

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

Alan Rempel

PRODUÇÃO DE BIOETANOL E BIOMETANO A
PARTIR DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp.

Passo Fundo

2018

Alan Rempel

PRODUÇÃO DE BIOETANOL E BIOMETANO A
PARTIR DA BIOMASSA DE *Spirulina* sp.

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof.^a. Dr.^a. Luciane Maria Colla e co-orientação da Prof.^a. Dr.^a. Helen Treichel.

Passo Fundo

2018

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo, aprova a dissertação de mestrado “Produção de bioetanol e biometano a partir da biomassa de Spirulina sp.,” elaborada por Alan Rempel, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data de aprovação: dia 02 de abril de 2018

Membros componentes da Banca Examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Luciane Maria Colla
Universidade de Passo Fundo- UPF
Orientadora

Prof.^a. Dr.^a. Helen Treichel
Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS (Campus Erechim- RS)
Co-orientadora

Prof.^a. Dr.^a. Eliane Colla
Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR (Campus de Medianeira-PR)

Prof. Dr. Airton Kunz
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Embrapa Suínos e Aves-
(Concórdia-SC)

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião
Universidade de Passo Fundo- UPF

Passo Fundo, 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico,
Aos meus pais Marlene e Juarez e minha
irmã Aline.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e abençoar durante toda essa minha caminhada.

Aos meus pais, Juarez e Marlene a minha irmã Aline, que nunca mediram esforços para me proporcionar o melhor possível sempre me incentivando. Obrigado por todos os abraços, conselhos, consolos, carinhos e sorrisos. Obrigado por tudo, amo vocês.

A minha orientadora Luciane Maria Colla e a minha co-orientadora Helen Treichel, que nunca mediram esforços para me orientar. Sempre com uma solução para os meus problemas, sempre me incentivando a buscar conhecimento, questionar, aprender, enfim crescer pessoalmente e profissionalmente. Devo a vocês todo esse crescimento profissional e pessoal adquirido neste período.

A Ana Margarites, muito obrigado por todos as orientações, ensinamentos de métodos e acima de tudo, muito obrigado por fazer parte deste meu crescimento profissional, devo muito dele a você.

A Tainara Machado, muito obrigado pela ajuda e ensinamentos durante o mestrado, com certeza não teria feito tudo sem a tua ajuda. Você reforçou a importância da iniciação científica.

A todos os meus colegas do Laboratório, em especial a Francine, Cintia Guarienti, Francisco, Naiara, Cintia Gris, Tatiana Oro, Elionio, Janaina, Cindiele, Grazi, Júlia.... enfim a todos muito obrigado pelo convívio diário, trocas de experiências, risadas, chimarrão, café e as cervejadas.

A todos os meus colegas em especial as minhas irmãs de coração Eloisa, Bruna pela parceria e amizade verdadeira.

Obrigado a Universidade de Passo Fundo, a todos professores, funcionários do mestrado, obrigado por todo o empenho e dedicação.

Ao Parque Científico e Tecnológico da Universidade de Passo Fundo, pela disponibilidade de estrutura e apoio, agradecimento especial a Daiane e a Adriana.

A Embrapa Suínos e Aves de Concórdia- SC, obrigado pela disponibilidade de estrutura para a realização dos ensaios. Em especial, na pessoa do Ricardo Steinmetz e do Airton Kunz, por todo o auxílio e disponibilidade.

Enfim, a tudo e a todos que de uma forma ou outra me ajudaram a encerrar mais esta etapa da minha vida. Muito obrigado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes”.
Marthin Luther King

RESUMO

A elevada demanda por fontes de combustíveis renováveis e mais sustentáveis, que possam substituir a matriz energética atual, baseada no petróleo, tem levado à busca por novas fontes de biomassa, dentre as quais destaca-se a biomassa algal. As microalgas apresentam vantagens sobre outras matérias-primas por não necessitarem de terras aráveis para o seu cultivo, não competindo com a produção de alimentos, além de auxiliarem na fixação do gás carbônico atmosférico. A produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal tem sido relatada, porém a eficiência deste processo de produção ainda é baixa, havendo a necessidade de otimização das etapas de produção e redução de custos, o que pode ser realizado através do estudo de pré-tratamentos da biomassa e imobilização de enzimas usadas na hidrólise, além da utilização dos resíduos gerados para a obtenção de outros biocombustíveis, como o biometano, contribuindo para o aumento da viabilidade econômica do processo como um todo. Objetivou-se produzir bioetanol a partir da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 52 e utilizar os resíduos da produção do bioetanol na produção de biometano. A microalga foi cultivada em tanques abertos de 10 L utilizando meio Zarrouk 20%, obtendo-se uma biomassa com 55% de carboidratos, a qual foi submetida a diferentes pré-tratamentos para ruptura celular por métodos físicos, visando estudar qual seria o mais eficiente na liberação dos polissacarídeos intracelulares. Após, estes foram hidrolisados por enzimas amilolíticas comerciais (alfa-amilase e amiloglicosidase), as quais foram previamente caracterizadas quanto as faixas ótimas de pH e temperatura de ação. A hidrólise da biomassa algal foi realizada após o pré-tratamento, utilizando-se extratos enzimáticos líquidos e imobilizados em poliuretano. As enzimas foram imobilizadas separadas e em conjunto no suporte. Após, realizou-se ensaios de sacarificação enzimática utilizando-se as enzimas livres, com posterior fermentação alcoólica. Na fermentação alcoólica, estudou-se a concentração inicial de açúcares redutores no mosto e a suplementação do hidrolisado com nutrientes. Os resíduos da sacarificação e do processo fermentativo foram posteriormente utilizados para a geração de biometano. O melhor pré-tratamento para realizar a ruptura celular foi o de congelamento/descongelamento. Na caracterização das enzimas quanto ao pH e temperatura ótimos, ambas enzimas apresentaram os melhores resultados na temperatura de 50 °C e pH 5,5. Com as enzimas não imobilizadas obtiveram-se resultados de eficiência hidrólise da biomassa próximos a 100% utilizando 1% (v/v) de cada uma das enzimas. Com os biocatalisadores imobilizados, as eficiências de hidrólise foram de 83% utilizando 1% (m/v) de suporte contendo as enzimas imobilizadas de forma conjunta. As fermentações apresentaram eficiências de produção de bioetanol em torno de 83% sem adição de nutrientes ao mosto e com menor adição de hidrolisado no preparo do inóculo, obtendo-se 23 g/L de etanol. Os resíduos da produção de etanol apresentaram elevado potencial de produção de biometano cerca de 422 L_N (kgSV_{ad}⁻¹). Sendo assim, é possível realizar o aproveitamento destes resíduos, dando assim mais rentabilidade e viabilidade no processo produtivo, propiciando assim um fechamento de ciclo, que vai desde o cultivo da microalga, passando pela produção de bioetanol e finalizando com o uso dos resíduos na produção de biometano, agregando assim maior viabilidade e sustentabilidade ao processo.

Palavras-chaves: biocombustíveis, microalgas, sacarificação enzimática, resíduos, potencial de produção de biometano.

ABSTRACT

The high demand for renewable and more sustainable sources of fuel that can replace the current energy matrix based on oil has led to the search for new sources of biomass, among which the algal biomass stands out. Microalgae have advantages over other raw materials because they do not need arable land for their cultivation, not competing with food production, besides helping to fix atmospheric carbon dioxide. The production of bioethanol from microalgal biomass has been reported, but the efficiency of this production process is still low, and there is a need for optimization of the production stages and cost reduction, which can be accomplished through the study of pre-treatments biomass and immobilization of enzymes used in hydrolysis, as well as the use of residues generated to obtain other biofuels, such as biomethane, contributing to increase the economic viability of the process as a whole. The objective was to produce bioethanol from *Spirulina* sp. LEB 52 and to use waste from the production of bioethanol in the production of biomethane. The microalga was cultivated in open tanks of 10 L using Zarrouk 20% medium, obtaining a biomass with 55% of carbohydrates, which was submitted to different pre-treatments for cellular rupture by physical methods, aiming to study which would be the most efficient in the release of intracellular polysaccharides. Afterwards, they were hydrolyzed by commercial amylolytic enzymes (alpha-amylase and amyloglucosidase), which were previously characterized for optimum ranges of pH and temperature of action. The hydrolysis of the algal biomass was carried out after pretreatment, using liquid enzymatic extracts and immobilized in polyurethane. The enzymes were immobilized separately and joined together in the support. Afterwards, enzymatic saccharification tests were performed using the free enzymes, with subsequent alcoholic fermentation. In alcoholic fermentation, the initial concentration of reducing sugars in the must and the supplementation of the hydrolyzate with nutrients were studied. The residues from saccharification and the fermentation process were subsequently used for the generation of biomethane. The best pre-treatment for cell disruption was freezing / thawing. In the characterization of the enzymes for optimum pH and temperature, both enzymes had the best results at 50 °C and pH 5.5. With the non-immobilized enzymes results of near-100% biomass hydrolysis efficiency were obtained using 1% (v/v) of each of the enzymes. With the immobilized biocatalysts, the hydrolysis efficiencies were 83% using 1% (m/v) support containing the immobilized enzymes together. The fermentations presented efficiencies of bioethanol production around 83% without addition of nutrients to the must and with less hydrolyzate addition in the preparation of the inoculum, obtaining 23 g / L of ethanol. Ethanol production residues had a high bioethanol production potential of about 422 L_N (kgSV_{ad}⁻¹). Thus, it is possible to make use of these residues, thus giving more profitability and viability in the production process, thus providing a cycle closure, from microalgae cultivation to bioethanol production and ending with the use of residues in production of biomethane, thus adding greater viability and sustainability to the process.

Keywords: biofuels, microalgae, enzymatic saccharification, residues, biomethane production potential.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentuais de carboidratos de diferentes microalgas- Percentuais de carboidratos de diferentes microalgas	18
Tabela 2- Delineamento dos ensaios de ruptura celular da microalga	31
Tabela 3- Delineamento dos ensaios de atividade enzimática	32
Tabela 4- Volumes de enzimas α -amilase e amiloglicosidase imobilizados.....	34
Tabela 5- Delineamento dos ensaios de sacarificação da biomassa de Spirulina com enzimas livres e imobilizadas	36
Tabela 6- Delineamento experimental dos ensaios de fermentação.....	39
Tabela 7- Massas adicionadas aos meios reacionais	42
Tabela 8- Resultados de atividades amilolíticas em solução de amido com enzimas livre.	50
Tabela 9- Resultados de atividades amilolíticas em solução de amido com enzimas imobilizadas.....	50
Tabela 10- Resultados de atividades amilolíticas em solução de Spirulina com enzimas livre.....	51
Tabela 11- Resultados de atividades amilolíticas em solução de Spirulina com enzimas imobilizadas.....	52
Tabela 12 - Resultados de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática dos polissacarídeos da microalga Spirulina	53
Tabela 13-Resultados de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática.....	54
Tabela 14- Ensaios de sacarificação utilizando enzimas livres e imobilizadas, resultados de açúcares redutores (AR) liberados após 24 h de hidrólise. Eficiência de hidrólise (EH -%) e EHP - Eficiência de hidrólise com base na quantidade de enzima.....	59
Tabela 15- Fatores de conversão e eficiências de transformação dos açúcares em bioetanol.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Métodos de separação de biomassa, vantagens e desvantagens	19
--	----

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Tipos de biocombustíveis produzidos por diferentes compostos celulares microalgais	15
Figura 2- Diferentes rotas da produção de bioetanol.....	16
Figura 3- Etapas de produção de bioetanol	16
Figura 4- Formas de cultivos de microalgas abertos e fechados	17
Figura 5- Ação das enzimas amilolíticas.....	23
Figura 6-Transformação do amido em glicose.....	23
Figura 7- Diferentes técnicas de imobilização	25
Figura 8- Etapas da fermentação alcoólica.....	26
Figura 9- Vias metabólicas da AD para produção de biometano	28
Figura 10- Fluxograma da metodologia experimental	29
Figura 11- Sistema automático de teste de potencial de metano.....	42
Figura 12- Curva de crescimento média dos 10 cultivos da microalga Spirulina.....	44
Figura 13- Composição proximal da microalga Spirulina em base seca.....	45
Figura 14- Comparativo dos métodos de ruptura celular da biomassa Spirulina.....	46
Figura 15- Açúcares redutores liberados após ação das enzimas α -amilase e AMG na hidrólise da solução de amido (a) e (c) e nos polissacarídeos de Spirulina platensis LEB 52(b) e (d).....	48
Figura 16- Resultados de açúcares redutores formados após a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de enzima livre	54
Figura 17- Açúcares redutores formados após hidrólise com enzimas imobilizadas separadamente	56
Figura 18- Açúcares redutores formados após hidrólise com enzimas imobilizadas em conjunto.....	57
Figura 19- Comparativo de eficiências de hidrólise após 24 horas.....	58
Figura 20- Comparativo das eficiências após os reusos das enzimas imobilizadas.....	60
Figura 21- Cromatograma do hidrolisado de Spirulina platensis.....	62
Figura 22- Perfil de liberação de açúcares redutores ao longo da hidrólise enzimática no ensaio de aumento de escala.....	63
Figura 23- Concentrações (▲) Açúcar Redutor (g/L), (■) Etanol (g/L) e (●) Levedura (g/L) dos ensaios: (a) F.S.3%; (b) F.S.15%; (c) F.C.15%	64
Figura 24- Produtividade de etanol dos diferentes ensaios de fermentação.....	67
Figura 25- Produção acumulada de biometano por massa de sólidos voláteis.....	68
Figura 26- Balanço de energia por rota tecnológica.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Biocombustíveis produzidos a partir de biomassa microalgal	14
2.2	Bioetanol.....	15
2.2.1	Produção de bioetanol através de sacarificação e fermentação	16
2.2.1.1	Formas de cultivos.....	17
2.2.1.2	Separação da biomassa	19
2.2.1.3	Ruptura celular	20
2.2.1.4	Sacarificação.....	21
2.2.1.5	Fermentação	26
2.3	Biometano.....	27
3	METODOLOGIA	29
3.1	Biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 52.....	30
3.2	Caracterização da biomassa.....	30
3.3	Ruptura celular da biomassa de <i>Spirulina</i>	30
3.4	Caracterização das enzimas	32
3.4.1	Avaliação do pH e temperatura ótimos de ação	32
3.4.2	Imobilização das enzimas	33
3.4.3	Atividade enzimática das enzimas livres e imobilizadas.....	34
3.4.4	Determinação da atividade específica das enzimas	35
3.5	Sacarificação da biomassa algal	35
3.5.1	Avaliação do reuso das enzimas imobilizadas.....	37
3.5.2	Caracterização dos monômeros	38
3.6	Produção de bioetanol	38
3.6.1	Microrganismo.....	38
3.6.2	Fermentações	39
3.7	Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	41
3.8	Análise Estatística	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Produção de biomassa de <i>Spirulina</i>	44
4.2	Ruptura da parede celular da biomassa de <i>Spirulina</i>	45
4.3	Caracterização de enzimas	47
4.3.1	Avaliação de pH e temperatura ótimos em amido e em carboidratos microalgais.....	47
4.3.2	Resultados das atividades amilolíticas e específicas das enzimas livres e imobilizadas.....	49
4.4	Sacarificação da biomassa algal	52
4.4.1	Reuso das enzimas imobilizadas e desprendimento da enzima do suporte	60
4.5	Caracterização dos monômeros	61
4.6	Aumento de escala dos ensaios de sacarificação.....	62
4.7	Produção de bioetanol	63
4.8	Potencial Bioquímico de Metano (PBM)	68
4.9	Balço energético	69
5	CONCLUSÕES.....	72
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
	ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da demanda por energias a fim de suprir o avanço da sociedade ocasionou o aumento do número de estudos e discussões sobre as reservas de combustíveis fósseis como carvão, petróleo e gás natural (PEJIN et al., 2015). Além da possibilidade de esgotamento das reservas, existem fortes incentivos para as reduções de emissões de dióxido de carbono, bem como o desenvolvimento de fontes alternativas de produção de energia (ULLAH et al., 2015).

Ao longo das últimas décadas, houve um acréscimo gradual no preço do petróleo e seus derivados, oriundos da escassez e disputa políticas sobre as reservas. Baseados nestes fatores ocorreu o surgimento de novas áreas de pesquisas e o desenvolvimento de fontes e formas renováveis para a produção de combustíveis. Estes combustíveis gerados através de fonte sustentáveis estão sendo denominados biocombustíveis (CHEN et al., 2011).

A biomassa das microalgas está cada vez mais sendo explorada como uma fonte de matéria-prima para produção de biocombustíveis, por não necessitarem de elevadas áreas para os cultivos, desta forma não competindo com a produção de alimentos (WIGMOSTA et al., 2011). Além disso, espécies de microalgas podem acumular quantidades consideráveis de carboidratos e lipídios, devido a suas altas taxas de crescimento e grandes eficiências de conversão fotossintética (CHISTI, 2011).

A partir da biomassa microalgal podem ser produzidos uma gama de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol e biometano. O biocombustível a ser produzido depende da composição da biomassa microalgal, em termos de teores de carboidratos, lipídios e proteínas. As microalgas podem ser produzidas de forma contínua e são passíveis de manipulações genéticas visando uma composição bioquímica desejada para produção específica de um biocombustível. Além disso, as microalgas auxiliam na remoção de dióxido de carbono da atmosfera. Por estes fatores, as microalgas possuem alto potencial para a produção de combustíveis renováveis como o bioetanol (HALLENBECK et al., 2016).

Para utilizar os carboidratos das microalgas para a produção de bioetanol é necessário realizar uma série de etapas envolvendo processos de ruptura celular, sacarificação, fermentação e destilação, sendo que estas devem ser executadas de forma correta para obtenção de elevada eficiência de produção (MELIS et al., 2004).

Nos processos de sacarificação e fermentação para a produção de bioetanol, há a formação de resíduos que podem ser utilizados para a produção de biometano, característico

por ser produzido com biomassas residuais, com a ação de microrganismos anaeróbios (MAHDY et al., 2014).

Ainda que as microalgas possuam um grande potencial energético para a produção de combustíveis é de suma importância o desenvolvimento de tecnologias e métodos que visam uma produção economicamente viável, bem como a utilização de toda a biomassa.

Neste contexto, este trabalho se enquadra dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental na linha de pesquisa de Infraestrutura Sustentável. Além disso, este está vinculado também na linha de pesquisa “Potencial Biotecnológico das Microalgas – Biorrefinarias de Microalgas”, dentro do projeto de pesquisa “Planta piloto de produção de microalgas e uso da biomassa em aquicultura, na produção de bioetanol e como antioxidante”, pois a proposta deste estudo é realizar a produção de bioetanol e biometano com a biomassa microalgal de *S. platensis*. Este estudo é de grande interesse as indústrias produtoras de biocombustíveis, pois visa um aprimoramento das metodologias de produção, bem como a utilização dos resíduos gerados nas fases de sacarificação e fermentação do bioetanol.

Objetivou-se o uso da biomassa da microalga *Spirulina platensis* para produção de bioetanol e biometano. Os objetivos específicos foram:

- a) Realizar a ruptura celular da microalga com diferentes métodos físicos;
- b) Estudar a sacarificação dos polissacarídeos da microalga pelo uso de enzimas livres e imobilizadas;
- c) Produzir bioetanol utilizando o substrato obtido pela sacarificação;
- d) Avaliar a produção de biometano com os resíduos obtidos na sacarificação e fermentação alcoólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, realizou-se uma revisão da literatura com o objetivo de apresentar os principais conceitos relacionados à produção de biocombustíveis a partir da biomassa microalgal. Buscou-se apresentar os principais conceitos relacionados a produção de bioetanol, demonstrando todas as etapas do processo produtivo, elencando os principais fatores que influenciam diretamente no rendimento e viabilidade do processo. Além disso, apresenta conceitos direcionados a produção de biometano a partir dos compostos celulares da *Spirulina platensis* LEB 52.

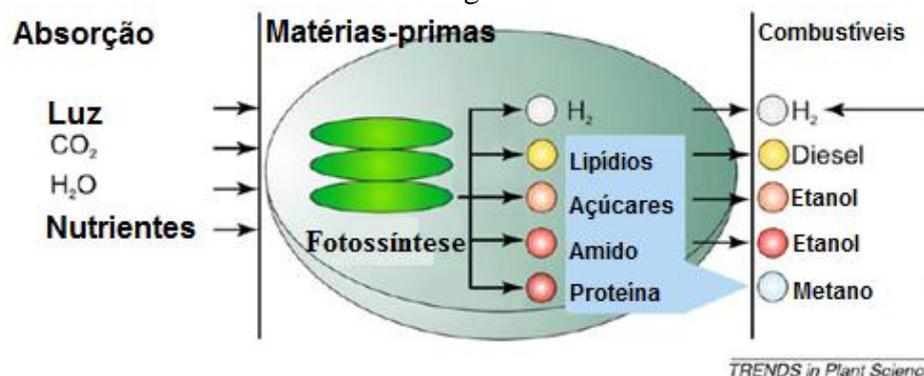
2.1 Biocombustíveis produzidos a partir de biomassa microalgal

As microalgas apresentam potencial para serem utilizadas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, devido a fatores como: capacidade de serem cultivadas em terras não aráveis; possibilidade de incorporação de águas residuais como fonte de nutrientes na composição dos meios de cultivos; taxas de crescimento e multiplicação maiores que de outros vegetais produtores destes biocombustíveis; possibilidade de utilização de gases de emissões das queimas de combustíveis fósseis como nutrientes durante os cultivos fotossintéticos (VAN DEN HENDE et al., 2012).

Várias espécies de microalgas podem ser cultivadas em diferentes formas e meios de cultivos para a obtenção de biomassa. Uma variedade de biocombustíveis pode ser produzida, tais como biodiesel, biometano, bioetanol, biohidrogênio, dependendo das características da biomassa. Através de ferramentas, como a engenharia metabólica, que desenvolve a manipulação de microrganismos para otimizar tais processos, minimizando gastos energéticos e a geração de subprodutos indesejáveis, é possível aumentar os rendimentos e otimizar a produção de biocombustíveis (HALLENBECK et al., 2016).

Geralmente, a composição bioquímica das microalgas cultivadas em condições normais, sem formas de *stress* de cultivo ou limitações de nutrientes, é de 30% a 50% de proteínas, 20% a 40% de carboidratos e 8% a 15% de lipídios. Muito vem sendo estudado para modificar esta composição bioquímica da biomassa, conforme o biocombustível que se deseja produzir (HO et al., 2013). A Figura 1 apresenta um esquema relacionando os compostos celulares presentes na biomassa com o tipo de biocombustível possível de ser produzido (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Figura 1- Tipos de biocombustíveis produzidos por diferentes compostos celulares microalgais



Fonte: Adaptado de Stephens et al. (2010).

Organismos fotossintéticos são mais favoráveis para a produção de combustíveis renováveis, devido ao seu baixo custo de cultivo, porém os rendimentos obtidos ainda não são eficientes (DESAI; ATSUMI, 2013).

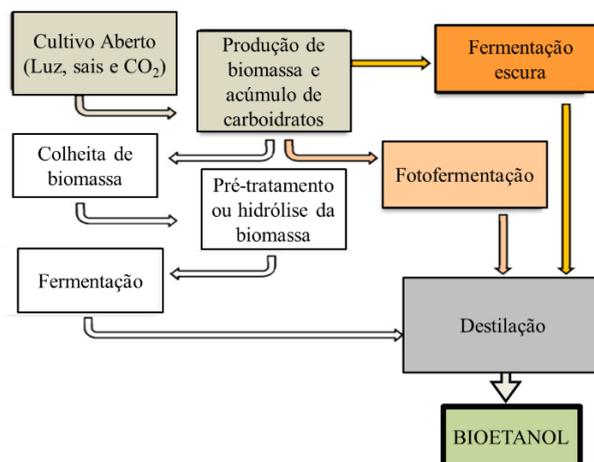
2.2 Bioetanol

A produção de bioetanol por meio de biomassa microalgal é uma prática viável, pois apresenta maior produtividade se comparada a matérias primas como cana-de-açúcar e milho. Microalgas e cianobactérias podem chegar a acumular 50% de sua biomassa seca em carboidratos, porém, estes polissacarídeos devem ser hidrolisados para posterior assimilação destes nos processos fermentativos subsequentes (TERCERO et al, 2014).

