

PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Trichoderma koningiopsis*

EMANUELY FAGUNDES DA SILVA^{1,2*}, ISABELY SANDI BALDASSO^{1,2}, e HELEN TREICHEL^{2,3}

1 Introdução

Visando o desenvolvimento de bioprocessos eficientes na área ambiental, torna-se relevante a busca por estratégias que tornem enzimas eficientes, metodologicamente e economicamente viáveis. O fungo filamentoso *Trichoderma koningiopsis* é um microrganismo de destaque na produção enzimática (Camargo et al., 2024; Kubeneck et al., 2025). Devido ao seu metabolismo ativo no consumo do meio de cultura proposto e às condições de fermentação que possibilitam a indução da produção de extratos enzimáticos complexos, os resultados referentes a essa espécie destacam-se como alternativa promissora para diferentes aplicações biotecnológicas (Mokrani et al., 2024).

Diante deste panorama, o presente estudo tem como principal pilar a produção de enzimas pelo microrganismo *T. koningiopsis* e dois métodos distintos de purificação de enzimas após a fermentação em biorreator de tipo *airlift*.

2 Objetivos

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar métodos de purificação enzimática de um biocomposto produzido por fermentação em meio de cultura definido com o fungo filamentoso *Trichoderma koningiopsis*.

3 Metodologia

Para a obtenção das enzimas, foi realizada uma fermentação com o fungo *Trichoderma koningiopsis* em um meio quimicamente definido. O meio de fermentação foi composto por 60 g de glicose, 15 g de extrato de levedura, 7,5 g/L de peptona e 3 L de água destilada. O fungo *T. koningiopsis* (código de identificação: GenBank MK860714) encontra-se mantido no banco

¹ Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária. UFFS, campus Erechim, contato: emanuely.silva@uffs.edu.br. Bolsista vinculada ao subprojeto Obtenção de ácido levulínico a partir de biomassa de frutas e posterior uso de metodologias emergentes para purificação do composto.

² Grupo de pesquisa: Agroenergia

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

de microrganismos no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos da Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Erechim.

A fermentação ocorreu no biorreator *airlift* (Tecnal, Brasil), à temperatura de 28 °C, com fluxo de ar de 3,5 LPM (litros por minuto), pH de 7,10 e 300 mL de antiespumante. O oxigênio dissolvido foi mantido em, no mínimo, 75%. O biorreator foi autoclavado e, após, foram inoculados 10⁶ esporos/mL de *Trichoderma koningiopsis*. A fermentação completa durou 48 horas. O extrato bruto final foi filtrado em tecido sintético; o líquido foi centrifugado e o sólido descartado. A centrifugação (NT 815 - Nova Técnica, Brasil) foi realizada a 3500 rpm, por 30 min a 8 °C. O sobrenadante da centrifugação foi destinado às etapas seguintes do presente estudo.

A quantificação das atividades enzimáticas foi realizada conforme as respectivas metodologias padrão citadas abaixo. A enzima lipase, segundo Treichel et al. (2017). A atividade de protease foi determinada pela metodologia de Waghmare et al. (2015). A ascorbato peroxidase, conforme a metodologia de Nakano e Asada (1981). A amilase foi determinada segundo a metodologia de Fuwa (1954) e Pongsawasdi e Yagisawa (1987) e pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalísico) de acordo com Miller (1959), descrito por Kubeneck et al. (2025).

A purificação enzimática com sistema aquoso bifásico baseou-se em estudos anteriores de Klanovicz et al. (2021) e de Preczeski et al. (2018). O sistema foi composto por uma solução de polietilenoglicol (PEG) 1500 (concentração p/v) e por uma solução salina (concentração p/v). Inicialmente, adicionou-se o PEG 1500 a 50% de concentração, juntamente com o sal em solução a 40%, após o que se adicionou o extrato enzimático e se agitou em vórtex. O sistema foi mantido em banho de gelo por 20 minutos para que ocorresse a separação das fases. Foram coletadas as fases superior e inferior para as etapas subsequentes de determinação da atividade enzimática.

A precipitação foi realizada conforme a metodologia de Golunski et al. (2017). Por meio do método, a bomba peristáltica dosou o solvente orgânico, como a acetona. O processo iniciou-se com o preparo das soluções de sal (cloreto de sódio) nas concentrações de 0,84 mol/L, 0,56 mol/L e 0,36 mol/L. Já as soluções de acetona em concentrações de 60%, 70% e 80%. Adicionou-se o sal ao extrato enzimático; em seguida, acetona, por meio de bomba peristáltica, com vazões de 8,5 mL/min, 10 mL/min e 4,6 mL/min, por 3 minutos, mantendo-se em agitação constante e sob banho de gelo.

