



**CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DA MICROALGA *Chlorella
pyrenoidosa***

Maria Fernanda dos Santos Mota

Projeto Final de Curso

Orientadores

Prof^a Dr^a Suely Pereira Freitas

Prof^a Dr^a Elba Pinto da Silva Bon

Prof Dr Marcoaurélio Almenara Rodrigues

Agosto de 2015

CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa*

Maria Fernanda dos Santos Mota

Projeto de Final de Curso submetido ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Graduação de Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Heloísa Lajas Sanches, D.Sc.

Eveline Lopes Almeida, D.Sc.

Leda Maria Fortes Gottschalk, D.Sc.

Orientado por:

Suely Pereira Freitas, D.Sc.

Elba Pinto da Silva Bon, Ph.D.

Marcoaurélio Almenara Rodrigues, Ph.D.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Agosto de 2015

Mota, Maria Fernanda dos Santos.

Caracterização e hidrólise enzimática da microalga *Chlorella pyrenoidosa*/ Maria Fernanda dos Santos Mota. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2015.

ix, 39 p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2015.

Orientadores: Suely Pereira Freitas e Elba Pinto da Silva Bon e Marcoaurélio Almenara Rodrigues

1. Microalgas. 2. Produção de enzimas. 3. Hidrólise enzimática. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Suely Pereira Freitas e Elba Pinto da Silva Bon e Marcoaurélio Almenara Rodrigues. I. Título.

Aos meus pais, Barbara e Claudio, e à minha irmã, Maria Beatriz.

“A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Elba P. S. Bon, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, pela incansável orientação e atenção e por ter me proporcionado a oportunidade de atuar em diferentes áreas de pesquisa que foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Professora Suely P. Freitas por ser sempre muito atenciosa e solícita, pela orientação e pela ajuda que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Marcoaurélio A. Rodrigues, pela orientação, pelo acompanhamento e pelos preciosos ensinamentos na parte teórica e experimental.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Laboratório Bioetanol, pela ajuda tanto na parte teórica quanto na parte experimental e pelo agradável ambiente de trabalho. Em especial à Maria Antonieta Ferrara, pela enorme atenção e pelos ensinamentos no início da minha iniciação científica, e à Marcella F. Souza pela paciência, dedicação e eterna ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus amigos de faculdade, por tornarem a Escola de Química um ambiente alegre e bem mais acolhedor. Sem vocês esses anos de faculdade perderiam todo o sentido.

Agradeço também a Professora Andrea M. Salgado pela atenção e ajuda em todos os momentos em que precisei resolver problemas burocráticos relacionados à graduação.

Às minhas avós Haydee e Cordeli, que apesar de não estarem mais presentes em vida, estão eternamente presentes na minha memória e no meu coração. Não existem palavras para expressar a saudade que sinto de vocês.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo suporte, incentivo e amor incondicional que fazem de mim uma pessoa com alegria de viver e me encham de confiança para seguir o caminho que desejar.

A todos que contribuíram de alguma forma na minha trajetória durante a faculdade e para a realização desse trabalho, muito obrigada.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Graduação em Engenharia de Bioprocessos

CARACTERIZAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa*

Maria Fernanda dos Santos Mota
(nandaffcmota@gmail.com)

Agosto, 2015

Orientadores: Prof^a Dr^a Suely Pereira Freitas

Prof^a Dr^a Elba Pinto da Silva Bon

Prof Dr Marcoaurélio Almenara Rodrigues

As microalgas possuem uma composição química diversificada, podendo ser fontes de lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos. Elas podem apresentar uma parede celular rica em polissacarídeos, tais como a celulose, e amido intracelular como reserva energética. Sendo assim, a hidrólise enzimática dessa biomassa permite a obtenção de açúcares redutores que podem ser fermentados a etanol. A hidrólise enzimática da parede da alga pode também ser uma etapa preliminar na obtenção de compostos de interesse. Nesse trabalho, a microalga verde comercial *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyta) foi caracterizada quanto ao seu teor de carboidratos e de proteínas e foi, posteriormente, submetida à hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares monoméricos. A caracterização dos carboidratos da biomassa da alga, por hidrólise ácida, revelou um total de 14,91% de carboidratos, sendo 9,03% glucana, 3,62% galactana e menores quantidades de arabinose, manose e xilose. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry sem e com a adição de SDS, resultando em um percentual de 29,3 e 59,4, respectivamente. Para os experimentos de hidrólise enzimática, foram utilizadas as enzimas advindas dos sobrenadantes de culturas dos fungos *Aspergillus awamori*, *Trichoderma harzianum* 422 e *Trichoderma reesei* RUT C30. Os sobrenadantes foram utilizados individualmente ou misturados de forma a serem obtidas diferentes proporções de FPase (*Filter paper activity*), endoglucanase e β -glicosidase. A biomassa da alga foi submetida à hidrólise enzimática antes e após tratamento em moinho de bola. Independentemente da enzima utilizada para a hidrólise do material moído, foram observados rendimentos em glicose próximos a 80% em relação ao percentual de glucana total em 24 horas de incubação. Nos experimentos com o material não tratado em moinho de bola, o maior rendimento em glicose foi cerca de 54% utilizando-se enzimas de *A. awamori*, comparado a cerca de 25% obtido com os outros preparados enzimáticos. Esses resultados apontam que o preparado enzimático de *Aspergillus awamori* é o mais indicado para a hidrólise enzimática da biomassa de *Chlorella pyrenoidosa* e que o tratamento por moinho de bola é eficaz para essa biomassa.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Microalgas	3
2.1.1. Sistemas de produção de microalgas	4
2.1.2. Métodos para colheita das microalgas.....	6
2.1.3. Principais utilizações comerciais das microalgas.....	7
2.1.4. <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	9
2.2. Hidrólise enzimática	9
2.3. Pré-tratamentos	13
3. Objetivos	14
4. Materiais e métodos	15
4.1. Matéria-prima	15
4.2. Composição da parede celular da biomassa.....	15
4.2.1. Método NREL - National Renewable Energy Laboratory (VAN WYCHEN & LAURENS, 2013)	15
4.2.2. Método de NORTHCOTE et al. (1958)	15
4.2.3. Análise de carboidratos por HPAEC	15
4.3. Determinação de proteínas.....	16
4.3.1. Protocolo de Lowry sem SDS	16
4.3.2. Protocolo de Lowry com SDS	17
4.4. Difração de raio X.....	17
4.5. Cultivo dos fungos	17
4.7.1. <i>Aspergillus awamori</i>	17
4.7.2. <i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 e <i>Trichoderma harzianum</i> 422	18
4.6. Dosagens enzimáticas	19
4.8.1. Dosagem de atividade de FPase (<i>Filter paper activity</i>)	19
4.8.2. Dosagem da atividade de CMCase (β -1,4-endoglucanásica)	19
4.8.3. Dosagem da atividade de β -glicosidase.....	20
4.7. Tratamento em moinho de bolas.....	20
4.8. Hidrólise enzimática	21
4.9.1. Avaliação do pré-tratamento em moinho de bola.....	21
4.9.2. Avaliação do efeito do pH e da necessidade de meio tamponado.....	21

4.9.3.	Efeito das enzimas de <i>T. reesei</i> RUT C30, <i>T. harzianum</i> 422 e <i>A. awamori</i> na biomassa não tratada.....	21
4.9.4.	Efeito das enzimas de <i>A. awamori</i> e <i>T. harzianum</i> 422 na biomassa não tratada	22
4.9.5.	Efeito das diferentes proporções de endoglucanase e β -glicosidade do pool enzimático do <i>A. awamori</i> na biomassa não tratada	22
4.10.	Dosagem de açúcar redutor	22
5.	Resultados e discussões.....	23
5.1.	Composição em carboidratos da biomassa	23
5.2.	Determinação de proteínas.....	24
5.3.	Difração de raio X.....	24
5.4.	Cultivo do fungo <i>Aspergillus awamori</i>	25
5.5.	Hidrólise enzimática	26
5.5.1.	Avaliação do pré-tratamento em moinho de bola.....	26
5.5.2.	Avaliação do efeito do pH e da necessidade de meio tamponado.....	28
5.5.3.	Efeito das enzimas de <i>T. reesei</i> RUT C30, <i>T. harzianum</i> 422 e <i>A. awamori</i> na biomassa não tratada.....	30
5.5.4.	Efeito das enzimas de <i>A. awamori</i> e <i>T. harzianum</i> 422 na biomassa não tratada	32
5.5.5.	Efeito das diferentes proporções de endoglucanase e β - glicosidade do <i>pool</i> enzimático do <i>A. awamori</i> na biomassa não tratada	32
6.	Conclusões	35
7.	Referências bibliográficas	36

1. Introdução

Atualmente o mundo tem buscado fontes alternativas de energia que ofereçam menores impactos ambientais, substituindo integralmente ou parcialmente os combustíveis fósseis, supostamente causadores do aumento do efeito estufa. Além disso, a queima desses combustíveis fósseis gera altos índices de poluição atmosférica, uma vez que produz gases poluentes, substâncias tóxicas e partículas sólidas altamente prejudiciais à saúde dos seres humanos.

Devido a essa tendência mundial, a produção de biocombustíveis - combustíveis provenientes de fontes biológicas renováveis - tem crescido rapidamente. Os biocombustíveis de primeira geração já são produzidos e comercializados em escala mundial e são obtidos a partir de culturas terrestres, sendo a cana-de-açúcar, no Brasil, e o milho, nos Estados Unidos, as principais matérias-primas para a produção do etanol e a soja para a produção de biodiesel.

A segunda geração de biocombustíveis encontra-se em estágio avançado de pesquisa, com as primeiras plantas industriais já sendo instaladas, e propõe a utilização de resíduos agroindustriais, permitindo o aumento da produção desses combustíveis sem aumentar a utilização de matérias-primas da indústria alimentícia. A implementação industrial e a comercialização de biocombustíveis de segunda geração com preços competitivos ainda carecem de pesquisas que aumentem a eficiência do processo e reduzam os custos (SOCCOL et al., 2010).

A utilização das macro e microalgas, além de outros microrganismos, para a produção de combustíveis caracteriza os biocombustíveis de terceira geração. A biomassa algal pode ser utilizada para a produção de biodiesel, pois algumas espécies de microalgas possuem alto conteúdo lipídico que pode ser extraído e transesterificado, e para a produção de bioetanol, quando falamos de espécies que acumulam amido ou outros polissacarídeos e/ou possuem parede celular rica em celulose e hemicelulose, que podem ser hidrolisados a açúcares fermentáveis (JOHN et al., 2011). Nesse contexto de utilização de microalgas podemos ressaltar as publicações de RODRIGUES et al. (2015), que estudou a hidrólise enzimática da microalga *Chlorella homosphaera* com enzimas produzidas por diferentes fungos filamentosos a fim de identificar quais atividades enzimáticas são necessárias para a hidrólise dessa biomassa, e de CHUN-CHONG FU et al. (2010), que avaliaram a hidrólise enzimática da *Chlorella sp.* e a extração de lipídios após o processo enzimático.

As microalgas têm sido alvo de diversos estudos por apresentarem vantagens como: alta concentração lipídica e/ou alta concentração de carboidratos dependendo da espécie e das condições de cultivo; não competir com a produção de alimentos, uma vez que não necessita de terras aráveis; não necessitar de água potável (SHEEHAN, 2009). Além disso, as microalgas podem ser utilizadas para a captura de carbono, podendo reduzir os níveis de CO₂ na atmosfera e para a produção de produtos de alto valor agregado, como as proteínas e os pigmentos (clorofila e carotenoides). Uma vez que os

carboidratos e os lipídios são componentes de reserva energética da microalga, o maior acúmulo desses componentes é, geralmente, inversamente proporcional à atividade fotossintética. Essa atividade pode sofrer redução por diversos fatores de estresse como, por exemplo, a limitação de alguns nutrientes importantes, tal qual o nitrogênio. (BECKER, 1994).

A utilização da biomassa algal vai ao encontro do conceito de biorrefinaria, no qual a biomassa deve ser aproveitada integralmente, pois, além da produção de biodiesel e bioetanol, as microalgas podem ser utilizadas para a extração de compostos de alto valor agregado, como a clorofila, os carotenoides e as proteínas (SPOLAORE et al., 2006). A integração desses processos é essencial para a viabilização da produção e redução dos custos dos derivados de microalgas (POWELL e HILL, 2009).

A etapa de caracterização da microalga é essencial para o uso sustentável desta biomassa, possibilitando o real conhecimento do seu potencial econômico. Adicionalmente, o planejamento dos processos de fracionamento posteriores auxilia na seleção dos produtos de maior interesse comercial e dos métodos de extração e fracionamento mais indicados para cada produto.

Para produzir bioetanol a partir de microalgas, é necessária uma etapa de hidrólise da biomassa, visando a sacarificação da parede celular e do amido intracelular a açúcares fermentáveis. A etapa de hidrólise da biomassa pode ser feita por meio de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico que atuam na cadeia de celulose e hemicelulose, respectivamente, e de amilases, que atuam no amido, liberando açúcares livres.

Essas enzimas são produzidas por diversos microrganismos, incluindo os fungos filamentosos, e ainda possuem um elevado custo de produção, sendo esse o maior entrave econômico do processo. Por consequência desse alto custo das enzimas, uma etapa de pré-tratamento pode ser necessária para se obter elevados rendimentos de hidrólise enzimática em baixas cargas do catalisador biológico e, consequentemente, promover a viabilidade do processo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Microalgas

As microalgas são organismos fotoautotróficos que se diferenciam das plantas por não necessitarem de sistema vascular para transporte de nutrientes. São tipicamente encontradas em água doce ou salgada em formas de células individuais ou em colônias e são consideradas responsáveis por aproximadamente 60% da produção primária de oxigênio da Terra (CHISTI, 2004). O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, porém estima-se que existam até alguns milhões de espécies.

