

Área: Ciência de Alimentos

## INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO MICROALGAL SOBRE A HIDRÓLISE A PARTIR DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS

Angela Luiza Astolfi\*, Maycon Alves, Vítor Augusto Farina Cavanhi, Ana Cláudia Margarites, Alan Rempel, Luciane Maria Colla, Jorge Alberto Viera Costa

*Laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos, Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos*

*Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

*\*E-mail: angelaastolfi@hotmail.com*

**RESUMO** –As microalgas representam uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol de terceira geração. A hidrólise dos polissacarídeos intracelulares da microalga é uma etapa preliminar necessária para posterior produção de bioetanol, e quando esta hidrólise é realizada via utilização de enzimas, é influenciada por diversos parâmetros, como temperatura, pH, concentração de substrato, concentração de enzimas, entre outros. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da concentração de substrato na hidrólise dos carboidratos da microalga *Spirulina* sp. através das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase. As concentrações de biomassa microalgal testadas foram 5, 10, 20 e 30%. Para tal, às soluções de biomassa em tampão fosfato pH 5,5 foram adicionadas as enzimas amilolíticas e após incubação, foi determinada a concentração de açúcar redutor gerado para cada uma das enzimas avaliadas. Observou-se que a maior concentração de açúcares redutores foi obtida na concentração mais alta de biomassa de microalga (30%) para ambas as enzimas.

**Palavras-chave:** *Spirulina* sp., concentração de sólidos, bioetanol.

### 1 INTRODUÇÃO

A área de alimentos, bem como dos biocombustíveis, farmacêutica, ambiental e de química fina, tem impulsionado o estudo no desenvolvimento de pesquisas relacionadas a catalise enzimática, visando a compreensão da estabilidade, estrutura e mecanismos de ação das enzimas (CINELLI,2012).

Dentre as enzimas industriais, as amilases e amiloglicosidases estão entre as mais importantes, apresentando grande importância biotecnológica, representando 25% do mercado mundial de enzimas (BORGIO, 2011; KUMAR; SAHAI; BISARIA, 2012).

As enzimas amilolíticas atuam sinergicamente sobre seu substrato de ação, o amido, degradando este polissacarídeo em oligossacarídeos e glicose. Desta forma são necessárias diversas enzimas agindo em conjunto para converter completamente o amido em glicose (VAN DER MAAREL et al., 2002).

A *Spirulina platensis* é uma microalga que possui elevado teor de proteína. Entretanto, modificações em condições de cultivo de microalgas, como concentração de nutrientes, podem colaborar para o acúmulo de

componentes de reserva intracelular, como os carboidratos. Os carboidratos presentes em células de *Spirulina* são, em sua maioria, amido (HO et al, 2013).

Os carboidratos microalgais podem ser aplicados na tecnologia de produção de bioetanol de terceira geração, porém há a necessidade da prévia hidrólise destes liberando açúcares fermentescíveis que podem ser fermentados por leveduras (TALEKAR et al., 2013).

O rendimento em bioetanol pode ser afetado por variáveis como a quantidade de carboidratos presentes na biomassa microalgal investigada (WINGREN et al., 2003). Porém, quando são utilizadas concentrações acima de 10-20% podem ocorrer problemas técnicos para se realizar a hidrólise. A viscosidade inicial do material nessas concentrações é alta, dificultando a agitação e aumentando o consumo de energia em tanques agitados (FAN et al., 2003; MOHAGHEGHI et al., 1992). Há também a dificuldade de difusão das enzimas quando há elevada concentração de sólidos no meio.

Neste sentido, objetivo do trabalho foi investigar o efeito da concentração da microalga *Spirulina* sp testando as faixas de concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% sobre a ação das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase nos polissacarídeos microalgal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Biomassa microalgal e caracterização química

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi utilizada na forma seca, proveniente de cultivos realizados na planta de produção de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A biomassa foi moída em moinho de facas e padronizada em 40 mesh ou abertura de 420  $\mu$ m.

