

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LIPASE DE *FUSARIUM SOLANI* UEM E3

Bianca de Souza Dias (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann
(Orientador). E-mail: ipbtessmann@uem.br@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Bioquímica / Enzimologia.

Palavras-chave: Enzima lipolítica; Fungo; Caracterização.

RESUMO

Lipases hidrolisam ligações éster entre glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, sendo a terceira classe de hidrolases industriais mais comercializadas. Um isolado de *Fusarium solani* foi previamente obtido de caixa de gordura residencial. Neste trabalho, a produção de uma lipase por esse fungo foi otimizada em meio líquido, e a enzima foi parcialmente purificada e caracterizada. A enzima, com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, teve atividade com substratos sintéticos contendo butirato, palmitato e dodecanoato. Além disso, a enzima foi ativa em baixas temperaturas, representando uma alternativa para atividades industriais que requerem essa propriedade.

INTRODUÇÃO

As lipases pertencem ao grupo das triacilglicerol-éster hidrolases e atuam sobre gliceroil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (≥ 10 átomos de carbono). Algumas lipases atuam em interface orgânico-aquosa (ALI *et al.*, 2023). Essas enzimas são encontradas em plantas, animais e microrganismos. No entanto, as enzimas microbianas são mais procuradas, devido sua diversidade catalítica, alta produção, ausência de flutuações sazonais, maior estabilidade e baixo custo de produção (ALI *et al.*, 2023).

O mercado internacional de lipases microbianas está previsto atingir a cifra de US\$ 428,6 milhões em 2025 (ALI *et al.*, 2023). Essas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias de detergentes e limpeza, de papel e celulose, de alimentos, de couro, de cosméticos e de síntese de ésteres como o biodiesel. Também são utilizadas no tratamento de efluentes, na síntese de biopolímeros como polifenóis e poliésteres e na resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários (ALI *et al.*, 2023).

Anteriormente em nosso laboratório, foi obtido um isolado de *Fusarium solani* com característica de produção de lipase em meio sólido. O presente trabalho teve como objetivos estudar a produção da enzima, bem como purificar parcialmente e caracterizar a enzima produzida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo

Foi utilizado o isolado de *F. solani* UEM E3 obtido previamente a partir de resíduos de caixa de gordura residencial (SILVA *et al.*, 2024). Este fungo está sendo mantido em meio ágar batata dextrose (BDA) inclinado e BDA coberto com óleo mineral.

Ensaio enzimático e dosagem de proteínas

A atividade enzimática foi avaliada pela hidrólise do *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) (WINKLER & STUCKMANN, 1979). A reação continha *p*-NPB a 113 µM e foi realizada em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0, em um volume final de 1,1 mL. A quantidade de enzima capaz de liberar um µmol de *p*-NP/min foi definida como uma unidade. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford.

Condições de cultivo em meio líquido e otimização da produção de lipase

O meio líquido continha peptona (3 g/L), extrato de levedura (2 g/L), tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, óleo de oliva (2%), MgSO₄•7H₂O (0,4 g/L) e (NH₄)₂SO₄ (0,4 g/L). O inóculo consistiu em 1,0 mL de água destilada estéril contendo 4,0 × 10⁵ esporos (4%, v/v). O cultivo foi realizado a 25 °C, 100 rpm, em frascos de 125 mL contendo 25 mL do meio. As culturas foram filtradas em papel de filtro, e o peso do micélio seco a 50 °C avaliou o crescimento do fungo. A atividade enzimática foi determinada no filtrado.

Na otimização da produção da enzima, o óleo de oliva foi substituído por glicose, tributirina e por vários outros óleos vegetais, todos na concentração de 2%. O tamanho do inóculo também foi avaliado, e uma curva de crescimento foi realizada. A média e o desvio padrão dos resultados foram calculados e as médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey (α = 0,01).

Purificação parcial da enzima

O fungo foi cultivado nas condições padronizadas por 72 horas. Os filtrados das culturas de 15 frascos foram combinados, e as proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio a 90%. As proteínas foram coletadas por centrifugação (12.000g, 5 min) e dialisadas em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. O dialisado foi aplicado em uma coluna de Sephacryl S-200 HR (Sigma-Aldrich, EUA), e a eluição foi feita com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. As frações com maior atividade enzimática foram juntadas, acrescidas de glicerol 20% e congeladas a -20 °C. A pureza da enzima e a sua massa molecular foram avaliadas por eletroforese em SDS-PAGE.

