

IV Semana de Ciência e Tecnologia

Tecnologia, Educação e Meio Ambiente:
construindo um Jequitinhonha de oportunidades

4 - 8 • Novembro • 2025

Análise do efeito do meio de cultura submerso no cultivo do *Aspergillus* sp. C333 para produção de celulases

Carlos Arturo Rivera Olavo^{1*}, Tarcisio Michael Ferreira Soares de Oliveira¹, Lídia Sousa dos Santos¹, Vivian Machado Benassi¹,

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

***e-mail:** carlos.olavo@ufvjm.edu.br

Resumo: A produção de celulases por fungos é de grande interesse biotecnológico, dada a aplicação dessas enzimas na indústria de bioetanol, papel, têxtil e alimentícia. Entre os fatores influenciado pela síntese enzimática, o meio de cultura submerso é determinante para maximizar a atividade enzimática. O presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes meios de cultura submersos visando identificar aquele que proporciona maior produção de celulases do fungo *Aspergillus* sp. C333. Foram testados diversos meios e mensurada a atividade enzimática ao longo do período de cultivo. Os resultados indicaram que o meio de cultura Vogel promoveu a maior indução da atividade de celulases, destacando-se entre os meios avaliados. Vale citar que a resposta enzimática aos meios de cultura depende do tipo de enzima. Esses achados contribuem para preencher lacunas na literatura sobre a produção de celulases em cultivo submerso, oferecendo informações relevantes para o desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes e sustentáveis. Futuras pesquisas poderão investigar ajustes nos componentes do meio para potencializar a atividade enzimática enquanto reduzem custos, ampliando a aplicabilidade industrial das enzimas.

Palavras-chave: Biotecnologia, Enzimas, Prospecção.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariontes, heterotróficos e ubíquos, podendo ser encontrados em diversos ambientes, tais como ar, solo, água, plantas e animais. Morfologicamente é comum distingui-los em dois grupos: leveduras e fungos filamentosos. No entanto, vale ressaltar que essa distinção não possui valor taxonômico, visto que ambas as formas podem ser encontradas no mesmo grupo de fungos [1].

Os fungos filamentosos são caracterizados por serem constituídos por um conjunto de células formando os filamentos, denominados de hifas, os quais podem ser cenocíticas ou septadas, sendo o conjunto denominado de micélio. Essas estruturas possibilitam a troca de nutrientes e informações genéticas entre as células fúngicas, permitindo a adaptação a diferentes ambientes [2].

Esses fungos são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários, como enzimas, ácidos orgânicos e pigmentos, com diversas aplicações biotecnológicas [3]. As enzimas produzidas por esses microrganismos são poderosos catalisadores, estas atuam nas reações sem alterar o equilíbrio das mesmas, acelerando a sua velocidade, diminuindo a energia de ativação de maneira mais eficiente que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos [4]. Na indústria, as enzimas têm um papel fundamental na melhoria de processos, na qualidade do produto final e na redução de resíduos.

Esses catalisadores podem ser produzidos por diferentes organismos, como bactérias, fungos, plantas e células animais, porém, os fungos filamentosos têm se destacado como uma das melhores fontes para a produção de enzimas em escala industrial [13].

Muitos estudos têm sido realizados visando aprimorar a eficiência e robustez dos coquetéis de celulasas no âmbito da produção de biomassa para biocombustíveis e outros bioprodutos, visando melhorar a economia industrial nesse setor [14].

Celulasas são enzimas hidrolíticas (carboidrases) capazes de romper as ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de glicose. Existem quatro tipos de celulasas [5]. As endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), que rompem o polímero de celulose desordenadamente, no meio da molécula, liberando oligossacarídeos β -1,4. Muitas endoglucanases não são capazes de atacar a celulose cristalina, agindo apenas sobre a fração amorfa do polímero e fazendo uma hidrólise incompleta. Enquanto, as exo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.91 – Celobiohidrolase) rompem a celulose a partir da extremidade, liberando D-glicose e celobiose (dissacarídeo de glicoses unidos por ligações *O*-glicosídicas do tipo β -1,4). Essa celobiose liberada é hidrolisada pelas β -glucosidases (EC 3.2.1.21 – Celobiase) [6].

Por fim, as glicohidrolases (EC 3.2.1.74) removem unidades de glicose da extremidade de polímeros (celulose) e oligômeros de alta massa molecular [6]. Essas enzimas são protagonistas na hidrólise de materiais lignocelulóticos.