4 Resultados e Discussão

As principais atividades enzimáticas relacionadas à fermentação com o fungo *Trichoderma koningiopsis* foram as de amilase ($32,02 \pm 21,43$ U/mL), de ascorbato peroxidase ($51,09 \pm 19,15$ U/mL) e de protease ($270,00 \pm 146,06$ U/mL). A enzima amilase é encontrada em fermentações resultantes da degradação de estruturas, como polissacarídeos. A glicose no meio fermentativo encontrava-se prontamente disponível para assimilação, o que resultou em baixa atividade de amilase, o que representa o comportamento natural do metabolismo do fungo filamentoso (Kubeneck et al., 2025). A ascorbato peroxidase é uma enzima antioxidante com a principal função de inibir as espécies reativas de oxigênio (EROs), impedindo a oxidação. A pequena expressão da mesma pode estar relacionada à respiração celular. Como as condições de fermentação não foram destinadas a esta alteração, possivelmente ela esteja ligada a interações de controle do próprio metabolismo do fungo (Aguirre et al., 2005).

Nos resultados obtidos referentes à purificação com sistema aquoso bifásico e precipitação com solvente orgânico, as enzimas amilase e ascorbato peroxidase reduziram a atividade enzimática em todas as condições utilizadas. Com relação à enzima protease, foi observado aumento da atividade enzimática nos dois métodos de purificação (Sistema Aquoso Bifásico e Precipitação com Solvente Orgânico), considerado relevante, passando de 270,00 U/mL para 707,50 U/mL no bifásico e de 487,22 U/mL para precipitação. A enzima protease no sistema aquoso bifásico apresentou afinidade pela fase superior, o que indica afinidade pelo PEG (polímero) (Asenjo et al., 2012). No método de precipitação com solvente orgânico a condição que pode agregar essa enzima sem que ela perdesse atividade, foi a que continha NaCl: 0,560 mol/L, acetona: 70% e vazão: 10 mL/min.

As diferenças entre as distribuições no sistema aquoso bifásico e na precipitação com solvente orgânico sugerem que as propriedades físico-químicas e as particularidades de cada enzima definem essas interações. Portanto, a realização dos dois métodos de purificação com solventes orgânicos como acetona e sal cloreto de sódio, e o sistema aquoso bifásico com o PEG 1500 e sulfato de amônia, podem melhorar e aumentar a disponibilidade da enzima do pool enzimático do biocomposto. Desse modo, entende-se que as metodologias são promissoras para a purificação, pois separam a enzima de outros compostos interferentes presentes no meio. Com base no aumento observado na atividade da protease, viabiliza-se aplicações.

5 Conclusão

Este estudo demonstrou que a fermentação de *Trichoderma koningiopsis* em biorreator do tipo *airlift* destacou-se na obtenção de um pool enzimático de interesse biotecnológico. Diante dos métodos pesquisados, o Sistema Aquoso Bifásico (SAB) e a precipitação com acetona mostraram-se estratégias promissoras para o isolamento de proteínas; evidencia-se a alta afinidade e eficiência de ambos para a purificação da enzima protease. Com base nas condições apresentadas no estudo, o sistema bifásico mostrou-se a alternativa mais eficaz para a recuperação da protease, proporcionando o maior incremento em sua atividade enzimática.

Referências Bibliográficas

AGUIRRE, J.; RÍOS-MOMBERG, M.; HEWITT, D. *et al.* Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 111–118, mar. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>.

ASENJO, Juan A.; ANDREWS, Barbara A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 1-10, 18 maio 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>.

CAMARGO, A. F.; KUBENECK, S.; BONATTO, C. *et al.* *Trichoderma koningiopsis* fermentation in airlift bioreactor for bioherbicide production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 47, p. 651–663, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-024-02991-9>.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as a substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, ed. 5, p. 583–603, set. 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476>.

GOLUNSKI, S.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M. *et al.* Purification of inulinases by altering the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 1, p. 409–414, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160367>.

KLANOVICZ, N.; WARKEN, A.; PALIGA, L. *et al.* One-step procedure for peroxidase concentration, dye separation and color removal by aqueous two-phase system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 7, p. 9097–9106, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11412-9>.

KUBENECK, S.; CAMARGO, A. F.; LONGO, V. D. *et al.* Characterization of enzymatic and metabolic of a biocomposite based on *Trichoderma koningiopsis* and *Chlorella*.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 65, p. 103542, abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103542>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, ed. 3, p. 426–428, mar. 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MOKRANI, S.; HOUALI, K.; YADAV, K. K. et al. Bioremediation techniques for soil organic pollution: mechanisms, microorganisms and technologies. A comprehensive review. **Ecological Engineering**, v. 207, p. 107338, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2024.107338>.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, Jul. 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltoextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(87\)90144-0](https://doi.org/10.1016/0385-6380(87)90144-0).

PRECZESKI, K. P.; KAMINSKI, A. B.; SCAPINI, T. et al. Efficient and low-cost alternative for lipase concentration aiming the application in the treatment of used cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 851–857, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1919-y>.

TREICHEL, H.; SBARDELOTTO, M.; VENTURIN, B. et al. Production of lipase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 295–300, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/2211550105666151124193225>.

WAGHMARE, S. R.; GURAV, A. A.; MALI, S. A. et al. Purification and characterization of a novel organic solvent-tolerant 98 kDa alkaline protease isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK. **Protein Expression and Purification**, v. 107, p. 1–6, mar. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.11.002>.

Palavras-chave: Enzimas fúngicas; Sistemas aquosos bifásicos; Precipitação.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2025-0099

Financiamento