As microalgas possuem coloração variada e podem ser procariotas ou eucariotas. Os estudos para produção de biomassa e biocombustíveis incluem tanto as microalgas procariotas, como as cianobactérias (Cyanophyta), quanto as eucariotas, como as algas verdes (Chlorophyta), as algas vermelhas (Rhodophyta) e as diatomáceas (Bacillariophyta) (SINGH e GU, 2010). A composição química das microalgas varia de acordo com a espécie e com as condições de cultivo empregadas, e, portanto, elas podem ser uma excelente fonte de lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos, em especial, os carotenoides e a clorofila.

Microalgas do gênero *Chlorella* (Chlorophyta) podem apresentar conteúdo lipídico entre 20 e 50% (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010) e quantidade de carboidrato, geralmente, de 40 a 70%. Essa microalga é uma das mais utilizadas para a suplementação alimentar por possuir em sua composição altas quantidades de proteínas, clorofila e outros compostos bioativos (GORGÊNIO et al., 2013).

Como são organismos fotoautotróficos, as microalgas necessitam de luz e fonte de carbono inorgânico, como CO_2 e HCO_3^- , para obtenção de energia e crescimento através da fotossíntese. Nesse caso, o crescimento das microalgas é diretamente afetado pela disponibilidade e intensidade luminosa e pela concentração dos nutrientes, como CO_2 , HCO_3^- , fósforo e nitrogênio, necessários para o crescimento celular.

Além de afetar o crescimento celular, a disponibilidade e concentração de nutrientes também afeta a composição química da microalga. Em condições de deficiência de nitrogênio, por exemplo, ocorre uma diminuição do conteúdo proteico e um aumento de compostos de reserva energética, como os lipídios e carboidratos. Nestas circunstâncias, há uma competição entre a síntese de lipídios e carboidratos, ocorrendo, primeiramente, a biossíntese de carboidratos de reserva e, posteriormente, a de lipídios como compostos de reserva de longo prazo (SIAUT et al., 2011). Sendo assim, há uma alta correlação entre a quantidade e o tipo de compostos de reserva e a duração do período de baixa disponibilidade de nitrogênio, sendo este um importante parâmetro operacional para a maximização da produção de carboidratos e lipídios a partir de microalgas (HO et al., 2011).

Algumas espécies também podem realizar crescimento heterotrófico ou mixotrófico. No metabolismo heterotrófico não há a necessidade de luz; as microalgas

utilizam compostos orgânicos, como a glicose, como fonte de carbono e de energia. O metabolismo mixotrófico é uma união do fotoautotrófico e do heterotrófico, havendo necessidade de luz e de uma fonte de carbono orgânico. Um cultivo mixotrófico de microalgas bem-sucedido permite a integração dos componentes fotossintéticos e heterotróficos de modo a reduzir a perda de biomassa durante o período não iluminado e diminuir a quantidade de compostos orgânicos utilizados durante o crescimento (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Atualmente, as microalgas são alvo de inúmeros estudos e podem ser utilizadas para diversos fins comerciais, como suplementos alimentares, produção de biocombustíveis (biodiesel, etanol, hidrogênio, bioquerosene, entre outros), produção de produtos de alto valor agregado como carotenoides e compostos nutracêuticos e também em sistema de tratamento de efluentes.

2.1.1. Sistemas de produção de microalgas

A escolha do sistema de cultivo ideal deve levar em consideração as características da espécie de microalga a ser cultivada, os custos envolvidos (energia, mão de obra, nutrientes e terra) de modo a minimizá-los, disponibilidade e qualidade da água e dos nutrientes e o tipo de produto final desejado. Existem basicamente dois tipos de sistemas para a produção de microalgas, os sistemas abertos (lagoas) e os sistemas fechados (fotobiorreatores). A produção pode ser realizada em ambientes externos, para o caso das lagoas, ou em ambientes externos e internos, quando são usados os fotobiorreatores.

Existem diversos tipos de sistemas abertos para a produção de microalgas. Dentre eles destacam-se: as lagoas abertas simples, que não possuem nenhum sistema de agitação da cultura; as lagoas circulares, que possuem um braço giratório no centro para agitar a cultura; e as lagoas do tipo *raceway*, que possuem rodas de pás ou bombas de ar comprimido quem mantêm o fluxo e melhoram a transferência de CO₂ para o meio líquido (COPLIN, 2012).



Figura 1 - Sistemas abertos de cultivo de microalgas.

- 1) Lagoas simples (Parabel, Melbourne-USA);
- 2) Lagoas circulares (Taiwan Chlorella Manufacturing Company);
- 3) *Raceway* (Seambiotic, Ltd.)

As lagoas abertas devem ser de baixa profundidade e alta área superficial para aumentar o aproveitamento da luz (BENEMANN et al., 1996). Esses sistemas têm a produtividade afetada pela difusão do CO₂ para a atmosfera, alta variação de temperatura, alta taxa de evaporação, limitação luminosa e alta taxa de contaminação (PULZ, 2001).

Os sistemas fechados, usualmente chamados de fotobiorreatores, foram criados com a intenção de solucionar os problemas existentes nas lagoas abertas. Os fotobiorreatores permitem o controle da temperatura e da intensidade luminosa (para o caso de fotobiorreatores em ambientes fechados), reduzem os riscos de contaminação e, praticamente, eliminam a perda de CO₂ e a evaporação (PULZ, 1992). Existem inúmeras pesquisas relacionadas ao projeto e às configurações dos fotobiorreatores, sendo os tubulares e os em placas os mais utilizados (COPLIN, 2012).



Figura 2 - Diferentes projetos de fotobiorreatores.

1) Tubular (Photobioreactor PBR 4000 G IGV Biotech); 2) Em placa (NanoVoltaics, Inc).

Os sistemas fechados apresentam diversas vantagens como maior produtividade de biomassa e menor risco de contaminação em comparação aos sistemas abertos, porém o alto custo de construção e manutenção é um gargalo tecnológico dos sistemas fechados (COPLIN, 2012). Problemas como queda da produtividade por fotoinibição, por dano celular, pela tensão de cisalhamento e pelo aumento excessivo da pressão parcial de oxigênio também são desvantagens que podem ocorrer nos sistemas fechados. A Tabela 1 compara as vantagens e as desvantagens dos sistemas de produção de biomassa.

Tabela 1 – Comparação entre os sistemas abertos e fechados para a produção de microalgas.

Parâmetros	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Área requerida	Grande	Pequena
Custo	Menor	Maior
Dependência climática	Muita	Pouco ou nenhuma
Energia requerida no cultivo	Baixa	Alta
Estabilidade do cultivo	Baixa	Alta
Perda de água	Alta	Baixa
Perda de CO₂	Alta	Baixa
Produtividade	Menor	Maior
Risco de Contaminação	Muito alto	Baixo
Variedade de espécies cultiváveis	Pouca, só espécies mais resistentes	Alta

Adaptado de COPLIN (2012) e PULZ (2001)

Apesar da menor produtividade de biomassa, do menor controle sobre o cultivo e das demais desvantagens dos sistemas abertos em comparação com os sistemas fechados apresentados na Tabela 1, os sistemas abertos ainda são os mais utilizados para produção de microalgas em larga escala, devido ao menor custo de construção e operação. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas acerca do projeto e dos custos de construção e operação envolvidos nos cultivos em fotobiorreatores, com o intuito de maximizar a produtividade de biomassa e minimizar os custos de produção.

2.1.2. Métodos para colheita das microalgas

A etapa de recuperação da microalga representa cerca de 20 a 30% do custo total da produção da biomassa (GUDIN e THERPENIER, 1986; DAVIS et al., 2011) e, por isso, é considerada uma etapa crucial para a viabilidade do processo. As principais barreiras da etapa de recuperação são as baixas concentrações de biomassa e o pequeno tamanho celular das microalgas. Os principais métodos para a recuperação das microalgas são: centrifugação, floculação e filtração. A escolha do método ideal para a colheita de microalgas depende do tamanho da espécie, da concentração atingida no sistema de produção, do produto desejado e dos gastos de energia envolvidos. A colheita da microalga geralmente envolve duas etapas, a primeira etapa visa separar a biomassa do

restante do meio de cultura, enquanto a segunda etapa consiste em aumentar a concentração da microalga no lodo obtido na primeira etapa, envolvendo um maior gasto energético.

A floculação geralmente é empregada na primeira etapa de colheita da microalga, consistindo na adição de floculantes químicos, como cloreto férrico e sulfato férrico. Esses floculantes promovem a agregação das microalgas em “flocos” de maior massa que decantam mais rapidamente, aumentando a eficiência da segunda etapa de colheita (ELMALEH et al., 1991).

A centrifugação e a filtração são geralmente aplicadas na segunda etapa de recuperação da biomassa. A centrifugação é um método bastante eficiente e rápido para separar a biomassa da água, porém possui alto consumo de energia. A filtração é mais indicada para microalgas relativamente grandes, pois microalgas com diâmetros muito pequenos necessitam de membranas com poros também muito pequenos, que são mais caras, e necessitam de alta pressão para promover o escoamento, tornando essa etapa lenta e de alto custo.

2.1.3. Principais utilizações comerciais das microalgas

A principal aplicação comercial das microalgas consiste na produção de biomassa com alta concentração de proteínas e de compostos nutracêuticos para a suplementação alimentar. As principais espécies cultivadas para esse fim são: *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*.

A *Chlorella* foi a primeira microalga produzida comercialmente. Seu cultivo teve início na década de 60 no Japão para produção de alimento com alto valor nutritivo (BENEMANN et al., 1996). Atualmente, os principais produtores de *Chlorella* são Japão e Taiwan. O sistema de produção varia de fotobiorreatores fechados a lagoas circulares. A principal importância da suplementação alimentar com *Chlorella* é devido à sua alta concentração de proteínas, aminoácidos e pigmentos, como a clorofila. Estudos apontam que a biomassa da *Chlorella* pode auxiliar no emagrecimento, na diminuição dos níveis de colesterol, no controle da pressão arterial e na atividade antitumoral (OKUDO et al, 1975, MIYAZAWA et al., 1988, e MERCHANT et al., 2002).

A *Spirulina* é outra microalga produzida comercialmente em larga escala como suplemento alimentar. Além do alto conteúdo proteico, muitos estudos apontam seu alto potencial farmacêutico, indicando sua eficiência no tratamento de diabetes, perda de peso e diminuição do nível de colesterol, além de ajudar diversos distúrbios emocionais e mentais (KURMAN et al. 2009). Sua produção ocorre principalmente na Ásia e nos Estados Unidos.

As principais microalgas utilizadas para suplementação alimentar são a *Chlorella* e a *Spirulina*; como já mencionado, essas microalgas possuem alto conteúdo proteico, mas também apresentam altas concentrações de vitaminas e pigmentos, como

carotenoides e clorofila. A composição nutricional dessas duas microalgas cultivadas de forma comercial para a maximização do acúmulo de proteínas encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição nutricional das microalgas comerciais *Chlorella* e *Spirulina*.

Composição nutricional (100 g)	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>
Proteínas	60 – 65 g	63 g
Gordura	10 – 15 g	4.3 g
Carboidratos	12 – 20 g	17.8 g
Calorias	360 kcal	373 kcal
Caroteno	106 mg	504 mg
β-Caroteno	95,9 mg	211 mg
Vitamina B1	2,0 mg	0.5 mg
Vitamina B2	5,0 mg	4.5 mg
Vitamina B6	2,0 mg	0.96 mg
Vitamina B12	830 µg	162 µg
Niacina	29,2 mg	14.9 mg
Clorofila	2890 mg	1150 mg
Cálcio	315 mg	468 mg
Ferro	153 mg	87.4 mg
Cobre	3,1 mg	0.47 mg
Fósforo	1,63 mg	961 mg
Potássio	900 mg	1660 mg
Magnésio	348 mg	319 mg
Zinco	7,6 mg	1.45 mg
Selênio	8,0 µg	25.5 mg

PURACHLORELLA; TANG e SUTER (2011)

Por ser uma ótima produtora de β-caroteno, a *Dunaliella salina*, juntamente com a *Chlorella* e com a *Spirulina*, é uma das principais microalgas produzidas em larga escala. Ela pode apresentar até 21 mg.g⁻¹ de biomassa enquanto a cenoura apresenta em torno de 0,058 mg.g⁻¹, sendo assim o cultivo desta microalga se torna uma ótima alternativa para a obtenção desse composto de alto valor agregado. Essa microalga é uma das que melhor se adaptaram ao cultivo em larga escala, uma vez que possuem tolerância a altas e baixas temperaturas e à alta salinidade. O cultivo da *D. salina* é, geralmente, realizado em áreas ensolaradas e com baixa densidade de nuvens, devido à necessidade de alta incidência luminosa para a uma maior produção de β-caroteno. Atualmente, o seu cultivo é realizado em escala industrial em regiões da Austrália, Estados Unidos e Israel (EMEISH, 2012).

Outra aplicação industrial das microalgas que vem crescendo ultimamente é o tratamento de efluentes. Esse tratamento se divide em algumas etapas: pré-tratamento ou tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário. O pré-tratamento ou tratamento preliminar visa à redução de sólidos grosseiros em suspensão; o tratamento primário envolve a remoção de sólidos suspensos e material flutuante; o tratamento secundário tem por finalidade reduzir o nível de matéria orgânica, geralmente consistindo de um processo biológico de natureza aeróbia ou anaeróbia; o tratamento terciário ou tratamento avançado consiste em uma série de processos para

melhorar a qualidade do efluente, podendo ser empregado na redução de sólidos em suspensão, carga orgânica biodegradável ou não biodegradável, sais minerais, metais pesados, nutrientes, entre outros.