A biomassa lignocelulolítica (LCB) é uma fonte promissora de biocombustível, pois não compete diretamente com a produção de alimentos. Além disso, apresenta uma variedade de fontes disponíveis, como resíduos agrícolas, resíduos florestais, gramíneas e culturas energéticas. Apesar da abundância desses recursos em todo o mundo, sua contribuição para o setor de energia ainda é limitada. Isso pode ser atribuído à falta de tecnologias economicamente viáveis e aplicáveis em escala industrial [16]. A biomassa é uma matéria heterogênea composta principalmente pelos três principais polímeros vegetais: celulose, hemicelulose e lignina.

A celulose é um polissacarídeo formado por subunidades de celobiose, ligadas por ligações glicosídicas β -1,4, o que permite a compactação das fibrilas de glicose e a formação de estruturas cristalinas. Por outro lado, as hemiceluloses são polissacarídeos ramificados, compostos por uma espinha dorsal de xilana com cadeias laterais de arabinose e ácido glucurônico, sendo este último frequentemente metilado. As hemiceluloses apresentam uma estrutura amorfa e aleatória, formando uma rede na parede celular vegetal, que faz ligações cruzadas entre as fibrilas de celulose e a lignina. Sua estrutura fina pode variar entre diferentes plantas, tecidos e até mesmo dentro da mesma molécula. Em contraste com a celulose e a hemicelulose, a lignina não é um polissacarídeo, mas consiste em unidades de fenilpropanóides que formam uma rede tridimensional [17,18].

A lignina é hidrofóbica e confere rigidez à parede celular, bem como resistência contra insetos e fitopatógenos [17,18]. A degradação enzimática é, dentre outras tecnologias, empregada na desconstrução da biomassa lignocelulósica em seus monômeros [5]. Sendo uma das matérias-primas mais abundantes, considerada uma opção sustentável, renovável e economicamente desejada, apresentando enorme potencial para contribuir para a crescente demanda energética e a produção de bioprodutos como hidrogéis, nanopartículas, fibras de carbono, rações e impressões 3D [19,20].

Dessa forma, esse trabalho objetivou analisar o efeito de diferentes meios de culturas submersos na indução da produção de celulases pelo fungo filamentoso *Aspergillus* sp. C333.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP), na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus JK, Diamantina, Minas Gerais. O microrganismo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número A64AD93.

2.1 Produção de celulases pelo *Aspergillus* sp. C333 em meios de cultura submersos

Inicialmente, o microrganismo em estudo *Aspergillus* sp. C333 foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura sólido composto por aveia Quaker® e ágar bacteriológico [11], à 30°C. Esse cultivo será utilizado para o inóculo em meio de cultura submerso.

Em seguida, foram preparados 50 mL de distintos meios de cultura submersos, contidos em Erlenmeyers de 250 mL, sendo esses: (a) Carvalho-Peixoto (CP) [7]; (b) M5 [8]; (c) Meio

Adams [9] e (d) Meio Vogel [10]. Os mesmos foram autoclavados à 120°C, 1 atm, durante 30 minutos. Após o resfriamento dos meios foi realizado o inóculo do microrganismo nos meios submersos utilizando-se de dois discos de 1 polegada cada do cultivo em placa de Petri contendo meio sólido composto por aveia contendo o fungo em estudo.

Os meios foram mantidos em estufa bacteriológica, de forma estacionária, à 30°C, durante quatro dias. Para a identificação do melhor meio de cultura realizou-se o acompanhamento, retirando uma duplicata de cada cultivo, realizando-se a análise quantitativa de pH, volume (mL) e a dosagem enzimática.

A quantificação da atividade enzimática foi realizada utilizando como substrato a carboximetilcelulose (CMC) Sigma® a uma concentração de 1% (m/v) em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,8. Para a reação enzimática, foram adicionados 250 µL da solução do substrato CMC com 250 µL do extrato bruto enzimático em um tubo. A reação ocorreu em banho-maria à 50°C, por 10 minutos, em seguida foi retirada três alíquota de 50 µL do meio reacional e adicionando-se 50 µL de DNS (ácido 3',5'-dinitrosalicílico), seguindo a fervura à 100 °C, por 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 1000 µL de água destilada [12]. O branco consistiu na retirada de uma alíquota de reação antes da inserção em banho-maria, demonstrando que não houve a ação das células presentes no extrato bruto.

