

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa*

M. F. S. MOTA<sup>1</sup>, M. F. SOUZA<sup>1</sup>, M. A. RODRIGUES<sup>2</sup>, S. P. FREITAS<sup>1</sup>, E. P. S. BON<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

E-mail para contato: nandaffcmota@gmail.com

**RESUMO** – As microalgas possuem uma composição química diversificada, podendo ser boas fontes de lipídios, carboidratos, proteínas, pigmentos e carotenoides, dependendo da espécie. A hidrólise enzimática é um método para obtenção de açúcares redutores e pode ser utilizada como uma etapa preliminar na obtenção de compostos de interesse a partir da biomassa algal. Nesse trabalho, *Chlorella pyrenoidosa*, uma alga verde que apresenta parede celular rica em carboidratos, foi submetida à hidrólise enzimática usando celulasas fúngicas e enzimas acessórias para produzir açúcares monoméricos. Foram realizados experimentos utilizando os sobrenadantes de culturas individuais de *Aspergillus awamori*, *Trichoderma harzianum* 422 e *Trichoderma reesei* RUT C30 com diferentes proporções de  $\beta$ -glicosidase e FPase. A biomassa algal foi submetida à hidrólise em sua forma íntegra e após tratamento em moinho de bola. Todos os preparados enzimáticos apresentaram rendimentos em glicose próximos de 60 % e 94 % após 6h e 48h, respectivamente, para a biomassa tratada em moinho de bola. Entretanto, nos experimentos com o material não tratado, o maior rendimento de glicose encontrado foi de 53,76 % em 24h utilizando apenas enzimas de *A. awamori* após redução de carga enzimática e aumento da carga de sólidos. Esses resultados comprovam que o preparado enzimático de *Aspergillus awamori* é o mais indicado para a hidrólise enzimática da biomassa algal e que o tratamento por moinho de bola é eficaz para essa biomassa.

### 1. INTRODUÇÃO

As microalgas tem sido alvo de diversos estudos para produção de biocombustíveis e bioprodutos por apresentar vantagens como: alto rendimento em biomassa e concentração lipídica elevada; não competir com a produção de alimentos, uma vez que não necessita de terras aráveis; não necessitar de água potável (Sheehan, 2009). Além disso, as microalgas podem ser utilizadas para a captura de carbono, podendo reduzir os níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera.

A utilização da biomassa algal vai ao encontro do conceito de biorrefinaria, onde a biomassa deve ser aproveitada integralmente, sendo utilizada para a produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol, e para a extração de compostos de alto valor agregado, como a clorofila, os carotenoides e proteínas (Spolaore et al., 2006). A integração desses processos é essencial para a viabilização da produção e a redução dos custos dos derivados de microalgas (Powell e Hill, 2009).

A hidrólise enzimática tem sido demonstrada como um bom método para obtenção de açúcares redutores e pode ser utilizada como uma etapa preliminar na obtenção de compostos de interesse a partir da biomassa algal. No entanto, devido ao alto custo das enzimas, uma etapa de pré-tratamento pode ser necessária para aumentar os rendimentos de hidrólise e, conseqüentemente, a viabilidade do processo.

Esse trabalho tem como objetivo avaliar a hidrólise enzimática da microalga *Chlorella pyrenoidosa* antes e depois de pré-tratamento em moinho de bola, com enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* RUT C30, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma harzianum* 422 e misturas com diferentes cargas de  $\beta$ -glicosidase e celulasas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Composição em Carboidratos da Biomassa

A determinação da composição da parede celular da microalga *Chlorella pyrenoidosa* foi realizada através de hidrólise ácida, utilizando o método descrito pelo NREL (Van Wychen & Laurens, 2013) e o método descrito por Northcote et al. (1958).

### 2.2. Tratamento em Moinho de Bola

O tratamento por moinho de bola foi realizado em um moinho vibratório (Fritsch, Alemanha) contendo 1 bola com amplitude 1,5 por 90 minutos.

### 2.3. Hidrólise Enzimática

Avaliação do pré-tratamento em moinho de bola: Ensaios de hidrólise enzimática com 5% de carga de sólidos utilizando a biomassa antes e depois do pré-tratamento em moinho de bola foram conduzidos com 5 cargas enzimáticas diferentes: *A. awamori* e *T. reesei* RUT C30 com 10 FPU e 20 e 30 BGU/g biomassa, *A. awamori* com 20 e 30 BGU/g biomassa e *T. reesei* RUT C30 com 10 FPU/g biomassa.

Comparação entre *T. reesei* RUT C30 e *T. harzianum* 422: Para a biomassa íntegra, ou seja, antes do pré-tratamento por moagem, foi realizado um ensaio hidrolítico comparando a eficiência das enzimas produzidas pelos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Trichoderma harzianum* 422. Os experimentos foram realizados com 5% de carga de sólidos e 5 FPU/g de glucana (carga minimizada após ensaios realizados em outro trabalho). Foram testadas 4 cargas enzimáticas diferentes: *A. awamori* e *T. reesei* RUT C30 com 20 BGU/g de glucana, *A. awamori* e *T. harzianum* 422 com 20 BGU/g de glucana, *T. reesei* RUT C30 e *T. harzianum* 422.