Caracterização bioquímica da enzima

A temperatura ótima foi determinada por meio do ensaio enzimático em diferentes temperaturas. Na avaliação da estabilidade térmica, a enzima foi incubada por 10

minutos em diferentes temperaturas e, em seguida, submetida ao ensaio enzimático a 30 °C. A temperatura na qual a enzima perde 50% de sua atividade (T_{50}) foi calculada com a equação da curva de regressão polinomial obtida. A especificidade da enzima foi avaliada pela substituição do *p*-NPB do ensaio enzimático por *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP), *p*-nitrofenil dodecanoato (*p*-NPD) ou *p*-nitrofenil-acetato (*p*-NPA), mantida a mesma concentração. K_M e $V_{m\acute{a}x}$ para *p*-NPB e *p*-NPP foram estimados por regressão não linear, usando a ferramenta SOLVER do programa Excel, a partir dos dados obtidos em curvas de saturação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As melhores condições para a produção da enzima foram: meio de cultivo com óleo de oliva 2% (Figura 1A e B), inóculo de 4% (Figura 1C) e 72 h de cultivo (Figura 1D). O perfil de eluição da enzima da coluna de Sephacryl S-200 HR mostrou um único pico (Figura 2A). Houve um aumento da atividade específica na purificação, com recuperação final de 52% (Tabela 1). A análise de SDS-PAGE mostrou uma proteína predominante com massa molecular aproximada de 60 kDa (Figura 2B).

A lipase parcialmente purificada apresentou temperatura ótima na faixa de 10 a 35 °C e foi ativa a 0 °C, indicando adaptação ao frio (Figura 3A). A curva de estabilidade térmica mostrou que a enzima tem uma T_{50} de 50,7 °C (Figura 3B). A enzima não apresentou atividade para *p*-NPA, mas foi ativa com *p*-NPB, *p*-NPD e *p*-NPP (Figura 3C), indicando especificidade para ácidos graxos de cadeia média a longa. A enzima apresentou valores de K_M de 112,9 para *p*-NPB e 96,2 μ M para *p*-NPP, e de $V_{m\acute{a}x}$ de 15,4 e 16,6 μ mol/min para *p*-NPB e *p*-NPP, respectivamente (Figura 3D).

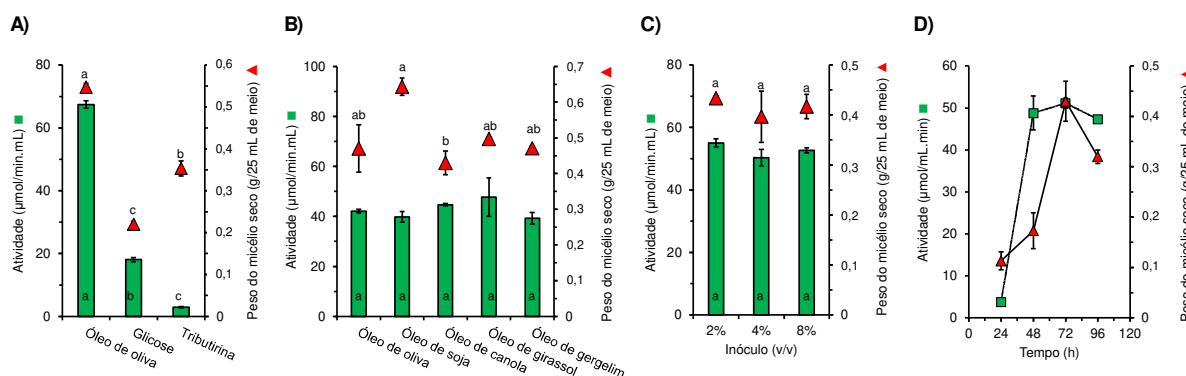


Figura 1 – Otimização da produção da enzima. A) Melhor fonte de carbono. B) Melhor óleo vegetal. C) Tamanho do inóculo. D) Tempo de cultivo. Os dados são a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em três frascos de cultivo. Dados com letras iguais não diferem estatisticamente.

