



XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp
PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIBIC/SAE
QUOTA 2019/2020

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA DE MICROALGAS PARA A
PRODUÇÃO DE BIOETANOL 3G**

Aluna: Giovanna Alves Gasparotto (RA: 173177)

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Goldbeck

Co-orientadora: Maria Augusta de Carvalho Silvello

1. Introdução

O desenvolvimento de fontes de energia renováveis tem sido impulsionado devido a necessidade da substituição dos combustíveis fósseis por alternativas sustentáveis e com menores impactos ambientais. O bioetanol atende a essas demandas e, recentemente, a utilização de matérias-primas alternativas têm motivado pesquisas na área, dentre as quais as microalgas se destacam. As microalgas são microrganismos eucarióticos, consideradas a terceira-geração (3G) das matérias-primas para a produção de biocombustíveis por apresentarem maior taxa de crescimento e fixação de CO₂ em relação às outras gerações e altas produtividades teóricas de lipídios e carboidratos. A desestruturação da biomassa de microalgas, visando a obtenção de açúcares fermentescíveis para a posterior etapa de fermentação a etanol, pode ser realizada por diversas metodologias, entretanto maior atenção tem sido dada às hidrólises enzimáticas devido ao foco atual em investimentos em tecnologias sustentáveis e verdes. Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar as condições de hidrólise enzimática dos carboidratos presentes nas biomassas das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus brasiliensis* visando a produção de bioetanol 3G.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Hidrólise enzimática, Microalgas.

2. Objetivos

O principal objetivo proposto para o projeto consistiu em otimizar as condições de hidrólise enzimática dos carboidratos presentes na biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus brasiliensis* visando a produção de bioetanol 3G. Para tanto, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

- I. Otimizar a hidrólise das biomassas microalgais para cada enzima;
- II. Determinar a melhor formulação de misturas enzimáticas para maior liberação de açúcares redutores utilizando a metodologia de planejamento experimental;
- III. Realizar a fermentação da condição otimizada de hidrólise enzimática para a produção de bioetanol 3G;



IV. Determinar os parâmetros cinéticos, rendimentos e produtividades da fermentação da biomassa microalgal.

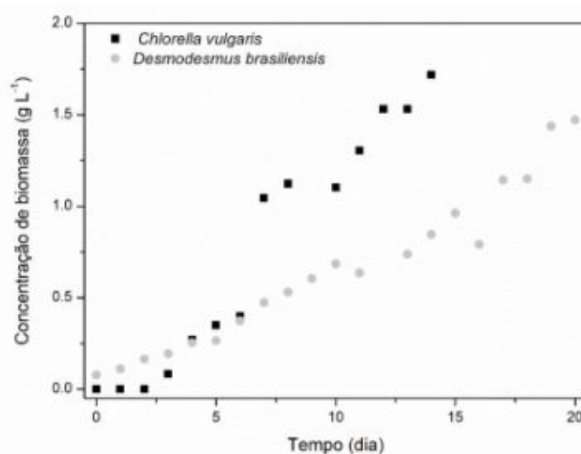
Destes, foram cumpridos integralmente os objetivos I e II. Considerando a pandemia da Covid-19, a realização das atividades III e IV foi impossibilitada pela suspensão das atividades presenciais na Unicamp, iniciada em 13 de março de 2020, de acordo com as resoluções GR-24/2020, GR-34/2020, GR-60/2020 e GR-65/2020 e posteriormente prorrogadas por tempo indeterminado pela Resolução GR no. 72/2020 de 29/06/2020 declaradas pela reitoria da UNICAMP.

3. Resultados

a. Curvas de crescimento das microalgas

As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus brasiliensis* foram cultivadas em meio BG-11 por 14 e 21 dias, respectivamente, tendo a *C. vulgaris* sido cultivada em um meio de cultivo com depleção de nitrogênio, enquanto a microalga *D. brasiliensis* foi incubada em um meio com a metade da concentração dos nutrientes sugeridos no meio padrão (BG-11). Foram obtidas, as curvas de crescimento de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Curvas de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* (em preto) e *Desmodesmus brasiliensis* (em cinza).