A produção de bioetanol utilizando microalgas como matéria-prima pode ser realizada por três rotas. A primeira é a forma mais comum, a biomassa é exposta a uma hidrólise enzimática e posterior fermentação com leveduras. A segunda maneira é caracterizada por utilizar vias metabólicas em condições escuras, similares a produção de biohidrogênio (SILVA; BERTUCCO, 2016).

A terceira forma é a fotofermentação, definida como um mecanismo natural que realiza a conversão de luz solar e produtos fermentáveis, através de uma via metabólica de grande eficiência. Esta maneira é a menos utilizada e estudada, necessitando assim de mais estudos e otimização dos processos, como o uso de engenharia metabólica e genética para redirecionar as vias bioquímicas existentes nas microalgas e ser mais eficiente na produção do biocombustível (SILVA; BERTUCCO, 2016). A Figura 2 apresenta um esquema das diferentes rotas possíveis para a obtenção do bioetanol a partir de biomassa microalgal.

Figura 2- Diferentes rotas da produção de bioetanol



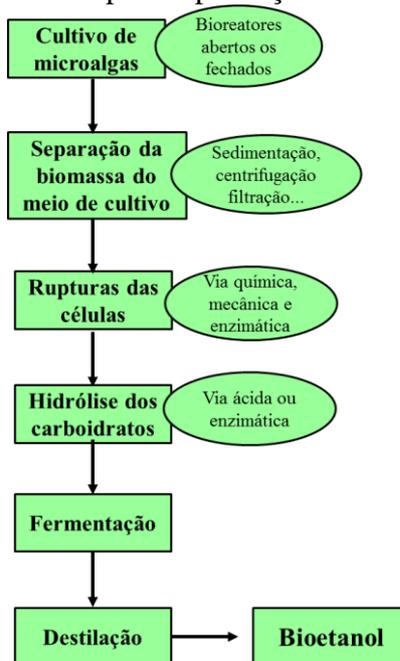
Fonte: Adaptado de Silva; Bertucco (2016)

2.2.1 Produção de bioetanol através de sacarificação e fermentação

Neste processo de produção por sacarificação e fermentação, a obtenção de biomassa microalgal é realizada em fotobiorreatores, sucedendo-se de etapas de ruptura da estrutura celular para liberação dos compostos intracelulares, hidrólise e posterior fermentação (PHILL et al., 2010).

A Figura 3 apresenta as etapas e os procedimentos necessários para a produção de bioetanol a partir da biomassa microalgal.

Figura 3- Etapas de produção de bioetanol



Fonte: Adaptado Mussatto (2010)

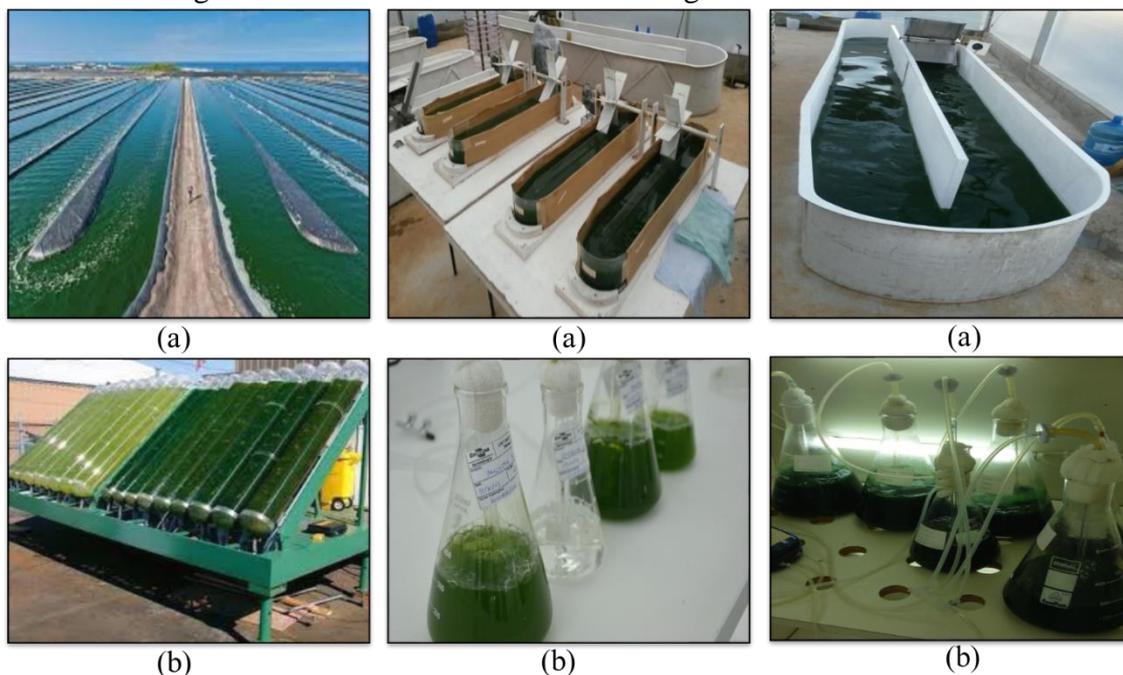
2.2.1.1 Formas de cultivos

Inicialmente é necessário escolher uma espécie de microalga, bem como o meio e a forma de cultivo para dar início a produção de biomassa. Existem várias maneiras de cultivar microalgas para produção de biomassa. A forma mais simples são os sistemas abertos de cultivo (Figura 4a), onde os mais conhecidos são as lagoas abertas rasas e os *raceways*. Estes fotobiorreatores abertos são mais utilizados por se caracterizarem como uma forma mais barata de implantação, porém apresentam baixo rendimento em biomassa devido a dificuldades em controlar parâmetros como temperatura, luminosidade, entre outros (HUNDT; REDDY, 2011).

Outro sistema de cultivo bastante utilizado são os fotobiorreatores fechados (Figura 4b) onde em uma matriz de tubos transparentes expostos à luz é realizado o cultivo. Neste, é adicionado, de forma constante, uma fonte de dióxido de carbono e nutrientes. Este sistema é muito utilizado em indústrias, onde o próprio dióxido de carbono é produzido e posteriormente incorporado ao sistema (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

Quando comparados os sistemas aberto e fechado de cultivos, os fechados apresentam vantagens no rendimento de produção de biomassa, visto que nesse sistema há maior controle de temperatura, menores taxas de evaporação e contaminações por bactérias, fungos e protozoários, controle maior das trocas de gases entre cultivo e ar atmosférico e redução de áreas de cultivos (HUNDT; REDDY, 2011).

Figura 4- Formas de cultivos de microalgas abertos e fechados



Existem formas de alterações dos meios de cultivos para otimizar a produção de biomassa, ou aumentar teores de compostos celulares como aumento de teores de lipídios, proteínas ou carboidratos. Para a produção do bioetanol o composto celular de interesse são os carboidratos. Desta forma o rendimento de produção está associado diretamente aos percentuais deste componente. A Tabela 1 apresenta diferentes cepas de microalgas, bem como seus percentuais de carboidratos.

Tabela 1- Percentuais de carboidratos de diferentes microalgas- Percentuais de carboidratos de diferentes microalgas

Microalga	Acúmulo de carboidratos (%)
<i>Arthrospira platensis</i>	58
<i>Chlamydomonas fasciata Ettl 437</i>	43,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	59,7
<i>Chlorella sokoniana</i>	40,3
<i>Chlorella variabilisNC64A</i>	37,8
<i>Chlorella vulgarisP12</i>	41
<i>Chlorella vulgarisFSP-E</i>	52
<i>Chlorella vulgarisKMMCC-9</i> UTEX26	22,4
<i>Chlorella sp. KR-1</i>	49,7
<i>Chlorococcum humicola</i>	32
<i>Chlorococcum infusionum</i>	32
<i>Dunaliella tertiolectaLB999</i>	37,8
<i>Dunaliella tertiolectaLB999</i>	40,5
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	45–50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	30
<i>Scenedesmus obliquusCNW-N</i>	51,8
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	26
<i>Synechococcus elongatus PCC</i> 7942	28
<i>Synechococcus sp.PCC 7002</i>	59
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	45–50

Fonte: Adaptado de Silva; Bertuccio et al. (2016)

Salla (2016) realizou um estudo para aumentar os teores de carboidratos em células de *Spirulina* sp. cultivadas em meio contendo concentrado proteico de soro de leite, utilizando *Spirulina* sp., o déficit de nutrientes no meio de Zarrouk diluído a 20% e a adição de 2,5% de resíduos levou à produtividade elevada carbono chegando a 60 mg L⁻¹ d⁻¹. Vários estudos já foram desenvolvidos como o objetivo de produzir bioetanol com os carboidratos microalgais. Margarites (2014) em experimentos de produção de bioetanol a partir de

biomassa de *Spirulina* sp., verificou produtividade de etanol de 1,18 g.L⁻¹.h⁻¹, utilizando 50% dos carboidratos provindos da sacarificação da biomassa e 50% a partir da glicose.

2.2.1.2 Separação da biomassa

A escolha da tecnologia para realizar a separação da biomassa do meio de cultivo é um dos procedimentos que mais influenciam na economia e na eficiência nos processos de produção de combustíveis renováveis (DANQUAH et al., 2009). Esta escolha é feita a partir de uma série de fatores como o tipo da célula, a densidade e o tamanho das células (BRENNAN; OWENDE, 2010). A colheita da biomassa dos meios de cultivos é uma das etapas de elevado custo no processo, pois a escolha certa do método de extração pode influenciar em até 30% no rendimento final de produção de biomassa (MATA et al. 2010). Os processos de filtração, sedimentação e centrifugação são os mais utilizados para separação da biomassa produzida do meio de cultivo (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2012).

O Quadro 1 apresenta os métodos mais utilizados para a separação da biomassa, demonstrando as principais vantagens e desvantagens de cada método.

Quadro 1- Métodos de separação de biomassa, vantagens e desvantagens

Método	Recuperação	Vantagens	Desvantagens
Centrifugação	> 90%	Aplicável para quase todas as espécies; Alta eficiência; Não requer adição de produtos químicos.	Energia requerida; Dano celular (forças de cisalhamento).
Filtração tangencial	70 – 90%	Alta eficiência; Permite a separação de espécies sensíveis ao cisalhamento.	Entupimento; Limpeza das membranas; Custo alto.
Sedimentação gravimétrica	10 – 90%	Simples; Barato	Processo demorado; Baixa eficiência; Possibilidade de deterioração da biomassa; Pode utilizar flocculantes.
Flotação	50 – 90%	Viável para grande escala; Alta eficiência; Custo médio.	Pode utilizar flocculantes.
Floculação e Coagulação	25 – 98%	Custo médio; Alta eficiência; Viável para grande escala.	Possibilidade de contaminação da biomassa

Fonte: adaptado de Laamanen et al. (2016)

2.2.1.3 Ruptura celular

Para a produção de bioetanol é necessário realizar a ruptura celular ou pré-tratamento na biomassa microalgal, com o objetivo de liberar os carboidratos que estão no interior da célula (HO et al., 2013).

Estes pré-tratamentos, além de liberar os compostos intracelulares auxiliam no aumento da eficiência das próximas etapas, sacarificação e fermentação. Tais processos podem ser divididos em físicos, químicos e enzimáticos (MATA et al. 2010).

Cada tipo de tratamento possui suas características próprias e também custos que dependem de alguns parâmetros como custo com eletricidade; reagentes alcalinos ou ácidos; temperatura necessária durante o tratamento; tipologia das enzimas utilizadas; adição de tensoativos durante a hidrólise enzimática e tipo de matéria prima (biomassa utilizada). Se compararmos em uma escala dos menores aos maiores custos temos a seguinte ordem: os tratamentos físicos (micro-ondas, ultrassom, autoclave e ciclos de congelamento/descongelamento); os tratamentos químicos (reações alcalinas e básicas); e os tratamentos enzimáticos (amilases e celulasas) (GONZÁLEZ-LÓPEZ et al., 2013).

Os tratamentos físicos mais utilizados são aumento de temperatura/pressão e o ultrassom (sonicação). Nahak et al. (2010) relatou sobre o efeito da pressão de vapor na microalga *Enteromorpha* a 120 °C durante 1 min e comparou os rendimentos com um pré-tratamento químico com ácido sulfúrico. No final, a biomassa pré-tratada com pressão de vapor apresentou maior liberação de carboidratos.

O uso de ultrassom também vem sendo relatado com boas eficiências na liberação dos carboidratos. Quando se utiliza este tipo de tratamento, há uma entrada de energia específica que é necessária para romper a estrutura celular e a eficiência do rompimento depende de fatores físicos da célula da microalga, como forma, tamanho e estrutura intracelular (PURCELL et al., 2013).

Métodos que envolvem ciclos de congelamento e descongelamento são relatados como métodos de baixo custo e com boas eficiências. O congelamento em temperaturas próximas a -20 °C forma cristais de gelo, desta forma, a água se expande. Tal expansão é responsável pelo rompimento das paredes celulares e conseqüentemente liberação dos compostos intracelulares. Este efeito de expansão aumenta a área superficial e o volume dos poros da biomassa, melhorado assim os rendimentos nas fases de sacarificação (CHANG et al., 2011).

Os pré-tratamentos químicos referem-se a reações químicas alcalinas ou ácidas, sendo que baixas concentrações de ácidos já podem romper a parede celular. Tratamentos alcalinos podem apresentar maiores eficiências devido ao fato de envolver menores pressões e temperaturas. Harun et al. (2011) realizou um tratamento alcalino na microalga *Chlorococcum infusionum* utilizando NaOH e descreveu que esta é uma técnica promissora para o tratamento microalgal visando a produção de bioetanol.

Os processos de tratamentos enzimáticos podem apresentar boas eficiências nas rupturas celulares e são métodos menos agressivos e sem geração de produtos inibitórios (HO et al., 2013). Porém, um fator importante nestes métodos é a escolha correta das enzimas, pois diferentes cepas de microalgas com características particulares necessitam de enzimas específicas (SCHENK et al., 2008).

Mahdy et al. (2014) relatam que o uso de enzimas como as proteases são mais eficientes nas rupturas celulares, permitindo assim uma liberação maior de compostos como carboidratos, lipídios e proteínas. Ainda é possível realizar a combinação de tratamentos enzimáticos e físicos, que resultam em uma redução do consumo de energia e reduzem a geração de produtos secundários ou tóxicos que possam alterar a qualidade do produto final (CHEN et al., 2011). Segundo Ometto et al. (2014), para a produção de biogás, a adição de proteases é fundamental, pois a hidrólise aumenta as frações de matéria orgânica solúvel de forma mais significativa.

2.2.1.4 Sacarificação

Após a etapa de ruptura celular é realizada a hidrólise dos polissacarídeos para posterior fermentação e obtenção do bioetanol. A hidrólise ou sacarificação são procedimentos que realizam a conversão dos amidos presentes na biomassa em açúcares mais simples, visto que os amidos são estruturas mais complexas e inacessíveis aos microrganismos que irão realizar a fermentação. A sacarificação geralmente é caracterizada por uma etapa que limita a velocidade de produção de bioetanol. A hidrólise dos polissacarídeos pode ser realizada de duas principais formas: a hidrólise química e hidrólise enzimática (SCIPIONI, 2011).

O processo de sacarificação química é mais rápido que a sacarificação enzimática, porém necessita de condições extremas de temperaturas, pH, pressão e adição de ácidos e bases. Devido a esses fatores mais extremos, pode haver a geração de inibidores que interferem diretamente na fermentação, prejudicando assim o rendimento na produção de

biocombustíveis e aumentando a geração de resíduos (MUSSATTO et al., 2010). Além disso, segundo Nguyen et al. (2010) é necessário criar um sistema de manutenção de condições para a reação acontecer, fatores como temperatura, umidade, pH são essenciais para a redução de produtos inibidores.

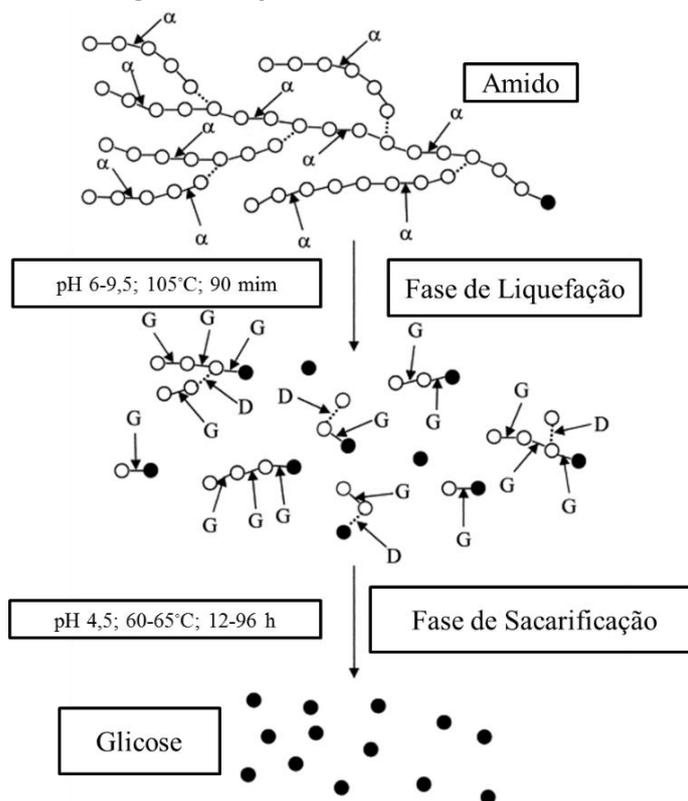
Nguyen et al. (2010) relatam também que utilizando ácido sulfúrico um rendimento de 95% de conversão de carboidratos para açúcares fermentáveis foi alcançado. Por outro lado, Harun et al. (2011) utilizando métodos alcalinos com NaOH, chegou a produções de açúcares a partir de biomassa de *C. ifusionum* de 0,35 g de açúcar/ g de biomassa. Tais estudos confirmam as vantagens do uso de hidrólise química, realizando a conversão de açúcares mais assimiláveis para microrganismos fermentadores, no entanto o rendimento em açúcares por hidrólise enzimática é maior (CHOI et al., 2010).

Processos de sacarificação enzimática de biomassa microalgal envolvem a utilização de enzimas como celulosas, amilases, glicoamilases, amiloglicosidase, sendo estas as mais utilizadas. Este processo é realizado em condições mais brandas de temperatura do que a hidrólise ácida e não há geração de subprodutos ou alterações que possam prejudicar a posterior fermentação dos compostos convertidos, sendo uma das vantagens em relação a hidrólise química (YEH et al, 2010).

A temperatura na hidrólise enzimática é um dos fatores mais importantes para maior eficiência, pois em temperaturas ótimas há a transformação de açúcares mais complexos em monossacarídeos mais simples. As enzimas amilolíticas hidrolisam compostos celulares como carboidratos, trabalhando em uma faixa ótima de 40 a 55 °C (HARUN et al., 2014), apresentando assim melhores rendimentos na conversão.

A hidrólise dos carboidratos microalgais é realizada por enzimas amilolíticas, como as α -amilases e as amiloglicosidase. Este processo é desenvolvido em duas etapas principais, sendo a primeira a liquefação, na qual a suspensão de carboidratos mais concentrada é convertida em uma solução de dextrinas mais solúveis. Na segunda etapa ocorre a sacarificação, na qual as dextrinas transformam-se em glicose. A Figura 5 mostra a hidrólise enzimática do amido em glicose devido a ação de enzimas amilolíticas.

Figura 5- Ação das enzimas amilolíticas



D*= desramificação enzimática

G*= amiloglicosidase

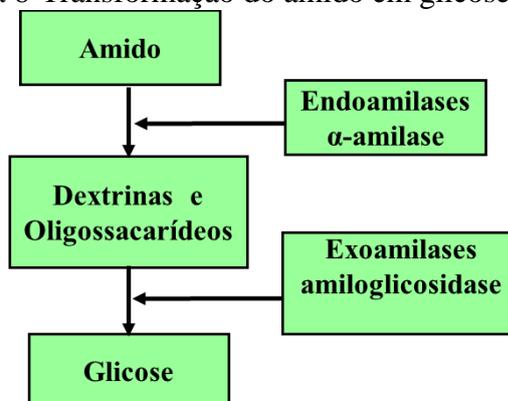
 α = amilase

• = glicose

Fonte: Adaptada Lévêque et al. (2000)

A Figura 6 apresenta as etapas de transformação do amido em glicose, demonstrando a ação das enzimas.

Figura 6-Transformação do amido em glicose



Fonte: Adaptada Scipioni, (2011).

O amido é característico por apresentar um elevado peso molecular, e é formado por dois principais componentes, a amilose e a amilopectina. A amilose é constituída por resíduos de α -D-glicose, unidas por ligações α -1,4. Já a amilopectina é definida com uma estrutura muito ramificada, pois além dos resíduos de α -D-glicose agrupados por ligações α -1,4 são interconectadas por ligações α -1,6 (SCIPIONI, 2011).

Tais enzimas são capazes de hidrolisar as moléculas de amido, liberando dextrinas e polímeros de menor peso molecular compostos por unidades de glicose. As enzimas amilolíticas são divididas em dois grupos: as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases são responsáveis por hidrolisar o interior da molécula do amido, resultando em ramos lineares de oligossacarídeos. Já as exoamilases, hidrolisam as extremidades liberando unidades de glicose, produto final de menor peso molecular (SANTANA, 2012).

Através da ação das amilases, sob condições ótimas, o amido é transformado em glicose, raminose, galactose, entre outros monômeros. Estes monômeros podem ser identificados por cromatografia líquida, a partir do uso de padrões sintéticos (TEMPLETON et al., 2012).

Choi et al. (2010) estudaram os efeitos das enzimas comerciais α -amilase, de *B. licheniformis*, e glicoamilases, a partir de *Aspergillus niger*, para a conversão dos polissacarídeos de *Chlamydomonas reinhardtii* em bioetanol. Os resultados mostraram que os polissacarídeos foram hidrolisados a pH 4,5 e 55 °C durante 30 min, apresentando uma conversão de 0,57 g de açúcar/g de biomassa.

Processos enzimáticos podem ocorrer em condições extremas de pH e temperaturas, podendo gerar problemas relacionados a inibição enzimática. Além disso, vários estudos são necessários para otimizar as quantidades de enzimas utilizadas no processo, visto que tais biocatalisadores possuem elevado custo, podendo aumentar de forma considerável o custo total de produção (DATTA et al., 2013).