As microalgas podem ser empregadas no tratamento terciário do efluente para a remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo. A remoção desses nutrientes tem crescido mundialmente devido a problemas de eutrofização relacionados com seu acúmulo nos corpos receptores.

Atualmente existem, em operação nos Estados Unidos, diversas plantas de pequena escala (menor que 10 hectares) e poucas de larga escala (maior que 100 hectares) que utilizam microalgas no tratamento de efluentes (LUNDQUIST et al., 2010).

2.1.4. *Chlorella pyrenoidosa*

A microalga *Chlorella pyrenoidosa* é uma alga verde de água doce, possui forma esférica, diâmetro entre 2-10 µm e não apresenta flagelo. É uma espécie fotossintetizante, mas também pode ser cultivada em condições heterotróficas ou mixotróficas. Seu conteúdo lipídico varia entre 20 e 50% (CHISTI, 2007; MATA et al., 2010) e sua parede celular é rica em carboidratos. Segundo NORTHCOTE et al. (1958), o conteúdo de celulose representa aproximadamente 33% da biomassa seca. É uma das espécies mais utilizadas para suplementação alimentar devido ao seu alto conteúdo proteico.

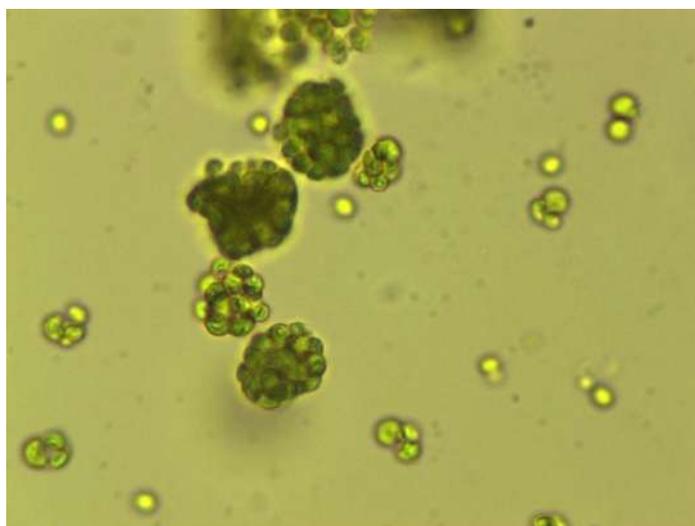


Figura 3 - Imagem de microscopia ótica da microalga *Chlorella pyrenoidosa* (aumento de 400 x).

2.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é um dos processos de sacarificação de biomassa mais estudados atualmente, pois requer condições de operação brandas e praticamente não gera subprodutos indesejáveis, uma vez que as enzimas são catalisadores altamente seletivos.

Porém, o alto custo das enzimas ainda é um gargalo tecnológico para a utilização industrial desse processo e, por isso, há a necessidade de diversos estudos visando a otimização do processo e a obtenção de altos rendimentos em açúcares utilizando baixas cargas enzimáticas.

No processo de hidrólise enzimática da celulose há a atuação de diferentes enzimas de forma sinérgica, conforme demonstrado na Figura 8 (BÉGUIN e AUBERT, 1994). Essas enzimas são classificadas como endoglucanases (1,4- β -D-glicano-4-glicanoidrolase, EC 3.3.1.4), exoglucanases/celobiohidrolases (1,4- β -D-glicano-celobiohidrolase, EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (GOSH e GOSH, 1993).

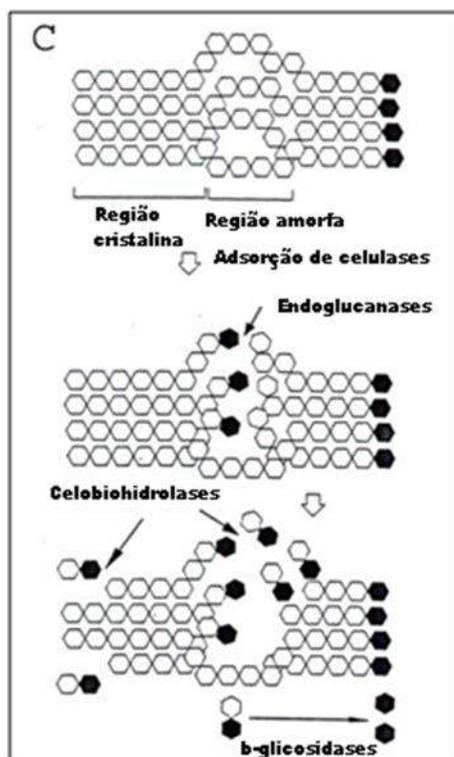


Figura 4 – Modelo esquemático da atuação das enzimas do complexo celulolítico, onde os hexágonos escuros representam os terminais reductores. (Adaptado de BÉGUIN e AUBERT, 1994)

As endoglucanases atuam de forma randômica, catalisando a hidrólise das ligações β -1,4, preferencialmente, da parte amorfa da celulose, gerando cel- oligossacarídeos de diversos tamanhos. A ação dessa enzima gera um terminal redutor e um não redutor onde as exoglucanases (também chamadas de celobiohidrolases – CBH) atuarão, liberando celobiose. As exoglucanases são responsáveis por transformar regiões cristalinas em regiões amorfas, facilitando a ação das endoglucanases. A CBH pode ser subdividida em CBH I (enzima do tipo I), que hidrolisa terminais reductores, e a CBH II (enzima tipo II), que hidrolisa terminais não reductores.

As β -glicosidases, por sua vez, atuam catalisando a hidrólise da ligação β -1,4 da molécula de celobiose em glicose, finalizando o processo de hidrólise enzimática. A

β - glicosidase, que também é capaz de hidrolisar pequenos oligossacarídeos, é uma enzima fundamental no processo enzimático, uma vez que as celulases são fortemente inibidas pela presença de celobiose.

Diversos microrganismos são capazes de produzir complexos celulolíticos, porém os fungos são os mais estudados devido a sua capacidade de produzir sistemas completos de celulases em quantidades expressivas e a sua característica de excretar as enzimas produzidas. Dentre esses, destacam-se os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Humicola*.

O gênero *Trichoderma* tem sido reportado como um bom produtor de celulases e hemicelulases, sendo a espécie *T. reesei* a principal produtora de celulases e hemicelulases comerciais (MERINO E CHERRY, 2007). Entretanto, o *pool* enzimático do *T. reesei* apresenta pouca produção de β -glicosidase, o que reduz sua capacidade de realizar a hidrólise da celulose a moléculas de glicose de forma eficiente (WEN et al., 2005).

Em contrapartida, o gênero *Aspergillus* é reportado como um bom produtor de β - glicosidase e hemicelulases, apresentando baixa atividade de endoglucanase e exoglucanase. Devido a esses fatores, a mistura dos preparados enzimáticos dos fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* tem sido amplamente estudada e apresentam resultados satisfatórios na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (GOTTSCHALK et al., 2010).

Em teoria, a hidrólise da biomassa algal é mais fácil que a de materiais lignocelulósicos, uma vez que a parede celular das microalgas não apresenta lignina (composto que confere rigidez, impermeabilidade e resistência à degradação microbiana e enzimática em vegetais superiores). Além disso, a celulose das microalgas se apresentam na configuração triclínica, resultando em ligações de hidrogênio mais fracas e cadeias de celulose mais isoladas. Tal característica permite um maior acesso das celuloses e, conseqüentemente, facilita a hidrólise (ATALLA e VAN DER HART, 1948; HAYASHI et al, 1997). Entretanto, segundo CORGIE et al. (1997), algumas celulases possuem maior afinidade pela forma monoclínica da celulose, configuração encontrada nos vegetais superiores, que permite um maior empacotamento das fibras de celulose.

Além da celulose, as microalgas podem apresentar quantidades expressivas de amido. O amido é um composto energético de reserva para as microalgas, estando presente na forma de grânulos no interior das microalgas. Para a total hidrólise do amido à glicose, é necessário que as enzimas hidrolisem todas as ligações α -1,4 e α -1,6 presentes e que se tenha uma enzima específica para gerar glicose como produto final (Figura 9).

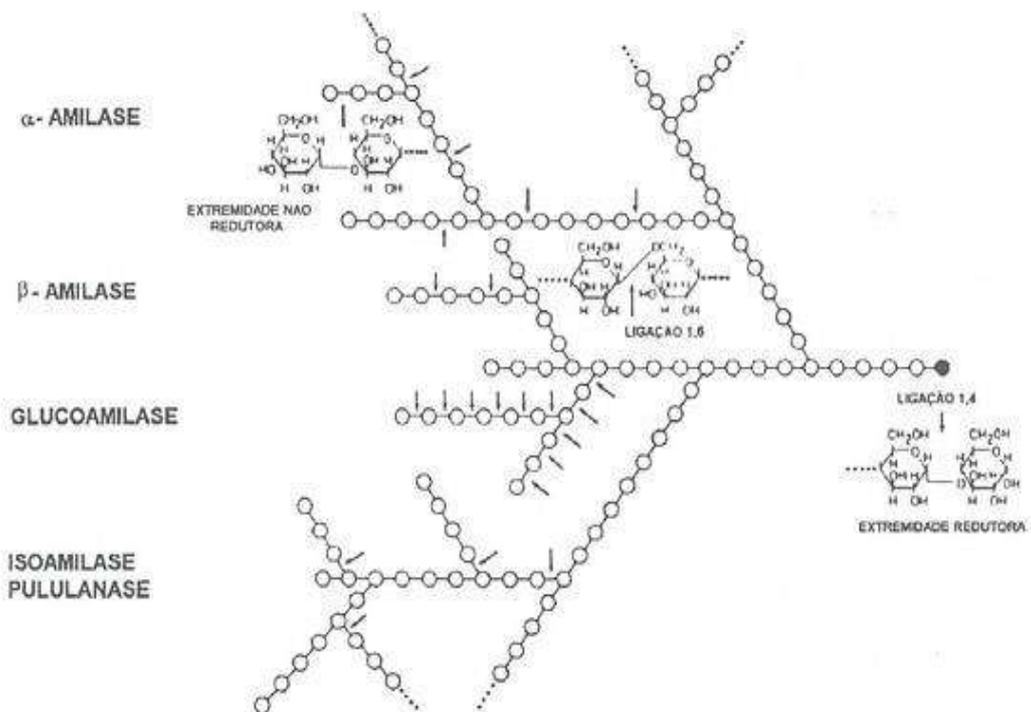


Figura 5 – Esquema da ação enzimática na cadeia do amido.
(CBBIOPROCESSO)

As enzimas responsáveis pela ruptura das ligações α -1,4 são a α -amilase (EC 3.2.1.1) e a β -amilase (EC 3.2.1.2). A α -amilase, enzima de ataque randômico, é responsável pela ruptura de ligações α -1,4 da amilose e da amilopectina. A ruptura das ligações glicosídicas α -1,4 da amilose gera uma mistura de maltose, amilopectina e glicose, enquanto a da amilopectina gera uma mistura de polissacarídeos denominados “dextrinas”. A atividade enzimática da α -amilase diminui rapidamente com a redução do grau de polimerização do substrato; já a β -amilase possui ataque sequencial e é responsável pela ruptura das ligações α -1,4 dos polissacarídeos resultantes da hidrólise da amilopectina, originando maltose pura.

As enzimas responsáveis pela ruptura das ligações α -1,6, também chamada de enzima desramificadora, são as pululanases (EC 3.2.1.4). Essas enzimas são extremamente importantes para a hidrólise do amido, uma vez que as α -amilases e β -amilases não conseguem degradar as ligações glicosídicas α -1,6.

A glucoamilase (EC 3.2.1.3), por sua vez, é uma enzima que atua apenas nas extremidades de cadeia, sendo responsável pela hidrólise da ligação α -1,4 do amido a partir da extremidade não redutora até a obtenção de monômeros de glicose. Essa enzima também é capaz de romper ligações α -1,6, porém em menores proporções (SELVAKUMAR et al., 1996).

A produção de amilases também é realizada por microrganismos, como bactérias e fungos. Dentre as bactérias, destacam-se as do gênero *Bacillus*, enquanto entre os

fungos, os principais produtores são os dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (NOROUZIAN et al., 2006).

2.3. Pré-tratamentos

A hidrólise enzimática de biomassas *in natura*, ou seja, sem nenhum tratamento prévio, geralmente apresenta baixa eficiência devido à recalcitrância desses materiais. Portanto, é necessária uma etapa de pré-tratamento da biomassa de forma a aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose, aumentando os rendimentos de hidrólise.

Os pré-tratamentos podem ser realizados por processos físicos (mecânicos ou térmicos), químicos, biológicos ou uma combinação destes. O pré-tratamento é considerado eficaz quando: reduz a cristalinidade da celulose, aumentando a sua susceptibilidade à ação enzimática; produz pouca quantidade de inibidores (compostos originários da degradação de açúcares que são tóxicos para as demais etapas do processo, como furfural e hidroximetilfurfural); tem uma baixa demanda energética e um baixo custo (GALBE e ZACCHI, 2007). As altas temperaturas e os solventes utilizados em alguns tipos de pré-tratamento são considerados gargalos tecnológicos devido a problemas de corrosão de equipamentos.