A biomassa seca foi caracterizada quanto ao teor de carboidratos e proteínas, lipídios, cinzas e minerais. Para as determinações de carboidratos e lipídios a parede celular da microalga foi previamente rompida para liberação dos compostos intracelulares. Este rompimento celular foi realizado em autoclave á 121 °C por vinte minutos. Para realizar tal análise foram adicionados 5 mg de biomassa em 10 mL de água destilada e posterior autoclave. Após realizada a ruptura celular foi determinado o teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O teor de proteínas da biomassa algal foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry et al., (1951). Para determinação do teor de lipídeos, a quantificação foi realizada de acordo com Folch et al., (1957) modificado por Colla et al.,(2004). A umidade foi determinada por secagem direta em estufa a 105°C até peso constante, e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen, seguida de incineração em forno mufla a 550°C, baseando-se no método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

### 2.2 Avaliação da hidrólise microalgal

Antes de realizar a hidrólise foi necessário realizar um pré-tratamento da biomassa, que consiste em romper a parede celular da biomassa microalgal para ocorrer a liberação dos compostos intracelulares. Foi realizado pelo método de congelamento e descongelamento (24h / 24h), proposto por Rempel et al., (2017).

As enzimas utilizadas para hidrolisar os polissacarídeos da microlaga *Spirulina* foram a  $\alpha$ -amilase (Liquozyme Supra 2.2X) e amiloglucosidase (AMG 300L) cedidas pela Novozymes Latin América. A determinação da hidrólise a partir das enzimas amilolíticas seguiu o método proveniente de estudos de Rempel et al (2017) que avaliou que ambas as enzimas amilolíticas possuem as mesmas condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50 °C). A atividade de enzimática foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados.

Foram testadas as seguintes concentrações de biomassa: 5%,10%, 20% e 30% (m/v) de biomassa seca de *Spirulina* em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5. Um volume de 4 mL desta solução foi adicionado de 40 $\mu$ L das soluções enzimáticas em tubos de ensaios e incubados em banho termostático a 50 °C por 1 hora (REMPEL et al., 2017). Após, as enzimas foram inativadas e precipitada as proteínas. Em seguida, foi determinado açúcares redutores (AR) pelo método 3,5-DNS, proposto por Miller (1959). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados com análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey com 95% de confiança.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização química da biomassa microalgal

A Tabela 1 apresenta a caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, em base seca, utilizada neste trabalho.

Tabela 1 – Caracterização química da biomassa *Spirulina* sp. LEB 18.

Componentes	Base Seca (g. 100 g <sup>-1</sup> )
Proteína	74,53 $\pm$ 0,81
Carboidratos	11,23 $\pm$ 0,08
Lipídios	2,89 $\pm$ 0,48
Cinzas	14,11 $\pm$ 0,01

Resultados de média  $\pm$  desvio padrão.

A concentração de carboidratos (CHO) (11,23%) presente na biomassa da microalga serviu de base para os cálculos de concentração de substrato polissacarídeo utilizados nos ensaios de determinação de açúcares redutores. As soluções de 5, 10, 20 e 30% de biomassa de *Spirulina* apresentaram 5,5, 11, 22 e 33 g<sub>carboidratos</sub>/L, respectivamente.

Dentre todos os componentes da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, se destaca o alto teor de proteína, indicando ser uma boa fonte alimentar. Assim, a continuação deste trabalho tem por objetivo além de produzir bioetanol com o componente carboidrato da biomassa microalgal, utilizará o resíduo da produção de bioetanol para obtenção de peptídeos ativos, se encaixando em um contexto de biorrefinaria.

#### 3.2 Avaliação da influência do substrato sobre a hidrólise microalgal

O estudo da influência da concentração de substrato na liberação de açúcares redutores (AR) das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase pode ser observado na Tabela 2, nas quais as enzimas apresentaram uma atividade enzimática de 0,69U/mL para a  $\alpha$ -amilase e 4,62 U/mL para a amiloglicosidase.

Tabela 2 - Açúcares redutores (AR) liberados pelas enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase (AMG) nos processos de hidrólise dos polissacarídeos de *Spirulina*.