b. Curvas de saturação

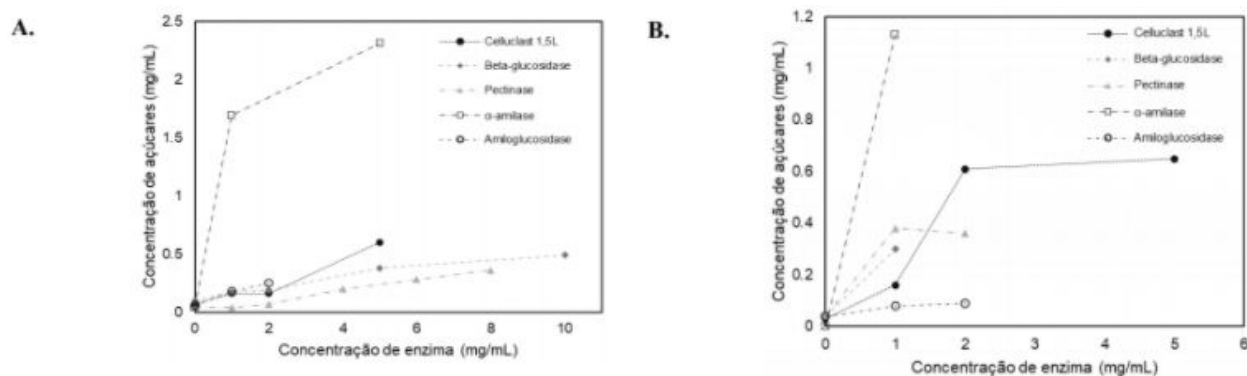
As enzimas estudadas foram: beta-glicosidase (NS-50010, Novozymes®), pectinase (Ultrazym AFPL, Novozymes®), α -amilase (Termamyl, Novozymes®), e amiloglucosidase (Megazyme®). O coquetel enzimático empregado foi o Celluclast 1,5L (Novozymes®). Para cada uma das enzimas, foi realizada uma curva de saturação de modo a determinar a quantidade mínima de proteína necessária para os ensaios.

As preparações enzimáticas foram quantificadas quanto às suas concentrações de proteína e submetidas aos ensaios de curva de saturação. Para isso, a atividade enzimática foi determinada frente ao aumento da concentração de enzima na solução a fim de identificar a concentração ideal de enzima a ser adicionada no planejamento experimental. A Figura 2 (A e B) apresenta as curvas



de saturação da concentração enzimática para *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus brasiliensis*, respectivamente.

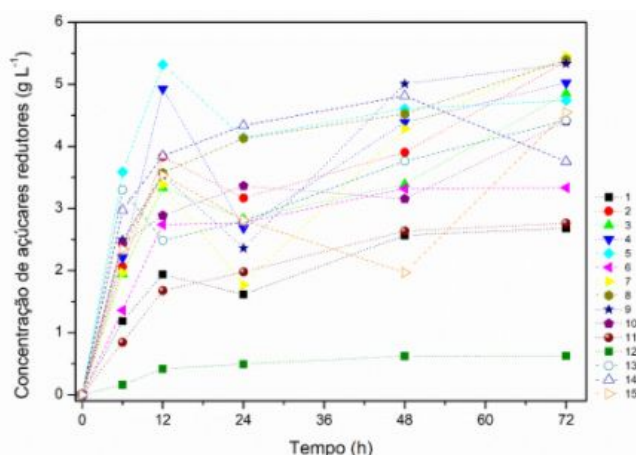
Figura 2. Curvas de saturação para as microalgas *Chlorella vulgaris* (A) e *Desmodesmus brasiliensis* (B). Foi realizado um escalamento de 10 vezes para a enzima α -amilase, de forma que facilitasse a visualização de sua atividade na biomassa.



c. Planejamento experimental

Uma vez identificadas as concentrações de saturação para cada enzima em relação a cada biomassa microalgal, um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman 12 (PB12) foi delineado. As variáveis independentes do planejamento experimental foram as 5 enzimas escolhidas e a resposta avaliada foi a liberação de açúcares redutores. Executado o planejamento experimental, as alíquotas coletadas a cada 12h para cada dos 15 ensaios realizados, numerados de 1 a 15, durante o processo de hidrólise foram analisadas quanto à concentração de açúcares liberados. A partir disso, uma cinética de liberação de açúcares fermentescíveis foi gerada para cada microalga. Foram gerados os gráficos das Figuras 3 e 4.

Figura 3. Cinética de açúcares do planejamento experimental de variáveis (DOE) - *Chlorella vulgaris*.

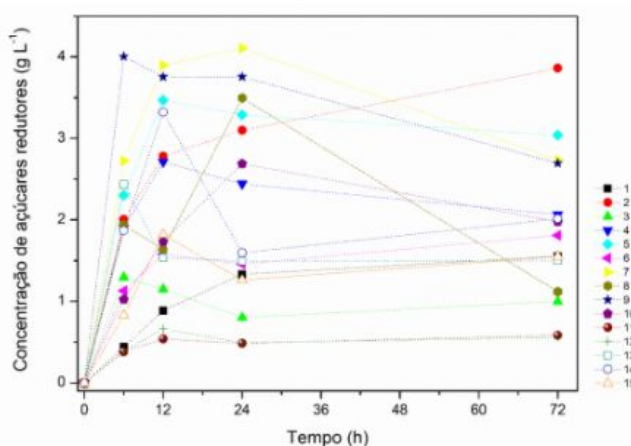


Verificou-se para a *Chlorella vulgaris* que apesar dos ensaios 4 e 5 apresentarem pico após 12h, a maior concentração de açúcares ocorre após 72h de início da hidrólise enzimática.