Dentre os pré-tratamentos químicos se destacam os pré-tratamentos ácidos, alcalinos, oxidativos e os líquidos iônicos. Esses processos são normalmente conduzidos com a adição de calor. Esses tratamentos resultam em um aumento da eficiência de hidrólise enzimática devido à abertura da matriz celulósica, porém apresentam diversos problemas relacionados à geração de alta quantidade de inibidores e à necessidade de equipamentos resistentes e de uma etapa de neutralização e geração de resíduos.

Os tratamentos mecânicos são bastante promissores, pois não geram inibidores e não requerem o uso de substâncias químicas. O moinho de bolas, apesar de seu alto gasto energético, é um pré-tratamento mecânico eficiente, tendo como finalidade diminuir o tamanho da partícula, aumentando a área superficial da biomassa. Esse tratamento tem como característica reduzir a cristalinidade da biomassa sem modificar a composição da mesma, gerando uma biomassa amorfa mais susceptível à hidrólise enzimática.

3. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar a hidrólise enzimática da biomassa comercial liofilizada de *Chlorella pyrenoidosa*, antes e depois de pré-tratamento em moinho de bola, com enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* RUT C30, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma harzianum* 422 e misturas desses com diferentes cargas de β -glucosidase e celulasas.

4. Materiais e métodos

4.1. Matéria-prima

Neste trabalho foi utilizada a microalga *Chlorella pyrenoidosa* comercial da empresa Fuqing King Dnarmsa (lote CP12033, lote int. 046387), uma empresa de origem Chinesa. De acordo com o fabricante, essa alga foi submetida à secagem ao sol e esterilização, sendo comprada já na forma de pó esterilizado.

4.2. Composição da parede celular da biomassa

A determinação da composição da parede celular da microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi realizada através de hidrólise ácida, utilizando o método descrito pelo NREL - National Renewable Energy Laboratory (VAN WYCHEN & LAURENS, 2013) e pelo método descrito por NORTHCOTE et al. (1958). Os dois procedimentos foram realizados em triplicata.

4.2.1. Método NREL - National Renewable Energy Laboratory (VAN WYCHEN & LAURENS, 2013)

Esse método consistiu em hidrolisar 25 mg de microalga com 250 µL de ácido sulfúrico 72% a 30 °C durante 1 hora sendo a mistura homogeneizada de 5 em 5 minutos com bastão de vidro. Após essa etapa, adicionou-se 7 mL de água destilada e a mistura foi levada para autoclave por 1 hora a 121 °C. A amostra foi então neutralizada com carbonato de cálcio até pH entre 4 e 6, centrifugada e o sobrenadante analisado por HPAEC (*High-Performance Anion-Exchange Chromatography*) para quantificação de carboidratos (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose e manose).

4.2.2. Método de NORTHCOTE et al. (1958)

Esse método consiste na hidrólise de 4,0 mg de microalga com 2,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L a 100 °C durante 6 horas. Decorrida esta etapa, a amostra foi neutralizada com carbonato de bário até pH entre 4 e 6, centrifugada e o sobrenadante analisado por HPAEC para quantificação de carboidratos.

4.2.3. Análise de carboidratos por HPAEC

Para as análises dos açúcares, foi utilizado o sistema de *high-performance anion-exchange chromatography and pulse amperometric detection* no equipamento *Ion Chromatography System 5000* (ICS-5000, Dionex Ltd, Canada), com o *software Chromeleon 6.8* (Dionex Ltd., Canada) e um sistema de colunas composto pela pré-

coluna CarboPac PA1 (4 x 50 mm, Thermo Scientific Ltd., USA) e a coluna analítica CarboPac PA1 (4 x 250 mm, Thermo Scientific Ltd., USA).

O gradiente empregado consistiu em NaOH 300 mM e água deionizada (Milli-Q) grau reagente tipo I (18 ou mais megaohm-cm de resistividade), descarbonatada e filtrada em filtro 0,2 µm com fluxo de 1,0 mL por minuto. Para a detecção de celobiose na pós- coluna, foi utilizada uma solução de NaOH 400 mM com fluxo de 0,3 mL por minuto. A temperatura do forno e do detector foi de 30 °C e o tempo de corrida de 50 minutos. Foi utilizado um detector eletroquímico (amperometria).

4.3. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et. al., 1951). O método de Lowry é uma metodologia colorimétrica que se baseia na redução do reagente Folin Ciocalteu quando reage com proteínas na presença de cobre, gerando um complexo de cor azul que possui absorção máxima a 750 nm.

Para esse método são preparados os seguintes reagentes: i) reagente A: Na₂CO₃ 2% p/v em NaOH 0,1 mol/L; ii) reagente B1: CuSO₄•H₂O 0,5% p/v; iii) reagente B2: Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado 1% p/v; iv) reagente B: Mistura de 1 volume de B1 com 1 volume de B2 (deve ser feito no momento da análise); v) reagente C: Mistura de 50 volumes de A com 1 volume de B. O reagente de Folin Ciocalteu deve ser diluído em água no momento da análise na proporção de 1:3.

Esse protocolo foi testado com e sem a adição de solução de SDS (dodecil sulfato de sódio). O SDS é um detergente amplamente utilizado na área de biologia celular e molecular para promover a solubilização das membranas celulares e proteínas, auxiliando na extração destas últimas. As microalgas possuem elevada quantidade de proteínas de membrana em seus tilacóides (estruturas presentes nos cloroplastos) compondo os complexos fotossintéticos, a adição do SDS no protocolo de dosagem de proteínas (método concebido no laboratório) foi devido à limitação do método padrão em extrair e dosar as proteínas de membrana adequadamente, sendo capaz somente de dosar as proteínas solúveis. As dosagens de proteínas foram realizadas em triplicata.

4.3.1. Protocolo de Lowry sem SDS

O protocolo consiste em incubar, por 24 h a 30 °C, 6,0 mg da microalga previamente moída com 1,0 mL de água destilada, visando devolver a umidade necessária à biomassa e extrair as proteínas solúveis em pH neutro. Após as 24 h, adiciona-se 5 mL do reagente C e incuba-se por mais 24 h a 30 °C, de forma a afrouxar a parede celular e permitir a extração das proteínas solúveis em meio básico.

Para a análise colorimétrica, 1,5 mL do sobrenadante previamente diluído é adicionado a 4,5 mL de uma mistura de 5 mL do reagente C e 1 mL de água. A essa mistura foi adicionado 0,5 µL do reagente de Folin diluído e as amostras foram deixadas

para reagir no escuro por 30 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 750 nm contra a água e uma solução de albumina 120 µg/mL foi utilizada como padrão. A leitura contra a água foi feita para que fosse determinado valor com maior precisão a leitura de absorvância do branco.

4.3.2. Protocolo de Lowry com SDS

O protocolo, concebido em nosso laboratório de pesquisa, consiste em incubar, por 24 h a 60 °C, 6,0 mg da microalga previamente moída com 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de SDS 250 mg.mL⁻¹. Após as 24 h, adiciona-se 5 mL do reagente C e incuba-se por mais 24 h a 30 °C. A análise colorimétrica foi realizada como descrito acima. Foram feitos controles para averiguar a influência do SDS e dos pigmentos fotossintéticos na absorção à 750 nm.

4.4. Difração de raio X

As análises de difração de raio X foram realizados no difratômetro Miniflex (modelo Rigaku), operando a 50 kV e 30 mA. A intensidade da difração foi medida com o ângulo de varredura (2θ) na faixa de 2-60 ° utilizando uma variação de 0,02 ° e uma frequência de 2 °.minuto⁻¹.

4.5. Cultivo dos fungos

4.7.1. *Aspergillus awamori*

O fungo filamentoso *Aspergillus awamori* foi cultivado em meio Breccia modificado (BRECCIA et al., 1995), utilizando farelo de trigo como fonte de carbono (Tabela 3), tanto para o cultivo do pré-inóculo quanto para o cultivo de produção de enzimas. O cultivo foi realizado a 200 rpm e 30 °C e o tempo de pré-inóculo foi de 2 dias e o tempo total de cultivo foi de 7 dias.

Tabela 3 – Composição do meio Breccia modificado. BRECCIA et al. (1995)

Reagente	Pré-inóculo (g/L)	Meio de produção (g/L)
NaNO ₃	1,2	1,2
KH ₂ PO ₄	3	3
K ₂ HPO ₄	6	6
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,05	0,05
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,2	0,2
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,002	0,002
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,016	0,016
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,005	0,005
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0014	0,0014
Extrato de Levedura	12,0	12,0
Farelo de Trigo	30,0	30,0

BRECCIA et al. (1995)

O cultivo do fungo *A. awamori* também foi realizado variando o pH inicial dos meios de cultura. Os diferentes pHs foram obtidos através da retirada dos fosfatos (KH₂PO₄ e K₂HPO₄) e da adição de tampão citrato de sódio pH 6,0 e tampão fosfato de sódio pH 6,5 e 7,0 no meio de cultivo de produção de enzimas. Para a análise desse cultivo, foram realizadas dosagens das atividades enzimáticas CMCase e β-glicosidase do sobrenadante do cultivo do 5º, 6º e 7º dia.

4.7.2. *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Trichoderma harzianum* 422

Cada um dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Trichoderma harzianum* 422 foi cultivado em meio de Mandels (MANDELS e WEBER, 1969). Conforme descrito na Tabela 4, para o pré-inóculo foi utilizado o meio de Mandels, enquanto que para o cultivo de produção de enzimas foi utilizado o meio de Mandels modificado. O cultivo foi realizado a 200 rpm e 30 °C, o tempo de pré-inóculo foi de 3 dias e o tempo total de cultivo foi de 5 dias.

Tabela 4 - Composição do meio de Mandels e do meio de Mandels modificado.

Reagente	Pré-inóculo (g/L)	Meio de produção (g/L)
Uréia	0,3	0,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	1,4
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0
CaCl ₂	0,3	0,3
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,3	0,3
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,005	0,005
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,02	0,02
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	0,0016	0,0016
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0014	0,0014
Celulose (Avicel)	7,5	-

Extrato de Levedura	0,25	6,0
Milhocina	-	0,6 % p/v
Lactose	-	30
NaH₂PO₄	-	12,143
Na₂HPO₄	-	3,218

MANDELS e WEBER (1969)

4.6. Dosagens enzimáticas

4.8.1 Dosagem de atividade de FPase (*Filter paper activity*)

A dosagem da atividade de FPase (*Filter paper activity*) visa a determinação da atividade total do complexo celulolítico frente a uma fita de papel de filtro (celulose cristalina) (GHOSE, 1987).

Para a atividade de FPase foi utilizado o protocolo descrito pelo NREL- National Renewable Energy Laboratory (ADNEY e BAKER, 1996). Nesta metodologia, o cálculo da unidade de papel de filtro (FPU – *filter paper unit*) é realizado na diluição da enzima capaz de liberar 2 mg de açúcar redutor (equivalente a 4% de hidrólise da fita de papel de filtro) após 60 minutos de reação.

O procedimento consistiu em adicionar 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, sobre a fita de papel de filtro, com as dimensões de 6 x 1 cm, enrolada. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL da preparação enzimática, propriamente diluída, e as amostras foram incubadas a 50 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 3,0 mL de DNS. Para análise colorimétrica, as amostras foram fervidas por 5 minutos, seguidas de uma etapa de resfriamento. Após resfriadas, 0,2 mL de cada amostra foi diluído em 2,5 mL de água destilada. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de FPase em unidades internacionais (UI/ml) será tratada como FPU ao longo do texto.

4.8.2 Dosagem da atividade de CMCCase (β -1,4-endoglucanásica)

Na dosagem da atividade de CMCCase utiliza-se como substrato a carboximetilcelulose (CMC), que é um derivado de celulose, quantificando assim, principalmente, a atividade de β -1,4-endoglucanase.

O protocolo da dosagem enzimática da CMCCase baseia-se na dosagem dos açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática da CMC. Para essa dosagem foi utilizada a metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) com modificações. Nesse procedimento, reagiu-se 0,25 mL da enzima previamente diluída em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,25 mL de solução de CMC 4% p/p a 50°C durante 10 minutos. Após os 10 minutos, adicionou-se 0,5 mL de DNS e as amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos. Para a análise colorimétrica foram adicionados 6,5 mL de água e a leitura

foi realizada a 540 nm. A atividade de CMCase em unidades internacionais (UI/ml) será tratada como EGU ao longo do texto.

4.8.3 Dosagem da atividade de β -glicosidase

A dosagem de β -glicosidase foi realizada seguindo a metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) com modificações. Este procedimento utiliza uma solução de celobiose 15 mM como substrato da reação. A reação enzimática foi realizada adicionando 0,5 mL da solução de celobiose e 0,5 mL da preparação enzimática na diluição adequada, diluição realizada com tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. A incubação foi feita a 50 °C por 30 minutos. Depois dos 30 minutos de reação enzimática, os tubos foram fervidos a 100 °C por 5 minutos para inativação das enzimas. A determinação da concentração de glicose foi feita em analisador bioquímico YSI 2700, após o resfriamento dos tubos. A atividade de β -glicosidase em unidades internacionais (UI/ml) será tratada como BGU ao longo do texto.

4.7. Tratamento em moinho de bolas

Para melhorar os rendimentos de hidrólise enzimática, foi realizado em pré-tratamento em moinho de bola em um experimento preliminar. O tratamento foi realizado em um moinho vibratório (Fritsch, Alemanha) contendo 1 bola com amplitude 1,5 mm por 90 minutos (Figura 10).



Figura 6 - Moinho de bola vibratório (Fritsch, Alemanha).