A leitura foi realizada na absorvância à 540 nm em leitor de microplacas Locus LMR-96. A concentração de açúcares redutores foi determinada pela curva padrão de glicose (0–0,05 mg/mL), com $R^2 \geq 0,98$. A atividade enzimática foi expressa em U/mL conforme a Equação 1 a seguir:

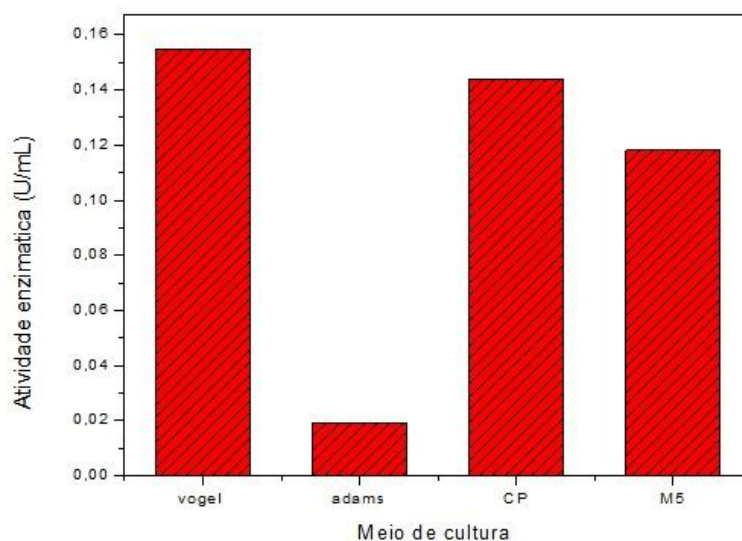
$$\text{Atividade Celulolítica (U/ml)} = \text{ABS (nm)} \cdot \frac{1}{t(\text{min})} \cdot \frac{1}{f \text{ (nm/}\mu\text{mol)}} \cdot \frac{1}{v \text{ (mL)}} \quad (1)$$

Sendo ABS a absorvância, t o tempo de reação (min.), f o fator de conversão do DNS (nm/µmol), e v o volume da enzima (mL). Uma unidade (U) correspondeu a liberação de 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições descritas de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade enzimática da CMCase variou consideravelmente em função do meio de cultivo utilizado (Figura 1). O meio Vogel apresentou a maior atividade (0,153 U/mL), evidenciando seu potencial em promover a síntese de celulases pelo fungo *Aspergillus* sp. C333. Os meios CP e M5 apresentaram atividades intermediárias (0,14 e 0,12 U/mL, respectivamente), demonstrando potencial como alternativas ao Vogel.

Figura 1. Atividade enzimática dos meios de cultura submersos.



Fonte: Próprio Autor.

Esse desempenho pode ser atribuído à formulação balanceada do meio, rica em nutrientes essenciais e elementos-traço, favorecendo a expressão de enzimas lignocelulolíticas. Resultados semelhantes foram reportados por Sukumar et al. (2021) [21], os quais destacam que a composição do meio de cultivo exerce influência direta na regulação genética e na secreção de celulases em fungos filamentosos.

Em contrapartida, o meio Adams apresentou a menor atividade enzimática (0,02 U/mL). Essa baixa eficiência sugere que sua composição nutricional não foi adequada para estimular a produção de CMCase, corroborando observações de Passoth e Sandgren (2019) [22], que relataram menor rendimento enzimático em condições de limitação de nutrientes ou fontes de carbono pouco indutoras.

De forma geral, os resultados obtidos neste estudo reforçam que a escolha do meio de cultivo é um dos principais fatores determinantes na eficiência da produção de CMCase em fungos filamentosos. O melhor desempenho observado no meio Vogel indicou que este é o mais adequado para futuras etapas de otimização em bioprocessos. Além disso, a elevada atividade enzimática sugere potencial aplicação em processos de hidrólise de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis de segunda geração, em consonância com os avanços relatados por Wang et al. (2021) [23], que destacam a integração de plantas bioenergéticas e microrganismos como estratégia promissora para bioprocessos sustentáveis.

4. CONCLUSÃO

Entre os meios avaliados, o meio Vogel mostrou-se o mais indutivo para a produção de CMCase pelo fungo *Aspergillus* sp. C333, evidenciado pela maior atividade enzimática obtida em cultivo submerso. Esse resultado reforça a relevância de sua composição nutricional para a indução de celulasas. No entanto, considerando seu custo mais elevado, torna-se necessário investigar alternativas que conciliem a capacidade indutiva observada com maior viabilidade econômica, de modo a ampliar as perspectivas de aplicação em processos industriais de hidrólise de biomassa.