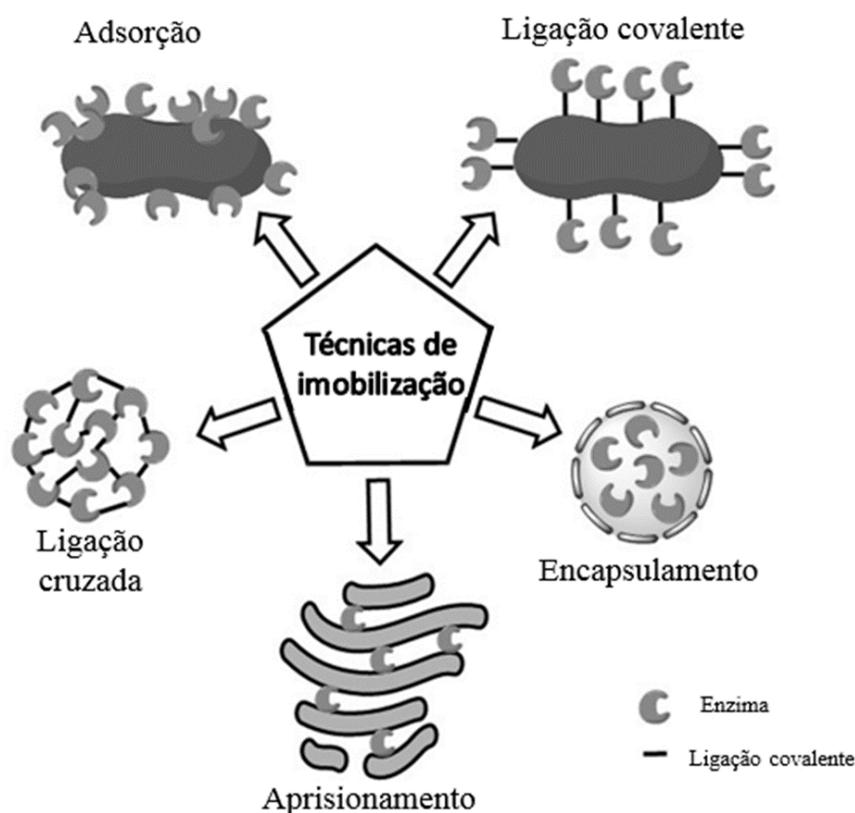
Uma alternativa que pode diminuir este custo é a imobilização de enzimas, que permite a reutilização, aumenta a estabilidade química e física das enzimas e diminuiu as perdas por inibição. A imobilização pode ser definida como um confinamento da enzima em um suporte ou agregado, e estes devem ser selecionados por características como: estabilidade e rentabilidade (WANG et al., 2010). Diferentes tipos de suportes podem ser utilizados, sendo os mais relatados os polímeros, nano partículas magnéticas e materiais orgânicos, entre outros (DONG et al., 2014; VAZ et al., 2016).

Para que as enzimas imobilizadas se tornem um processo econômico e efetivo é preciso avaliar o suporte que será utilizado. A espuma rígida de poliuretano (PU) é citada na

literatura como um suporte viável para a prática de imobilização (NYARY et al., 2016), este também se caracteriza por ser um material inerte, apresentando boa resistência mecânica e um baixo custo comercial (LIU et al., 2007).

A imobilização pode ocorrer por adsorção, ligações covalentes, encapsulamento, aprisionamento ou ligações cruzadas. A Figura 7 apresenta as diferentes técnicas de imobilização de enzimas.

Figura 7- Diferentes técnicas de imobilização



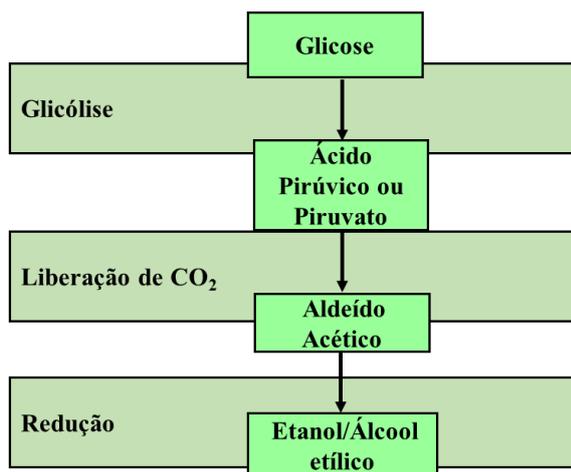
Fonte: Adaptado de Vaz et al. (2016)

Estes métodos de imobilização diferenciam-se entre si, apresentando vantagens e desvantagens. A escolha pela melhor técnica deve ser baseada na tipologia da enzima, nas relações entre enzima e suporte e nas relações posteriores a imobilização entre enzima, suporte e substrato. Estas relações devem ser levadas em conta para se garantir a manutenção das propriedades catalíticas da enzima (HOMAEI et al., 2013).

2.2.1.5 Fermentação

Fermentação é um conceito para a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos por microrganismos, em vários sistemas para a produção de energia (MATSUDO et al., 2011). A Figura 8 apresenta as etapas da fermentação.

Figura 8- Etapas da fermentação alcoólica



Fonte: Matsudo (2011)

A enzima piruvato descarboxilase, responsável pela descarboxilação do piruvato, está presente em todos os organismos que promovem a fermentação alcoólica, por exemplo leveduras de cervejarias (MATSUDO, 2011).

O processo de fermentação alcoólica para a obtenção de etanol é um procedimento descontínuo, caracterizado em três fases: fase preliminar, há uma grande multiplicação celular, etapa de alto poder fermentativo; fase tumultuosa, caracteriza-se pelo desprendimento do dióxido de carbono; e a fase complementar caracterizada pelo desprendimento de dióxido de carbono ser menor, evidenciando assim o fim do processo fermentativo (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009).

Para realizar estes processos é necessário um agente fermentativo. As leveduras são amplamente utilizadas nestes processos. A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada, sendo caracterizada como um microrganismo anaeróbio facultativo, que em anaerobiose realiza a transformação do açúcar em etanol e CO₂ (LUDWIG et al., 2000).

Ao metabolizar o açúcar há geração de energia em formato de adenosina trifosfato (ATP), e esta energia é utilizada pela própria levedura em seus processos metabólicos. O

etanol é um produto que é excretado pela célula em ambiente de anaerobiose e não é utilizado pela levedura (BOSQUEIRO, 2010).

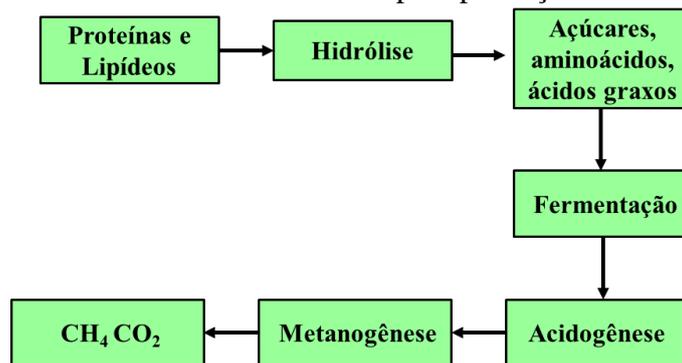
Em escala industrial, a produção de bioetanol via biomassa microalgal é realizada de forma tradicional, as soluções de açúcares fermentáveis são mantidas com o agente fermentador, sendo assim os açúcares são utilizados nos processos metabólicos e ocorre a excreção de bioetanol no meio. Em seguida, são desenvolvidos processos de destilação que por diferença de pressão de vapor ocorre a separação da água e do álcool produzido podendo assim chegar ao produto final (MUSSATTO et al., 2010).

2.3 Biometano

O biometano é um gás resultante da digestão de matérias ou resíduos através de dois processos: a digestão anaeróbia (DA) e da liquefação hidrotermal (HTL), sendo tais tecnologias empregadas para realizar a transformação da biomassa residual em biocombustível (COONEY, 2007). A DA é um processo bioquímico que converte a biomassa residual úmida em biogás, através do metabolismo de bactérias anaeróbias. Basicamente este biogás possui dois elementos, o gás metano (CH_4) e o dióxido de carbono (CO_2), sendo que estes elementos podem ser purificados e sintetizados a biometano, podendo este ser usado na geração de eletricidade (BOHUTSKYI; BOUWER, 2013).

A DA basicamente é composta por 3 etapas: hidrólise dos compostos celulares, acidogênese e metanogênese, sendo que a primeira etapa, a hidrólise, é um fator limitante na velocidade da digestão anaeróbia. A realização de um pré-tratamento para realizar a ruptura celular da microalga pode aumentar o rendimento da AD, desta forma deixando os compostos intracelulares mais acessíveis à degradação por enzimas hidrolíticas produzidas pelas bactérias anaeróbias (MAHDY et al., 2014). A AD é um processo sinérgico, com uma série de vias metabólicas. A Figura 9 apresenta as etapas de degradação dos compostos até a transformação em gás metano.

Figura 9- Vias metabólicas da AD para produção de biometano



Fonte: Adaptado Yang, (2009)

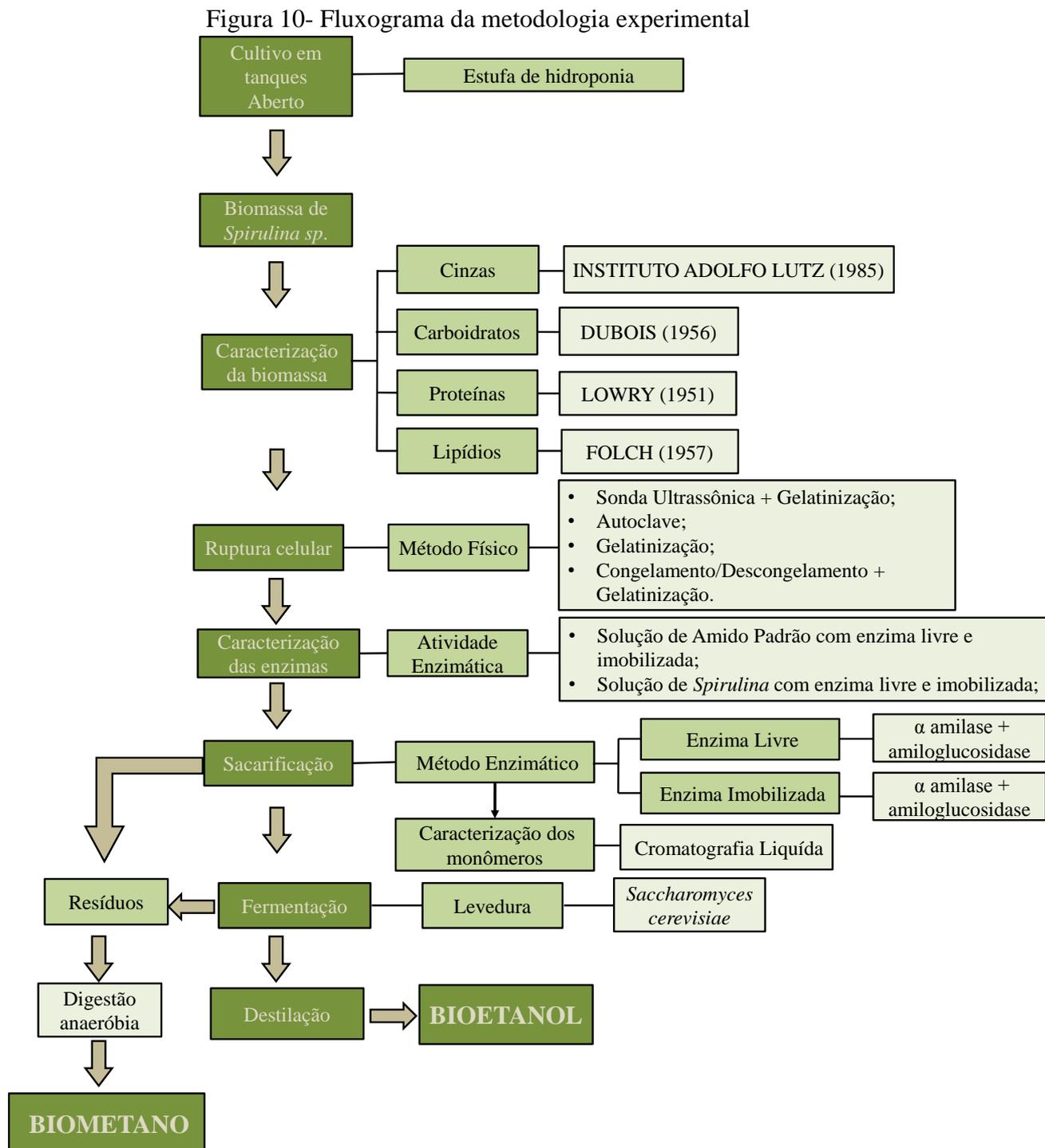
A digestão anaeróbia apresenta vantagens se comparadas a outros processos de produção de biocombustíveis, pois não é necessária uma secagem da matéria prima, desta forma possui um gasto energético menor e também uma geração muito baixa de subprodutos ou resíduos (YANG et al, 2007).

A liquefação hidrotermal é constituída por um processo termoquímico que converte a biomassa em uma espécie de óleo bruto, através de processos com água em altas temperaturas, porém quando há na composição celular altos teores de proteínas existe uma geração elevada de nitrogênio no produto final. A combustão deste nitrogênio resulta na formação de gases tóxicos (WARD et al., 2014). Ainda, segundo Ward et al. (2014), neste processo as proteínas são hidrolisadas em aminoácidos em condições hidrotérmicas podendo gerar descarboxilação e reações cruzadas de carboidratos.

Estudos revelam que a produção de biometano pode ser menos complexa e mais rentável, visto que as microalgas, de acordo com a sua composição celular, possuem características essenciais para a produção, como altos teores de carboidratos, lipídios e proteínas, fazendo com que estes sejam utilizados facilmente como substratos para a produção deste biogás (LAKANIEMI et al., 2011). A partir de uma quantidade de substratos biodegradáveis e a ação de um conjunto de bactérias anaeróbias, os substratos são degradados e transformados em biometano, sendo que o rendimento da produção está diretamente ligado aos teores de proteínas e lipídios disponíveis na biomassa microalgal.

3 METODOLOGIA

A Figura 10 apresenta as etapas da metodologia seguida para alcançar os objetivos propostos.



3.1 Biomassa de *Spirulina* sp. LEB 52

A microalga utilizada foi a *Spirulina* sp. LEB 52 cultivada em tanques abertos com capacidade máxima de 10 L com controle de agitação de 0,35 m/s e suplementados com meio *Zarrouk* 20% (MAGRO et al., 2017). Os cultivos foram realizados até as microalgas atingirem a fase de declínio (FD), fase em que ocorre o maior acúmulo de carboidratos intracelular.

A separação da biomassa foi realizada por filtração em tela de nylon com abertura de malha de 0,048 mm e posterior secagem em estufa a 50 °C por 24 h (MAGRO et al., 2017). Os tanques localizam-se em uma estufa de hidroponia alocada no Parque Tecnológico da Universidade de Passo Fundo.

3.2 Caracterização da biomassa

O preparo das amostras para quantificação do teor de carboidratos e proteínas foi realizado utilizando método da sonicação. A biomassa seca foi colocada em tubos de centrífuga com capacidade máxima de 15 mL, para realizar o rompimento celular. Foram adicionados 5 mg de biomassa em 10 mL de água destilada e posterior sonicação por cinco ciclos de 60 s em Sonicador de Ponteira Unique - Modelo: DES500.

Após a sonicação, foi determinado o teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) (ANEXO I). O teor de proteínas na biomassa algal foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951) (ANEXO II). Para a determinação da concentração de lipídios o método utilizado foi desenvolvido por Folch et al. (1957) (ANEXO III).

A análise de cinzas da biomassa foi realizada através do método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e expressas em base seca.

3.3 Ruptura celular da biomassa de *Spirulina*

Os procedimentos de ruptura celular foram realizados com o objetivo de romper a parede celular da microalga para ocorrer a liberação dos polissacarídeos intracelulares. Foram testados diferentes métodos físicos, conforme delineamento experimental apresentado na Tabela 2. Para realização de cada tratamento, foi preparada uma suspensão

10% (m/v) da biomassa, com volume total de 100 mL em erlenmeyer de 250 mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 2- Delineamento dos ensaios de ruptura celular da microalga

Tratamentos	Métodos	Descrição
1	Sonda Ultrassônica*	Solução de <i>Spirulina</i> 10% em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 5,5. Sonicação por 10 ciclos de 60 s.
2	Gelatinização	Solução de <i>Spirulina</i> 10% em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 5,5. Gelatinização em banho termostático a 100 °C por 10 min.
3	Autoclave	Solução de <i>Spirulina</i> 10% em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 5,5. Autoclavagem por 20 min a 121° C.
4	Congelamento/ Descongelação*	Solução de <i>Spirulina</i> 10% em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 5,5. As amostras foram congeladas e descongelada por 24 h cada ciclo.

*Métodos seguidos de gelatinização em banho termostático em 100 °C por 10 min.

Após realizada a ruptura celular foi realizada a sacarificação enzimática como forma de avaliar qual método de rompimento foi mais eficiente na liberação dos carboidratos. A sacarificação foi realizada através da adição das enzimas α -amilase (Liquozme ® Supra 2.2X) e amiloglicosidase (AMG ® 300L).

Após a ruptura celular foram adicionados de forma simultânea 1 mL de cada enzima, diluídas em água destilada, na proporção de 1:200 (v/v). Foram retiradas amostras nos tempos 1 h e 2 h após a inserção das enzimas, sendo mantidos incubados em mesa agitadora a 50 °C com agitação de 150 rpm.

Para determinação dos açúcares redutores gerados, foram realizadas amostragens de 1 mL das amostras de cada tratamento com posterior precipitação das proteínas, utilizando 0,4 mL de soluções de Carrez I e II, (solução 15% de ferrocianeto de potássio e solução 30% de sulfato ou acetato de zinco, respectivamente). Avolumou-se em balão volumétrico de 10 mL com água destilada, centrifugou-se a 3640g por 10 min. Após foi realizada uma filtração, e 1 mL do filtrado foi utilizado na determinação da concentração de açúcares redutores, através método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As determinações analíticas foram realizadas em duplicata.

3.4 Caracterização das enzimas

As enzimas foram caracterizadas com o objetivo de verificar as faixas ótimas de ação quanto ao pH e temperatura. Foram realizados ensaios utilizando extratos enzimáticos das enzimas α -amilase (Liquozme[®] Supra 2.2X) e a amiloglicosidase (AMG[®] 300L), doadas pela empresa Novozymes.

3.4.1 Avaliação do pH e temperatura ótimos de ação

As atividades enzimáticas foram avaliadas em três temperaturas e três pHs, conforme a Tabela 3.

Tabela 3- Delineamento dos ensaios de atividade enzimática

Tratamentos	Temperatura (°C)	pH
1	37	5,5
2	37	6,0
3	37	7,0
4	50	5,5
5	50	6,0
6	50	7,0
7	60	5,5
8	60	6,0
9	60	7,0

A avaliação do pH e temperatura ótima de ação das enzimas foi realizado para α -amilase e amiloglicosidase utilizando como substratos soluções de amido e de biomassa de *Spirulina*.

A atividade enzimática sobre o amido foi realizada com solução de amido 1% em tampão fosfato de sódio 0,2 Mol/L nos pHs desejados. As enzimas foram diluídas na proporção 1:2000 (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 Mol/L. A reação foi realizada em triplicada em tubos de ensaios. Foram adicionados 4 mL de solução de amido e 1 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados em mesa agitadora por 60 min nas temperaturas de acordo com a Tabela 3.

Transcorrido o tempo de reação, foi realizada a inativação das enzimas com a adição de 5 mL de NaOH 1 Mol/L seguida de fervura em banho-maria a 100 °C por 10 min.

Após foi realizada a precipitação de proteínas com soluções de Carrez I (solução 15% de ferrocianato de potássio) e II (solução 30% de sulfato de zinco) e determinada a concentração de açúcares redutores (AR) pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959),

utilizando-se uma curva padrão, obtida a partir de solução estoque de glicose anidra, realizando-se a diluição das amostras a fim de que se obedecesse aos limites da curva-padrão.

A atividade enzimática utilizando *Spirulina* como substrato foi realizada após o pré-tratamento da biomassa. Foi preparada uma suspensão 10% (m/v) de *Spirulina* seca em tampão fosfato de sódio 0,2 Mol/L nos pH desejados (Tabela 2). A ruptura celular foi realizada por métodos de congelamento/descongelamento seguida de gelatinização em banho termostaticado a 100 °C por 10 min. A reação enzimática foi realizada utilizando 4 mL da solução obtida e 1 mL das enzimas diluídas na proporção 1:200 (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 Mol/L conforme os pH (Tabela 2). Após 60 minutos de reação foi realizada inativação das enzimas, adicionando 5 mL de NaOH 1 Mol/L, com posterior fervura á 100 °C por 10 min. Após foi realizada a precipitação de proteínas com soluções de Carrez I (solução 15% de ferrocianato de potássio) e II (solução 30% de sulfato de zinco).

A concentração de açúcares redutores (AR) liberados foi determinada pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959), utilizando-se uma curva padrão, obtida a partir de solução estoque de glicose anidra, realizando-se a diluição das amostras a fim de que se obedecesse aos limites da curva-padrão.

3.4.2 Imobilização das enzimas

As enzimas α -amilase e amiloglicosidase foram imobilizadas utilizando metodologia de imobilização *in situ* (adaptado de BUSTAMANTE-VARGA et al., 2015) que consistiu na adição de 5 mL de poliol poliéster e 5 mL de isocianato de tolueno, mantendo relação de 5:5 (v/v). Os reagentes que constituíram o suporte foram cedidos pela Mannes (Brasil). Os suportes com as enzimas foram mantidos em dessecador por 24 h para total polimerização e, após isso, foram fracionados utilizando um liquidificador industrial, embalados a vácuo e armazenados a 4 °C.

Foram adicionados diferentes volumes de enzimas aos imobilizados, baseados nos volumes utilizados na sacarificação com o biocatalisador livre. Estes volumes demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4- Volumes de enzimas α -amilase e amiloglicosidase imobilizados

Enzimas	Volume (mL)
α -amilase	0,5
α -amilase	1,0
α -amilase	1,5
AMG	0,5
AMG	1,0
AMG	1,5
α -amilase+AMG	0,5 + 0,5*
α -amilase+AMG	1,0 + 1,0*
α -amilase+AMG	1,5 + 1,5*

* As enzimas foram imobilizadas em conjunto.

3.4.3 Atividade enzimática das enzimas livres e imobilizadas

Após determinados o pH e temperatura ótimos de ação das enzimas α -amilase e amiloglicosidase, foi determinada a atividade enzimática destas em soluções de amido e de *Spirulina* por metodologias baseadas na quantificação de açúcares redutores (MILLER, 1959), produzidos pela hidrólise de amido, sendo o tempo de reação de 60 min. O volume de enzima usado na atividade das enzimas α -amilase e amiloglicosidase livre foi 1 mL e para enzimas imobilizada foi 0,1g.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto nas condições do método proposto (ALVA et al., 2007). As atividades enzimáticas foram calculadas utilizando a Equações 1.

$$AA = \frac{[AR]}{t} \times \frac{1000}{180} \quad (1)$$

Sendo:

[AR]: Concentração de açúcares redutores (mg/mL);

Abs: Absorbância em 546 nm;

AA: Atividade amilolítica (U/mL_{Enzima}).

t: Tempo de reação (min)

3.4.4 Determinação da atividade específica das enzimas

A determinação das proteínas totais dos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Lowry et al., (1951), a fim de determinar-se as atividades específicas. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático diluídos 2000 vezes, e acrescidos de 0,5 mL de uma solução NaOH 1 Mol/L. Após, as amostras foram colocadas em banho termostático a 100° C por 5 min. Em seguida adicionou-se 2,5 mL da solução preparada no momento do uso, composta de carbonato de sódio 5% (p/v) sulfato de cobre 1% (p/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (p/v).

Os tubos foram mantidos por 10 min, seguido da adição de 0,5 mL de Folin Ciocalteau. Após 30 minutos a absorvância foi medida em espectrofotômetro calibrado no comprimento de onda de 750 nm. A partir da concentração de proteína presente na enzima, foi calculada a atividade específica da enzima (Equação 2), que é a razão da atividade amilolíticas pela concentração de proteína da enzima.

$$AE = \frac{AA}{[proteína]} \quad (2)$$

Sendo:

AE: Atividade Específica Enzimática (U/mg_{proteína});

AA: Atividade enzimática amilolítica (U/mL_{enzima});

[Proteína]: Concentração de proteína na enzima (mg_{proteína}/mL_{enzima}).

