

Área: Ciência de Alimentos

SACARIFICAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL *SPIRULINA PLATENSIS*

Éllen Francine Rodrigues*, Noany Volpato, Christian Oliveira Reinehr, Telma Elita Bertolin, Luciane Maria Colla

*Laboratório de Fermentações, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

*E-mail: ellen_fr@hotmail.com

RESUMO – A utilização da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis é vista como uma alternativa promissora, pois se faz possível o controle das condições de cultivo no seu contexto geral. O uso de biomassa algal para a produção de biocombustíveis, exige a etapa de processo de hidrólise enzimática ou ácida dos carboidratos presentes na microalga, a fim de torná-los fermentescíveis. Objetiva-se a produção de enzimas amilolíticas via fermentação em estado sólido (FES) para utilização na hidrólise dos polissacarídeos da *Spirulina* para a produção de bioetanol. A produção da enzima foi realizada via FES utilizando como substrato o farelo de trigo, em condições previamente estudadas. O processo de sacarificação da biomassa de *Spirulina* foi realizado utilizando o farelo enzimático na sua forma íntegra. No processo de sacarificação foram estudadas as seguintes variáveis: proporção sólidos (%) e pH durante a reação enzimática através de um Planejamento Fatorial Completo 3². As variáveis respostas serão a quantidade de açúcares redutores. A partir dos resultados obtidos observou-se que ocorreu a produção de enzimas via FES e os resultados obtidos para o processo de sacarificação utilizando a biomassa *Spirulina* cepa Leb 18 mostraram que as quantidades de açúcares redutores gerados foram aumentados ao longo do tempo e somente a variável pH apresentou-se significativa ($p < 0,05$) e positiva, sendo seu ponto de maior geração de açúcares redutores em pH 6,0. Pode-se concluir que ocorreu a produção de enzimas e os resultados obtidos no processo de sacarificação mostraram que o farelo fermentado favoreceu a hidrólise da biomassa *Spirulina*.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, fermentação em estado sólido, hidrólise enzimática.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas possuem grande diversidade e capacidade de acúmulo de polissacarídeos que são características importantes para produção de bioetanol, sendo assim uma alternativa bastante promissora e crescente no âmbito energético. As microalgas são capazes de acumular polissacarídeos intracelulares e extracelulares, os principais polissacarídeos intracelulares são os de reserva, geralmente formados por glucanos homogêneos, como o amido. A limitação da produção de bioetanol a partir de carboidratos microalgais é que as

leveduras podem fermentar somente açúcares simples, tais como glucose e frutose. Consequentemente, os carboidratos de microalgas (polímeros de açúcar) têm primeiro de ser hidrolisados para açúcares simples, de modo que possam ser fermentados pelas leveduras. A hidrólise, no entanto, contribui para o custo de produção de etanol, assim, processos de hidrólise mais econômicos devem ser selecionados de modo a tornar o processo de bioetanol economicamente atrativo, sendo que o procedimento deve ser energeticamente eficiente, de baixo custo, de fácil aplicação e não devem degradar os açúcares fermentáveis.

Uma alternativa para a redução dos custos do processo de hidrólise é o uso de enzimas produzidas por fermentação em estado sólido (FES) em detrimento das enzimas comerciais. A FES utiliza substratos oriundos da agroindústria, como os farelos de trigo, milho, soja, entre outros. A incorporação do amido presente no farelo fermentado para a síntese de enzimas no processo de sacarificação, além de permitir maiores rendimentos em relação àqueles obtidos somente a partir de sacarificação da biomassa algal, contribui para a valoração dos resíduos agroindustriais.

O objetivo deste trabalho foi estudar a hidrólise enzimática da biomassa *Spirulina platensis* a partir de enzimas amilolíticas produzidas via fermentação em estado sólido utilizando *Aspergillus niger*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Biomassa algal *Spirulina platensis* e caracterização físico-química

A biomassa algal utilizada para a sacarificação foi a *Spirulina* sp. LEB 18, proveniente de cultivos realizados na planta piloto de produção de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande – FURG situada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS.

A caracterização físico-química foi realizada através da determinação da concentração de carboidratos (% p/p) pela adaptação do método de 3,5 DNS, com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos através da adição de HCl 1,5 N, baseando-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl, utilizando como fator de conversão de 5,22, específico para cianobactérias (LOURENÇO *et al.*, 2006). O teor de lipídios foi determinado pelo método proposto por Folch *et al.*, (1957) adaptado por Colla (2002). A umidade foi realizada em estufa a 105 °C por 24 h, de acordo com o método da (AOAC, 2005), e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen e colocadas em forno mufla a 550 °C até obtenção de uma cinza branca (INSITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As amostras foram pesadas até adquirirem um peso constante.

2.2 Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado para fermentação em estado sólido foi o *Aspergillus niger* cepa O-4, pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo.

