

DESENVOLVIMENTO DE BIOINSUMO AGRÍCOLA EM BIORREATOR

LARISSA CAPELETTI ROMANI^{1,2*}, HELEN TREICHEL³, ALTEMIR JOSÉ MOSSI^{2,4}

1 Introdução

O crescimento populacional e a urbanização aumentam os desafios no saneamento, exigindo alternativas aos tratamentos de efluentes (Camargo et al., 2024). Assim, as microalgas surgem como uma solução, capazes de remover poluentes e gerar biomassa de valor agregado para aplicações agroecológicas. Portanto, este estudo investiga a fermentação de microalgas de esgoto com *Trichoderma koningiopsis* a fim de produzir um composto enzimático com potencial biotecnológico.

2 Objetivos

Analisar a viabilidade da ampliação da fermentação com microalgas de esgoto e *Trichoderma koningiopsis* para produzir um pool enzimático com potencial ambiental e agrícola, além estudar a escala fermentativa e avaliar a ação do composto contra patógenos agrícolas futuramente.

3 Metodologia

As microalgas foram cultivadas em um reservatório contendo 50 L de efluente previamente tratado com 5 L de inóculo composto por microalgas provenientes de águas residuais sanitárias da ETE Candeia/Bauru-SP. Os gêneros de microalgas identificados foram cianobactérias, em especial *Aphanotece sp.* e *Aphanocapsa sp.* O microrganismo fúngico empregado foi o *Trichoderma koningiopsis* (identificado no GenBank sob o código MK860714), isolado da planta invasora *Digitaria ciliares*. Esse fungo demonstrou potencial para a síntese de enzimas em investigações anteriores (Camargo et al., 2024).

A fermentação submersa em escala reduzida foi conduzida em frascos Erlenmeyer com volume operacional de 100 mL. O meio de cultivo foi preparado com 6,66 g de biomassa

¹ Graduada em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim, contato: larissaromani139@gmail.com.

² Grupo de Pesquisa: Agroecologia. Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI).

³ Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, campus Erechim.

⁴ Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal Fronteira Sul, campus Erechim, **Orientador**.

microalgal seca, para suplementar um meio fermentativo sintético já otimizado para a produção enzimática. Os frascos foram inoculados com 10^6 esporos do fungo *Trichoderma koningiopsis* por mL de meio fermentativo e mantidos sob agitação a 120 rpm, a uma temperatura de 28 °C, durante 72 horas. Após o período, os extratos foram filtrados por prensagem em tecido sintético. O resíduo sólido retido foi esterilizado e descartado, enquanto o filtrado foi submetido a centrifugação a 2000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi empregado para a quantificação da atividade enzimática. O processo em larga escala foi realizado em um biorreator de bancada Airlift, modelo Bio-Tec-Pro-II (Tecnal, Brasil), com volume útil de 3,0 L. A condição testada contou com 5,53g de biomassa de microalgas, 400 mL de antiespumante e uma aeração de 8 LPM, sendo todo o teste realizado a 28 °C por 72 horas, e o pH manteve-se em 8,3 até o final do processo.

A fermentação ocorreu com volume final de 2,0 L. O antiespumante AFP 320 da FAXON Química foi utilizado nos testes. O oxigênio dissolvido foi monitorado, visando mantê-lo em pelo menos 75%. O biorreator foi autoclavado a 120 °C por 30 min a 1 atm. Após a esterilização, ao conteúdo foram inoculados com 10^6 esporos/mL de suspensão de *Trichoderma koningiopsis*. Durante os testes, amostras foram coletadas a cada 24 h para verificação enzimática. Na condição testada, a cada retirada de amostra, o mesmo volume de biomassa microalgal diluído em água destilada foi adicionada para avaliar como o processo se comportaria com a reintrodução do substrato ao longo do tempo. As amostras coletadas e o extrato final foram filtrados em tecido sintético, o sólido retido foi esterilizado e descartado, e o permeado líquido foi centrifugado a 2000 rpm, 4 °C por 30 min. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado para as etapas subsequentes. Para analisar a presença de um pool enzimático, foram escolhidas as enzimas peroxidase, lacase, amilase, celulase e lipase. Os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicata, contendo um controle reacional, sem a presença de extrato. Foram utilizadas as seguintes metodologias para as atividades enzimáticas: Peroxidase: Devaiah e Shetty (2009), Khan e Robinson (1994). Lacase: Hou et al. (2004). Amilase: Fuwa (1954), Pongsawadi e Yagisawa (1987). Lipase: Treichel et al. (2016). Celulase: Ghose (1987). Os dados foram tratados estatisticamente através do uso de análise de variância seguida de teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), sendo adotado o software Statistica 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4 Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da produção enzimática em pequena escala

O ensaio controle já apresentava enzimas, conforme evidenciado na Tabela 1, pois as microalgas atuam como organismos primários e acumular compostos biodisponíveis. Após 72 horas, observou-se um aumento na atividade enzimática, com destaque para a enzima Peroxidase. Estudos indicam que o fungo empregado possui capacidade de produção dessa enzima e secreta enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários (Reichert Júnior et al., 2019).