3.5 Sacarificação da biomassa algal

Foram realizados ensaios de sacarificação dos polissacarídeos microalgais com enzimas livres e imobilizadas. As enzimas α -amilase e amiloglicosidase foram adicionadas em uma solução de *Spirulina* 20% (m/v) previamente tratada segundo o melhor resultado de teste de rompimento celular. A biomassa foi preparada em tampão fosfato no pH ótimo de ação das enzimas.

A sacarificação ocorreu em agitador orbital a 150 rpm, em erlenmeyer de 250 mL com volume útil de 100 mL e temperatura ótima pré-determinada para ação de ambas as enzimas. A sacarificação foi realizada com as enzimas livres e imobilizadas, conforme ensaios da Tabela 5. No caso das enzimas imobilizadas utilizou-se proporção de suporte com o imobilizado de 1% (m/v).

Tabela 5- Delineamento dos ensaios de sacarificação da biomassa de *Spirulina* com enzimas livres e imobilizadas

Condição/Enzima	Quantidade de enzima adicionada
Livre/ α -amilase+AMG	0,8 (mL)
Livre/ α -amilase+AMG	0,5 (mL)
Livre/ α -amilase+AMG	1,0 (mL)
Livre/ α -amilase+AMG	1,5 (mL)
Imobilizadas separadas/ α -amilase+AMG	0,5 (g) de suporte de cada enzima imobilizada no concentração 0,5 mL
Imobilizadas separadas/ α -amilase+AMG	0,5 (g) de suporte de cada enzima imobilizada na concentração 1,0 mL
Imobilizadas separadas/ α -amilase+AMG	0,5 (g) de suporte de cada enzima imobilizada na concentração 1,5 mL
Imobilizadas em conjunto/ α -amilase + AMG	1,0 (g) de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 0,5 mL
Imobilizadas juntas/ α -amilase + AMG	1,0 (g) de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 1,0 mL
Imobilizadas juntas/ α -amilase + AMG	1,0 (g) de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 1,5 mL

Para determinação dos açúcares redutores gerados, foram realizadas amostragens de 3 mL das amostras de cada ensaio, num intervalo de tempo de 0 a 24 h, adicionou-se mais 3 mL de NaOH 1 molar, com posterior precipitação das proteínas, utilizando 0,4 mL de soluções de Carrez I e II, (solução 15% de ferrocianeto de potássio e solução 30% de sulfato ou acetato de zinco, respectivamente). Avolumou-se em balão volumétrico de 10 mL com água destilada, centrifugou-se a 3640g por 10 min. Após foi realizada uma filtração, e 1 mL do filtrado foi utilizado na determinação da concentração de açúcares redutores, através método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As determinações analíticas foram realizadas em duplicata.

A eficiência de hidrólise, foi calculada conforme a equação 3, além disso foi determinada a eficiência de hidrólise com base da quantidade de enzima utilizada no ensaio, esta determinada conforme equação 4.

$$EH(\%) = \frac{AR_{\text{após hidrólise}}}{\frac{(m_{\text{biomassa}} \cdot CHO)}{V} \cdot 1,1} \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo:

EH (%) = Eficiência de hidrólise

$AR_{\text{após hidrólise}}$ (g.L⁻¹)= Açúcares redutores obtidos após a hidrólise

m_{biomassa} (g) = Massa de *Spirulina* utilizadas na sacarificação

CHO (%): Carboidratos presentes na biomassa de *Spirulina*

V (L) = Volume final dos ensaios de sacarificação

$$EHP = \frac{AR_{\text{após hidrólise}}}{V_{\text{enzima}} \cdot PTN_{\text{extrato enzimático}}} \quad (4)$$

Sendo:

EHP (%): Eficiência de hidrólise baseada na quantidade de enzima e quantidade de proteína no extrato enzimático

$AR_{\text{após hidrólise}}$ (g.L⁻¹)= Açúcares redutores obtidos após a hidrólise

V_{enzima} (mL): Volume de enzima livre ou imobilizado

$PTN_{\text{extrato enzimático}}$ (mg/mL): Quantidade de proteína presente no extrato de enzima livre. Quando as duas enzimas, foram utilizadas em conjunto, as massas de enzimas utilizadas foram calculadas separadas e depois somadas.

O ensaio que apresentou maior eficiência dentre os que continham enzima livre, passou por um aumento de escala. Utilizou-se um reator de hidrólise com capacidade de 1,5 L, este experimento foi realizado em duplicata.

Após a sacarificação, foi realizado uma centrifugação a 1320g por 20 min, o sobrenadante foi utilizado como substrato na fermentação alcoólica. O resíduo deste processo foi utilizado para a produção de biometano.

3.5.1 Avaliação do reuso das enzimas imobilizadas

A partir da melhor condição de sacarificação utilizando as enzimas imobilizadas, foram testados o reuso. Os testes foram realizados a partir de uma solução de *Spirulina* 10% (m/v) em tampão fosfato pH 5,5 com rompimento celular por ciclos de 24 h de congelamento/descongelamento. Os testes foram incubados em agitador durante 24 h a 50°C sob agitação de 150 rpm. Após a reação, as amostras foram filtradas através de papel de

filtração para separar a enzima imobilizada, que foi lavada com água destilada e novamente submetida à hidrólise da biomassa da *Spirulina*. Os açúcares redutores foram determinados no filtrado pelo método colorimétrico, utilizando 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Os ciclos foram encerrados após perda de 50% das eficiências de hidrólise.

Para avaliar o desprendimento das enzimas imobilizadas no suporte, foi incubada uma massa de suporte contendo as duas enzimas (1% m/v) em 0,2 mol/L de fosfato de sódio em um erlenmeyer de 250 mL com um volume inicial de 100 mL. A cada duas horas, foram retiradas amostras para a determinação de proteínas no líquido usando o método de Lowry et al. (1951).

3.5.2 Caracterização dos monômeros

A caracterização dos monômeros após a hidrólise dos polissacarídeos de *Spirulina* foi determinada por HPLC. A amostra do hidrolisado foi filtrada em membrana de celulose 0,45 µm (Milipore®) e injetada em coluna AMINEX HPX-87H (Biorad). A fase móvel foi constituída de solução H₂SO₄ 5,0 mM mantida sob fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida a 50 °C e a detecção foi por índice de refração, a 210 nM. Os padrões utilizados foram glicose, frutose, xilose, arabinose, manose e galactose da Sigma-Aldrich.

3.6 Produção de bioetanol

3.6.1 Microrganismo

A levedura *S. cerevisiae* CAT-1 foi mantida em tubos de ensaio à 4 °C, com meio sólido inclinado com a seguinte composição: 1% de extrato de levedura; 2% de peptona; 2% de glicose e 2% de ágar. Posteriormente, as células da levedura foram ativadas pela realização de um pré-inóculo. O meio de cultivo foi composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2 % de glicose, o qual após esterilização a 121°C por 20 min e arrefecimento. O pré-inóculo foi preparado em erlenmeyer de 250 mL com volume útil de 100 mL e incubado em agitadora orbital por 48 h a 150 rpm e 30 °C. Após, os inóculos foram preparados adicionando-se ao meio de cultivo do inóculo (2% glicose, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona) 10% (v/v) do pré-inóculo.

Foram preparados dois inóculos diferentes, adicionando-se, 2% glicose, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e em variou-se as concentrações de hidrolisados

provenientes da sacarificação enzimática dos polissacarídeos da microalga em 3% ou 15%. Os inóculos foram preparados em erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 100 mL, mantidos em agitadora orbital a 150 rpm durante 10 h (tempo necessário para que a levedura se encontre na fase exponencial de crescimento).

3.6.2 Fermentações

O pH do hidrolisado foi ajustado entre 4,5 e 5,0 com ácido acético e posteriormente esterilizado e inoculado com 10% (v/v) de inóculo da levedura *S. cerevisiae*. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 1 L com volume útil de 450 mL em estufa a temperatura de 30 °C. O processo foi realizado na ausência de agitação. A coleta das amostras foi realizada no tempo inicial e a cada 4 h para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR), concentração de etanol e concentração celular de *S. cerevisiae*. Os ensaios foram encerrados após a estabilização dos parâmetros testados. Os ensaios de fermentações foram realizados variando a adição de hidrolisado no inóculo e a inserção de nutrientes ao mosto, conforme a Tabela 6.

Tabela 6- Delineamento experimental dos ensaios de fermentação

Ensaio	Hidrolisado no inóculo (%)	Nutrientes
F.S.3%	3	N/C
F.S.15%	15	N/C
F.C.15%	15	5 g/L de extrato de levedura; 3,5 g/L de fosfato de potássio anidro (K ₂ HPO ₄); 0,75 g/L de sulfato de magnésio (MgSO ₄ ·7H ₂ O); 1 g/L de cloreto de cálcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O).

F.S.3%- fermentação sem adição de nutrientes ao hidrolisado e adição de 3% de hidrolisado durante o preparo do inóculo. **F.S.15%**- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e adição de 15% de hidrolisado durante o preparo do inóculo. **F.C.15%**- fermentação com adição de nutrientes ao mosto e adição de 15% de hidrolisado durante o preparo do inóculo. N/C- Sem a adição de nutrientes.

As diferentes concentrações de hidrolisado inseridos no inóculo, foram testadas com o propósito de verificar se com o aumento do substrato no preparo do inóculo a levedura se adaptaria melhor na fase subsequente da fermentação, por estar mais adaptada a esta fonte. Também foi testado em um ensaio a adição de nutrientes ao mosto de fermentação, com o

objetivo de verificar se havia de necessidade de adição de nutrientes sintéticos ou somente os componentes da biomassa de *Spirulina* seriam suficientes para a nutrição da levedura durante o processo fermentativo.

O mosto fermentado foi centrifugado à 1320g por 15 min os resíduos foram utilizados para testar o potencial de produção de biometano.

A determinação da concentração celular foi realizada por meio de espectrofotometria, através da leitura da absorbância do meio de cultura a 600 nm. O sobrenadante obtido após centrifugação foi utilizado como branco para eliminar a interferência de coloração do meio.

Foi verificado através das análises AR o consumo do substrato pela levedura. Este foi quantificado pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959), utilizando-se uma curva padrão, obtida a partir de solução estoque de glicose.

A concentração de etanol foi quantificada através do método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas (SALIK; POVH, 1993).

A eficiência (η) na formação de etanol será obtida através da Equação 5 (HANG; LEE; WOODAMS, 1981).

$$\eta (\%) = \frac{\Delta E}{0,511 \times (S_0 - S)} \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

ΔE = Variação da concentração de etanol (g.L^{-1});

S_0 = Concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação (g.L^{-1});

S = Concentração de açúcares redutores totais no final da fermentação (g.L^{-1}).

Também foram determinados os parâmetros do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) (Equação 6), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) (Equação 7), fator de conversão de produto em célula ($Y_{X/P}$) (Equação 8) e produtividade em etanol (P_{etanol}) (Equação 9) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$Y_{X/S} (\text{g}_{\text{células}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}})^{-1} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \quad (6)$$

Sendo:

ΔX = Variação da concentração de células (g.L^{-1});

ΔS = Variação da concentração de substrato (g.L^{-1}).

$$Y_{P/S} (g_{produto} \cdot g_{substrato})^{-1} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (7)$$

Sendo:

ΔP = Variação da concentração de etanol ($g \cdot L^{-1}$);

ΔS = Variação da concentração de substrato ($g \cdot L^{-1}$).

$$Y_{X/P} (g_{célula} \cdot g_{produto})^{-1} = \frac{\Delta X}{-\Delta P} \quad (8)$$

Sendo:

ΔX = Variação da concentração de célula ($g \cdot L^{-1}$);

ΔP = Variação da concentração de etanol ($g \cdot L^{-1}$).

$$P_{etanol} (g \cdot L^{-1} h^{-1})^{-1} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad (9)$$

Sendo:

ΔE = Variação da concentração de etanol ($g \cdot L^{-1}$);

Δt = Variação do tempo de fermentação (h).

Ao término da fermentação foi realizada a destilação do mosto fermentado em microdestilador de bancada da marca Tecnal modelo TE-012.

O mosto fermentado foi centrifugado á 1320g por 15 min os resíduos foram utilizados para a produção de metano.

A geração de energia proveniente do etanol produzido, foi calculada pela entalpia deste combustível, onde foi relacionado o potencial energético em kJ/mol.

3.7 Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

Os ensaios de PBM foram realizados no Laboratório de Estudos em Biogás (LEB) da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC, de acordo com recomendações do procedimento VDI 4630 (2006). Todos os testes de digestão anaeróbia foram realizados em triplicata usando o Sistema Automático de Teste de Potencial de Metano II (AMPTS II, Bioprocess Control, Suécia), o qual determina o volume de metano produzido, em reatores de vidro de 500 mL mantidos a 37 °C (Figura 11).

Figura 11- Sistema automático de teste de potencial de metano



A Tabela 7 apresenta as massas inseridas nos meios reacionais para os testes de potencial bioquímico de produção de metano.

Tabela 7- Massas adicionadas aos meios reacionais

Ensaio	Inóculo (g)	Substrato (g)	Sólidos Totais (g)		Sólidos Voláteis (g)	
			Inóculo	Amostra	Inóculo	Amostra
Inóculo	396,09	NA	14,72	NA	9,30	NA
Celulose	399,31	2,03	14,85	1,93	9,38	1,93
Biomassa de <i>Spirulina</i>	397,49	3,85	14,78	3,56	9,34	3,35
Resíduo da sacarificação	386,57	14,96	14,38	3,40	9,08	2,79
Resíduo da fermentação	383,57	18,85	14,25	2,09	9,00	1,42

NA= não adicionado

Foram testados como substrato os resíduos provenientes após sacarificação dos polissacarídeos microalgais, os resíduos oriundos após fermentação dos monômeros de glicose e a biomassa íntegra da microalga *Spirulina*. Visando avaliar a atividade metanogênica do inóculo anaeróbio foi realizado controle, visando avaliar a produção de biometano do inóculo, mais ensaio controle positivo, aplicando como substrato celulose microcristalina de alta pureza (Sigma-Aldrich). Além dos ensaios contendo os substratos de interesse ao estudo, também foi avaliada a produção cumulativa de biogás em reatores somente com inóculo, para fins de descontar a contribuição basal gerada pelo inóculo anaeróbio em todos os demais bioreatores.

O inóculo utilizado é proveniente de reator anaeróbio mantido em condições mesofílicas, no LEB da Embrapa, portanto, tratando-se de inoculante previamente aclimatado e enriquecido, conforme padronização e validação descrita por Steinmetz et al. (2016). Este é constituído de partes iguais de inóculos iniciadores: dejetos bovinos frescos, lodo anaeróbio granular de UASB de uma empresa de gelatina, lodo anaeróbio de reator UASB alimentado com dejetos de suínos.

O inóculo foi alimentado com uma mistura de ração para suínos (75% m/m), grama seca e moída (15% m/m), leite em pó (5% m/m) e óleo vegetal (5% m/m) a uma velocidade de carga de $0,3 \text{ g VS L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Estas diversas fontes de substrato no inóculo é utilizada visando um aumento de diversidade microbiana e por consequência uma maior capacidade metabólica (STEINMETZ, 2016). O inóculo foi mantido sob condições anaeróbias a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação intermitente (60 rpm, durante 15 min a cada hora).

Os testes foram finalizados quando a produção diária de metano foi igual ou inferior a 1% do montante já produzido e os volumes registrados foram normalizados em condições normais à temperatura de 273 K e pressão de 1013 hPa. VDI 4630 (2006).

A geração de energia proveniente do metano produzido, foi calculada pela entalpia deste combustível, onde foi relacionado o potencial energético em kJ/mol.

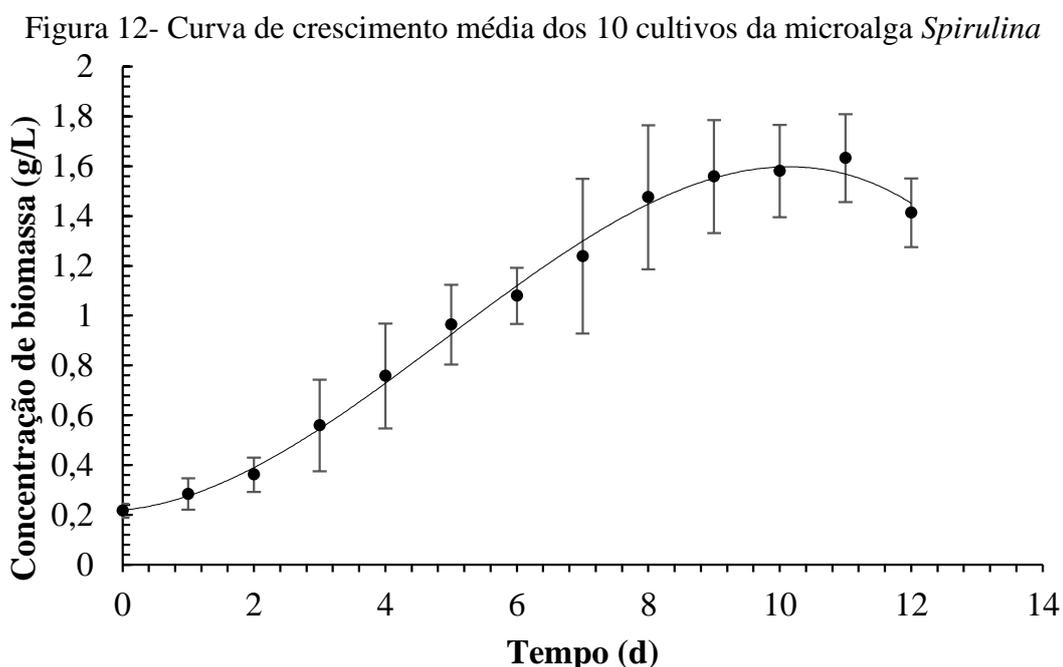
3.8 Análise Estatística

As diferenças entre as médias dos ensaios foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) no nível de 95% de confiança seguida pelo Teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de biomassa de *Spirulina*

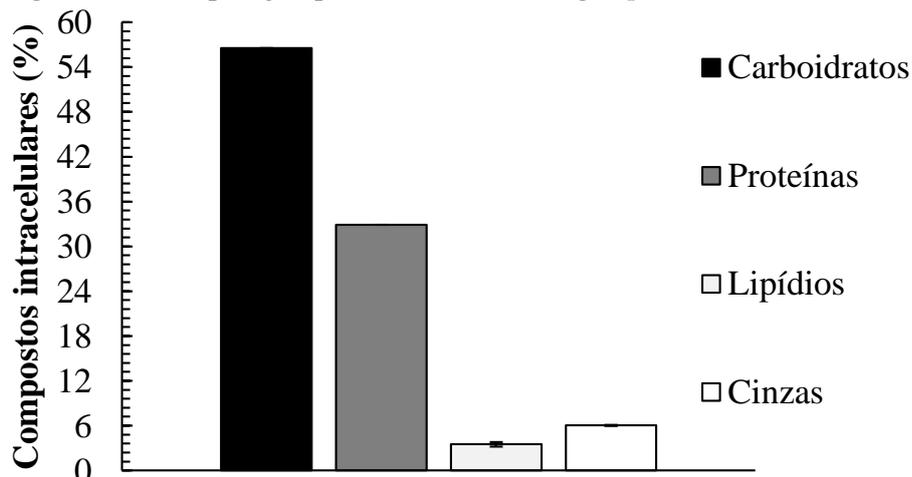
Através das determinações diárias de concentração celular, foi possível monitorar o crescimento da microalga. Foram realizados um total de 40 cultivos em mini tanques de 10 L. A média de tempo de cultivo foi de 12 dias até a fase de declínio do crescimento. A Figura 12 apresenta a curva de crescimento média de todos os cultivos realizados, com seus respectivos desvios-padrão.



Os cultivos foram encerrados na fase de declínio, pois nesta fase há maior acúmulo de carboidratos intracelulares, composto de maior interesse para a produção de bioetanol. Segundo Magro et al. (2017), a colheita realizada na fase de declínio do crescimento da microalga aumenta os teores de carboidratos devido às restrições de nutrientes nesta fase de cultivo.

Dois fatores são citados como fundamentais na alteração dos teores de carboidratos intracelulares. De acordo com Dismukes et al. (2008) a fase da colheita e a velocidade de agitação, são capazes de alterar e inverter as concentrações de proteínas à carboidratos. A Figura 13 apresenta os resultados da caracterização físico-química dos compostos intracelulares da *Spirulina* LEB 52.

Figura 13- Composição proximal da microalga *Spirulina* em base seca

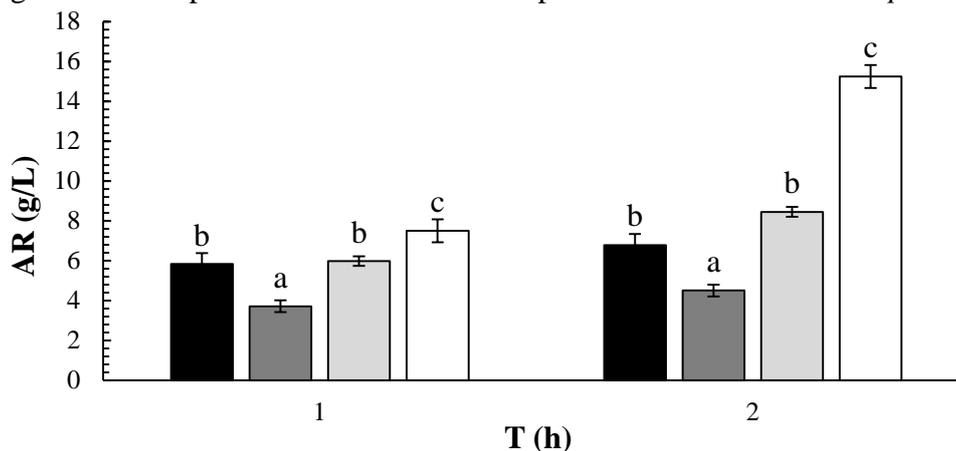


Analisando as concentrações dos compostos intracelulares verifica-se que a biomassa obtida apresenta um acréscimo de carboidratos e uma redução no teor de proteínas em comparação com biomassas obtidas de cultivos realizados em meios repletos de nutrientes, nos quais a *Spirulina* apresenta altos teores de proteínas, em torno de 74%, carboidratos na faixa de 17%, 7% de cinzas e baixos teores de lipídios (de 3% a 10 %) (CHAGAS et al., 2016, VONSHAK, 2002). Em relação aos teores de lipídios, a *Spirulina* tipicamente apresenta valores abaixo de 10%.

Markou et al. (2012) relata que em fases de declínio a microalga é induzida a produzir compostos de reserva nutricional, acumulando carboidratos, justificando assim a redução do valor de proteínas.

4.2 Ruptura da parede celular da biomassa de *Spirulina*

Os ensaios de ruptura celular foram desenvolvidos utilizando diferentes métodos físicos. Após realizada a ruptura celular, uma sacarificação foi realizada em condições iguais em todos os ensaios, para avaliar apenas a variável método de ruptura celular. A Figura 14 apresenta os resultados de concentração de AR formados após sacarificação realizada após o uso dos diferentes métodos de rompimento celular da microalga.

Figura 14- Comparativo dos métodos de ruptura celular da biomassa *Spirulina*

■ Sonda Ultrassônica ■ Gelatinização □ Autoclave □ Congelamento/Descongelação

Todos os ensaios passaram pelo mesmo processo de sacarificação enzimática, sendo adicionado 1 mL (1% v/v) de cada enzima, diluídas em água destilada, na proporção de 1:200. Foram retiradas amostras para determinação de AR (g/L) após 1 e 2 h de reação em mesa agitadora a 50 °C e 150 rpm. * Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si num nível de 95% de confiança (média±dp) pelo teste de Tukey

Analisando a Figura 14 é possível verificar que os pré-tratamentos testados diferiram entre si, apresentando valores diferentes de AR após a hidrólise enzimática. Nota-se que os ensaios variam suas concentrações de AR após 1 h e 2 h da mesma forma, sendo que o melhor pré-tratamento em 1 h foi o melhor também após 2 h de sacarificação.

