

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE BIOMASSA DE MICROALGAS E FUNGO *Trichoderma koningiopsis* COMO UMA TENDÊNCIA PARA DIVERSAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

CAROLINE DALASTRA^{1,2*}, FÁBIO SPITZA STEFANSKI^{3,2}, ALINE FRUMI CAMARGO^{4,2}, WILLIAM MICHELON⁵, HELEN TREICHEL^{6,2}

1 INTRODUÇÃO

No cenário de produção enzimática por meio de subprodutos, as cepas microbianas surgem como parte imprescindível do processo, já que a obtenção de enzimas por fermentação ocorre através da atuação de microrganismos (principalmente fungos e bactérias) nestes substratos que secretam enzimas com diferentes afinidades e de interesse biotecnológico. Duas aplicações em que recentemente o papel das enzimas tem sido alvo de exploração é com relação à produção de bioherbicidas e de aplicações no tratamento biológico de efluentes da indústria têxtil (BORDIN et al., 2018; KLANOVICZ et al., 2020).

Os bioherbicidas são definidos como produtos de origem natural para o controle de plantas daninhas que podem ser organismos vivos, relacionados especificamente a microrganismos ou os metabólitos que são formados ao longo de seu desenvolvimento. O uso desses microrganismos na agricultura pode retardar o desenvolvimento de ervas daninhas agindo como uma forma de biocontrole e reduzindo os riscos ambientais (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD_ALLAH, 2018). Bordin et al. (2018), usando meio de cultivo sintético, observaram resultados satisfatórios no controle biológico de *Euphorbia heterophylla* que foi associado a presença de enzimas secretadas pelo fungo *Trichoderma koningiopsis*, como celulasas e peroxidases.

A ação da enzima peroxidase também pode estar relacionada ao tratamento biológico de efluentes industriais. Na literatura, diversos estudos trazem a abordagem dessas enzimas em processos de tratamento de efluentes de indústria têxtil, entretanto, a maioria desses estudos utiliza enzimas comerciais que limita a aplicação em virtude dos altos custos envolvidos.

Nesse sentido, a busca por métodos mais baratos, eficazes e sustentáveis em processos

1 Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, contato: carolinedalastra@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa em Agroenergia e Linha de Pesquisa em Bioprocessos e Aplicação em Bioenergias da Universidade Federal da Fronteira Sul

3 Engenheiro Ambiental e Sanitarista, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim

4 Doutoranda em Biotecnologia e Biociência, Universidade Federal de Santa Catarina, *campus* Florianópolis

5 Doutorando em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, *campus* Florianópolis

6 Doutora em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim, **Orientadora.**

biológicos no tratamento de efluentes têxteis, é um grande esforço de pesquisa, devido à crescente preocupação ambiental e de saúde que os elementos tóxicos presentes nesse material ocasionam quando lançados em corpos receptores.

2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial da utilização de biomassa de microalgas como matéria-prima em processo fermentativo submerso, visando a produção de enzimas com potencial para tratamento biológico de efluentes têxteis e na aplicação dos biocompostos em áreas de interesse ambiental.

3 METODOLOGIA

A linhagem de microalga utilizada corresponde a espécie *Chlorella spp.* A biomassa foi cedida pela Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC), sendo resultante do processo de fitorremediação da água residuária da suinocultura, após o tratamento anaeróbio (UASB). O microrganismo utilizado para a produção dos extratos enzimáticos corresponde a espécie *Trichoderma koningiopsis*, obtido no banco de microrganismos do Laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Erechim, RS.

Testes preliminares foram realizados com a biomassa microalgal em três diferentes condições: 1) biomassa bruta (com 89% de umidade); 2) biomassa liofilizada (condições: 72 h, -50 °C e pressão de vácuo); 3) biomassa bruta e liofilizada pré-tratada com sonda de ultrassom (80% de potência, 10 min e 3 pulsos). O meio fermentativo foi preparado em erlenmeyers com volume efetivo de 150 mL, e esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C e 1 atm. Os meios foram inoculados com 10⁶ esporos/mL do microrganismo e incubados em agitador orbital sob condições de 120 rpm, 28 °C durante 72 h (BORDIN et al., 2018). Ao final da fermentação foi analisada a presença das enzimas lipase, celulase, amilase e peroxidase no extrato bruto após separação da biomassa resultante. Todas as amostras foram realizadas em triplicatas.