4.8. Hidrólise enzimática

Todos os experimentos de hidrólise foram conduzidos a 50 °C e 200 rpm, utilizando uma massa total de 25 g e variadas cargas de sólidos (carga de biomassa expressa em porcentagem da fração mássica). A determinação de glicose ao longo da hidrólise enzimática foi realizada em analisador bioquímico YSI 2700 e a dosagem de açúcar redutor foi feita pelo método do DNS (SUMNER, 1925; SUMNER e SISLER, 1944). Todos os ensaios hidrolíticos foram feitos em triplicata, os rendimentos em glicose são em relação à glicose total presente no ensaio e os rendimentos em açúcares redutores totais são em relação aos açúcares redutores totais presentes no ensaio, ambos em relação à caracterização feita pelo método do NREL.

4.9.1. Avaliação do pré-tratamento em moinho de bola

Os experimentos foram realizados com 5% p/p de carga de sólidos e pH 4,8. Foram testadas 5 preparações enzimáticas diferentes: os sobrenadantes individuais de *A. awamori* (20 e 30 BGU.g⁻¹ de biomassa) e de *T. reesei* RUT C30 (10 FPU.g⁻¹ de biomassa) e misturas de *A. awamori* -*T. reesei* RUT C30 (10 FPU e 20 e 30 BGU.g⁻¹ de biomassa). Esse ensaio foi realizado utilizando a biomassa antes e depois do pré-tratamento em moinho de bolas. Para manter o pH durante a hidrólise, foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM ajustado em pH 4,8.

4.9.2. Avaliação do efeito do pH e da necessidade de meio tamponado.

Foi realizado também um ensaio avaliando o perfil da hidrólise enzimática em tampão citrato de sódio 50 mM com pH 4,8 e em água pura, ou seja, sem adição de tampão. Esse ensaio foi realizado com 5% p/p de carga de sólidos, utilizando mistura *A. awamori*- *T. reesei* RUT C30 (10 FPU e 20 BGU.g⁻¹ de biomassa). Esse ensaio foi realizado utilizando a biomassa antes e depois do pré-tratamento em moinho de bolas.

Para os ensaios de hidrólise conduzidos em água, as atividades enzimáticas foram determinadas como descrito anteriormente onde o tampão foi substituído por água, possibilitando o cálculo real das atividades enzimáticas utilizadas em cada ensaio.

4.9.3. Efeito das enzimas de *T. reesei* RUT C30, *T. harzianum* 422 e *A. awamori* na biomassa não tratada

Para a biomassa não tratada, ou seja, antes do pré-tratamento por moagem, foi realizado um ensaio hidrolítico comparando a eficiência das enzimas produzidas pelos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Trichoderma harzianum* 422.

Os experimentos foram realizados com 5% p/p de carga de sólidos e 5 FPU.g⁻¹ de glucana (carga enzimática otimizada em trabalhos preliminares). Foram testadas 4 preparações enzimáticas diferentes: os sobrenadantes individuais de *T. reesei* RUT C30 (0,69 BGU.g⁻¹ de glucana) e *T. harzianum* 422 (22 BGU.g⁻¹ de glucana) e misturas de *T. reesei* RUT C30 - *A. awamori* (20 BGU.g⁻¹ de glucana) e de *T. harzianum* 422 -

A. awamori (20 BGU.g⁻¹ de glucana). Para manter o pH durante a hidrólise, foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM ajustado em pH 4,8.

4.9.4. Efeito das enzimas de *A. awamori* e *T. harzianum* 422 na biomassa não tratada

Também para o caso da biomassa não tratada, foi realizado um experimento comparando os perfis hidrolíticos obtidos com enzimas de *A. awamori* e *T. harzianum* 422 com mesma carga de β-glicosidase.

Os experimentos foram realizados com 25% p/p de carga de sólidos e 54 BGU.g⁻¹ glucana (melhores condições obtidas em experimentos preliminares). Foram testadas duas preparações enzimáticas diferentes: os sobrenadantes individuais de *A. awamori* (0,35 FPU.g⁻¹ de glucana) e *T. harzianum* 422 (13,59 FPU.g⁻¹ de glucana). Para manter o pH durante a hidrólise, foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM ajustado em pH 4,8.

4.9.5. Efeito das diferentes proporções de endoglucanase e β-glicosidade do pool enzimático do *A. awamori* na biomassa não tratada

Novamente para o caso da biomassa não tratada, foi realizado um experimento comparando os perfis hidrolíticos obtidos com a combinação das enzimas de *A. awamori* com diferentes proporções de β-glicosidase e endoglucanase (BGU:EGU).

Os experimentos foram realizados com 5% p/p de carga de sólidos e 25 BGU.g⁻¹ glucana (carga enzimática mínima obtida em experimentos preliminares). Foram testadas 3 preparações enzimáticas diferentes: os sobrenadantes individuais de *A. awamori* com 3,11 EGU.g⁻¹ de glucana, 4,32 EGU.g⁻¹ de glucana e 8,22 EGU.g⁻¹ de glucana. Essas diferentes proporções de β-glicosidase e endoglucanase foram obtidas através do cultivo do fungo usando diferentes pHs iniciais (6,0; 6,5 e 7,0, respectivamente). Para manter o pH durante a hidrólise, foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM ajustado em pH 4,8.

4.10. Dosagem de açúcar redutor

A análise de açúcar redutor foi realizada espectrofotometricamente a 540 nm, pelo método de DNS (SUMNER, 1925; SUMNER e SISLER, 1944). Essa metodologia consiste na oxidação do grupo carbonila do monossacarídeo através da redução do ácido 3,5-di-nitrossalicinato (DNS), que possui uma coloração amarela, a 3-amino-5-nitrosalicilato, que apresenta elevada absorvidade em 540 nm e, portanto, uma coloração laranja-marrom.

O procedimento experimental consistiu em adicionar 0,5 mL da amostra previamente diluída a 0,5 mL de DNS e aquecer a mistura a 100 °C por 5 minutos. Após

o aquecimento, foi resfriado e adicionado 6,5 mL de água destilada. A leitura da absorvância é feita a 540 nm e uma solução de glicose 1,8 g/L foi utilizada como padrão.

5. Resultados e discussões

5.1. Composição em carboidratos da biomassa

Como não há um protocolo otimizado para microalgas e devido à importância dessa caracterização, foram testados esses dois protocolos descritos na literatura afim de se encontrar a caracterização mais adequada. A composição de carboidratos da biomassa determinada por dois métodos baseados em hidrólise ácida encontra-se representada na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da composição de carboidratos da *Chlorella pyrenoidosa* determinada pelo método NREL e pelo método de NORTHCOTE et al.

Carboidratos	Glicose (%)	Xilose (%)	Galactose (%)	Arabinose (%)	Manose (%)	Total (%)
Método NREL	9,30 ± 0,08	0,339 ± 0,005	3,62 ± 0,04	1,10 ± 0,004	0,558 ± 0,017	14,92 ± 0,15
Método Northcote et al.	8,33 ± 0,46	0,266 ± 0,029	3,05 ± 0,14	1,001 ± 0,06	0,417 ± 0,041	13,07 ± 0,74

n = média ± desvio padrão

De acordo com teste de comparação de médias (Fisher-LSD), os valores percentuais de todos os carboidratos obtidos pelo método NREL foram superiores e apresentaram menores desvios-padrão. Essa diferença se deve, possivelmente, à escala do ensaio, o método de NORTHCOTE et al. (1958), hidrolisa apenas 4 mg de biomassa, gerando um maior erro relacionado à pesagem do material, já que esse valor se encontra próximo à incerteza das balanças analíticas.

A caracterização dos carboidratos da biomassa, na qual foi observada a presença predominante de glicose, indica claramente a presença de glucana como um importante componente da parede da alga, e em sendo uma Chlorophyta, muito provavelmente, a glucana em questão deve ser celulose (NORTHCOTE et al., 1958). Esse resultado sugere a necessidade de enzimas celulolíticas para a hidrólise dessa biomassa.

5.2. Determinação de proteínas

A determinação das proteínas pelo método de Lowry gerou um percentual e um desvio padrão de $29,3 \pm 2,3$ de proteínas, enquanto o método de Lowry com SDS gerou $59,4 \pm 1,03$ %. A metodologia de Lowry sem SDS gerou um percentual muito baixo de proteínas, entretanto a adição de SDS promoveu valores percentuais mais próximos ao esperado (o conteúdo proteico anunciado pelo comerciante dessa biomassa é de 60% de proteínas). Não houve influência do SDS e dos pigmentos na análise colorimétrica.

Esse método emprega meio básico para afrouxar a parede celular e causar a ruptura da membrana celular, solubilizando as proteínas. Porém, como os resultados comprovam, essa ruptura não é suficiente para solubilizar todas as proteínas de membrana, sendo o método capaz apenas de dosar as proteínas solúveis. As microalgas possuem levada quantidade de proteínas de membrana em seus tilacóides compondo os complexos fotossintéticos, portando a adição do SDS na etapa de incubação promove a solubilização dessas membranas celulares, permitindo extração e dosagem total das proteínas.

5.3. Difração de raio X

A difração de raio X é uma técnica que permite analisar o perfil de cristalinidade da amostra. A identificação do perfil de cristalinidade da amostra é importante para a análise dos rendimentos de hidrólise enzimática e da importância e atuação de cada enzima neste processo. Quanto mais cristalina a amostra for, mais difícil será a hidrólise desse material.

Os resultados de difração de raio X podem ser observados nos gráficos da Figura 11. Para fins comparativos, foram representados, os perfis de cristalinidade da amostra e da celulose microcristalina.

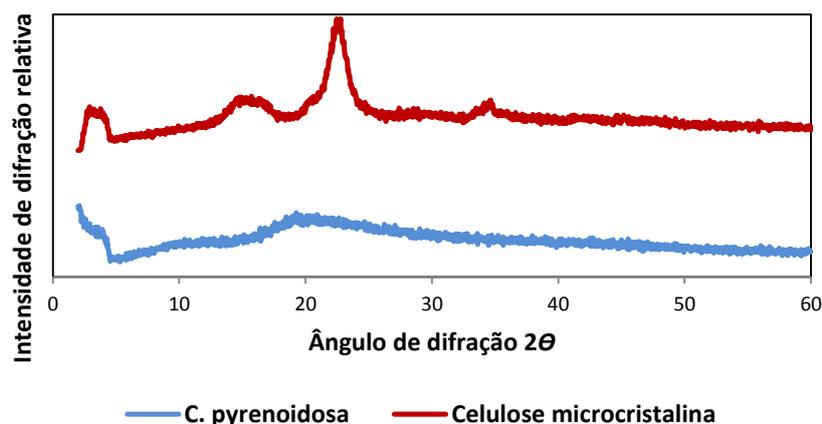


Figura 11 - Comparação do perfil de cristalinidade da *C. pyrenoidosa* (linha inferior) e da celulose microcristalina (linha superior).

Pelas curvas obtidas (Figura 11) pode-se perceber que a biomassa da microalga *C. pyrenoidosa* apresenta um perfil totalmente amorfo, não apresentando o vale e o pico característicos da celulose microcristalina.

5.4. Cultivo do fungo *Aspergillus awamori*

O fungo filamentoso *A. awamori* foi cultivado em meio Breccia modificado (BRECCIA et al., 1995), utilizando-se farelo de trigo como fonte de carbono e diferentes pHs iniciais. Foram testados os cultivos em pH 6,0; 6,5 e 7,0 em triplicata. As atividades de β -glicosidase e CMCase do sobrenadante do 5º, 6º e 7º dias foram medidas e estão ilustrados na Figura 12.

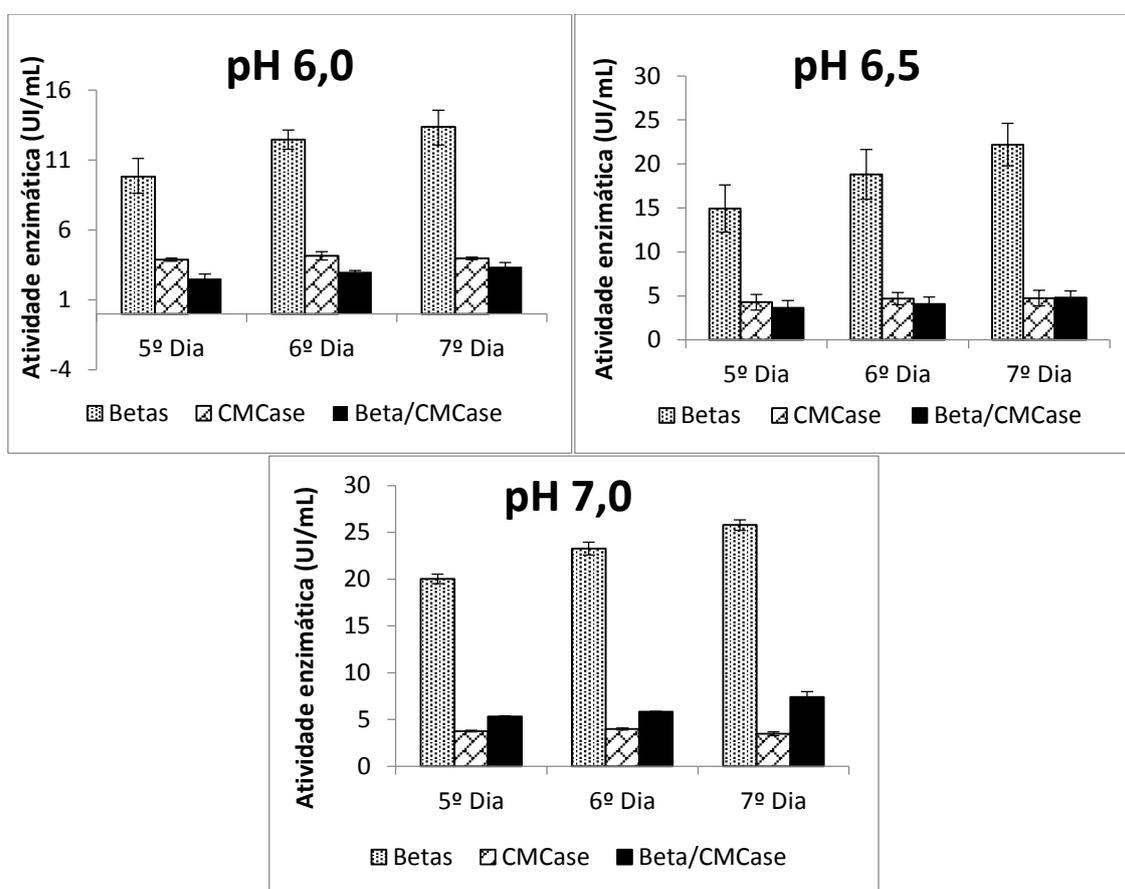


Figura 12 – Resultados das dosagens de β -glicosidase, da CMCase e da proporção de β -glicosidase/CMCase do cultivo do fungo *A. awamori* em diferentes pHs iniciais.