Os ensaios apresentaram diferença estatística entre si, sendo que o pré-tratamento congelamento e descongelamento foi o melhor ($p < 0,05$), que apresentou maior valor de AR após a sacarificação, evidenciando assim que com este método foi alcançada melhor eficiência de ruptura celular.

Os ensaios com sonda ultrassônica e tratamento térmico não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,97$). Já a gelatinização foi o que apresentou a menor concentração de AR, fato este que comprova que o uso de apenas elevada temperatura não é capaz de romper totalmente a parede celular da microalga. Na gelatinização, não se faz uso de elevada pressão, ondas ultrassônicas ou expansão de áreas superficiais formadas pelo congelamento da água, além disso, há baixa concentração de produtos solubilizados (SINGH et al., 2016).

O tratamento congelamento/descongelamento é relatado na literatura como um método de ruptura celular eficiente, pois com a formação de cristais de gelo ocorre a ruptura celular, além disso, a expansão da água, aumentando assim as áreas superficiais e os volumes dos poros da biomassa, realizando assim o rompimento celular (CHANG et al., 2011). No decorrer do processo de congelamento e descongelamento a água presente na célula forma cristais de gelo, ocasionando a ruptura celular (TUANKRIANGKRAI; BENJAKUL, 2010).

Smichi et al. (2016) realizaram estudo com o objetivo de realizar a ruptura em *Juncus maritimus* para a produção de bioetanol, comparando os resultados entre dois pré-tratamentos: congelamento/descongelamento e adição de solução 1% de ácido sulfúrico. Após realizada a ruptura celular, um consórcio de enzimas foi utilizado para realizar a hidrólise dos carboidratos liberados. O pré-tratamento congelamento/descongelamento apresentou valores superiores de AR.

Diante do exposto, foi possível observar que o pré-tratamento é necessário para liberar os carboidratos armazenados nas células da microalga. Uma vantagem é que a parede celular da microalga *Spirulina* é composta por peptídeoglicano, não havendo a presença de hemicelulose e lignina, o que favorece a ruptura da parede celular (JOHN et al., 2011).

4.3 Caracterização de enzimas

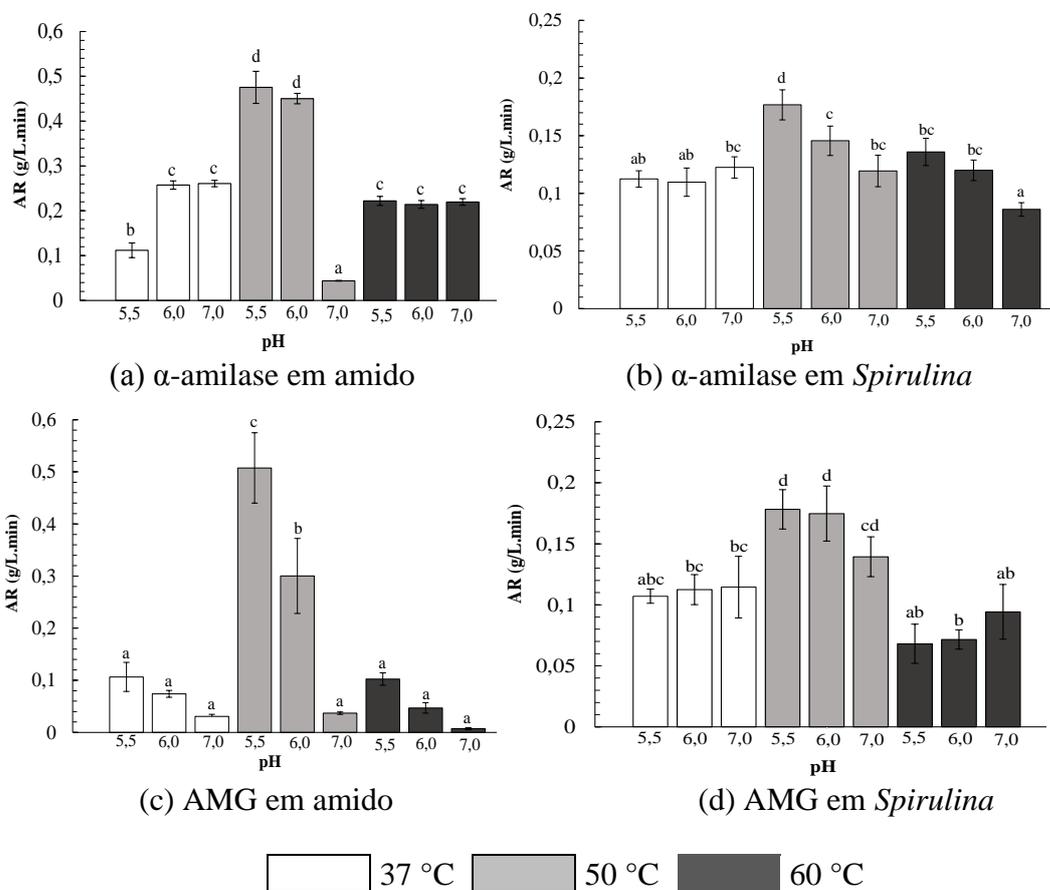
4.3.1 Avaliação de pH e temperatura ótimos em amido e em carboidratos microalgais

As hidrólises enzimáticas do amido (1% m/v) e da solução *Spirulina* (10% m/v) foram afetadas pelos pHs e temperatura utilizados, conforme pode ser verificado através da Figura 15. Analisando de forma conjunta, os melhores resultados foram obtidos em temperaturas de 50 °C e pHs 5,5 e 6,0, respectivamente, para os dois substratos. As maiores concentrações de açúcares redutores liberadas utilizando amido como substrato (Figura 15a e 14b) foram obtidas nos ensaios (4 e 5), temperatura de 50° C e pH 5,5 para ambas enzimas ($p < 0,05$). Nos ensaios com temperatura de 37 °C e 60 °C e nos três pH testados, os valores de formação de AR são inferiores, mostrando que nestas faixas as enzimas α -amilase e AMG não realizam a hidrólise com a mesma eficiência.

Nos ensaios que utilizaram a biomassa de *Spirulina* como substrato foram obtidos os resultados de liberação de açúcares redutores apresentados na Figura 15 (b) e (d), inferiores aos obtidos quando utilizado amido como substrato. Para a enzimas α -amilase (Figura 15 b) temperatura 50 °C e pH 5,5 apresentou o maior valor de velocidade de formação AR e se diferiu estatisticamente dos demais ensaios, mostrando assim a faixa ótima de atuação da α -amilase para hidrólise dos polissacarídeos da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.

Já para a enzima amiloglicosidase (Figura 15 d), dois ensaios apresentaram maiores valores de AR, temperatura 50 °C pH 5,5 e pH 6,0 respectivamente, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Para as duas enzimas, temperaturas de 37 °C e 60 °C e nos três níveis de pH testados, resultaram em concentrações inferiores AR.

Figura 15- Açúcares redutores liberados após ação das enzimas α -amilase e AMG na hidrólise da solução de amido (a) e (c) e nos polissacarídeos de *Spirulina platensis* LEB 52(b) e (d)



Em cada figura, as médias seguidas por minúsculas iguais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em um intervalo de confiança de 95% (resultados apresentados na média \pm desvio padrão). Diluições das enzimas em amido: 1: 2000. Diluições de enzimas para a biomassa de *Spirulina* 1: 200.

Analisando-se os resultados das duas enzimas, agindo com os dois tipos de substratos, verifica-se que a existência de uma melhor faixa de atuação comum entre eles, sendo esta, nas condições de temperatura a 50 °C e pH 5,5. Este fato é importante, pois em processos de hidrólise, as enzimas poderão ser adicionadas juntas ao sistema, diminuindo etapas de ajustes de pH e temperaturas durante os processos de sacarificação. Sendo assim, buscando a otimização dos ensaios futuros de sacarificação e partir dos resultados de AR, definiu-se que para as duas enzimas as condições ótimas são temperatura de 50 °C e pH 5,5.

A diferença no rendimento de produção de AR após a hidrólise enzimática com variações nas faixas de temperatura está associada à degradação ou inativação das enzimas em temperaturas mais baixas ou mais elevadas (PANCHÁ et al., 2010).

Gomes et al. (2014) realizou ensaios de hidrólise de amido com as mesmas enzimas utilizadas neste trabalho. As condições de temperatura e pH utilizadas foram 37 °C e 7,1,

faixa que segundo o autor foram sugeridas pelo fabricante das enzimas, não realizando ensaios que variavam as condições de pH e temperatura.

Vaithanomsat et al. (2013) realizaram uma sacarificação do amido de mandioca, com a enzima Liquozyme, tendo com faixas de melhor atuação a temperatura de 60 °C e pH 6,0. Já Presečki (2009) realizou hidrólise de amido com a enzima Liquozyme e obteve maiores concentrações de glicose em faixas de pH 5,5 e temperatura a 65 °C. Faixas um pouco superiores às verificadas neste trabalho, devido ao fato que o substrato é oriundo de matérias-primas diferentes.

Em estudo de sacarificação da microalga *Dunaliella tertiolecta* para a obtenção de bioetanol, realizado por Lee et al. (2013), foi utilizada a enzima amiloglicosidase AMG 300 L para realização da hidrólise dos polissacarídeos. A sacarificação enzimática foi testada em três níveis de temperatura e pH (35 °C, 45 °C e 55 °C e 3,5; 4,5; 5,5, respectivamente). As melhores concentrações de AR foram obtidas nas faixas de temperatura 55 °C e pH 5,5, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Pancha et al. (2016) realizaram sacarificações enzimáticas de microalgas em diferentes níveis de temperaturas e pH e observou que temperaturas abaixo de 30 °C e acima de 55 °C, bem como pH abaixo de 3,5 e acima de 6,5 resultavam em eficiências de hidrólise mais baixas.

4.3.2 Resultados das atividades amilolíticas e específicas das enzimas livres e imobilizadas

A Tabela 8 apresenta os resultados de atividades amilolíticas em amido, concentração de proteína e atividade específica das enzimas livres α -amilase e amiloglicosidase. Verificou-se que a enzima α -amilase apresenta uma atividade específica maior que AMG, devido a diferença das quantidades de proteínas na composição dos extratos enzimáticos.

Outro fator que corrobora para que os valores de AE sejam maiores para a α -amilase comparados com os da AMG, é que a α -amilase hidrolisa simultaneamente as reações α -1,4, não atuando sobre reações α -1,6. Sua ação se caracteriza por ser rápida, diminuindo a viscosidade do meio. A ação da α -amilase ocorre em duas etapas: na primeira ocorre a liberação muito rápida dos grupos redutores, transformações de amido em dextrinas. Na segunda fase é a sacarificação que ocorre de maneira mais lenta, necessitando assim da inserção de outro biocatalisador (REGULY, 1996).

Ainda, segundo Reguly (1996), a amiloglicosidase, atua sobre reações α -1,4 e α -1,6, porém de forma mais lenta, atuando em substratos que não passaram pela ação da α -amilase.

Atuando em substratos pré-hidrolisados pela α -amilase, esta realiza a transformação das dextrinas em glicose de forma mais rápida e altas eficiências.

Foram testadas as atividades das enzimas atuando em conjunto, pois durante os processos de sacarificação enzimática estes biocatalisadores atuarão de maneira simultânea.

Tabela 8- Resultados de atividades amilolíticas em solução de amido com enzimas livre.

Enzima	AA (U/mL enzima)*	Proteína (mg proteína/mL enzima)*	AE (U/mg proteína)*
α -amilase	0,97±0,003	9,85±0,01	0,10±0,003
AMG	5,90±0,18	165,97±0,04	0,03 ±0,002
α -amilase + AMG	4,92±0,12	175,82±0,05	0,02±0,007

AA: Atividade amilolítica; AE: Atividade específica. U: μ mol AR/min.mL. *Resultados de média±desvio padrão.

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados de atividades amilolíticas em amido, concentração de proteína e atividade específica das enzimas α -amilase e amiloglicosidase imobilizadas.

Tabela 9- Resultados de atividades amilolíticas em solução de amido com enzimas imobilizadas

α-amilase				
Vol. de enzima (mL)	Peso suporte (g)	AA (U/mL enzima)*	Proteína (mg proteína/mL enzima)*	AE (U/mg proteína)*
0,5	10,34	173,07±1,14	9,85±0,0001	17,57±0,11
1,0	10,04	214,06±1,04	9,85±0,0001	21,73±0,10
1,5	10,94	164,27±1,06	9,85±0,0001	16,67±0,10
Amiloglicosidase				
0,5	7,64	484,12±1,38	165,96±0,0004	2,91±0,008
1,0	9,69	372,57±0,94	165,96±0,0004	2,24±0,005
1,5	9,42	264,80±1,21	165,96±0,0004	1,59±0,007
α-amilase + Amiloglicosidase				
0,5+0,5	9,43	359,57±3,66	175,82±0,0005	2,46±0,02
1,0+1,0	10,65	226,20±3,21	175,82±0,0005	1,28±0,01
1,5+1,5	10,97	161,69±1,02	175,82±0,0005	0,91±0,0001

AA: Atividade amilolítica; AE: Atividade específica. U: μ mol AR/min.mL. *Resultados de média±desvio padrão.

As atividades enzimáticas da α -amilase livre em solução de amido foi de 0,10±0,003 (U/mg_{proteína}), sendo a atividade da mesma enzima imobilizada 200 vezes superior, atingindo 21,73±0,10 (U/mg_{proteína}). Comparando os valores de AE com a enzima AMG livre e imobilizada, houve um aumento dos resultados de atividade enzimática AE em até de 97 vezes, obtendo-se valores na faixa de 2,91±0,08 (U/mg_{proteína}). Para as duas enzimas juntas, na condição imobilizada, os resultados de AR também foram superiores se comparados a

condição livre, variando de $0,02 \pm 0,007$ para $2,46 \pm 0,02$ U/mg_{proteína}, representando um aumento de mais 100 vezes quando testadas na condição imobilizada.

Comparando-se os resultados de atividades específicas de enzimas livres e imobilizadas para as duas enzimas testadas, houve um aumento dos resultados de AE, fato justificável pela literatura que em condições de imobilização, o material utilizado como suporte para o biocatalisador atua como um agente protetivo para a enzima. Desta forma, protegendo-as contra inibições enzimáticas oriundas de mudanças de faixas de pH e temperaturas (RODRIGUES et al., 2017).

A Tabela 10 apresenta os resultados de atividades amilolíticas em solução de *Spirulina* (10% v/v) concentração de proteína e atividade específica das enzimas livres sem diluição α -amilase e amiloglicosidase.

Tabela 10- Resultados de atividades amilolíticas em solução de *Spirulina* com enzimas livre

Enzima	AA (U/mL _{enzima})*	Proteína (mg _{proteína} /mL _{enzima})*	AE (U/mg _{proteína})*
α -amilase	$3,27 \pm 0,04$	$9,85 \pm 0,0001$	$0,33 \pm 0,004$
AMG	$16,01 \pm 0,15$	$165,96 \pm 0,0004$	$0,09 \pm 0,0009$
α -amilase + AMG	$10,47 \pm 0,19$	$175,82 \pm 0,0005$	$0,05 \pm 0,001$

AA: Atividade amilolítica; AE: Atividade específica. U: μ mol AR/min.mL *Resultados de média \pm desvio padrão.

A partir dos dados da Tabela 10 é possível observar que os valores de AE tendo como substrato uma solução de *Spirulina*, os valores variam, sendo que novamente a enzima α -amilase apresentou um valor maior, relacionado ao fato em que a α -amilase possui um valor menor de proteína em sua estrutura.

A Tabela 11 apresenta os resultados de atividades amilolíticas em *Spirulina*, concentração de proteína e atividade específica das enzimas imobilizadas α -amilase e amiloglicosidase.

Os valores AE para enzimas imobilizadas foram superiores, se comparados aos resultados AR utilizando os biocatalisadores livres, devido as interações e proteções que o suporte proporciona com a enzima. Analisando cada enzima separadamente, em condição livre para a α -amilase o valor de AE foi de $0,32 \pm 0,004$ U/mg_{proteína}, já utilizando o biocatalisador imobilizado em três volumes diferentes, houve um aumento de AE em até 42 vezes, apresentando valores de AE na faixa de $13,63 \pm 0,14$ U/mg_{proteína}.

Tabela 11- Resultados de atividades amilolíticas em solução de *Spirulina* com enzimas imobilizadas

α-amilase				
Vol. de enzima (mL)	Peso suporte (g)	AA (U/mL enzima)*	Proteína (mg proteína/mL enzima)*	AE (U/mg proteína)*
0,5	10,34	134,30±1,44	9,85±0,0001	13,63±0,14
1,0	10,04	82,20±0,71	9,85±0,0001	8,34±0,07
1,5	10,94	67,82±1,57	9,85±0,0001	6,88±0,16
Amiloglicosidase				
0,5	7,64	239,01±3,43	165,96±0,0004	1,44±0,02
1,0	9,69	281,57±3,49	165,96±0,0004	1,70±0,01
1,5	9,42	272,41±2,20	165,96±0,0004	1,64±0,01
α-amilase + Amiloglicosidase				
0,5+0,5	9,43	142,32±0,72	175,82±0,0005	0,81±0,04
1,0+1,0	10,65	160,79±0,91	175,82±0,0005	0,91±0,02
1,5+1,5	10,97	156,68±0,84	175,82±0,0005	0,89±0,01

AA: Atividade amilolítica; AE: Atividade específica. U: μ mol AR/min.mL *Resultados de média±desvio padrão.

A enzima AMG livre, apresentou valores de $0,09\pm 0,0009$ U/mg_{proteína}), quando testadas a AE com enzima imobilizada os valores aumentaram em até 19 vezes, chegando a $1,70 \pm 0,1$ (U/mg_{proteína}).

Comparando-se os valores AE obtidos com os biocatalisadores em ação conjunta em condição livre ($0,05\pm 0,001$ (U/mg_{proteína}) com estas mesmas enzimas, porém em condição imobilizadas, estas apresentaram valores superiores chegando a $0,91 \pm 0,02$ U/mg_{proteína} aumentando em até 18 vezes suas atividades específicas.

O aumento dos valores de AE obtidos após reações com os biocatalisadores imobilizados são relatos na literatura, devido aos benefícios de utilizar técnicas de imobilização. Tais enzimas imobilizadas possuem suas atividades catalíticas retidas, reagindo assim somente quando em contato com os substratos, minimizando perdas por inibições (SOARES, 2012).

4.4 Sacarificação da biomassa algal

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de açúcares redutores obtidos ao longo do processo de sacarificação enzimática utilizando 0,8 mL α -amilase e 0,8 mL amiloglicosidase (0,8% v/v). A concentração de biomassa foi de 20% (m/v) e concentração de carboidratos intracelulares da microalga de 58%. Caso a hidrólise ocorresse na eficiência de 100% resultaria na quantificação de 104,4 g/L de AR. A solução de *Spirulina* passou pelo prévio processo de ruptura celular congelamento/descongelamento.

As enzimas foram adicionadas de forma simultânea, e o ensaio teve duração de 10 h. Segundo Reguly (1996), as reações de hidrólise da α -amilase são as transformações iniciais do amido em dextrinas, porém passado estes processos, a sacarificação só pela enzima α -amilase, é muito lenta. Desta forma se insere a enzima amiloglicosidase que atua diretamente nas dextrinas e realiza a transformação em glicose. Tais biocatalisadores utilizados de forma simultânea aumentam as velocidades de reações e conseqüentemente suas eficiências.

Tabela 12 - Resultados de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática dos polissacarídeos da microalga *Spirulina*

Tempo (h)	Açúcar redutor (g/L)*
0	08,71±1,10 ^a
2	50,53±0,46 ^b
4	55,05± 1,30 ^c
6	60,22±0,13 ^d
8	57,98±1,88 ^{cd}
10	69,48±0,08 ^f
12	77,14±0,89 ^g

* Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si num nível de 95% de confiança (média±dp) pelo teste de Tukey. Sacarificação enzimática realizada com a adição simultânea das duas enzimas, sendo utilizadas concentrações de 0,8% (v/v) de cada biocatalisador livre.

Se analisarmos a Tabela 12, em duas horas de ação enzimática sobre os polissacarídeos da microalga, há um grande aumento na quantidade de AR liberado e, analisando os demais tempos análise, neste tempo (2 h) já houve elevada transformação dos polissacarídeos microalgais em glicoses. Xin et al. (2013) relatam que o aumento dos índices de sacarificação em fases iniciais, está ligado a maior disponibilidade dos sítios ativos das enzimas perante ao substrato, aumentando assim as velocidades de catálise.

Na Tabela 12, o maior valor de AR obtido foi no tempo de 12 h (77,14 g/L de AR), resultando uma eficiência de sacarificação de 73,88%. Lee et al. (2015) realizou uma sacarificação enzimática de biomassa microalgal com um consórcio de enzimas e adicionaram o biocatalisador amiloglicosidase AMG 300 L, melhorando a eficiência do processo, chegando a 80,9%.

Buscando melhorar as eficiências de hidrólise, foi realizada uma sacarificação aumentando o volume de enzima adicionado. A Tabela 13 exhibe os resultados de açúcares redutores gerados ao longo do processo de sacarificação enzimática utilizando 1,5 mL α -amilase + 1,5 mL amiloglicosidase (1,5% v/v).

A biomassa utilizada neste ensaio foi caracterizada quanto ao valor de carboidratos, e apresentou 55,29%, resultando, se hidrolisado 100%, um valor de 99,52 g/L de AR.

Tabela 13-Resultados de açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática

Tempo (h)	Açúcar redutor (g.L ⁻¹)*
0	6,22±0,25 ^a
6	84,87±1,48 ^c
12	81,38± 0,07 ^b
24	91,71±0,001 ^d

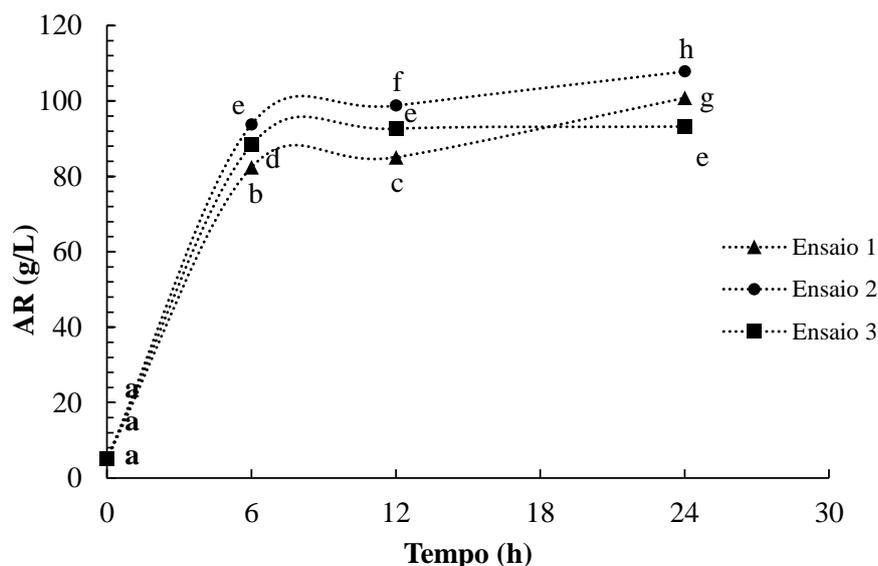
* Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si num nível de 95% de confiança (média±dp). Sacarificação enzimática realizada com a adição simultânea das duas enzimas, sendo utilizadas concentrações de 1,5% (v/v) de cada biocatalisador livre.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, com as variações dos tempos de reação, os valores de açúcares redutores foram aumentando, chegando a um valor máximo, após 24 h, de 91,71 g/L de AR, representando uma eficiência de 92,15% de transformação dos polissacarídeos em glicose.