Os extratos fermentados foram avaliados quanto sua ação bioherbicida frente a quatro plantas daninhas resistentes aos herbicidas comerciais: *Bidens pilosa* (picão preto), *Conyza bonariensis* (buva), *Urochloa plantaginea* (papuã) e *Euphorbia heterophylla* (leiteiro). As plantas daninhas foram cultivadas em casa de vegetação com controle de temperatura (24 °C) e sem controle de luminosidade. As aplicações foram coordenadas por pesquisadores do laboratório de Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Erechim/RS. Os extratos também foram avaliados quanto a capacidade de descolorização dos compostos recalcitrantes presentes em efluentes sintéticos de indústria têxtil. Os testes avaliaram a especificidade da enzima frente ao tratamento de diferentes tipos de corantes utilizados na indústria têxtil: vermelho (455 nm), azul (595 nm), amarelo (414 nm) e marrom (530 nm). A reação enzimática foi conduzida em agitador

orbital por 5 horas a 160 RPM e 25 °C. Posteriormente, a descolorização foi analisada usando espectrofotômetro com os respectivos comprimentos onda para cada corante mencionados acima. A quantidade de corante removida foi determinada por meio da Equação 1 expressa a seguir.

$$\text{Descolorização (\%)} = \frac{ABS_{INICIAL} - ABS_{FINAL}}{ABS_{INICIAL}} \times 100$$

(Equação 1)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição da biomassa microalgal após o processo de ficorremediação do digestato resultante da produção de biogás apresentou os seguintes resultados: 56,1% de proteínas, 34,7% de carboidratos, 1,7% de lipídios e 7,8% de minerais.

A partir dos ensaios iniciais de fermentação verificou-se que houve uma grande produção de peroxidases com a utilização de biomassa liofilizada e que o pré-tratamento ultrassônico não foi determinante para a produção dessa enzima (Tabela 1). O ensaio L4 foi o maior produtor de peroxidase e amilase (16.200,00 e 6,98 U/mL, respectivamente). O ensaio L3 apresentou a maior produção de celulase e biomassa. A alta produção de biomassa pode estar ligada à maior existência de substrato e aos maiores rendimentos de celulase. Também houve produções de amilase somente quando se detectou a presença de peroxidase com lipase (ensaio F3) e peroxidase com celulase (ensaio L4) sugerindo que possivelmente existe um sinergismo entre essas enzimas na dissolução de membranas e na quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular da microalga tornando acessível carboidratos como o amido para o crescimento fúngico que está presente intracelularmente

As melhores condições obtidas das respostas enzimáticas (ensaio F4 e L4) foram selecionadas para avaliar o potencial bioherbicida (Tabela 2). A porcentagem dos efeitos fitotóxicos foi relacionada com o ensaio controle ao qual utilizou-se somente água destilada.

Tabela 1 – Atividade enzimática e produção de biomassa após fermentação utilizando *T. koningiopsis* com biomassa microalgal fresca e liofilizada sob diferentes condições.

Condições		Biomassa fresca				Biomassa liofilizada				Meio sintético*
		F1	F2	F3	F4	L1	L2	L3	L4	
Atividade enzimática (U/mL)	Peroxidase	0,00	0,00	666,67	766,67	2966,70	133,30	15400,00	16200,00	41,00
	Celulase	0,50	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	3,99	5,99	10,62
	Amilase	0,00	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	6,98	17,25
	Lipase	0,00	0,00	0,75	1,57	0,00	0,00	0,00	0,00	3,22
Biomassa (g/L)		2,26	2,09	4,78	4,75	11,44	13,21	14,31	14,05	1,85

*Resultados de produção enzimática utilizando meios sintéticos para crescimento de *T. koningiopsis* que representaram melhor efeito bioherbicida em *H. heterophylla* (BORDIN et al., 2018).

F1 e L1: 7,5% (m/v) de microalga + 10⁶ esporos/mL *T. koningiopsis*; F2 e L2: 7,5% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10⁶ esporos/mL *T. koningiopsis*; F3 e L3: 10% (m/v) de microalga pré-tratada com sonda de ultrassom + 10⁶ esporos/mL *T. koningiopsis*; F4 e L4: 10% (m/v) de microalga + 10⁶ esporos/mL *T. koningiopsis*

Tabela 2 - Análise de fitotoxicidade em plantas daninhas após o 7º e 15º dia da aplicação dos biocompostos F4 e L4.