Agradecimentos

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, ao Instituto de Ciência e Tecnologia, ao Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos e pelo suporte ao desenvolvimento do trabalho e aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] F. Alterthum, *Biotecnologia industrial: fundamentos*, 2ª edição, Blucher, São Paulo, 2020.
- [2] G. Tortora, C. Case, B. Funke, *Microbiologia*, 12ª edição revisada e atualizada, Artmed, Porto Alegre, 2017.
- [3] W.A. Müller, M.V.A. Pasin, J.R. Sarkis, L. Damasceno, F. Marczak, Effect of pasteurization on *Aspergillus fumigatus* in apple juice: analysis of the thermal and electric effects, *Journal of Food Microbiology*, v. 338 (2021) 108993.
- [4] D. Nelson, M. Cox, A. Hoskins, *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 8ª edição revisada e atualizada, Artmed, Porto Alegre, 2022.
- [5] A. Singh, et al., Papel do pré-tratamento hidrotérmico para a biorrefinaria sustentável, *Tecnologia de Biorecursos*, v. 367 (2023) 128271.
- [6] M.G.B. Koblitz, *Bioquímica dos alimentos: teoria e aplicações práticas*, 2ª edição, Grupo GEN, Rio de Janeiro, 2019.
- [7] S.C. Peixoto, et al., *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases, *International Microbiology*, v. 6 (2003) 269-273.
- [8] D. Peralta, H.F. Terenzi, J.A. Jorge, β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, v. 1033 (1990) 243-249.
- [9] P.R. Adams, Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*, *Mycopathologia*, v. 112 (1990) 35-37.
- [10] H.F. Vogel, Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications, *American Naturalist*, v. 98 (1964) 435-446.
- [11] R. Emerson, An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*, *Lloydia*, v. 4 (1941) 77-144.
- [12] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- [13] M.V. Copetti, C.H. Corassin, T.C. Pimentel, C.A.F. Oliveira, A.G. Cruz, Micotoxinas e antibióticos no processamento de leite e derivados. In: A.G. Cruz, C.H. Corassin (orgs.), *Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados*, Elsevier, Rio de Janeiro, 2019.

- [14] J. Choudhary, S. Singh, L. Nain, Leveduras fermentadoras termotolerantes para fermentação sacarificação simultânea de biomassa lignocelulósica, *Revista Eletrônica de Biotecnologia*, v. 21, p. 82-92, 2016.
- [15] S. Moraïs, et al., O perfil enzimático de enzimas celulosômicas da bactéria intestinal humana *Ruminococcus champanellensis* revela um sistema afinado para o reconhecimento de coesinas, *Microbiologia Ambiental*, v. 18, n. 2 (2016) p. 542-556.
- [16] A. Yousuf, et al., Lignocellulosic biomass to liquid biofuels. In: A. Yousuf (ed.), *Fundamentals of lignocellulosic biomass*, Academic Press, London, 2020, cap. 1, p. 1-15.
- [17] V. Passoth, E. Sandgren, Produção de biocombustíveis a partir de hidrolisados de palha: realizações atuais e perspectivas, *Microbiologia Aplicada e Biotecnologia*, v. 103 (2019) p. 5105-5116.
- [18] R. Sukumaran, et al., Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi, *Bioresource Technology*, v. 329 (2021) 124746.
- [19] Y. Wang, et al., Cascading of engineered bioenergy plants and fungi sustainable for low-cost bioethanol and high-value biomaterials under green-like biomass processing, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 137 (2021) 110456.
- [20] L. Liu, W.-C. Huang, Y. Liu, M. Li, Diversity of cellulolytic microorganisms and microbial cellulases, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 163 (2021) 105277.
- [21] R. Sukumaran, et al., Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi, *Bioresource Technology*, v. 329 (2021) 124746.
- [22] V. Passoth, E. Sandgren, Biofuel production from straw hydrolysates: current achievements and perspectives, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103 (2019) 5105-5116.
- [23] Y. Wang, et al., Cascading of engineered bioenergy plants and fungi sustainable for low-cost bioethanol and high-value biomaterials under green-like biomass processing, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 137 (2021) 110456.