Após 6 h de hidrólise, grande parte dos polissacarídeos foram hidrolisados, o que reafirma que em processos de sacarificação enzimática, onde é realizado um pré-tratamento na biomassa, as taxas de hidrólise são mais elevadas.

Com o objetivo de avaliar as concentrações de enzimas utilizadas no procedimento de sacarificação, foi realizada uma nova reação, também numa concentração de biomassa 20% (m/v), com 60% de carboidratos, que se hidrolisada em sua totalidade resultaria em 108 g/L de AR. Foram variadas as concentrações de enzimas adicionadas em 0,5; 1,0; e 1,5% (v/v), resultados estes apresentados na Figura 16.

Figura 16- Resultados de açúcares redutores formados após a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de enzima livre



Ensaio 1: (0,5 mL α -amilase + 0,5 mL amiloglicosidase); Ensaio 2: (1,0 mL α -amilase + 1,0 mL amiloglicosidase); Ensaio3: (1,5 mL α -amilase + 1,5 mL amiloglicosidase). * Em cada linha, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si num nível de 95% de confiança (média±dp).

Observando os resultados da Figura 16 nos três ensaios realizados, as concentrações de AR aumentaram com o tempo de reação. O ensaio 3 que foi realizado com as maiores concentrações adicionadas, foi o que apresentou um valor inferior aos dos outros ensaios (93,23 AR g/L), o que mostra que a adição de maior volume de enzima não apresentou maiores índices de liberação de AR, o que representa um superdimensionamento nas dosagens das enzimas. Dosagens enzimáticas elevadas podem resultar em inibições irreversíveis na ação amilolítica, retardando assim os processos de hidrólise e consequentemente prejudicando as eficiências do processo (HARUM; DANQUAH, 2011).

O ensaio 1 apresentou 92,59% de eficiência de hidrólise. O ensaio que apresentou maior concentração de AR foi o ensaio 2 que era constituído na condição de 1% de enzima, resultando em 99,46% de eficiência de hidrólise, sendo assim considerando os desvios padrões, nesta concentração de enzima foi possível realizar a sacarificação completa dos polissacarídeos da biomassa microalgal em 24 h de reação.

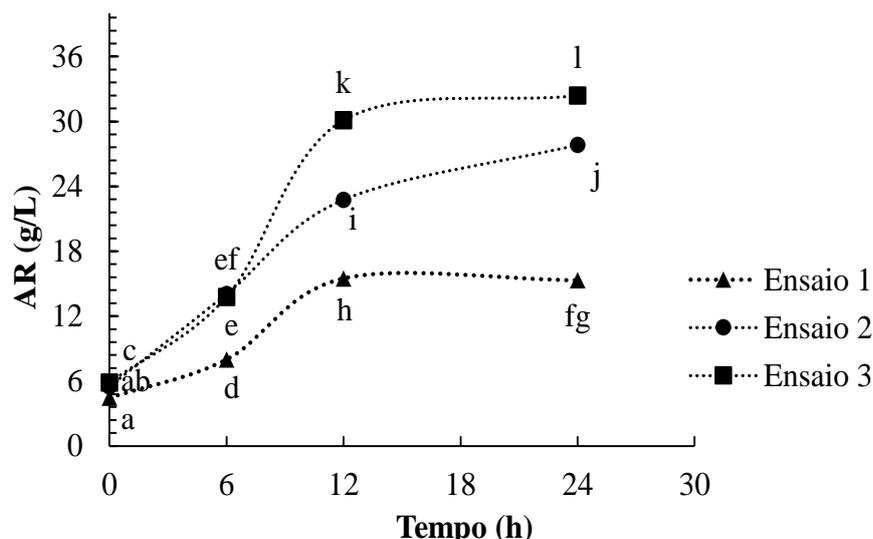
No presente estudo a biomassa microalgal passou por processos de ruptura celular com o objetivo de liberar os compostos intracelular e poder alcançar elevadas eficiências de hidrólise. Pancha et al. (2016) afirmam que, para produção de bioetanol por matérias-primas microalgais é um fundamental um pré-tratamento na biomassa para obtenção de altas eficiências de hidrólise.

Baseados nas três concentrações testadas acima, e partindo do suposto de que em maiores escalas seria necessário um grande volume de enzima, utilizou-se técnicas de imobilizações destes biocatalisadores. Segundo Antunes, (2015) as enzimas imobilizadas demonstram maior controle térmico, diminuição das inativações ou desnaturações, aumento das atividades enzimática e possibilidades de reuso em novos processos de sacarificação.

As enzimas foram imobilizadas nas mesmas concentrações testadas com biocatalisador livre. E, por atuarem em mesmas faixas de pH e temperatura, foram imobilizadas de duas formas, separadas e em conjunto. Desta forma, foram realizadas sacarificações nestas duas condições, utilizando 1% (m/v) do suporte. Utilizou-se uma concentração de biomassa 20% (m/v) que continha em sua composição 55,94% de carboidratos, podendo resultar 100,62 g/L de AR se hidrolisados em sua totalidade.

A Figura 17 apresenta os resultados de açúcares redutores resultantes do processo de sacarificação com os biocatalisadores imobilizados separadamente.

Figura 17- Açúcares redutores formados após hidrólise com enzimas imobilizadas separadamente



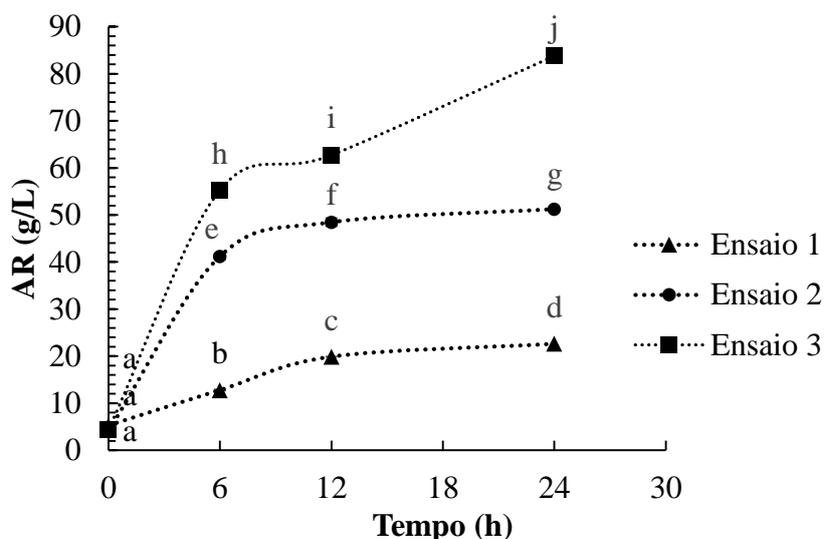
Ensaio 1: (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizada separadamente no volume de 0,5 mL); Ensaio 2: (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizada separadamente no volume de 1,0 mL); Ensaio 3: (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizada separadamente no volume de 1,5 mL). * Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança média \pm desvio padrão.

Avaliando os resultados da Figura 17 é possível observar que em todos os ensaios as eficiências de sacarificação não foram muito elevadas como as que utilizaram enzimas livres, visto que as quantidades de enzimas adicionadas eram em volumes inferiores. A quantidade utilizada de suporte com o imobilizado foi de 1% (m/v), o que representa um volume de enzima adicionada inferior aos testados com o biocatalisador livre. Os valores de AR aumentaram com o uso dos suportes contendo maiores volumes de enzimas imobilizadas, devido ao simples fato de haver mais sítios ativos em contato com o substrato.

Nota-se que as concentrações de AR não possuem um elevado aumento nos primeiros tempos de reação, como o ocorrido na sacarificação com enzimas livres. Isso se deve ao fato em que há uma menor quantidade de enzima no meio reacional e também por ser um sistema de imobilização, as taxas de velocidade de transformação são mais lentas em comparação ao uso de enzimas livres.

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos de açúcares redutores gerados ao longo do processo de sacarificação enzimática com enzimas imobilizadas em conjunto. Em todos os ensaios e os tempos testados, as concentrações de AR aumentaram, e que nos ensaios com os biocatalisadores imobilizados nas maiores concentrações foram observadas maiores transformações dos polissacarídeos. No ensaio 3 foi observado o maior valor de AR liberado (83,77 g/L) e se diferiu de todos os outros ensaios, por apresentar maior concentração dos biocatalisadores imobilizados.

Figura 18- Açúcares redutores formados após hidrólise com enzimas imobilizadas em conjunto



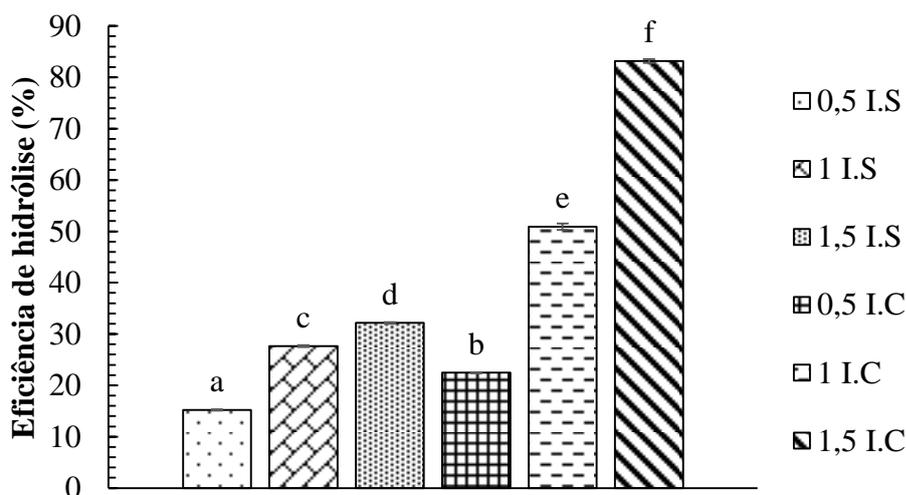
Ensaio 1: (1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 0,5 mL); Ensaio 2: (1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto 1,0 mL) Ensaio 3: (1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto 1,5 mL). * Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si num nível de 95% de confiança (média±dp).

Pode-se analisar que as taxas de velocidade de transformação nos primeiros tempos de reação ocorrem de maneira diferente entre os ensaios testados. Os ensaios com menores concentrações de biocatalisador apresentam menores concentrações de AR liberados. O ensaio 3 que continha uma concentração superior de enzima é o que apresenta uma maior liberação de AR em todos tempos, fato justificável devido ao maior número de sítios ativos disponíveis.

A Figura 19 apresenta um comparativo das eficiências de hidrólise das enzimas imobilizadas separadas e em conjunto, após 24 horas de reação. Os diferentes volumes de enzimas utilizadas na imobilização e a condição de imobilização, corroboraram para resultados inferiores e superiores de eficiência de hidrólise. Se analisarmos somente os ensaios que utilizaram os biocatalisadores imobilizados de forma separada, com a variação dos volumes de enzimas imobilizadas, houve um aumento das eficiências de hidrólise. Resultado plausível visto que, maiores concentrações de enzima no suporte imobilizado agem com melhor eficiência sobre o substrato.

Analisando os ensaios com as enzimas imobilizadas em conjunto, com o aumento das concentrações de biocatalisador no suporte, também houve um aumento dos índices de eficiência de transformação do substrato em AR liberados.

Figura 19- Comparativo de eficiências de hidrólise após 24 horas.



0,5 I.S (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizadas separadas na concentração 0,5 %); 1 I.S: (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizadas separadas na concentração 1,0 %); 1,5 I.S: (0,5 g de suporte de cada enzima imobilizadas separadas na concentração 1,5 %). 0,5 I.C: (1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 0,5 %); 1,0 I.C: (1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 1,0 %) 1,5 I.C:(1,0 g de suporte das enzimas imobilizadas em conjunto na concentração 1,5 %). * Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média±dp).

Se compararmos as eficiências entre as diferentes condições de imobilização, é possível verificar uma diferença significativa entre elas. Quando os biocatalisadores foram imobilizados de forma separada, um percentual de massa de suporte foi adicionado no meio reacional, e devido ao fato que como já mencionado neste estudo, as enzimas atuam de forma simultânea, desta forma, foram adicionados percentuais iguais de cada biocatalisador separadamente. Em contrapartida, quando os biocatalisadores foram imobilizados em conjunto, foi adicionado um percentual de massa de suporte de forma simultânea.

Nos ensaios com as enzimas imobilizados separadas foram obtidos resultados inferiores de eficiência, devido ao fato que o início da hidrólise ocorre com o biocatalisador α -amilase e depois com a amiloglicosidase, desta forma as reações não ocorrem na mesma velocidade e eficiência como ocorrem quando os biocatalisadores estão imobilizados juntos, na mesma fração de suporte.

Pode-se verificar que quando as duas enzimas estão imobilizadas no mesmo suporte o contato enzima/substrato é instantâneo, fato que não ocorre quando as enzimas estão imobilizadas em separado. A Tabela 14 apresenta um comparativo entre todas as sacarificações realizadas com as diferentes condições de enzimas testadas.

Tabela 14- Ensaios de sacarificação utilizando enzimas livres e imobilizadas, resultados de açúcares redutores (AR) liberados após 24 h de hidrólise. Eficiência de hidrólise (EH -%) e EHP - Eficiência de hidrólise com base na quantidade de enzima.

Ensaio	Volume de enzima livre ou massa de suporte contendo enzima imobilizada	V _{enzima} (% v/v)	CHO (%)	AR após 24 h de hidrólise (g/L)	EH (%)	EHP (%)
EL-0,5	0,5 mL α -amilase + 0,5 mL AMG	0,5+0,5	60,0 \pm 0,004	100,77 \pm 0,77	92,59	1,15
EL-1,0	1,0 mL α -amilase + 1,0 mL AMG	1,0 +1,0	60,0 \pm 0,004	107,77 \pm 0,41	99,83	0,61
EL-1,5	1,5 mL α -amilase + 1,5 mL AMG	1,5+1,5	60,0 \pm 0,004	93,23 \pm 0,54	86,32	0,35
EIS-0,5	0,5 g do suporte contendo a α -amilase + 0,5 g do suporte contendo a AMG. Com as enzimas imobilizadas separadas com a adição de 0,5 mL de enzima livre no suporte	0,056	55,94 \pm 0,03	15,3 \pm 0,10	15,21	3,10
EIS-1,0	0,5 g do suporte contendo a α -amilase + 0,5 g do suporte contendo a AMG. Com as enzimas imobilizadas separadas com a adição de 1,0 mL de enzima livre no suporte	0,10	55,94 \pm 0,03	27,82 \pm 0,19	27,62	3,16
EIS-1,5	0,5 g do suporte contendo a α -amilase + 0,5 g do suporte contendo a AMG. Com as enzimas imobilizadas separadas com a adição de 1,5 mL de enzima livre no suporte	0,147	55,94 \pm 0,03	32,38 \pm 0,139	32,15	2,51
EIC-0,5	1,0 g do suporte contendo α -amilase +AMG. Imobilização conjuntas das enzimas com a adição de 0,5 mL de cada enzima	0,106	55,94 \pm 0,03	22,64 \pm 0,095	22,48	2,42
EIC-1,0	1,0 g do suporte contendo α -amilase +AMG. Imobilização conjuntas das enzimas com a adição de 1,0 mL de cada enzima	0,187	55,94 \pm 0,03	51,25 \pm 0,626	50,89	3,11
EIC-1,5	1,0 g do suporte contendo α -amilase +AMG. Imobilização conjuntas das enzimas com a adição de 1,5 mL de cada enzima	0,273	55,94 \pm 0,03	83,77 \pm 0,371	83,19	3,50

EL: enzima livre. **EIS:** enzimas imobilizadas separadas. **EIC:** enzimas imobilizadas em conjunto. V_{enzima} (% v/v): volume de enzima adicionado na sacarificação em porcentagem, considerando enzima livre ou imobilizada. **CHO (%)**: porcentagens de carboidratos presentes na biomassa de *Spirulina*.

As eficiências de sacarificação demonstraram que com concentrações inferiores de enzima utilizadas em condições de imobilizações, resultaram em eficiências satisfatórias, se comparadas às eficiências com enzima livre. Em condições de biocatalisadores livres, as quantidades de enzimas são superiores se comparadas as condições das enzimas imobilizadas.

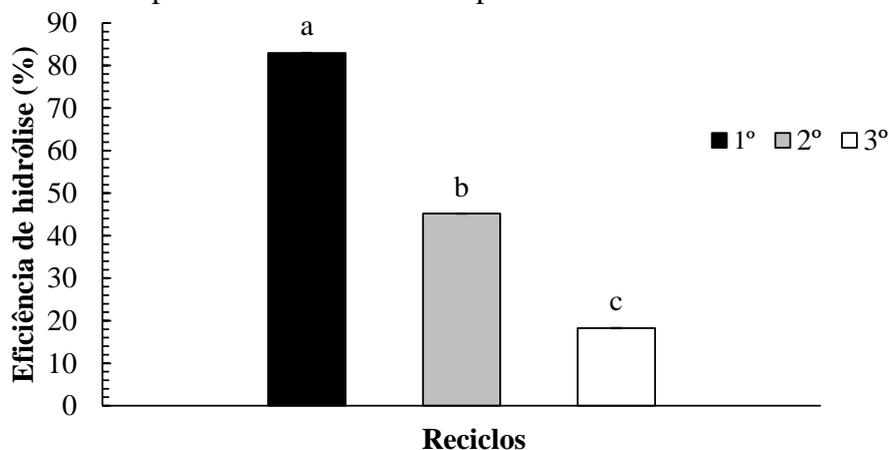
Melhores eficiências com enzimas imobilizadas são citadas devido, aos materiais utilizados como suportes, que protegem o biocatalisador a condições adversas de temperatura e pH, aumentando assim as atividades específicas dos mesmos (SINGHANIA et al., 2012).

Além das vantagens da imobilização citadas á cima, o fato das enzimas atuarem nas mesmas faixas ótimas de pH e temperatura, proporcionou a imobilização conjunta. O que ocasiona um contato enzima substrato mais rápido, resultando assim em boas eficiências de hidrólise em tempo menores de reação.

4.4.1 Reuso das enzimas imobilizadas e desprendimento da enzima do suporte

Os reusos foram realizados a partir da melhor condição de sacarificação, utilizando-se uma concentração de suporte com o imobilizado de (1%) (m/v). Foi utilizada a condição de enzimas imobilizadas em conjunto, sendo adicionados 1,5 mL de cada enzima. O processo de sacarificação foi mantido por 24 h com uma solução 10% de *Spirulina* (m/v) pré-tratada por processos de congelamento/descongelamento. A Figura 20 apresenta um comparativo de eficiências após os reusos.

Figura 20- Comparativo das eficiências após os reusos das enzimas imobilizadas.



* Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média±dp).

Avaliando os resultados apresentados na Figura 20, no primeiro reuso a eficiência de hidrólise foi superior se comparada as do segundo e terceiro. No 1º reuso foi obtido um resultado de 46,92 g/L de AR, o que representa uma eficiência de hidrólise de 82,95% num tempo reacional de 24 h. Transcorrido este tempo, o imobilizado foi retirado e separado da biomassa hidrolisada, e este imobilizado foi adicionado novamente em um sistema contendo apenas a microalga pré-tratada.

Passadas mais 24 h de reação, o imobilizado foi novamente separado e realizou-se a análise de AR, apresentando no segundo reciclo um valor de 25,56 g/L, o que representa uma eficiência de hidrólise de 45,19%. Foi realizado um 3º reciclo, que obteve liberações de AR muito inferiores, na ordem de 10,34 g/L de AR, apresentando uma baixa eficiência, cerca de 18,28%.

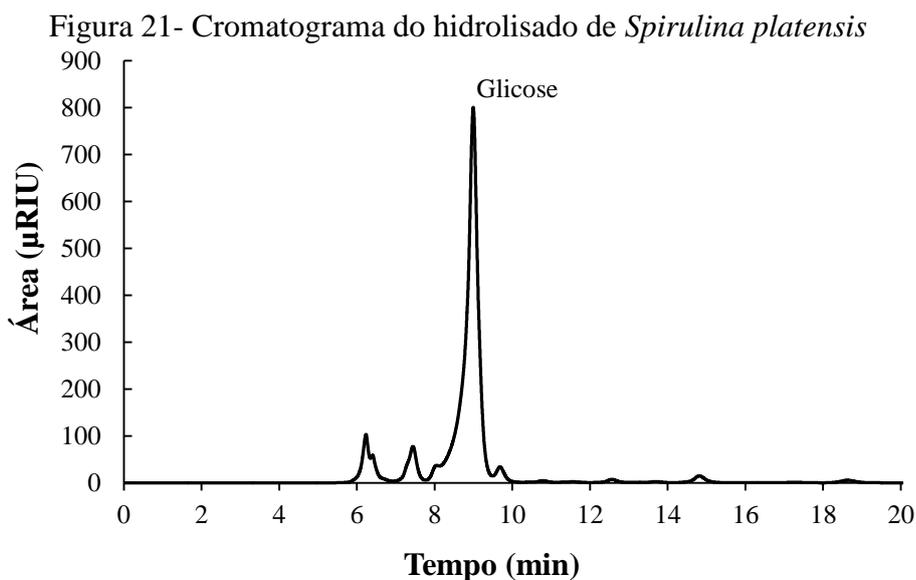
Nota-se que as concentrações de AR liberadas após a hidrólise do segundo reciclo, já houve a perda de 50% da capacidade de hidrólise, o indica que o imobilizado não apresentou um número alto de reciclos. Isto pode ser explicado pelo fato que, durante as 24 h de reação, a enzima imobilizada é desprendida do suporte, ocasionando assim uma lixiviação do biocatalisador para a fase líquida da reação, que no final é descartada.

Isto acarretou em uma perda da enzima, sendo assim o próximo reciclo já continha uma concentração menor da enzima no imobilizado, explicando desta forma a perda de eficiência enzimática já nos primeiros reciclos.

Os resultados obtidos de lixiviação demonstraram que a quantidade de proteínas liberadas do suporte foi de 43% do primeiro ao segundo ciclo (23,37 a 11,4 mg de proteína/g de suporte), um resultado muito próximo da perda de eficiência do primeiro para o segundo reciclo (45%), justificando os resultados obtidos anteriormente.

4.5 Caracterização dos monômeros

A partir do hidrolisado proveniente da hidrólise enzimática dos carboidratos da *Spirulina*, foi realizada uma cromatografia com o objetivo de identificar os monômeros de glicose (Figura 21).



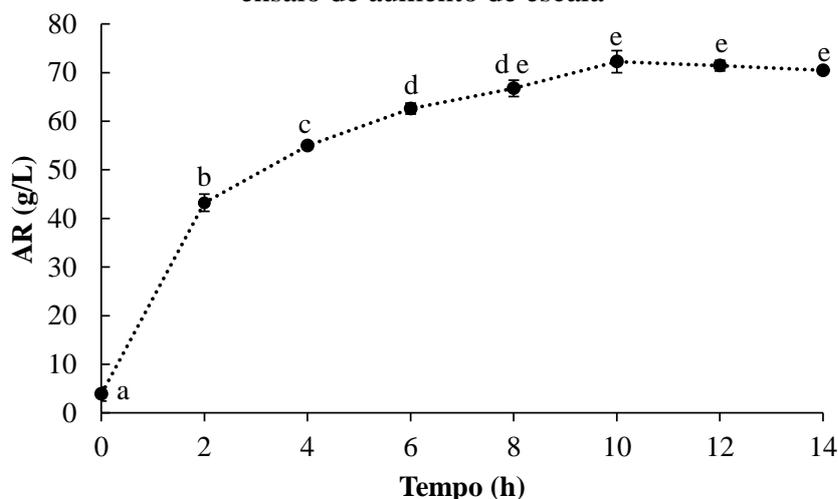
Observando a Figura 21 nota-se um pico maior entre o tempos 8 e 10 min de injeção, através dos tempos de detecção do padrão é possível comprovar que se trata do pico de glicose. A área total deste pico de glicose soma-se em mais de 82% da área total do cromatograma, o que indica que grande parte do hidrolisado era constituído por monômero de glicose.