Tabela 1. Resultados da atividade enzimática após 72 horas de fermentação em pequena escala. A amostra controle não foi inoculada, refletindo apenas as enzimas presentes no meio.

Atividade Enzimática	Controle (U/mL)	Fermentado (U/mL)
Amilase	14,73	18,90
Celulase	0,67	1,40
Lipase	0,00	0,00
Lacase	0,02	0,07
Peroxidase	67,16	194,00

*Os valores referem-se ao final do processo fermentativo e não apresentaram oscilações significativas ($p < 0,05$).

A enzima lacase teve um valor baixo pois requer a presença de substratos contendo indutores químicos, como compostos aromáticos e fenólicos. Ainda, a enzima lipase não foi identificada devido a fatores como a disponibilidade de nutrientes no meio ou à fase de crescimento da microalga. A presença da enzima amilase já no ensaio controle pode estar associada à capacidade das microalgas de degradar carboidratos, como o amido. Após a fermentação, essa enzima aumentou, o que pode ser atribuído à ação do fungo no processo.

4.2 Avaliação da produção enzimática em larga escala

É comum, em fermentações com a utilização de biorreator airlift, a formação de espuma no meio. Segundo estudos anteriores, a formação de espuma caracteriza um indício de maior atividade metabólica de *Trichoderma koningiopsis* (Camargo et al. 2024).

Tabela 2. Resultados da produção enzimática presente na fermentação realizada no biorreator Airlift sob a condição testada.

Atividade Enzimática	Fermentado(U/mL)
Amilase	1,5
Celulase	118,7
Lipase	167,0
Lacase	0,9
Peroxidase	2,3

*Os valores referem-se ao final do processo fermentativo e não apresentaram oscilações significativas ($p < 0,05$).

Sobre o processo, observou-se que o volume de antiespumante utilizado foi excessivo, podendo este ter causado estresse ao fungo, que produziu lipases e celulases em maiores quantidades, como pode ser observado na Tabela 2. A enzima lipase aparece de forma mais significativa, atingindo valores de 167 U/mL. No caso da celulase testada, a microalga possivelmente já continha conteúdo de enzima, isso pode ser confirmado pela presença da enzima no tempo zero, e conforme o tempo de fermentação passou, o fungo foi capaz de usar a microalga e produzir mais celulase (Korsa et al. 2023). Outras enzimas como lacase, peroxidase e amilase apresentaram quantidades menores. Geralmente a diminuição na produção enzimática pode estar relacionada à formação de metabólitos inibidores, os quais são produzidos em resposta às condições ambientais. A baixa atividade da enzima lacase também foi observada em outro estudo (Camargo et al., 2024), provavelmente porque a presença de indutores metálicos é necessária para sua produção. Em relação à amilase manter baixa atividade durante a fermentação, sabe-se que o processo de conversão de microalgas em glicose necessita da enzima α -amilase na etapa inicial e depois é seguida por uma enzima glucoamilase para produzir glicose. Portanto, seria necessário um processo de pré-tratamento para liberar o amido no meio.

5 Conclusão

O estudo demonstrou que a biomassa de microalgas tem múltiplas aplicações, servindo como substrato eficiente para o fungo *Trichoderma koningiopsis* produzir enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Os resultados comprovam a viabilidade dessa abordagem fermentativa para gerar bioprodutos de alto valor agregado a partir de efluentes tratados.

Referências Bibliográficas

CAMARGO, A. F. et al. Fermentação de *Trichoderma koningiopsis* em biorreator airlift para produção de bioherbicida. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 47, n. 5, p. 651–663, 30 maio 2024.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 94, p. 119-126, 2009.

FUWA, H. A. New method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*, v. 41, p. 583-603, 1954.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1415–1419, 2004.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. *Food Chemistry*, v. 49, p. 407-410, 1994.

KORSA, G.; KONWARH, R.; MASI, C. et al. Produção de celulase microbiana e sua potencial aplicação para indústrias têxteis. *Annals of Microbiology*, v. 73, p. 13, 2023.
<https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, v. 65, p. 463-467, 1987.

REICHERT JÚNIOR, F. W. et al. Novas perspectivas para o controle de plantas daninhas usando fungos autóctones com potencial bioherbicida seletivo. *Heliyon*, v. 5, e01676, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01676>

TREICHEL, H. et al. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation. *Current Biotechnology*, v. 5, p. 1-7, 2016.

Palavras-chave: *Trichoderma koningiopsis*; microalgas; biorreator, agroecologia.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2024-0242

Financiamento: FAPERGS