Tabela 1. Purificação da lipase de *F. solani* UEM E3.

	Volume (mL)	Atividade (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
Meio de cultivo	310	37039,5	40,1	924,8	
Após precipitação e diálise	8,5	54721,1	20,8	2630,8	147,7

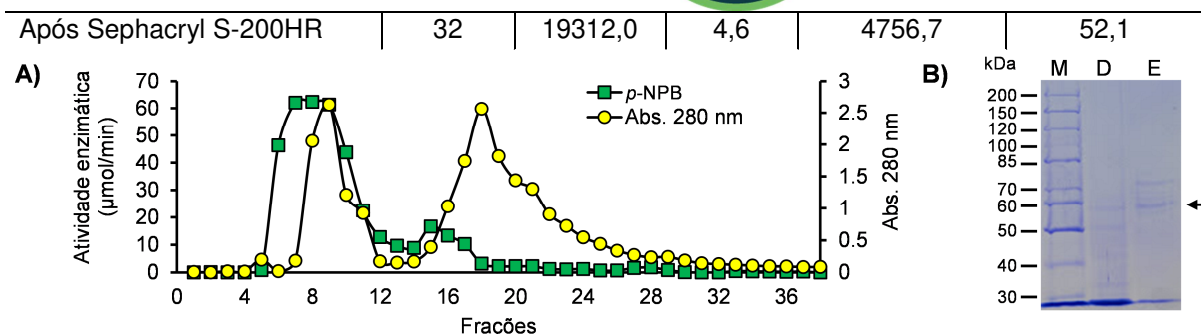


Figura 2 – Purificação da lipase de *F. solani* UEM E3. Perfil de eluição da coluna de Sephacryl S-200 HR. As frações de 6 a 14 foram juntadas. B) Gel de SDS-PAGE. M-Marcador. D-Dialisado. E-Enzima.

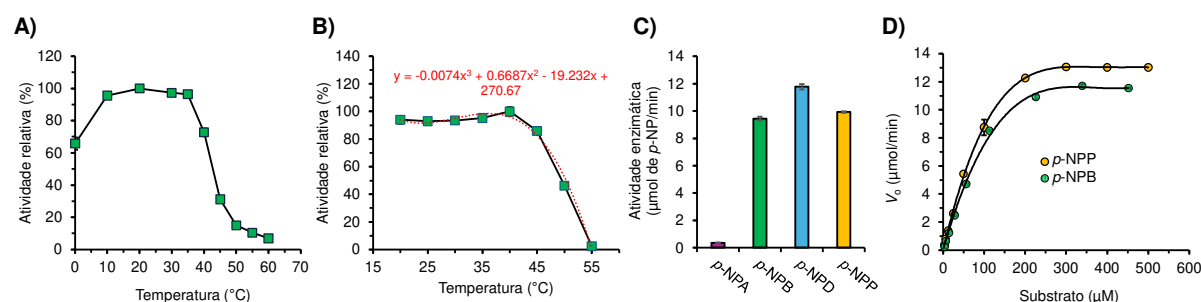


Figura 3 – Caracterização da enzima. A) Temperatura ótima. B) Estabilidade térmica. C) Especificidade. D) Curvas de saturação. Os dados são a média e o desvio padrão de triplicatas.

CONCLUSÕES

A produção da lipase de *F. solani* UEM E3 foi padronizada e a enzima foi parcialmente purificada e caracterizada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS

ALI, S.; KHAN, S. A.; HAMAYUN, M.; LEE, I.-J. The recent advances in the utility of microbial lipases: A review. **Microorganisms**, v. 11(2), p. 510, 2023. doi.org/10.3390/microorganisms11020510.

SILVA, M. G. L.; MAEDA, E. S.; REIS, K.L.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Bioprospecção e identificação molecular de bactérias e fungos produtores de enzimas lipolíticas. In 33º Encontro Anual de Iniciação Científica - 13º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 2024. **Anais eletrônicos**: UEM, 2024. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2024/anais/artigos/6994.pdf>.

34º Encontro Anual de Iniciação Científica
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 663–670, 1979. doi.org/10.1128/jb.138.3.663-670.1979.