4.6 Aumento de escala dos ensaios de sacarificação

A hidrólise enzimática dos polissacarídeos da microalga foi conduzida por 14 h e a concentração de açúcares redutores foi determinada ao longo do tempo. A Figura 22 apresenta a concentração de açúcares redutores ao longo de tempo durante o processo de hidrólise pelas enzimas α -amilase e amiloglicosidase, na qual verifica-se que após duas horas da ação conjunta das enzimas, o rendimento de hidrólise foi de aproximadamente 50%, tornando-se estável após 10 h de sacarificação, obtendo-se uma eficiência de conversão de amido em AR de aproximadamente 82% (70,45 g/L de AR).

É possível avaliar que as enzimas utilizadas neste estudo possuem elevada afinidade com o substrato, apresentando altas taxas de hidrólise em curtos períodos de tempo, podendo assim alcançar elevados rendimentos no processo de sacarificação e, por consequência, altos teores de açúcares redutores. Sendo este um dos fatores principais responsáveis por elevadas produções de bioetanol.

Figura 22- Perfil de liberação de açúcares redutores ao longo da hidrólise enzimática no ensaio de aumento de escala



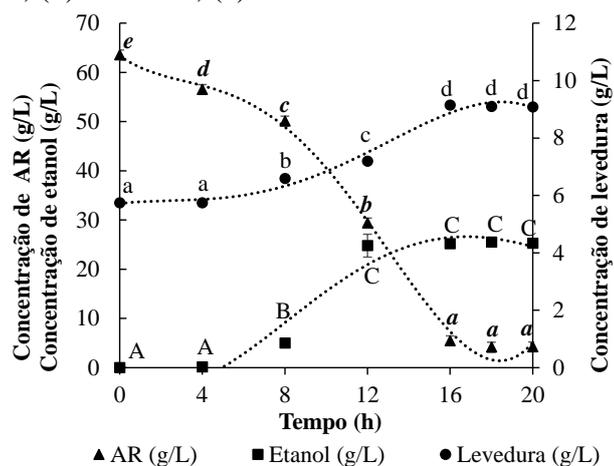
* Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média±dp).

Através da ação da α -amilase (Liquozyme® Supra 2.2X), o amido é transformado em dextrinas e oligossacarídeos devido a hidrólise das ligações α -1,4 e em seguida, as ligações α -1,4 e α -1,6 são hidrolisadas pela ação da enzima amiloglicosidase (AMG® 300L), realizando assim a transformação dos oligossacarídeos em monômeros de glicose de baixo peso molecular (SHOKRKAR; EBRAHIMI; ZAMANI, 2017).

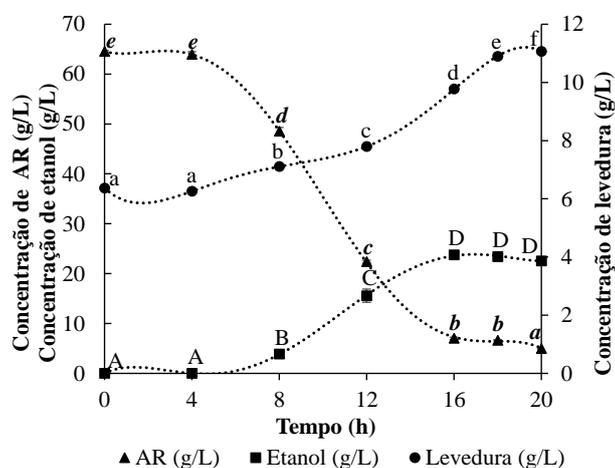
4.7 Produção de bioetanol

As fermentações foram realizadas por um período de 20 h, sendo que as concentrações de levedura, açúcares redutores e etanol obtidas ao longo do tempo estão apresentadas na Figura 23.

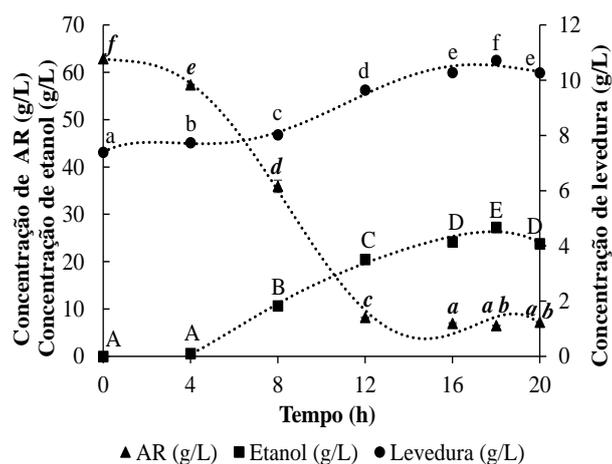
Figura 23- Concentrações (▲) Açúcar Redutor (g/L), (■) Etanol (g/L) e (●) Levedura (g/L) dos ensaios: (a) F.S.3%; (b) F.S.15%; (c) F.C.15%



(a) F.S.3%



(b) F.S.15%



(c) F.C.15%

F.S.3%- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e adição de 3% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.S.15%**- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.C.15%**- fermentação com adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. * Em cada linha, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média±dp)

Até 4 h de fermentação observa-se em todas as curvas (Figura 23) um tempo de adaptação do inóculo, apesar da adição de hidrolisado durante o preparo do inóculo. A concentração de etanol no tempo inicial de fermentação foi nula, indicando que não houve a produção de etanol pelo microrganismo durante o preparo de inóculo. Entre 4 e 16 h de fermentação, houve um decréscimo da concentração de açúcares redutores e, por consequência, aumento da concentração de levedura e de etanol em todos os cultivos.

Ao final do processo fermentativo, a concentração de células no ensaio F.S.15% (Figura 23 b) foi superior (11,06 g/L \pm 0,09) que no ensaio F.S.3% (9,07 g/L \pm 0,01) (Figura 23 a), indicando que apesar da adição de hidrolisado não ter contribuído para reduzir o tempo de adaptação celular, foi importante para o crescimento posterior do microrganismo.

A fim de realizar um comparativo entre as fermentações foram calculados os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), substrato em produto ($Y_{P/S}$), célula em produto ($Y_{P/X}$) e a eficiência de transformação do substrato em etanol, cujos resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15- Fatores de conversão e eficiências de transformação dos açúcares em bioetanol

Fatores de conversão	F.S.3%	F.S.15%	F.C.15%
$Y_{X/S}$ (g levedura/g AR)	0,07 \pm 0,0011 ^b	0,08 \pm 0,0017 ^c	0,05 \pm 0,0004 ^a
$Y_{P/S}$ (g etanol/g AR)	0,45 \pm 0,003 ^a	0,41 \pm 0,003 ^a	0,46 \pm 0,042 ^a
$Y_{P/X}$ (g etanol/g levedura)	7,61 \pm 0,11 ^b	4,96 \pm 0,05 ^a	8,77 \pm 0,15 ^c
η (%)	83,36 \pm 1,20 ^b	74,11 \pm 0,70 ^a	83,56 \pm 1,50 ^b

F.S.3%- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e adição de 3% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.S.15%**- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.C.15%**- fermentação com adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. Substrato em células ($Y_{X/S}$), substrato em produto ($Y_{P/S}$), célula em produto ($Y_{P/X}$) e a eficiência de transformação do substrato em etanol (η). * Em cada linha, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média \pm dp).

A conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) se deferiu estatisticamente ($p < 0,05$) em todos os ensaios. A F.S.15% apresentou o maior valor de conversão de substrato em células. Neste ensaio, foi adicionado maior volume de hidrolisado (15%) na preparação do inóculo, o que acarretou em maior crescimento da levedura. O maior crescimento da levedura neste ensaio foi, possivelmente causado pela maior adaptação do microrganismo no inóculo ao substrato que posteriormente foi adicionado no mosto da fermentação.

Porém, $Y_{X/S}$ do ensaio F.C.15% foi inferior ao da F.S.15%, sendo que nestes ensaios o volume de hidrolisado adicionado na preparação do inóculo foi o mesmo (15%). A diferença entre estas fermentações foi a suplementação de nutrientes na fermentação alcoólica. No ensaio F.S.15% as fontes de macro e micronutrientes disponíveis à levedura

eram apenas as já existentes na biomassa da microalga *Spirulina*. Portanto, a suplementação de nutrientes na fermentação alcoólica não acarretou em aumento do crescimento da levedura. Para o $Y_{P/X}$ em todos os testes os valores apresentaram diferença ($p < 0,05$), sendo que o maior valor foi verificado no ensaio F.C.15%. Neste ensaio, foi obtida a menor variação de concentração de levedura, ocasionando assim, o menor $Y_{S/X}$.

Além dos fatores de conversão foi calculada a eficiência de formação de bioetanol em cada ensaio. Os testes F.S.3% e o F.C.15% apresentaram eficiências estatisticamente iguais (83,36 % e 83,56 %) respectivamente.

Pancha et al (2016) investigou a produção de etanol a partir do hidrolisado da microalga *Scenedesmus sp.* CCNM 1077, pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6793. Os autores adicionaram ao hidrolisado, peptona (0,5%) e extrato de levedura (0,3%). Os resultados obtidos foram 0,4 g_{etanol}/g_{glicose}, o que representou 78% de eficiência de conversão, valores inferiores aos obtidos em nosso trabalho (cerca de 83%). Esta eficiência elevada foi obtida em ensaio sem adição de nutrientes ao mosto da fermentação, mostrando que a biomassa da microalga pode suprir as necessidades nutricionais da levedura, além de serem obtidas eficiências consideráveis de produção de bioetanol.

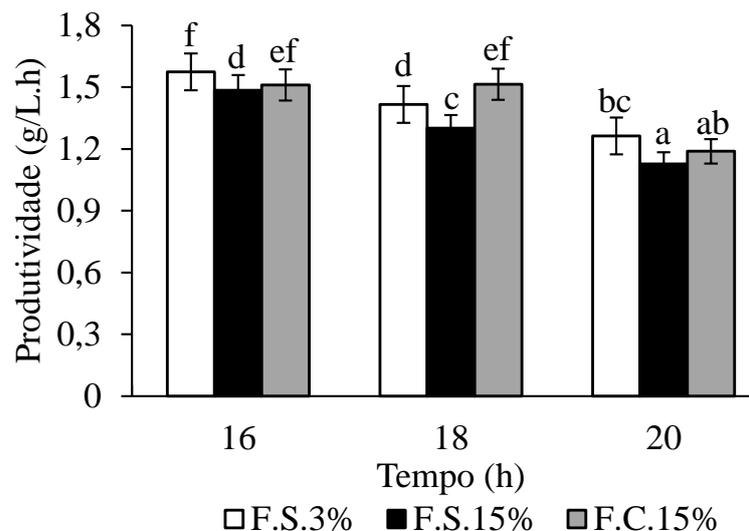
Lee et al (2013) realizou a produção de bioetanol com microalga *D. tertiolecta* LB999, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPH500 (ATCC 76626) obtendo 0,44 g etanol/ g glicose o que representou uma eficiência de 82%.

Lee et al (2015), produziu bioetanol através da microalga *Chlorella sp.* O KR-1 utilizando a levedura *S. cerevisiae* KCTC 7931 (ATCC 20626), e alcançou eficiências de 79,3%, para cada g de açúcar fermentável foram produzidos 0,4 g de etanol.

Nota-se que vários relatos na literatura de autores que utilizaram carboidratos microalgais hidrolisados para a produção de etanol apresentam taxas de eficiências de transformação bem semelhantes. O que demonstra o real potencial de substratos oriundo de microalgas para a obtenção de etanol.

Foram determinadas também as produtividades da produção de bioetanol nos tempos 16 h, 18 h e 20 h (Figura 24), com o objetivo de realizar um comparativo entre as fermentações e os tempos testados.

Figura 24- Produtividade de etanol dos diferentes ensaios de fermentação



F.S.3%- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e adição de 3% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.S.15%**- fermentação sem adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. **F.C.15%**- fermentação com adição de nutrientes ao mosto e com adição de 15% de hidrolisado no preparo do inóculo. * Em cada coluna, médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa entre si, num nível de 95% de confiança (média±dp).

Conforma a Figura 24 percebe-se que o maior valor de produtividade se deu no tempo 16 h para a fermentação F.S.3% (1,57 g/L.h ±0,02) o que reforça que a inserção de mais hidrolisado no inóculo e a inserção de nutrientes ao mosto, não influenciaram positivamente na produtividade de etanol, bem como na eficiência de transformação e conversão dos monômeros de glicose em produto. Além disso, constatou-se que o processo de fermentação alcoólica utilizando os polissacarídeos hidrolisados de *Spirulina platensis* LEB 52 pode ser realizado por apenas 16 h, não sendo necessário prosseguir com o processo até 20 h.

De acordo com Pyne et al. (2017) a biomassa de *Spirulina platensis* em sua composição possui fontes dos seguintes nutrientes, expressos em mg/100g de biomassa: Zinco, 3; Sódio, 900; Potássio, 1400; Fósforo, 800; Manganês, 5; Magnésio, 400; Ferro, 100; Cobre, 1,2 e Cálcio, 700.

Se analisarmos todos os fatores calculados, concentrações de etanol, levedura e as produtividades, é possível determinar que a inserção de nutrientes ao mosto não influenciou em maiores rendimentos. Desta forma, a biomassa de *Spirulina* serviu como fonte de macro e micro para a levedura.

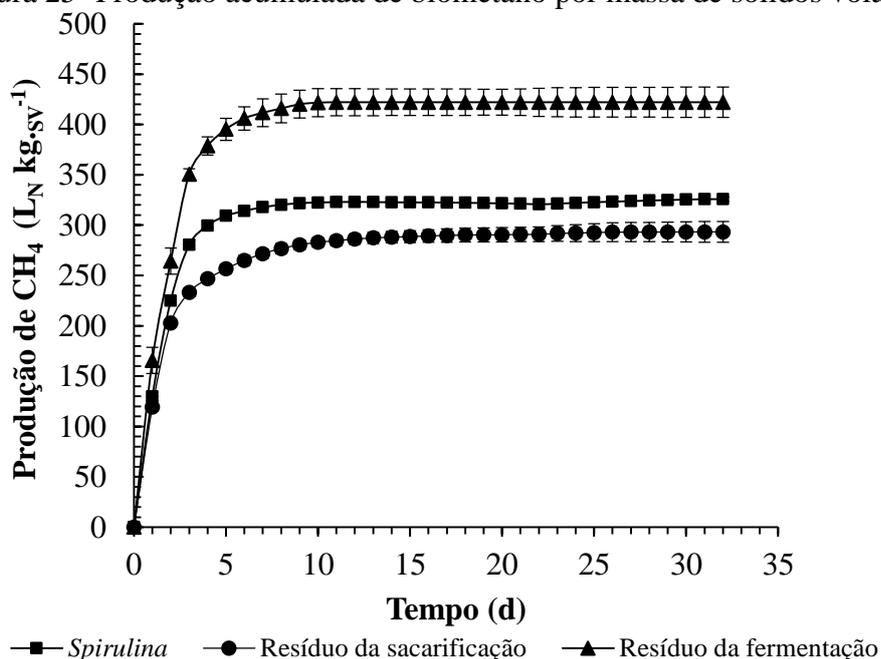
Se realizarmos uma comparação entre a biomassa de *Spirulina* e a lignocelulósica, a microalgal apresenta vantagens, visto que a ausência de celulose e lignina não resultam na geração de compostos inibidores da fermentação alcoólica. Além disto, segundo Panha et al. (2016) e Lee et al. (2015) os açúcares provenientes da hidrólise dos polissacarídeos das

microalgas são, em sua maioria, hexoses, não havendo assim a geração de pentoses o que torna ainda mais vantajoso o processo.

4.8 Potencial Bioquímico de Metano (PBM)

A partir dos resíduos provenientes da produção de etanol, mais especificamente nas etapas de sacarificação e fermentação, foram testados quanto ao PBM. Além dos resíduos, também foi avaliado o potencial de produção de biometano da biomassa de *Spirulina platensis* LEB 52 sem nenhum tipo de pré-tratamento (Figura 25).

Figura 25- Produção acumulada de biometano por massa de sólidos voláteis



A produção de biometano foi investigada por um período de 34 dias, tempo em que os ensaios foram encerrados devido a estabilização na produção de biometano. O controle positivo constituído de celulose microcristalina, produziu um valor de acumulação de $320,4 \pm 7,4$ L_N (kgSV_{ad}⁻¹), sendo que esta produção supera os 80% dos 366 L_N (kgSV_{ad}⁻¹), comprovando efetividade na atividade do inóculo anaeróbico conforme recomendações da VDI 4630 (2006). Assim é possível confirmar que o inóculo utilizado possuía atividade microbiana satisfatória e validando o teste (WANG et al., 2014).

O resíduo da fermentação foi o substrato que apresentou maior potencial de produção de biometano [422 ± 15 L_N (kgSV_{ad}⁻¹)]. Já o teste com a biomassa de *Spirulina* apresentou um valor de [326 ± 2 L_N (kgSV_{ad}⁻¹)], valores similares encontrados na literatura para digestão

anaeróbia de *Spirulina*. Rodríguez et al (2017) após 35 dias obteve 400 L_N ($kgSV_{ad}^{-1}$), El-Mashad (2013) após 40 dias de digestão atingiu valores na faixa de 355 L_N ($kgSV_{ad}^{-1}$).

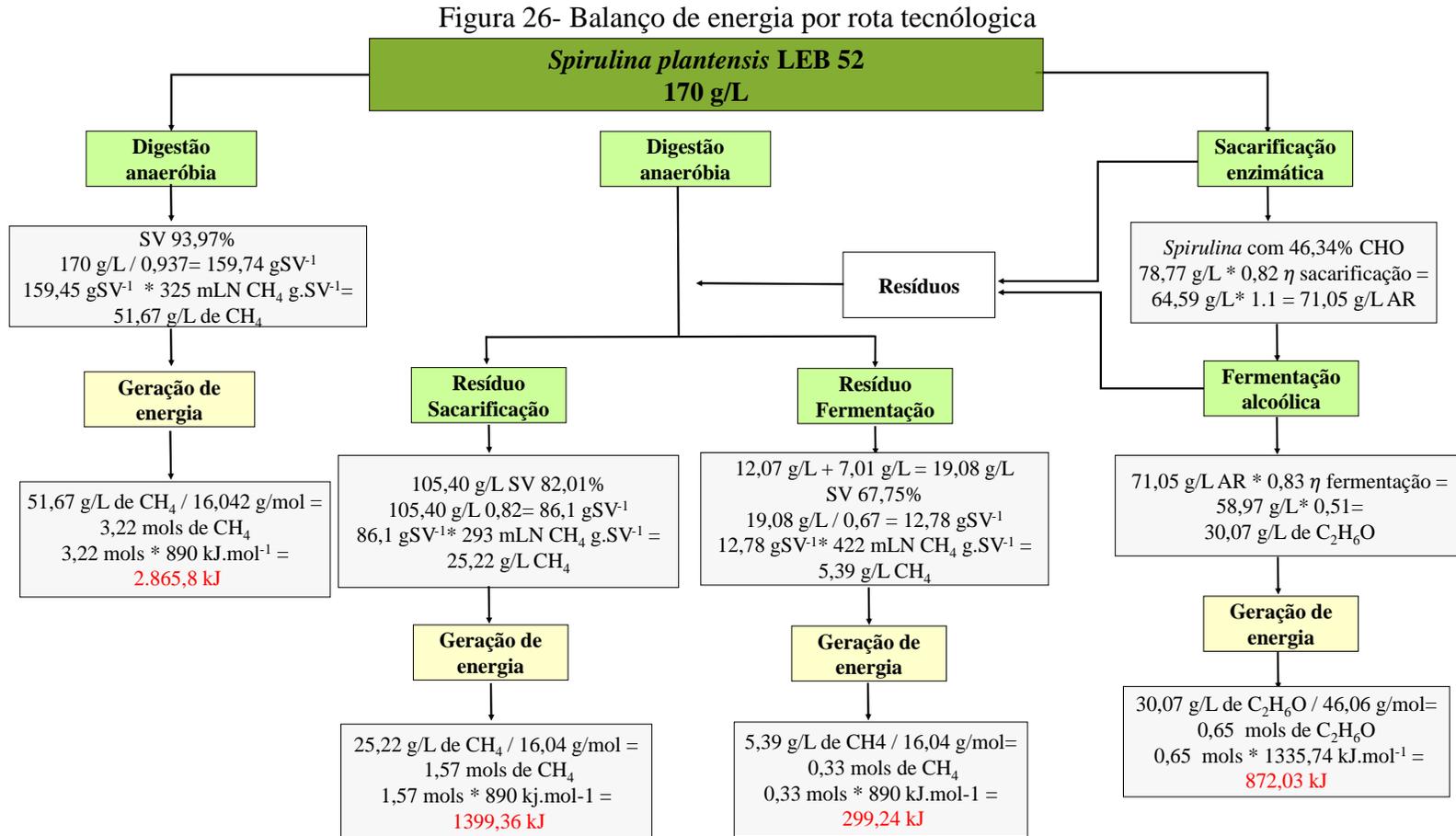
O resíduo da sacarificação apresentou menor valor de potencial de produção 296 ± 10 L_N ($kgSV_{ad}^{-1}$), os valores se diferiram entres os ensaios devido a diferença na composição dos resíduos. As transformações dos compostos celulares em metano variam entre si. De acordo com a VDI (2006) o potencial bioquímico de produção de metano expresso em L_N ($kgSV_{ad}^{-1}$) para carboidratos é de 750, já para as frações proteicas é de 800 e para lipídios é de 1390. Além disso, proteínas e lipídios já são relatados por produzir quantidades mais significativas de metano, porém a fração proteica apresenta vantagens em relação aos lipídios por possuírem taxas de conversão mais rápidas (MARSH et al., 2005; LALAK et al., 2015).

A partir disso é possível verificar que o resíduo da fermentação composto por células de levedura *Saccharomyces sp.* que apresenta composição de 40-50% de proteínas, 3-5% de lipídios e 30-50% de carboidratos (CABALLERO-CÓRBODA et al., 1997) faz com que este resíduo apresentasse maior potencial de produção, devido principalmente aos maiores percentuais de proteínas.

O resíduo da sacarificação apresentou o menor valor, sendo que neste a quantidade de proteína (32,9%) já era inferior ao resíduo da fermentação e além do mais não continha percentuais de carboidratos, pois este foram hidrolisados e utilizados na produção de bioetanol.

4.9 Balanço energético

Baseado nos resultados de produção de bioetanol e biometano foi realizado um balanço de massa e energia do sistema, com o objetivo de avaliar o potencial energético dos resíduos testados e da biomassa da *Spirulina* frente as duas possíveis rotas tecnológicas (Figura 26).



Dados utilizados: Molaridade etanol e metano: 46,06 g/mol, 16,042 g/mol, respectivamente. Entalpia de combustão do etanol 1335,74 kJ.mol⁻¹ (SILVA; MENEZES; CATALUÑA, 2008). Entalpia de combustão do metano 890 kJ.mol⁻¹ (BAIRD, 2011). 1,1 fator de conversão de amido em glicose (HALL et al., 2003). **Siglas-** AR: açúcares redutores; CH₄: metano; C₂H₆O: etanol; SV: sólidos voláteis; η: eficiência

Analisando os resultados do balanço de energia, se a biomassa de *Spirulina* fosse utilizada na íntegra para a produção de biometano, esta geraria um potencial energético de 16,85 KJ/g de biomassa. Realizando a produção de bioetanol e a utilizando os resíduos obtidos após sacarificação e fermentação, calculou-se um potencial energético de 15,03 kJ/g de biomassa. Em termos energéticos, a produção direta de biometano rende maior potencial energético, do que realizar a produção de bioetanol.