Concentração de <i>Spirulina</i> (%)	AR (g/L)	
	$\alpha$ -amilase	AMG
5	0,298±0,002 <sup>a</sup>	0,330±0,007 <sup>a</sup>
10	0,602±0,005 <sup>b</sup>	0,609±0,022 <sup>ab</sup>
20	0,950±0,008 <sup>c</sup>	0,976±0,005 <sup>bc</sup>
30	1,250±0,002 <sup>d</sup>	1,593±0,033 <sup>c</sup>

Em cada coluna, as médias seguidas por letras iguais não apresentam diferenças significativas entre si em um nível de confiança de 95% (média  $\pm$  desvio padrão).

Observa-se que com o aumento da concentração de substrato a quantidade de açúcares redutores liberados aumentaram para as duas enzimas avaliadas. A enzima  $\alpha$ -amilase apresentou diferença significativa entre todos os tratamentos, apresentando a máxima liberação de AR com concentração de 30% de biomassa da microalga *Spirulina* sp LEB. O aumento da concentração de sólido contribui para o aumento da concentração de carboidratos presentes na amostra e conseqüentemente, gera maior concentração de etanol após o processo de fermentação alcoólica.

Para a enzima amiloglicosidase os tratamentos com 5% e 10% de concentração de sólidos não apresentaram diferença entre si. O mesmo apresentou-se com as concentrações de 20 e 30 % de concentração microalgal não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Guilherme et al., (2014) realizou experimentos com aumento da carga de sólidos sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar variando concentração de 10, 15 e 20% de sólidos e observou uma redução da conversão da celulose em glicose durante a hidrólise do bagaço com o aumento da carga de sólidos, provavelmente causando inibição da enzima pelos produtos formados (glicose e celobiose), ou alterações no substrato e limitações de transferência de massa. No nosso estudo, o uso de 30% de biomassa de *Spirulina* não foi suficiente para causar este efeito negativo.

Observando a Tabela 1, a quantidade de açúcares redutores liberados com a enzima amiloglicosidase é maior se comparados aos liberados com o uso da  $\alpha$ -amilase. Isso se deve ao fato que as enzimas  $\alpha$ -amilases hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glicose em união  $\alpha$ -1,4. O ataque ocorre na forma não seletiva tipo endoenzima (no interior do polímero) sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Já as amiloglicosidades são exoenzimas que agem nas extremidades das cadeias de amilose e amilopectina catalisando tanto as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 apresentando assim, maior liberação de açúcares redutores (PANDEY et al.,2005).

#### 4 CONCLUSÃO



Altas concentrações de sólidos da biomassa microalgal interferem na liberação de açúcares redutores, devido principalmente a maiores teores de carboidratos na amostra. Apesar da concentração de 30% de sólidos ser alta e aumentar viscosidade, dificultando o processo, esta apresentou-se a melhor concentração para a obtenção de açúcares diretamente fermentescível a partir da biomassa microalgal.

## 5 AGRADECIMENTOS

À UPF – Universidade de Passo Fundo pela infraestrutura, à os colegas do laboratório Labio e à CAPES pelo apoio financeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

BORGIO, J. F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.

CINELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. Dissertação de mestrado – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fattyacids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperature sand nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 59, p. 55-59, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

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

HO, S. H., HUANG, S.W., CHEN, C. Y., HASUNUMA, T., KONDO., A., CHANG, J.; Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed. V. 1. São Paulo, 1985.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels**. 2:11, 2009.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Production of amylase and chlamydo spores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124-128, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin-phenol reagent, **Journal of Biochemistry Engineering**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MILLER, G.L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

REMPEL, A., COLLA, L. M., MARGARITES, A. C., ZEN, C. K., MACHADO, T. P., TREICHEL, H., VELAZQUEZ, J., RUIZ, H. A. Study of pre-treatment and enzymatic saccharification of microalgal biomass for bioethanol production. **In: XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Aracaju, SE, 2017.

TALEKAR, S., PANDHARBALE, A., LADOLE, M., NADAR, S., MULLA, M., JAPHALEKAR, K., PATTANKUDE, K., ARAGE, D. Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): A tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. **Bioresource Technology**. v. 147, p. 269–275. 2013.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J. C. M., LEEMHUIS, H. e DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the I • }-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v.94, n.2, p.137-155. 2002.