O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação do microrganismo em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de meio PDA (Potato Dextrose Agar) solidificado, incubados a 30 °C por 7 d.

2.3 Caracterização do substrato farelo de trigo utilizado na fermentação em estado sólido (FES)

O farelo de trigo utilizado para a produção de enzimas via FES é proveniente da Biotrigo Genética situada na cidade de Passo Fundo. Primeiramente o farelo de trigo foi peneirado em peneiras de mesh 14 e 22, para posterior utilização na caracterização físico-química e na FES.

A caracterização físico-química foi realizada através da determinação da concentração de carboidratos (% p/p) pela adaptação do método de 3,5 DNS, com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos através da adição de HCl 1,5 N, baseando-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). O teor de proteínas pelo método Kjeldahl, utilizando 6,21 como fator de conversão (AOAC, 2005). A determinação de lipídios utilizando o método de Soxhlet (AOCS, 1997). A umidade foi realizada em estufa a 105 °C por 24 h, de acordo com o método da (AOAC, 2005), e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen e colocadas em forno mufla a 550 °C até obtenção de uma cinza branca (INSITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As amostras foram pesadas até adquirirem peso constante.

2.4 Fermentação em estado sólido (FES)

O substrato foi esterilizado e a umidade ajustada a 60% com solução de nutrientes composta por: 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL.L⁻¹ de solução traço, a qual será composta por 0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L, inoculado com 4.10⁶ esporos/g_{meio}. A fermentação foi conduzida em estufa a 30 °C durante 8 dias.

As determinações das atividades amilolíticas do farelo fermentado nos tempos de 0 d (T₀) e 8 d (T₈) foram determinadas utilizando amido como substrato, denominado de método sacarificante, baseando-se na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959).

2.5 Sacarificação dos polissacarídeos da biomassa *Spirulina platensis*

O processo de sacarificação foi realizado a partir da adição do farelo fermentado íntegro à biomassa da microalga *Spirulina platensis* LEB18 em erlenmeyers de 250 mL, segundo o Planejamento Fatorial Completo 3² (PFC 3²) (Tabela 1). A concentração de sólidos foi fixada em 100 g.L⁻¹ utilizando tampões conforme os pHs propostos no PFC 3² e a temperatura em 40 °C, com base em resultados obtidos em testes preliminares. Três controles contendo a proporção de farelo de 10%, 30% e 50% sem a biomassa microalgal foram realizados com a sacarificação, sendo estes resultados de açúcares redutores liberados na ausência da biomassa microalgal subtraídos dos valores finais da sacarificação. Os experimentos foram realizados em banho termostaticado agitados a 100 rpm.

O processo de sacarificação foi realizado durante 4 horas e após a hidrólise, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 min e em seguida, realizado a determinação dos açúcares redutores através do método que utiliza o ácido 3,5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

2.6 Tratamento dos dados

Os resultados de açúcares redutores obtidos nos três experimentos controles contendo a proporção de farelo de 10%, 30% e 50% sem a biomassa microalgal foram diminuídos dos valores de açúcares redutores obtidos para cada experimento do Planejamento Fatorial Completo 3². Para a realização da análise de variância foram calculados adimensionais dos açúcares redutores, dividindo-se os resultados obtidos no tempo final pelos obtidos no tempo inicial de sacarificação, estes foram avaliados através de análise de variância, sendo calculados os efeitos estimados dos modelos gerados utilizando-se o *software Statistica 6.0*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal obtida para o farelo de trigo (umidade (9,4 %), proteínas (13,8 %), lipídios (5,2 %), carboidratos (60,1 %), cinzas (6,3 %) e fibras (5,2 %)), é similar à apresentada por Silveira e Furlong, (2007), que apresentaram resultados de umidade (9,4 %), proteínas (13,8 %), lipídios (5,2 %), carboidratos (60,1 %), cinzas (6,3 %) e fibras (5,2 %), levando-se em consideração as diferenças decorrentes do tipo de solo, da cultivar, do beneficiamento e da forma de estabilização dos mesmos.

Os resultados obtidos para a caracterização da biomassa *Spirulina* cepa Leb 18 (umidade (14,3 %), proteínas (51,8 %), lipídios (5,2 %), carboidratos (17,3 %), e cinzas (10,3 %)) que será utilizada no processo de sacarificação apresentam resultados semelhantes aos encontrados na literatura que indicaram resultados de análise da *Spirulina*: umidade (6 %), cinzas (6%), lipídios (5 %), proteínas (55 %) e carboidratos, fibras e ácidos nucleicos (22 %) (HABIB et al., 2008). A literatura indica que o conhecimento da composição química centesimal é importante para definir a utilização dos mesmos em processos.