Portanto, o tempo de 72h foi selecionado para análise estatística do planejamento experimental de modo a identificar quais enzimas são significativas para a máxima hidrólise da biomassa, como observado na Figura 3. Os ensaios 2, 7, 8 e 9 mostram-se mais eficientes (esses ensaios possuem pelo menos uma das amilases presente). E corroborando com esses resultados, pela análise do planejamento as enzimas que são estatisticamente significativas são as amilases Termamyl e Amiloglucosidase. Dentre esses, o ensaio 9, que contém ambas as amilases e não contém as outras enzimas, que se mostram pouco influentes para a hidrólise, foi o selecionado.

Figura 4. Cinética de açúcares do planejamento experimental de variáveis (DOE) – *Desmodesmus brasiliensis*.



A Figura 4 apresenta a cinética de hidrólise enzimática da biomassa de *Desmodesmus brasiliensis*. Nesse caso, o maior aumento da concentração dos açúcares foi no ponto de 24h. Os ensaios 2 e 5 apresentaram maior eficiência, os quais apresentam as enzimas Celluclast e α -amilase. Para a análise do planejamento, o tempo escolhido foi de 24h. Pela análise do gráfico, as enzimas Celluclast e α -amilase (Termamyl) apresentaram efeito significativo na liberação de açúcares redutores para a hidrólise da biomassa de *D. brasiliensis*. Logo, o ensaio escolhido para aumento de escala em futuros experimentos é o ensaio 2, que não possui a enzima Beta-glucosidase, pouco influente para a hidrólise em questão.

4. Discussão / Conclusão

Conforme os resultados obtidos para hidrólise enzimática das biomassas, foi possível encontrar a composição ideal de concentrações enzimáticas para a máxima liberação de açúcares fermentescíveis das microalgas. Foi observado que diferentes enzimas são necessárias a hidrólise de cada microalga, o que sugere diferenças na composição da biomassa de cada uma delas.

Uma vez que as enzimas que apresentaram efeitos significativos para a hidrólise enzimática da biomassa foram duas amilases (enzimas responsáveis pela degradação da molécula de amido), compreende-se que a *C. vulgaris* em questão, cultivada na ausência de fonte de nitrogênio, foi capaz de armazenar energia na forma de amido. Dessa forma, foi possível obter uma preparação enzimática para hidrólise da biomassa de *C. vulgaris* com máxima liberação de açúcares fermentescíveis: Termamyl na concentração de $0,05 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ e Amiloglucosidase na concentração $0,2 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$. Nos ensaios futuros de fermentação para produção de etanol



essa combinação será empregada como coquetel enzimático hidrolítico.

Em relação à microalga *Desmodesmus brasiliensis* foi possível observar que as enzimas com efeito significativo foram celulasas (Celluclast 1,5L) e α -amilase (Termamyl). A celulose é um polissacarídeo que compõe a parede celular das microalgas, diferente do amido que é um polissacarídeo de reserva. A presença de celulasas – enzimas que degradam a celulose – sugere que a microalga não comprometeu seu crescimento celular em detrimento do acúmulo de amido e apresentou mais celulose da parede celular a ser degradada. A diferença entre as microalgas pode ser explicada pela diferença na composição dos meios de cultivos, uma vez que para a *D. brasiliensis* o meio apresentava redução da concentração de nitrogênio, fósforo e enxofre, porém não ausência de nitrogênio como no caso do meio de cultivo da *C. vulgaris*. Logo, para a *Desmodesmus brasiliensis*, a preparação enzimática que propiciou a maior liberação de açúcares redutores em 24h foi: Termamyl, concentração de $0,01 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$ e Celluclast 1,5L, concentração de $0,2 \text{ g}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{substrato}}$.

Portanto, foi possível otimizar a hidrólise das biomassas microalgais para cada uma das espécies, através da determinação da melhor formulação enzimática que propiciou a maior liberação de açúcares redutores para cada biomassa. Além disso, foi possível identificar mudanças na composição das microalgas decorrentes da alteração da disponibilidade de nutrientes do meio de cultivo.

Referências Bibliográficas

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>>.

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.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-111-1-1>>.