Segundo resultados apresentados na Figura 12, os valores observados para a produção de endoglucanase (CMCase) variaram pouco com o pH inicial do meio, de cultivo, ficando praticamente em torno de 4 UI.mL⁻¹ durante o 5º, 6º e 7º dias. Entretanto, a produção de β -glicosidase aumentou significativamente com o aumento do pH e do tempo de cultivo, tendo o seu pico de produção em torno de 25 UI.mL⁻¹ no 7º dia de

cultivo em pH 7,0. Análises da produção de β -glicosidase no 8º dia de cultivo foram realizadas e registrou-se uma queda de produção (resultado não apresentado).

Os ensaios realizados nesta etapa forneceram sobrenadantes enzimáticos com diferentes proporções de β -glicosidase e endoglucanase. As proporções com diferenças mais significativas foram obtidas no 7º dia de cultivo (Figura 13). Estes preparados enzimáticos, apresentando proporções de β -glicosidase e endoglucanase de 3,11; 4,32 e 8,21, respectivamente, foram utilizados em experimentos de hidrólise enzimática de forma a avaliar a influência do aumento da carga enzimática de endoglucanase na hidrólise da biomassa. Os resultados estão apresentados na seção 5.5.5.

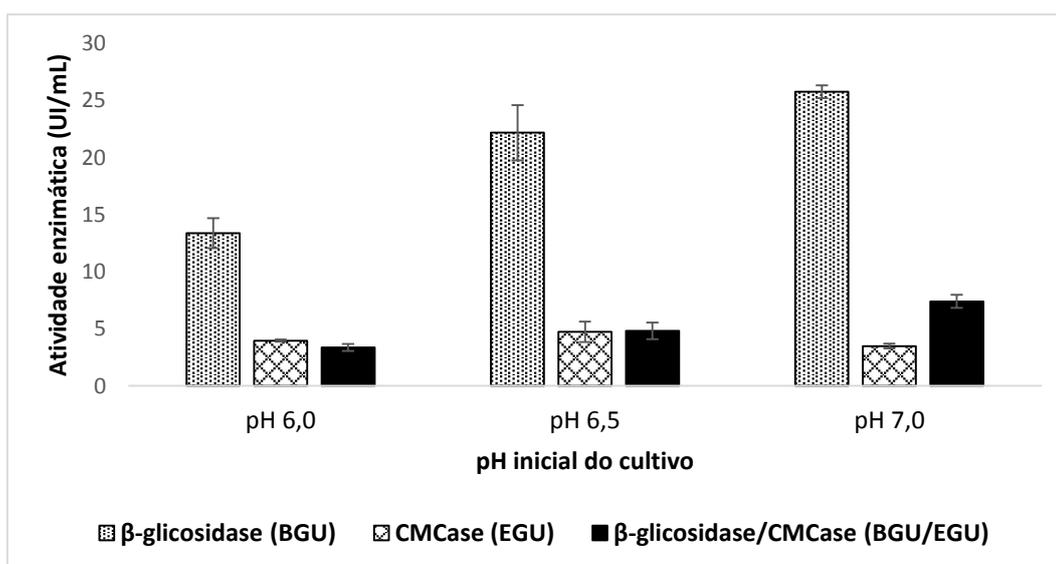


Figura 13 - Resultados das dosagens enzimáticas de β -glicosidase, daCMCase e da proporção de β -glicosidase/CMCase do 7º dia do cultivo do *A. awamori* em diferentes pH's iniciais.

5.5. Hidrólise enzimática

5.5.1. Avaliação do pré-tratamento em moinho de bola

Os rendimentos de glicose e de açúcar redutor dos testes de hidrólise enzimática estão ilustrados nos gráficos das Figuras 14 e 15, respectivamente, onde as linhas contínuas representam a hidrólise enzimática da microalga moída e as linhas pontilhadas representam a hidrólise da microalga não tratada.

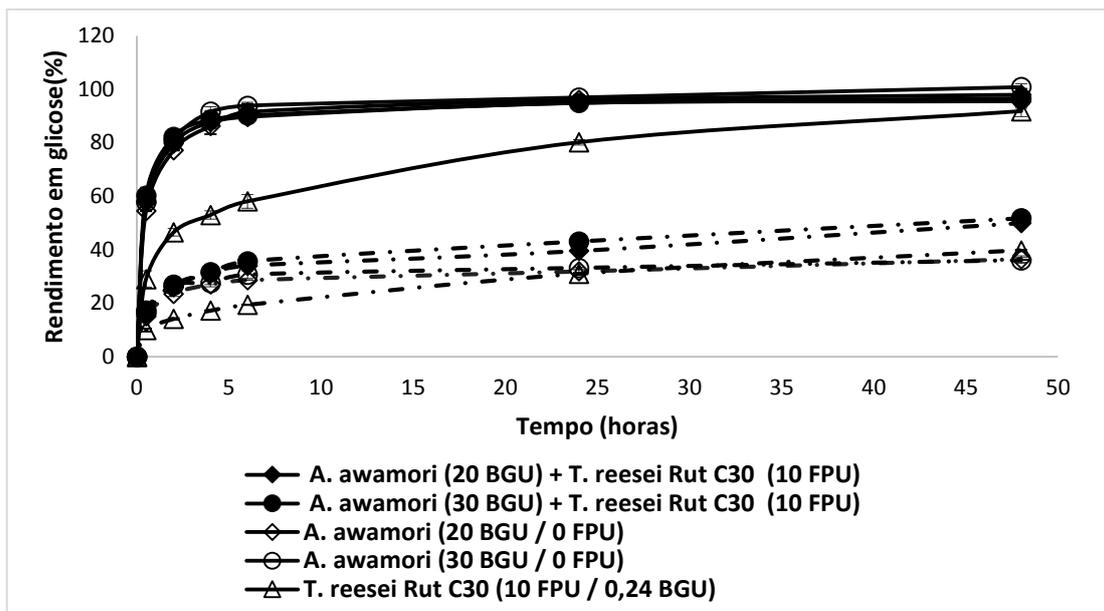


Figura 14 - Rendimento de glicose para hidrólise enzimática da biomassa algal antes (linhas pontilhadas) e depois do pré-tratamento em moinho de bola (linhas cheias) com enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30, *A. awamori* e misturas de ambas.

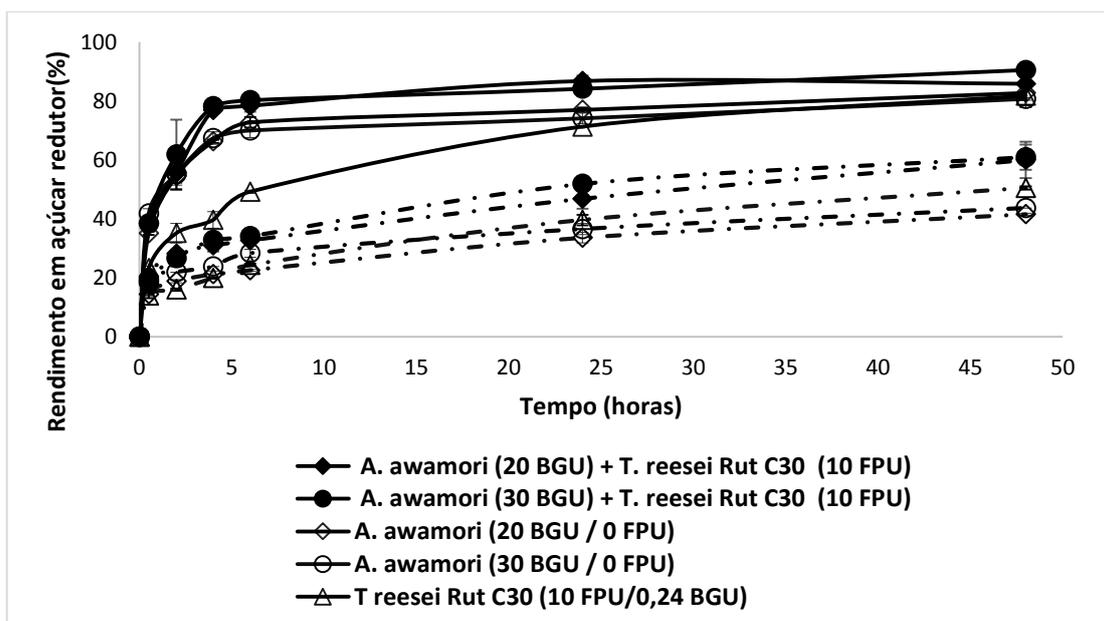


Figura 15 - Rendimento de açúcar redutor para hidrólise enzimática da biomassa algal antes (linhas pontilhadas) e depois do pré-tratamento em moinho de bola (linhas cheias) com enzimas do *T. reesei* RUT C30, *A. awamori* e misturas de ambas.

Pelos gráficos acima, pode-se inferir que o pré-tratamento em moinho de bola aumentou significativamente o rendimento da hidrólise enzimática tanto no rendimento em glicose quanto no rendimento em açúcares redutores. Observa-se também que, para hidrólise dessa biomassa, não é necessária a presença de exoglucanases (enzimas que atuam na região cristalina da celulose), uma vez que a preparação enzimática de *A. awamori*, rica principalmente em β -glicosidase e com atividade apenas basal de FPase

(e, conseqüentemente, de exoglucanase), alcançou rendimentos similares à preparação enzimática de *T. reesei* - *A. awamori*. Já para a biomassa não tratada, a mistura *T. reesei*-*A. awamori* alcançou rendimentos maiores, indicando que a presença de exoglucanases pode ser importante.

O aumento de rendimento da hidrólise enzimática causado pelo pré-tratamento em moinho de bola ocorreu, muito provavelmente, devido ao aumento da área superficial, melhorando a interação das enzimas com o substrato. A redução da cristalinidade da biomassa, característica do tratamento por moagem, não foi considerada como responsável pelo aumento do rendimento de hidrólise, uma vez que o material não tratado já apresentou perfil amorfo na análise em DR-X.

Os rendimentos em açúcares redutores foram inferiores aos rendimentos em glicose. Os açúcares redutores são açúcares que possuem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Glicose, xilose e galactose, açúcares presentes na biomassa algal, são exemplos de açúcares redutores. Entretanto, os preparados enzimáticos utilizados parecem carecer de atividades enzimáticas que hidrolisem a hemicelulose da biomassa, e portanto não foram liberadas concentrações significativas de outros açúcares que não a glicose, o que explica os rendimentos em açúcares redutores inferiores.

5.5.2. Avaliação do efeito do pH e da necessidade de meio tamponado

A condução da hidrólise em água, sem a utilização de tampão, foi testada como uma alternativa para redução dos custos do processo industrial, uma vez que o tamponamento do meio representa um custo adicional. Na Figura 16 comparam-se as atividades enzimáticas em tampão e em água pura das enzimas provenientes dos fungos *A. awamori* e *T. reesei* Rut C30. Os resultados comparativos para o perfil de hidrólise enzimática em água pura e em tampão foram realizados utilizando 10 FPU e 20 BGU.g⁻¹ de biomassa (proporção que gerou melhores rendimentos no ensaio supracitado). Esses resultados estão ilustrados nas Figuras 17 e 18, as quais indicam os rendimentos em glicose e açúcares redutores destes ensaios, respectivamente.

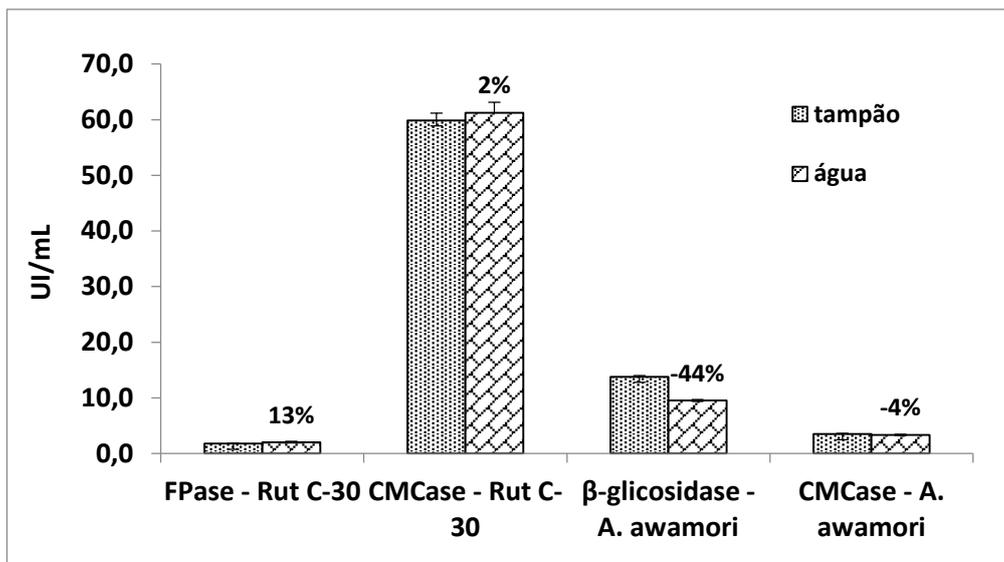


Figura 16 - Comparação das atividades das enzimas de *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori* em água e em tampão.