Os resultados de atividade amilolítica obtidos para o farelo fermentado foram de 8,57 U/g_{farelofermentado} (T₀) e 104,96 U/g_{farelofermentado} (T₈), sendo considerados satisfatórios para a realização da sacarificação. O aumento das atividades em relação ao tempo pode ser explicado devido à baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima no início da fermentação. Conforme Prado (2002), algumas cepas de *Aspergillus niger* produzem enzimas que são capazes de hidrolisar o amido liberando glicose, e também relatam a necessidade da presença de uma fonte de amido para ocorrer à indução da produção de amilases por fungos.

A partir dos resultados do processo de sacarificação dos polissacarídeos da biomassa *Spirulina* Leb cepa 18 (Tabela 1), observa-se que houve aumento na concentração de açúcares redutores em todos os ensaios realizados, comprovando assim a ação das enzimas presentes na matriz fermentada utilizada no processo que foram produzidas pelo *Aspergillus niger* via fermentação em estado sólido.

Tabela 1 - Concentração de açúcares redutores para os experimentos de sacarificação dos polissacarídeos da *Spirulina* cepa Leb 18 nos tempos inicial e 4 horas de hidrólise.

Exp.	Proporção Farelo/Biomassa (g.L ⁻¹)	pH	Açúcares Redutores (mg.mL ⁻¹)*		
			T _{0h}	T _{4h}	ADM T ₄ /T ₀
1	10 (-1)	5 (-1)	1,110±0,063	2,465±0,135	2,220
2	30 (0)	5 (-1)	0,818±0,032	1,175±0,016	1,436
3	50 (+1)	5 (-1)	0,519±0,002	1,100±0,066	2,119
4	10 (-1)	6 (0)	1,179±0,058	3,589±0,052	3,044
5	30 (0)	6 (0)	1,139±0,214	3,263±0,247	2,864
6	50 (+1)	6 (0)	0,578±0,052	1,109±0,002	1,918
7	10 (-1)	7 (+1)	1,131±0,045	1,704±0,180	1,506
8	30 (0)	7 (+1)	0,921±0,030	1,837±0,202	1,994
9	50 (+1)	7 (+1)	0,404±0,092	0,844±0,091	2,089

ADM: Adimensional *Resultados de média±desvio padrão.

Os resultados apresentados na Tabela 1 são a quantidade de açúcares redutores gerados ao longo do processo diminuídos da quantidade de açúcares redutores gerados pelos controles contendo a proporção de farelo de trigo fermentado de 10 %, 30 % e 50 % sem a biomassa microalgal. Assim observa-se que os experimentos 4 (10 % proporção farelo/biomassa e pH 6,0) e 5 (30 % proporção farelo/biomassa e pH 6,0) em 4 horas de hidrólise apresentou os maiores valores de açúcares redutores. Isso indica que a utilização da matriz íntegra (farelo fermentado + enzimas amilolíticas) proporcionou a hidrólise enzimática dos polissacarídeos presentes na biomassa da *Spirulina*. A alternativa da utilização da matriz íntegra para o processo de sacarificação se torna promissora, devido à retirada de uma das etapas do processo, sendo ela à etapa de extração das enzimas produzidas via fermentação em estado sólido, além dos açúcares redutores gerados no processo de sacarificação a partir farelo de trigo fermentado, que podem ser utilizados como fonte de açúcares para posterior fermentação alcoólica.

Tabela 2 - Efeitos estimados das variáveis do Planejamento Fatorial Completo 3² sobre a sacarificação da biomassa algal *Spirulina* cepa Leb 18

Fonte de Variação	Efeitos Estimados	p
Mean/Interc.	2,141346	0,000000
(1) Farelo/biomassa (L)	-0,206513	0,462314
Farelo/biomassa (Q)	-0,046973	0,845262
(2) pH	-0,050706	0,855215
pH (Q)	0,720029	0,009954
1L by 2L	0,355840	0,306408

Verifica-se na análise dos efeitos estimados das variáveis sobre a hidrólise enzimática (Tabela 2) que o efeito linear e quadrático da proporção farelo/biomassa não demonstrou significância, entretanto o efeito quadrático da variável pH apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) e positiva, indicando assim a presença da geração de açúcares, sendo este pH 6,0. Resultados semelhantes foram relatados por autores onde indicaram que máximas atividades da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* foram obtidos utilizando pH 6,0 (CRUZ et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais possibilitou a produção de enzimas amilolíticas e o farelo fermentado íntegro possibilitou a sacarificação da biomassa algal. As quantidades de açúcares redutores foram aumentadas em todos os experimentos, e somente a variável pH apresentou um efeito quadrático significativo ($p < 0,05$) e positivo. A biomassa da *Spirulina platensis* apresentou-se como uma boa fonte de substrato para a geração de açúcares redutores.

5 REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.
- COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. **Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas**, Vetor, v. 12, p. 61 – 78, 2002.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N.B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. p. 245-249, 2011.
- HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; M.R., H. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food humans and feeds for domestic animals and fish. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 1034, p.1-33, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo, 1985. v.1 – Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas** – princípios e aplicações. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Washington, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n.4, p. 805-811, 2007.