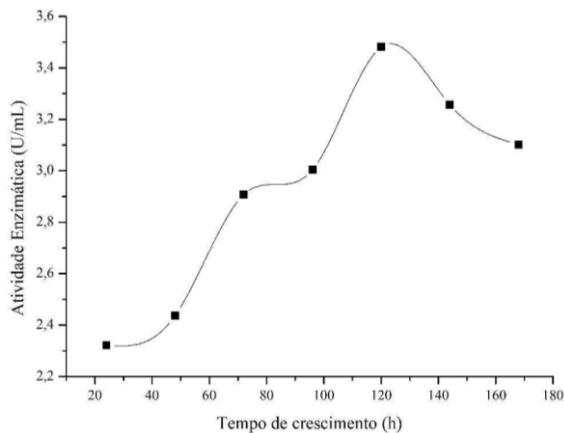
Fonte: Autoria própria.

### 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

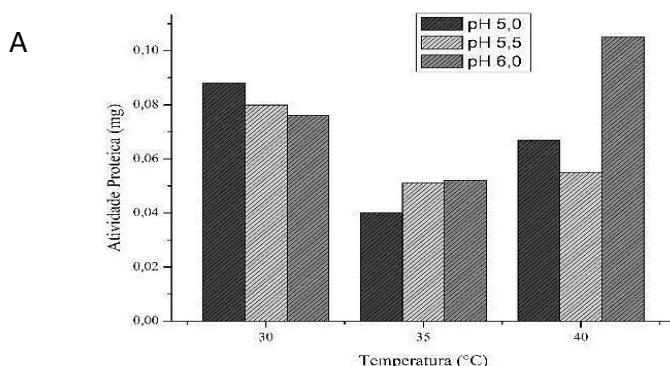
### 3.3 Análise do efeito do pH inicial do meio e da temperatura na produção de lipases pelo microrganismo em estudo

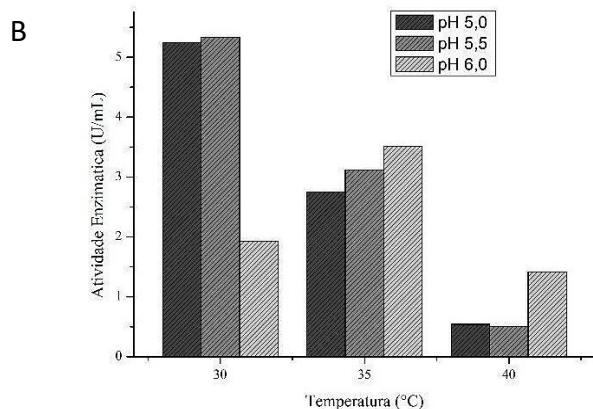
O pH e a temperatura do meio são fatores determinantes tanto para a estabilidade da enzima quanto para o crescimento do fungo, sendo avaliadas combinações de pH (5,0; 5,5; 6,0) e temperatura (30, 35 e 40 °C) em meio M5 com óleo de soja como fonte de carbono.

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.; TERENZI, H. F. et al. “ $\beta$ -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme”. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990