Porém, levando em consideração estratégias de mercado e estrutura para produção, o bioetanol apresenta vantagens em relação ao biometano, visto que o etanol de cana-de-açúcar ou do milho já está inserido no mercado de combustíveis e seu processo produtivo também se encontra mais desenvolvido, o que acabaria favorecendo maior aceitação de mercado por etanol produzido a partir de microalgas. Porém, a opção da rota tecnológica deverá ser baseada num estudo mais amplo de cenários, avaliando cada caso em específico.

Desta forma é possível produzir bioetanol e a partir dos resíduos desta produção também produzir biometano com elevados potenciais energéticos, dando assim maior rentabilidade e por consequência mais viabilidade a produção de etanol. Além do mais a utilização de biomassa microalgal agrega ainda mais, pois descarta a competitividade com a geração de alimentos, se levarmos em consideração a produção de etanol via primeira geração.

5 CONCLUSÕES

Através dos ensaios de ruptura celular foi possível observar que diferentes métodos físicos apresentam resultados diferentes de liberação dos polissacarídeos microalgais. O melhor método foi o de congelamento/descongelamento. As enzimas α -amilase e amiloglicosidase utilizadas possuem faixas ótimas de atuação iguais, temperatura de 50 °C e pH 5,5. Foi possível alcançar resultados próximos a 100% de eficiência de hidrólise utilizando concentrações de 1% (v/v) do biocatalisador livre.

Os resultados de atividades amilolíticas e específicas com o uso dos biocatalisadores imobilizados foram promissores, atingindo aumento de 100 vezes se comparadas com as atividades das enzimas livres. A eficiência de sacarificação com ambas enzimas imobilizadas conjuntamente em poliuretano foi de 83,19% utilizando 1% (m/v) do suporte com as enzimas imobilizadas na razão de 1,5 mL de extrato líquido para uma massa final de suporte de em torno de 10 g.

A eficiência de transformação de açúcares solúveis em etanol foi de 83,56% evidenciando que o hidrolisado microalgal é facilmente assimilado pela levedura. A suplementação do hidrolisado de microalga com nutrientes para realização da fermentação não é necessária, de forma que a própria biomassa de *Spirulina* tem em sua composição nutrientes necessários para o desenvolvimento celular da levedura.

Os resíduos das etapas de produção de bioetanol de microalgas pode ser usado para a produção de biometano, apresentando resultados elevados em torno de 422L_N (kgSV_{ad}⁻¹), reforçando assim a possibilidade de geração de energia provenientes dos resíduos. Portanto, é possível realizar um fechamento de ciclo, do cultivo à produção de bioetanol e a utilização de resíduos em outro processo produtivo, agregando assim maior viabilidade e sustentabilidade no processo.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

-Realizar o cultivo da microalga com meios alternativos, como por exemplo, o uso de efluentes industriais como fonte alternativa de nutrientes;

- Testar outros suportes para a imobilização das enzimas, buscando a minimização do desprendimento da enzima do suporte;

- Realizar o aumento de escala nos ensaios de fermentação;

- Reavaliar o balanço energético, levando em consideração os gastos energéticos gerados nos processos e através de ferramentas de avaliação de ciclo de vida, analisar o processo com um todo;

-Buscar outras formas de utilização dos resíduos da produção de etanol, como o uso destes na produção de biofertilizantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA, S; ANUPAMA, J; SAVLA, J; CHIU, Y. Y; VYSHALI, P; SHRUTI, M; KUMUDINI, B. S. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. **African journal of Biotechnology**, v. 6, p. 576, 2007.

ANTUNES, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (calb) in situ em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das APHA; AWWA; WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington: APHA, 2012.

BAIRD, C; CANN, M. **Química ambiental**. Tradução de Marco Tadeu Grassi. 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BOHUTSKYI, P; BOUWER, E. Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs. In: Lee JW, editor. **Advanced biofuels and bioproducts**. New York: Springer; p. 873, 2013.

BOSQUEIRO, A. **Composição química da aguardente de Cana-de-açúcar ao longo do processo de dupla destilação em alambique simples**. Dissertação no Programa de Pós-Graduação em Mestre em Ciência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade de São Paulo, 2010.

BOTHAST, R. J; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.19-25, 2005.

BRENNAN, P; OWENDE. Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Energ**, v.14, p. 557–577, 2010.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; DE OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E., SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p.35-43, 2015.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M; PACHECO, M. T. B; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food Science and Technology (Campinas)**, 1997.

CARDONA, C. A; SÁNCHEZ, Ó. J. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270-5295, 2007.

CASTRO, R. C. A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produção de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e**

fermentação simultânea de celulignina de palha de arroz. Dissertação no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa da Universidade de São Paulo, 2012.

CHADER, S; MAHMAH, B; CHETEHOUNA, K AMROUCHE F; ABDELADIM, K. Biohydrogen production using green microalgae as an approach to operate a small proton exchange membrane fuel cell. **Hydrogen Energy**, v. 36, p. 4089-4093, 2011.

CHAGAS, B. ME; DORADO, C; SERAPIGLIA, M. J; MULLEN, C. A; BOATENG, A. A; MELO, M. A. F; ATAÍDE, C. H. Catalytic pyrolysis-GC/MS of *Spirulina*: Evaluation of a highly proteinaceous biomass source for production of fuels and chemicals. **Fuel**, v. 179, p. 124-134, 2016.

CHANG, K; THITIKORN-AMORN, HSIEH, J; OU, B; CHEN, S; RATANAKHANOKCHAI, K; HUANG, P; CHEN, S. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 90-95, 2011.

CHEN, C.-Y., YEH, K.-L., AISYAH, R., LEE, D.-J., CHANG, J.- Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresour. Technol**, v. 102, p. 71–81, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol**, v. 25, p. 294–306, 2011.

CHOI, S. P; NGUYEN, M. T; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol productio. **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 5330–5336, 2010.

COONEY, M., MAYNARD, N., CANNIZZARO, C., BENEMANN, J. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2641–2651, 2007.

CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMASD, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTEE, R.; PINTOB, J. C.; FREIRE, D. M. G.. Preparation of core–shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica* effect of the support nature on catalytic properties. **A.G. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59– 67, 2014.

DANQUAH, M. K; ANG L; UDUMAN. N; MOHEIMANI. N; FORDEA. G. M. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration J. **Chem. Technol. Biotechnol**, v. 84, p. 1078–1083, 2009.

DATTA, S; CHRISTENA, L. R; RAJARAM Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotech**, v.3, p. 1–9, 2013.

DESAI, S. H; ATSUMI, S. Photosynthetic approaches to chemical biotechnology **Biotechnol**, v. 24, p. 1031–1036, 2013.

DISMUKES, G.C. ; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, n.19, p. 235-240, 2008.

DONG, L.; GE, C.; QIN, P.; CHEN, Y.; XU, L. Q. Immobilization and catalytic properties of candida lipolytic lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; MITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

GOMES, D. Í; SAMPAIO, C. B; DETMANN, E; VALADARES FILHO, S. C; RAFAEL MEZZOMO, R; REGADAS FILHO, J. G. L. Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutro em amostras com alto teor de amido. **Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2629-2642, 2014.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production. **Biofpr**, v. 6, p. 105 – 113, 2012.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V; CERÓN-GARCÍA, M. C; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M; GONZÁLEZ-CÉSPEDES, A. M; CAMACHO-RODRÍGUEZ, J; MOLINA-GRIMA, E. Medium recycling for *Nannochloropsis gaditana* cultures for aquaculture. **Bioresour Technol**, v. 129, p. 430–438, 2013.

HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods 1 2. **Journal of animal science**, v. 81, p. 3226-3232, 2003.

HALLENBECK, P. C; GROGGER, M; MRAZ, M; VEVERKA, D. Solar biofuels production with microalgae. **Applied Energy**, v. 179, p. 136-145, 2016.

HANG, Y.D.; LEE, C.Y.; WOODAMS, E.E. Production of alcohol from apple pomace. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, n.6, p.1128-1129, 1981.

HARUN, R; DANQUAH, M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chem. Eng. J**, v.168, p. 1079–1084, 2011.

HARUN, R; JASON, W. S. Y; CHERRINGTON, T. M. K; DANQUAH, M. K; HARUN, R; JASON, W. S. Y; CHERRINGTON, T; DANQUAH, M. K. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Appl Energy**, v. 88, p. 3464–3467, 2011.

HARUN, R; YIP, J. W; THIRUVENKADAM, S; GHANI, W. A; CHERRINGTON, T; DANQUAH, M. K. Algal biomass conversion to bioethanol—a step-by-step assessment. **Biotechnol**, v. 9, p. 73–86, 2014.

HEASMAN, M; DIEMAR, J; CONNOR, W. O; SUSHAMES, T; FOULKES, L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs — a summary, **Aquac**, v. 31, p. 637–659, 2000.

- HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical engineering journal**, v. 262, p. 939-945, 2015.
- HO, S.H.; HUANG, S.W, CHEN, C.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.
- HOMAEI, A. A; SAIRI, R; VIANELLO, F; STEVANATO, R. Enzyme immobilization: an update. **Chemical Biol**, v.6, p. 185–205, 2013.
- HUNDT, K.; REDDY, B.V. Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 6, p. 294 – 298, 2011
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed. V. 1. São Paulo, 1985.
- JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102 p. 186– 193, 2011.
- KRUPP, M; WIDMANN, R. Biohydrogen production by dark fermentation: experiences of continuous operation in large lab scale. **Hydrog Energy**, v. 34, p. 4509–4516, 2009.
- LAAMANEN, C. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Flotation harvesting of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 75 – 86, 2016.
- LAKANIEMI, A. M; HULATT, C.J; THOMAS, D.N; TUOVINEN, O.H; PUHAKKA, J.A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. **Biotechnol. Biofuels** v. 4, p. 1-34, 2011.
- LALAK, J; KASPRZYCKA, A; PAPROTA, E.M; TYS, J; MURAT, A. Development of optimum substrate compositions in the methane fermentation process. **Int. Agrophysics** v.29, p. 313-321, 2015.
- LEE, O. K; LEUM K. A; SEONG, H. D; LEE, C. G; JUNG, Y. T; LEE, J. W; LEE, E. W. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 197-201, 2013.
- LEE, O. K; OH, Y. K; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella sp.* KR-1. **Bioresource technology**, v.196, p. 22-27, 2015.
- LEMO, ELIANA G. M.; STRADIOTTO, NELSON R. (Org.). Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. (Coleção PROPe Digital - UNESP). ISBN 9788579832567. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123648>>.

LÉVÊQUE, E; JANECEK, S; HAYE, B; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p. 3-14, 2000.

LIU, S.; LIN, B.; YANG, X.; ZHANG, Q. Carbon-nanotube-enhanced direct electron-transfer reactivity of hemoglobin immobilized on polyurethane elastomer film. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 5, p. 1182-1188, 2007.

LOERA-QUEZADA, M. M.; OLGUÍN E.J. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. **Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 1, p. 91-116, 2010.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.

LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Desenvolvimento de uma técnica para monitoramento industrial da floculação do fermento por bactérias floculentas em destilarias produtoras de etanol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 893-898, 2000.

MAGRO, F. G; MARGARITES, A. C; REINEHR, C. O; GONÇALVES, G. C; RODIGHERI, G; COSTA, J. A. V; COLLA, L. *Spirulina platensis* biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds. **Environmental technology**, p. 1-10, 2017.

MAHDY A; MENDEZ L; BALLESTEROS M; GONZALEZ-FERNANDEZ C. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. **Energy Convers Manage**, v. 85, p. 551–557, 2014.

MAHDY, A; MENDEZ, L; BALLESTEROS, M; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus sp.* methane production. **Energy**, v. 78, p. 48-52, 2014.

MARGARITES, A.C.F. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 2014.

MARKOU, G.; CHATZIPAVLIDIS, I.; GEORGAKAKIS, D. Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 2661–2670, 2012.

MARSH, M; OFFICER, C.E; KRICH, K; AUGENSTEIN, D; BENEMANN, J; RUTLEDGE, B; SALOUR, D. Biomethane from Dairy Waste a Sourcebook for the Production and Use of. Prep. West. **United Dairymen. Funded part through USDA Rural Dev** 1-282, 2005.

MATA, T.M., MARTINS, A.A. & CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; CONVERTI, A., SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology progress**, v. 27, p. 650-656, 2011.

MELIS A, HAPPE T. TRAILS. Of green alga hydrogen research e from hans gaffron to new frontiers. **Photosynthesis Research**, v. 80, p. 01-409, 2004.

MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. **Anal. Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817- 830, 2010.

NAHAK, S; NAHAK, G; PRADHAN, I; SAHU, R. K. Bioethanol from Marine Algae: A Solution to Global Warming Problem. **J. Appl Environ Biol Sci**, v. 4, p. 74-80, 2011.

NGUYEN, T. A. D; KIM, K. R; KIM, M. S; S.J. SIM, S. J. *Thermophilic hydrogen fermentation from Korean rice straw by Thermotoga neapolitana*. **Int. J. Hydrogen Energy**, v.35, p. 13392-13398, 2010.

NYARY, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; de OLIVEIRA, D.; ZENI, J.; RIGO, E.; DALLAGO, R. M. *In situ* immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52-61, 2016.

OMETTO F; QUIROGA G; PSENICKA P; WHITTON R; JEFFERSON B; VILLA R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. **Water**, v.65, p.350-361, 2014.

PANCHA, D; JAIN, A; SHRIVASTAV, S. K; MISHRA, B; SHETHIA, S; MISHRA, B. PANCHA, I; CHOKSHI, K; MAURYAA, R; BHATTACHARYAB, S; BACHANIA, P; MISHRAA, S. Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, v.204, p. 9-16, 2016.

PANCHA, I; JAIN, D. SHRIVASTAV, A. MISHRA, S. K; SHETHIA, B; MISHRA, S; MOHANDAS, V. P; JHA, B. A thermoactive α -amylase from a *Bacillus* sp. isolated from CSMCRI salt farm. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 47, p. 288-291, 2010.

- PASCHOALINI, G. ALCARDE, V. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.16, p. 59-68, 2009.
- PEJIN, J. D; MOJOVIĆ, L. V; KOCIĆ-TANACKOV, D.S; SAVIĆ, D. S; NIKOLIĆ, S. B. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. **Fuel**, v. 142, p. 58-64, 2015.
- PHILL, S.; CHOI, M. T. N. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5330-5336, 2010.
- PRESEČKI, A. V; FINDRIK, Z; VASIĆ-RAČKI, Đ. V. Starch hydrolysis by the synergistic action of amylase and glucoamylase. **New Biotechnology**, v. 25, p. S170, 2009.
- PURCELL, D; PARSONS, S. A; JEFFERSON, B. The influence of ultrasounds frequency and power on the algal species *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Scenedesmus subspicatus* and *Melosira* sp. **Environ. Technol**, v. 34, p. 2477-2490, 2013.
- PYNE, P. K.; BHATTACHARJEE, P.; SRIVASTAV, P. P. Microalgae (*Spirulina Platensis*) and Its Bioactive Molecules: Review. **Indian J Nutri**, v. 4, n. 2, p. 160, 2017.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. 1º ed. Pelotas- RS: Universitária/UFPel, 1996.
- RICHMOND A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd**, p. 566- 576, 2004.
- RODRIGUES, É. F; FICANHA, A. M. M; DALLAGO, R. M; TREICHEL, H; REINEHR, C. O; MACHADO, T. P; NUNES, G. B; COLLA, M. L. Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 134-141, 2017.
- SALIK, F.L.M; POVH, N. P. Método electrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil. 1994, São Pedro. **Anais do Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, p. 262-266, 1993.
- SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v.209, p. 133-141, 2016.
- SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. Tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em engenharia de alimentos na Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, 2012.
- SCHENK, P. M; THOMAS-HALL, S. R; STEPHENS, E; MARX, U.C; MUSSGNUMG, J. H; C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, **Bioenergy Resour**, v. 1, p. 20–43. 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher, p. 254, 2011.

SCHOLZ, M. J; RILEY, M.R; CUELLO, J.L. Acid hydrolysis and fermentation of microalgal starches to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, **Biomass Bioenergy**, v. 48, p.59–65, 2013.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo fermentativo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum L.*) utilizando enzimas amilolíticas**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em engenharia de processos. Universidade Estadual de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.

SHOKRKAR, H; EBRAHIMI, S; ZAMANI, M. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. **Fuel**, v. 200, p. 380-386, 2017.

SILVA, C. E. F; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Process Biochemistry**, 2016.

SILVA, R; MENEZES, E. W; CATALUÑA, R. Rendimento térmico e emissões de contaminantes atmosféricos de gasolinas formuladas com etanol, MTBE e TAE. **Química nova**, v. 31, p. 980-984, 2008.

SINGH, A; NIGAM, P. S; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. **Bioresour. Technol**, v.102, p. 10-16, 2011.

SINGH, R; KRISHNAA, B. B; KUMARA, J; BHASKAR, T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v.199, p. 398-407, 2016.

SINGHANIA, R. R; PATEL, A. K; SUKUMARAN, R. K; LARROCHE, C; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2012.

SMICHI, N; MESSAOUDI Y; MOUJAHED, N; GARGOURI, M. Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1357-1361, 2016.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo-SP, 2012.

SOUZA, S. M. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para a imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração: Processos catalíticos e biocatalíticos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

STATSOFT. Statistica for Windows. Version 8.0 [S.I.]: StatSoft South America, 1999. CDROM.

- STEINMETZ, R. L. R; MEZZARI, M. P; DA SILVA, M. L. B; KUNZ, A., DO AMARAL, A. C; TÁPPARO, D. C; SOARES, H. M. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. **Bioresource technology**, v. 219, p. 21-28, 2016.
- STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; MUSSGNUM, J. H.; WAGNER, L. D.; BOROWITZKA, M. A.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Future prospects of microalgae biofuel production systems. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 554-564, 2010.
- TEMPLETON, D. W; QUINN, M; VAN, S; HYMAN, W. D; LAURENS M. L. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 225-234, 2012.
- TERCERO, E. A. R; G. DOMENICALI, G; BERTUCCO, A. Autotrophic production of biodiesel from microalgae: An update process and economic analysis **Energy**, v.76, p. 807–815, 2014.
- TUANKRIANGKRAI, S; BENJAKUL, S. Effect of modified tapioca starch on the stability of fish mince gels subjected to multiple freeze-thawing. **Journal of Muscle Foods**, n. 21, p. 399-416, 2010.
- ULLAH, K; AHMAD, M; SHARMA, V. K; LU, P; HARVEY, A; M. ZAFAR, M. Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: a review. **Fuel**, v. 143, p. 414-423, 2015.
- VAITHANOMSAT, P; KOSUGI, A; APIWATANAPIWAT, W; THANAPASE, W; WAEONUKUL, R; TACHAAPAUKOON, C; PASON, P; MORI, Y. Efficient saccharification for non-treated cassava pulp by supplementation of *Clostridium thermocellum* cellulosome and *Thermoanaerobacter brockii* β -glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 383-386, 2013.
- VAN DEN HENDE, S; VERVAEREN, H; BOON N. Flue gas compounds and microalgae: (bio-) chemical interactions leading to biotechnological opportunities **Biotech Adv**, v. 30, p. 1405–1424, 2012.
- VAROL, A; UGURLU, A. Biogas Production from Microalgae (*Spirulina platensis*) in a Two Stage Anaerobic System. **Waste and Biomass Valorization**, v.7, p.193-200, 2015.
- VAZ, R. P; MOREIRA, L. R. S; FERREIRA FILHO, E. X. An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.133, p. 127-135, 2016.
- VDI 4630 - Fermentation of organic materials - Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data and fermentation tests. Verein Deutscher Ingenieure. 2006, 96p.
- VONSHAK A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): **physiology, cellbiology and biotechnology**. Taylor & Francis, London, 2002.
- WANG, L; WEI, L; CHEN, Y; JIANG R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes. **Biotechnol**, v.150, p. 57–63, 2010.

WARD, A. J; LEWIS, D. M; GREEN, F. B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. **Algal Research**, v. 5, p. 204-214, 2014.

WIGMOSTA, M.S., COLEMAN, A.M., SKAGGS, R.J., HUESEMANN, M.H., LANE, L.J. National microalgae biofuel production potential and resource demand. **Water Resour**, v. 47, p. 1-13, 2011.

XIN, F; ZHANG, H; WONG, W. Bioethanol production from horticultural waste using crude fungal enzyme mixtures produced by solid state fermentation. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 1030–1037, 2013.

YANG, B. ROY, D. WANG, W. YUE, L. JIANG, E.Y. PARK, Y. MIAO. The most stirring technology in future: cellulase enzyme and biomass utilization, *Afr. J. Biotechnol*, v. 8, p. 493–499, 2009.

YANG, P. F.; ZHANG, R. H.; MEGARVEY, J. A.; BENEMANN, J. R. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 4761-4771, 2007.

YEH, A.I; HUANG, Y.C; CHEN, Y.C. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, **Carbohydr. Polym**, v. 79, p. 192–199, 2010.

YU, J., TAKAHASHI, P. Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii, 11pp, 2007.

ANEXOS

ANEXO I

Determinação de carboidratos

Inicialmente foi preparada uma solução de fenol 5%, que foi conservada em frasco escuro e sob refrigeração. Para a realização da análise foi adicionado 1 mL de amostra, devidamente diluída, e foi adicionado igual volume da solução de fenol. A mistura foi, posteriormente, homogeneizada em agitador de tubos e após foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação ocorreu durante 10 min, no fim, foi colocada num banho de água fria durante 20 min. A densidade óptica foi lida em um espectrofotômetro a 490 nm contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água destilada. Foi construída uma curva padrão com concentrações entre $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $140 \mu\text{g.L}^{-1}$ de glicose (DUBOIS et. al., 1956).

ANEXO II

Determinação de lipídios da microalga

A extração de lipídeos totais da biomassa foi realizada de acordo com o método descrito por Folch et al. (1957). Foi adicionado 0,5 g de biomassa em 5 ml de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) e essa mistura foi colocada em banho ultrassônico durante 5 min, em seguida, foi realizada a centrifugação a 5500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro após coletado em um funil de separação.

Em seguida, foi adicionada a solução de KCl (0,88%) numa proporção de 1:4 v/v do extrato lipídico. O extrato foi vigorosamente agitado por 1 minuto e deixado em repouso para a separação das fases, descartando-se o sobrenadante. Após, foi adicionado a solução de metanol: água (2:1 v/v), numa proporção de 1:4 v/v do extrato lipídico.

O extrato obtido foi filtrado em sulfato de sódio anidro, e acondicionado em balões previamente tarados, após o extrato foi colocado em rotoevaporador para realizar a evaporação do solvente. Os balões foram mantidos em estufa a 50 °C em peso constante, e os lipídeos totais foram quantificados gravimetricamente.

ANEXO III

Determinação de proteínas da microalga

Para a determinação de proteínas da biomassa da microalga foi realizada, inicialmente, uma curva de calibração com solução padrão de albumina. A quantificação de proteínas na biomassa foi feita após a biomassa passar pela sonicação em sonda ultrassônica..

Acrescentando-se 0,5mL de NaOH 1N e 0,5mL de amostra em banho termostaticado a 100 °C por 5 min. Transcorrido esse tempo os tubos foram resfriados em banho de água fria por 10 min. Após adiciona-se 2,5mL de solução de tartarato de sódio e potássio em conjunto com sulfato de cobre, agitou-se a amostra com o auxílio de um vortex e aguardou-se 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5mL do reagente folin-ciocalteau diluído em água (1:1), a amostra foi homogeneizada com o auxílio de um vortex e mantida no escuro por 30 minutos. Após este período a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro a 750 nm.