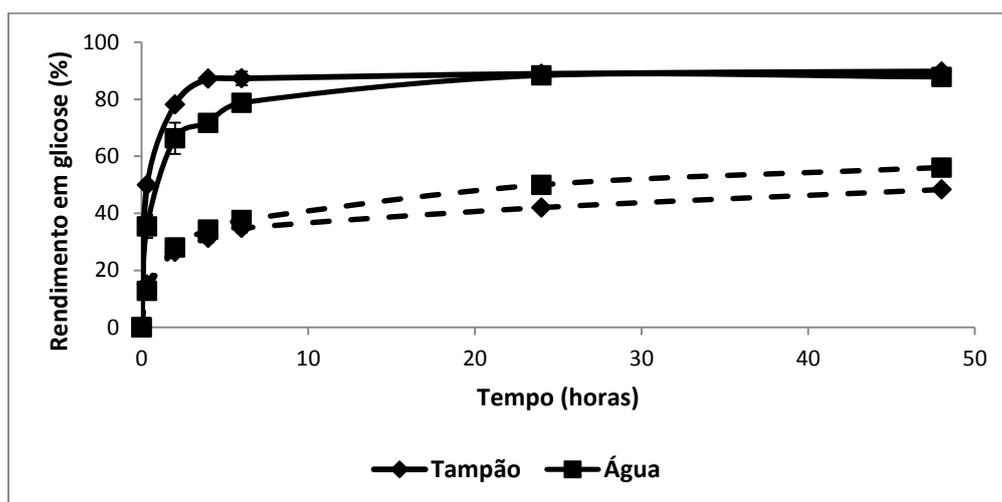


Figura 17 -Rendimento de glicose para hidrólise enzimática da biomassa algal antes (linhas pontilhadas) e depois do pré-tratamento em moinho de bola (linhas cheias) com enzimas do *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori* C30 (10 FPU e 20 BGU.g⁻¹ de biomassa) comparando o meio com tampão e água pura.

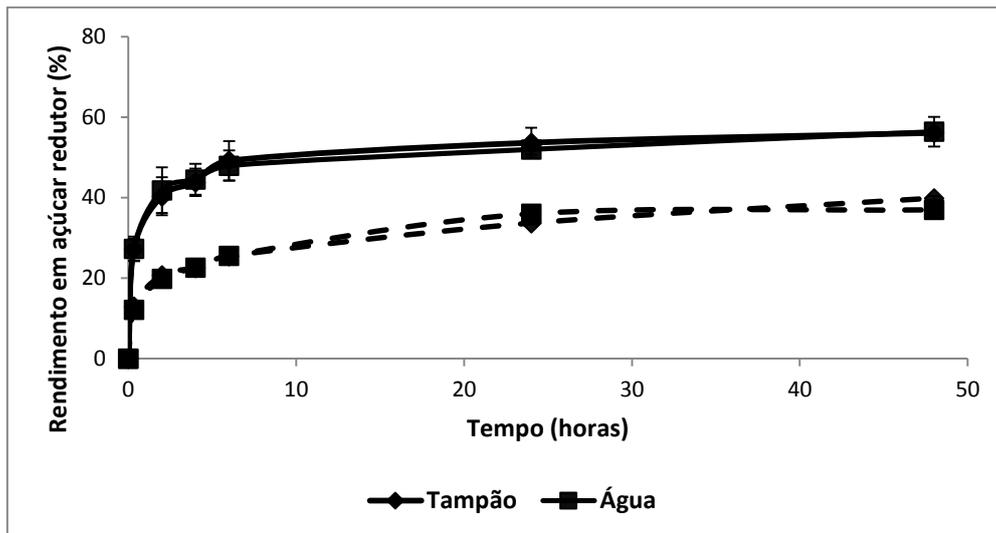


Figura 18- Rendimento em açúcar redutor para hidrólise enzimática da biomassa algal antes (linhas pontilhadas) e depois do pré-tratamento em moinho de bola (linhas cheias) com enzimas do *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori* C30 (10 FPU e 20 BGU.g⁻¹ de biomassa) comparando o meio com tampão e água pura.

Pode-se notar que para a microalga moída, a hidrólise conduzida em meio tamponado alcançou rendimentos em glicose maiores que a conduzida em água pura durante as 6 primeiras horas de hidrólise, porém em 48 h não houve diferença significativa dos rendimentos em glicose, de acordo com teste de Fisher-LSD. Essa velocidade inicial mais rápida da hidrólise em tampão pode ser explicada pela considerável diminuição da atividade de β -glicosidase em água (Figura 16), indicando que essa atividade enzimática é a mais importante para a hidrólise da biomassa pré-tratada, pois, embora a atividade da FPase na água ter sido 13% superior em relação à atividade em tampão, a velocidade inicial da hidrólise enzimática em tampão ainda foi superior.

Entretanto, os ensaios em água pura para a biomassa não tratada geraram rendimentos em glicose maiores que os em tampão, após 24 horas de hidrólise. As atividades enzimáticas medidas não elucidam esse comportamento (Figura 17), que pode ser consequência do aumento de atividade de alguma enzima não determinada.

Diferentemente do ocorrido para o rendimento em glicose (Figura 17), os rendimentos em açúcares redutores não sofreram diferença em relação à hidrólise realizada em água e em tampão, apresentando o mesmo perfil para ambos (Figura 18).

5.5.3. Efeito das enzimas de *T. reesei* RUT C30, *T. harzianum* 422 e *A. awamori* na biomassa não tratada

Devido à importância da presença de β -glicosidase comprovada pelos experimentos anteriores, um novo experimento, comparando a eficiência das enzimas produzidas pelos fungos *T. reesei* RUT C30 e *T. harzianum* 422, foi realizado com a biomassa não tratada. O fungo *T. harzianum* 422, além de bom produtor de celulases, é também capaz de produzir β -glicosidases em quantidade mais expressiva do que o

T. reesei RUT C30. As Figuras 18 e 19 apresentam os rendimentos de glicose e açúcares redutores obtidos com as enzimas dos fungos *T. reesei* e *T. harzianum* com e sem suplementação das enzimas de *A. awamori*.

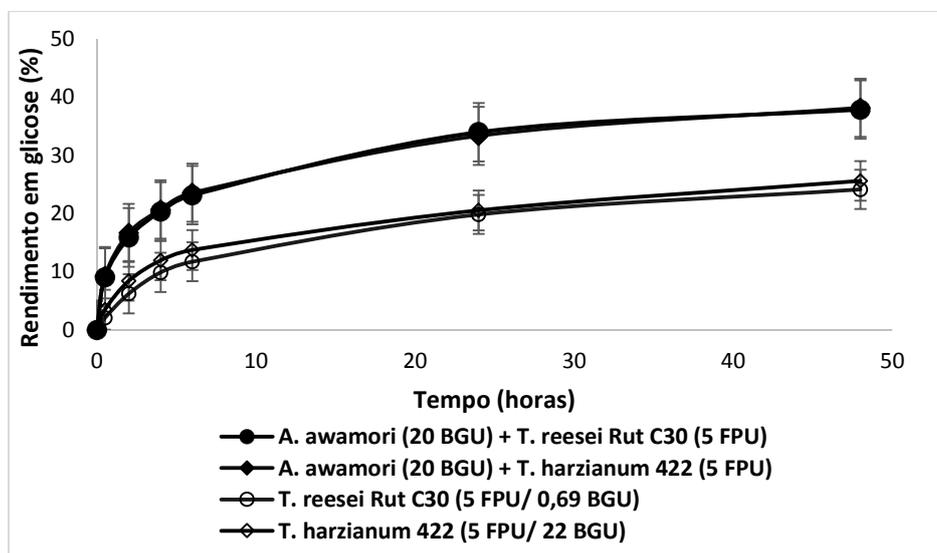


Figura 18 - Rendimento em glicose da hidrólise da microalga não tratada utilizando as enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30, *T. harzianum* 422 e *A. awamori*.

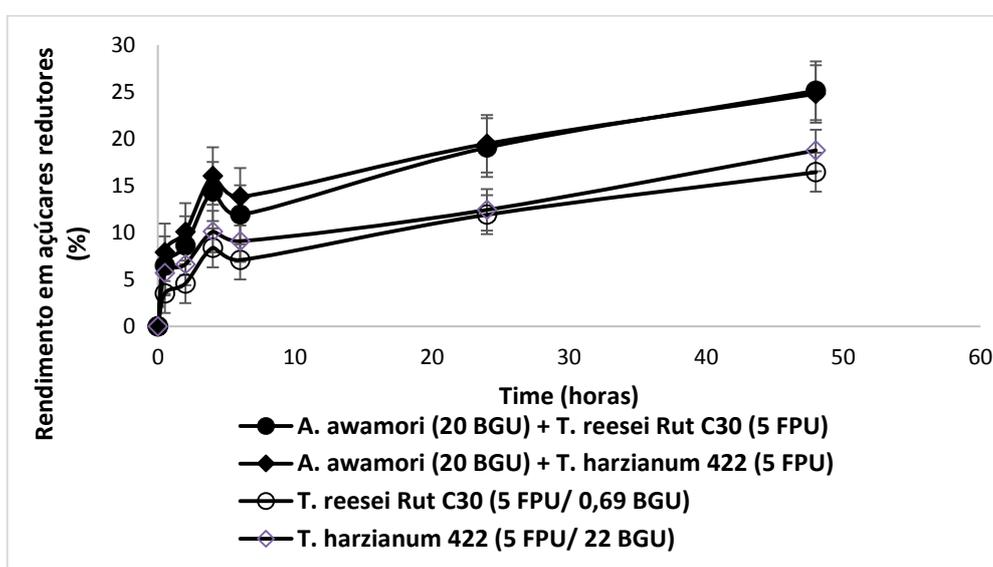


Figura 19 - Rendimento em açúcar redutor da hidrólise da microalga não tratada utilizando as enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30, *T. harzianum* 422 e *A. awamori*.

Conforme se observa nos gráficos acima, a adição de enzimas de *A. awamori* duplica o rendimento de hidrólise enzimática em relação aos experimentos realizados com enzimas de *T. reesei* RUT C30 ou *T. harzianum* 422. As enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30 e *T. harzianum* 422 não geraram diferença nos rendimentos de hidrólise entre si, apesar da maior carga de β -glicosidase no preparado do *T. harzianum*. Estes resultados indicam que, possivelmente, o *pool* enzimático produzido pelo *A. awamori* é mais

indicado para a hidrólise enzimática da microalga do que o produzido pelo *T. harzianum* 422.

5.5.4. Efeito das enzimas de *A. awamori* e *T. harzianum* 422 na biomassa não tratada

Para testar essa hipótese acima, foi realizado um experimento comparando-se os perfis de hidrólise enzimática com enzimas de *T. harzianum* 422 e *A. awamori* contendo a mesma carga de β -glicosidase e uma concentração maior de sólidos.

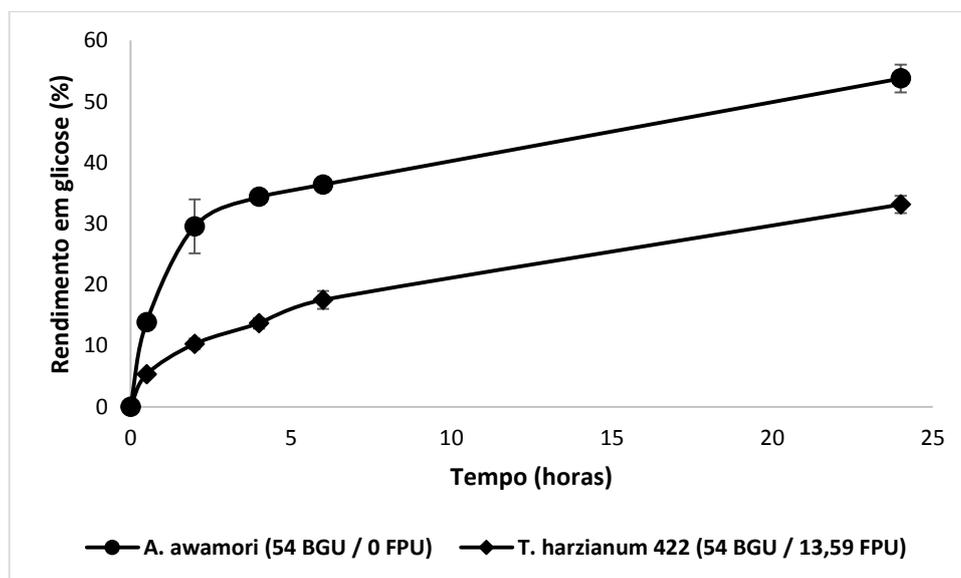


Figura 20 - Rendimento em glicose da hidrólise da microalga não tratada utilizando as enzimas dos fungos *A. awamori* e *T. harzianum* 422.