Espécies	Respostas aos danos foliares em (%)			
	Biocomposto F4		Biocomposto L4	
	7º dia	15º dia	7º dia	15º dia
<i>Bidens pilosa</i>	Nd	1	5	5
<i>C. bonariensis</i>	70	100	80	40
<i>E. heterophylla</i>	2	3	30	20
<i>U. plantaginea</i>	Nd	Nd	5	5

Biocomposto F4: Obtido da fermentação com a microalga fresca. *Biocomposto L4*: Obtido da fermentação com a microalga liofilizada. *Nd*: Efeito não detectado.

A partir dos resultados de aplicação desse estudo, verificou-se um efeito seletivo dos biocompostos F4 e L4 sobre a erva daninha *C. bonariensis* pela presença de maiores efeitos fitotóxicos. Os efeitos fitotóxicos após o 15º dia em *C. bonariensis* foram maiores com a utilização do biocomposto produzido a partir da biomassa fresca (F4) na fermentação do que em relação ao uso da biomassa liofilizada (L4). A diminuição do efeito fitotóxico após o 15º dia com a aplicação do biocomposto L4 pode evidenciar a forte resistência dessa erva daninha. Além de possibilitar uma redução de custos com o processo de secagem da microalga por liofilização, esses resultados mostram-se interessantes por terem apresentado um controle satisfatório de uma espécie considerada altamente resistente aos herbicidas convencionais.

Os corantes escolhidos foram avaliados com a utilização do extrato enzimático bruto, denominado F4 proveniente dos ensaios iniciais de fermentação. Em 5 mL de extrato enzimático houve uma descolorização de 2,75%, 54,42% e 3,19% para os corantes vermelho, marrom e

amarelo, respectivamente. Não foi identificada descolorização para o corante azul. Já em 10 mL, houve descolorizações de 3,3%, 45,46%, 4,2% e 22,37% para os corantes vermelho, marrom, amarelo e azul, respectivamente. Os resultados evidenciam que a enzima peroxidase presente no extrato apresentou especificidade para a descolorização do corante marrom, com 54,42% e 45,46% de descolorização no meio com 5 mL e 10 mL de extrato enzimático, respectivamente. Este resultado mostra-se promissor, comparado aos trabalhos na literatura que utilizaram peroxidases não comerciais para a descolorização de corantes.

5 CONCLUSÃO

O processo fermentativo utilizando *T. koningiopsis* e biomassa de microalgas recuperada do polimento de efluentes da suinocultura mostrou-se promissor para obtenção de biocompostos com diferentes funcionalidades. Na análise da produção enzimática, destacou-se a grande produção de peroxidases. Essas enzimas representam uma promissora alternativa no cenário ambiental para tratamento de uma diversidade de efluentes industriais com grande risco para o meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORDIN, E. R.; CAMARGO, A. F.; ROSSETTO, V.; SCAPINI, T.; MODKOVSKI, T. A.; WEIRICH, S.; CAREZIA, C.; FRANCESCHETTI, M. B.; BALEM, A.; GOLUNSKI, S. M.; GALON, L.; FUZINATTO, C. F.; REICHERT JÚNIOR, R. W.; FONGARO, G.; MOSSI, A. J.; TREICHEL, H. Non-toxic bioherbicides obtained from *Trichoderma koningiopsis* can be applied to the control of weeds in agriculture crops. **Industrial Biotechnology**, v.14, p. 157-163, 2018.

RADHAKRISHNAN, R.; ALQARAWI, A. A.; ABD_ALLAH, E. F. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 131-138, 2018.

KLANOVICZ, N.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F. S.; ZANIVAN, J.; SCAPINI, T.; POLLON, R.; WARKEN, A.; PALIGA, L.; PRECZESKI, K. P.; RIBEIRO, A. A. G. A.; GARDA-BUFFON, J.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Advanced oxidation processes applied for color removal of textile effluent using a home-made peroxidase from rice bran. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 261-272, 2020.

Palavras-chave: Enzimas; Bioherbicidas; Efluentes têxteis; Biomassa de microalgas.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2020 – 0197.

Financiamento: UFFS.