O rendimento em glicose utilizando-se o sobrenadante do cultivo de *A. awamori* foi maior ao obtido com o *T. harzianum* 422, apesar do preparado de *T. harzianum* possuir atividade de celulase cerca de 40 vezes maior do que os preparados de *A. awamori*. Esses resultados indicam que de fato a β -glicosidase de *A. awamori* é a mais apropriada para a hidrólise da biomassa algal e que a presença de exoglucanase não é importante.

5.5.5. Efeito das diferentes proporções de endoglucanase e β -glicosidase do pool enzimático do *A. awamori* na biomassa não tratada

Uma vez selecionado o melhor pool enzimático, realizou-se um ensaio para avaliar a influência do aumento da carga de endoglucanases na hidrólise enzimática da biomassa algal. Para esse ensaio, foram utilizados os sobrenadantes obtidos com o cultivo de *A.*

awamori em diferentes pHs iniciais (melhor mistura enzimática). A carga de β -glicosidase foi fixada em 25 BGU.g^{-1} de glucana e as cargas de endoglucanase obtidas foram de $8,03 \text{ EGU.g}^{-1}$ de glucana, $5,78 \text{ EGU.g}^{-1}$ de glucana e $3,04 \text{ EGU.g}^{-1}$ de glucana, gerando proporções de β -glicosidase: endoglucanase (BGU:EGU) de 3,11, 4,32 e 8,21, respectivamente. Os perfis hidrolíticos e os rendimentos em glicose então representados no gráfico da Figura 21.

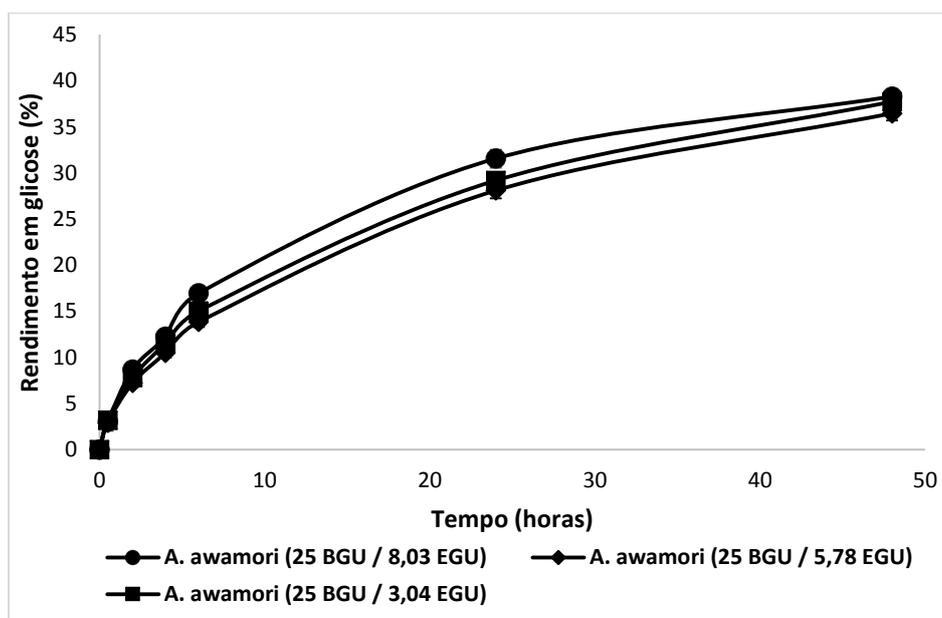


Figura 21 – Rendimento em glicose da hidrólise da microalga íntegra utilizando as enzimas do fungo *A. Awamori*.

Os perfis hidrolíticos obtidos com as diferentes preparações enzimáticas foram bem similares. Esses resultados sugerem que a β -glicosidase realiza o papel principal na hidrólise enzimática da glucana da *Chlorella* não tratada, com uma pequena contribuição da atividade da endoglucanase. Entretanto, esses ensaios enzimáticos não permitem analisar a real importância e participação da endoglucanase na hidrólise dessa biomassa algal, bem como não se pode afirmar que apenas a β -glicosidase é suficiente. Para tal, seria necessário realizar novos ensaios de hidrólise enzimática utilizando-se a β -glicosidase e a endoglucanase do *A. awamori* purificadas.

RODRIGUES et. al (2015), realizou ensaios de hidrólise enzimática com a biomassa da microalga não tratada *Chlorella homosphaera* utilizando enzimas de *A. awamori* e a β -glicosidase de *A. awamori* purificada, obtendo um rendimento total de 35,4% e 7,9%, respectivamente. Os autores comprovam que apenas a β -glicosidase não é suficiente para a hidrólise enzimática dessa biomassa algal e propõe que a endoglucanase presente no *pool* enzimático do *A. awamori* é essencial para esse processo hidrolítico.

6. Conclusões

Os resultados deste trabalho indicam que o pré-tratamento em moinho de bola foi eficaz para a biomassa de *Chlorella pyrenoidosa*, aumentando significativamente o rendimento da hidrólise enzimática.

Foi observado que o *pool* enzimático excretado pelo fungo *A. awamori*, pobre em atividade de exoglucanase, foi capaz de hidrolisar tanto a biomassa nativa quanto a biomassa moída da alga, com altos rendimentos. Este fato justifica-se pelo perfil amorfo da glucana da parede celular da alga, cuja hidrólise prescinde da presença de exoglucanases.

Embora não necessite de exoglucanase, a presença das enzimas endoglucanase e β -glicosidase é de extrema importância para a hidrólise da glucana presente na biomassa algal.

A hidrólise enzimática da microalga moída apresentou uma velocidade inicial mais rápida em tampão quanto comparada com a água, devido ao favorecimento da estabilidade de algumas enzimas, em particular da β -glicosidase. Entretanto, para a microalga não tratada, foram observados, após 6 horas de hidrólise, rendimentos de hidrólise maiores em água.

O preparado enzimático de *Aspergillus awamori* foi mais eficiente na hidrólise da glucana presente na biomassa da microalga em comparação àquele produzido por *T. harzianum* 422, para a mesma carga de β -glicosidase.

Mantendo-se a carga de β -glicosidase constante, as diferentes proporções de endoglucanase e β -glicosidase não interferiram nos rendimentos de hidrólise enzimática, indicando que a β -glicosidase realiza o papel principal na hidrólise enzimática da glucana da *Chlorella* não tratada, com uma pequena contribuição da atividade da endoglucanase.

Visando aumentar o rendimento da hidrólise enzimática e ao mesmo tempo diminuir o seu custo, trabalhos futuros serão desenvolvidos para: (i) otimizar o pre-tratamento da biomassa da alga em moinho de bola; (ii) avaliar diferentes condições reacionais como pH, temperatura e a carga de enzimas.

7. Referências bibliográficas

- Adney, B, Baker, J. 1996. Measurement of cellulase activities. National Renewable Energy Laboratory.
- Atalla, R.H., Van Der Hart, D.L.1948. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223, 283-285.
- Azeredo, V. B. S. 2012. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Planejamento Energético.
- Bbi-biotech. <<http://bbi-biotech.com/en/>>. Acessado em: 16/06/2015.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Cambridge University Press.
- Béguin, P., Aubert, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25-58.
- Breccia, J. D., Castro, G. R., Baigorí, M. D., Siñeriz, F. 1995. Detection of endo-xylanase activities in eletrophoretic gels with congo red staining. *Biotechnology Techniques* 9: 145-148.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae: a review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557–577.
- CBB Biomassa e Bioprocesso Ltda.
<<http://www.cbbioprocesso.com.br/conteudo/index/informacao-3>>. Acessado em: 01/06/2015
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3), 294–306.
- Chun-Chong Fu, Tien-Chieh Hung, Jing-Yi Chen, Chia-Hung Su, Wen-Teng Wu. 2010. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology* 101, 8750–8754.
- Corgie, S.C, Smith, H.M, Walker, L.P. 2011. Enzymatic Transformations of Cellulose Assessed by Quantitative High-Throughput Fourier Transform Infrared Spectroscopy (QHT-FTIR). *Biotechnology and Bioengineering* 108, 7.
- Davis, R., Aden, A., Pienkos, P.T. 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy* 88(10): 3524-3531.
- Elmaleh, S., Coma, J., Grasmick, A., Bourgade, L. 1991. Magnesium induced algal flocculation in a fluidized bed. *Water Sci Technol* 23:1695 – 702.

- Emeish, S. 2012. Production of Natural β -Carotene from *Dunaliella* Living in the Dead Sea. *Jordan Journal of Earth and Environmental Sciences*. Volume 4 (Special Publication, Number 2), ISSN 1995-6681, pages 23- 27.
- Galbe, M.; Zacchi, G. 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Series* Editor: T. Scheper; p. 41-67.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59: 257 - 268.
- Gorgônio, C.M.S., Aranda, D.A.G, Couri, S. 2013. Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. *Natural Science* 5 (7) 783-791.
- Gosh, B.K., Gosh, A. 1993. Degradation of cellulose by fungal cellulose. *Microbial Degradation of Natural Products* 84, 121.
- Gottschalk, L.M.F, Oliveira, R.A., Bon, E.P.S. 2010. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 51, 72-78.
- Gudin, C., Therpenier, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv Biotechnol Processes* 6:73 – 110.
- Hayashi, N., Sugiyama, J., Okanoc, T., Ishihara, M. 1997. Selective degradation of the cellulose I- α component in *Cladophora* cellulose with *Trichoderma viride* cellulose. *Carbohydrate Research* 305, 109-116.
- Ho, S-H., Chen, C-Y., Chang, J-S. 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* 113, 244–252.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, M., Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* 102, 186–193.
- Kumar, N., Singh, S., Patro, N., Patro, I. 2009. Evaluation of protective efficacy of *Spirulina platensis* against collagen-induced arthritis in rats. *Inflammopharmacol* 17: 181–190.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232.
- Mandels, M. E., Weber, J. 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95: 391-414.

- Merchant, R.E., Andre, C.A., Sica, D.A. 2002. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension. *J Med Food*. Fall;5(3):141-52.
- Merino, S.T., Cherry J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108, 95-120.
- Miyazawa, Y., Murayama, T., Ooya, N., Wang, L.F., Tung, Y.C., Yamaguchi N. 1988. Immunomodulation by a unicellular green algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in tumor-bearing mice. *J Ethnopharmacol*. 24(2-3):135-46.
- NanoVoltaics, Inc. <<http://www.nanovoltaics.com/>>. Acessado em: 16/06/2015.
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J.M., Moo-Young, M. 2006. Fungal glucoamylase. *Biotechnology Advances* 24, 80-85.
- Northcote, D.H., Goulding, K.J., Horne, R.W. 1958. The Chemical Composition and Structure of the Cell Wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Journal*, 70 (3), 391-397.
- Okudo M, Hasegawa T, Sonoda M, Okabe T, Tanaka M. 1975. The effects of *Chlorella* on the level of cholesterol in serum and liver. *Jap J Nutrition*. 33:3-8.
- Parabel. <<http://parabel.com/>>. Acessado em: 16/06/2015.
- Pereira, A. B. 2013. Produção de biomassa e de lipídeos por cultivo misto de microalgas suplementado com CO₂ [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Engenharia Química, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos.
- Powell, E.E., Hill, G.A. 2009. Economic assessment of an integrated bioethanol-biodiesel-microalgal fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. *Chemical Engineering Research and Design* 87, 1340-1348.
- Pulz O. 1992. Cultivation techniques for microalgae in open and closed ponds. *Proceedings of the 1st European workshop on microalgal biotechnology*. Potsdam, p 61.
- Pulz, O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 287-293.
- Purachlorella <<http://www.purachlorella.com.br/tabelanutricional.html>>. Acessado em: 06/08/2015.
- Rodrigues, M. A., Teixeira, R. S. S., Ferreira-Leitão, V. S., Bon, E. P. S. 2015. Untreated *Chlorella homosphaera* biomass allows for high rates of cell wall glucan enzymatic hydrolysis when using exoglucanase-free cellulases. *Biotechnology for Biofuels* 8:25.
- Seambiotic, Ltd. <<http://www.seambiotic.com/>>. Acessado em: 16/06/2015.

- Selvakumar, P., Ashakumary, L., Pandey, A. 1996. Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 55, 443-449.
- Sheehan, J. 2009. Engineering direct conversion of CO₂ to biofuel. *Nature Biotechnology* 27, 1128–1129.
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylidès, C., Li-Beisson, Y., Peltier, G. 2011. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology* 11:7.
- Socol, C.R., Vandenbergue, L.P.S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Bon, E.P.S., Moraes, L.M.P., Araújo, J.A., Torres, F.A.G. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 101, 4820–482.
- Souza, M.F. 2013. Seleção e avaliação de uma linhagem fúngica isolada da Amazônia para a produção de enzimas capazes de hidrolisar biomassa lignocelulósica [trabalho de conclusão de curso]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Engenharia Química, Escola de Química.
- Sumner, J.B. 1925. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J Biol Chem* 65, 51–54.
- Sumner, J.B., Sisler, E.B. 1944. A simple method for blood sugar. *Archives of Biochemistry* 4, 333-336
- Singh, J., GU, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 2596–2610.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial Applications of Microalgae *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2), 87–96.
- Taiwan Chlorella Manufacturing Company. < <http://www.taiwanchlorella.com/>>. Acessado em: 16/06/2015.
- Tang, G., Suter, P.M. 2011. Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences* 1, 111-118.
- Van Wychen, S., Laurens, L.M.L. 2013. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-5100-60957.
- Wen, Z., Liao, W., Chen S. 2005. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 40, 3087-3094.