Comparação entre *A. awamori* e *T. harzianum* 422: Foi realizado um experimento com a biomassa íntegra comparando os perfis hidrolíticos obtidos com enzimas de *A. awamori* e *T. harzianum* 422 com mesma carga de  $\beta$ -glicosidase. Os experimentos foram conduzidos com 54 BGU/g de glucana e 25% de carga de sólidos (condições otimizadas por planejamento experimental realizado em outro trabalho).

Todos os experimentos de hidrólise foram conduzidos com uma massa total de 25g a 50°C, 200 rpm e pH 4,8 em tampão citrato de sódio 50 mM. A determinação de glicose ao longo da hidrólise enzimática foi realizada em analisador bioquímico YSI 2700.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Composição em Carboidratos da Biomassa

A composição de carboidratos da biomassa determinada por dois métodos baseados em hidrólise ácida encontra-se representada na Tabela 1. Os valores correspondem às médias das triplicatas independentes.

Tabela 1 – Comparação da composição de carboidratos da *Chlorella pyrenoidosa* determinado pelo método NREL e pelo método de Northcote et al. (1958)

Carboidratos	Glicose (%)	Xilose (%)	Galactose (%)	Arabinose (%)	Manose (%)
Método NREL	9,301±0,080	0,339±0,005	3,622±0,039	1,105±0,004	0,558±0,017
Método Northcote	8,327±0,461	0,266±0,029	3,052±0,145	1,009±0,065	0,417±0,041

As duas metodologias geraram caracterizações parecidas, porém o método NREL gerou valores percentuais de carboidratos maiores e menores desvios-padrão. Essa diferença se deve, possivelmente, à etapa de homogeneização do ácido com a biomassa existente nesse método, o que promove uma maior interação ácido-biomassa e uma hidrólise mais completa.

A caracterização dos carboidratos da biomassa comprova a necessidade de enzimas celulolíticas para a hidrólise dessa biomassa, já que a glicose foi o açúcar mais abundante.

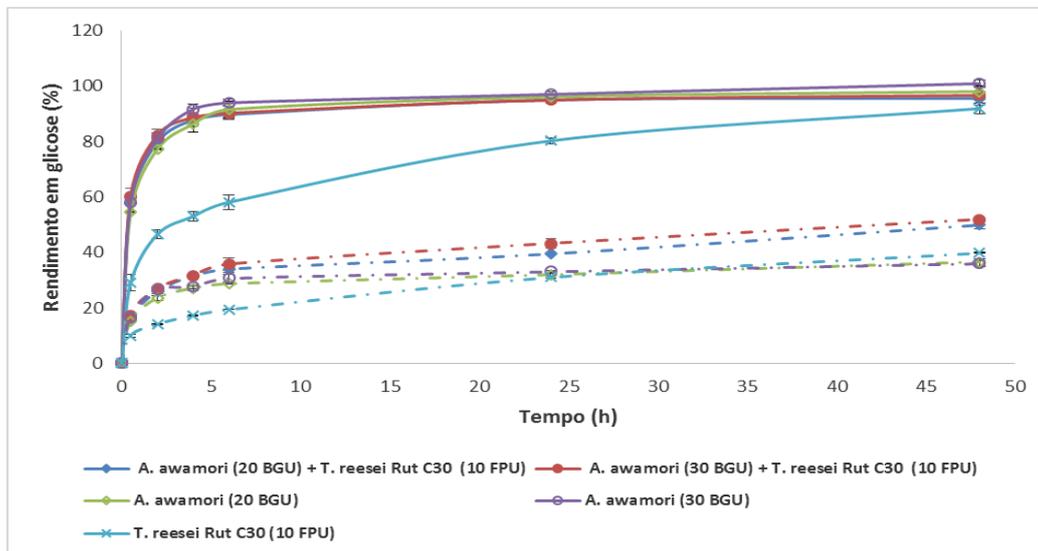
#### 3.2. Hidrólise Enzimática

Os rendimentos de glicose dos testes de hidrólise enzimática realizados com carga de 10 FPU/g de biomassa estão descritos na Figura 1, em que as linhas contínuas representam a hidrólise enzimática da microalga moída e as linhas pontilhadas representam a hidrólise da microalga íntegra.

Pode-se notar que o pré-tratamento em moinho de bolas aumentou significativamente o rendimento da hidrólise enzimática. Observa-se também que, para a hidrólise dessa biomassa, não é necessário a presença de exoglucanases (enzimas que atuam na região cristalina da celulose), uma vez que a preparação enzimática de *A. awamori*, rica principalmente em  $\beta$ -glicosidase, gerou rendimentos similares à preparação enzimática de *T. reesei-A. awamori*. Já para a biomassa íntegra, a mistura *T. reesei-A. awamori* gerou rendimentos maiores.

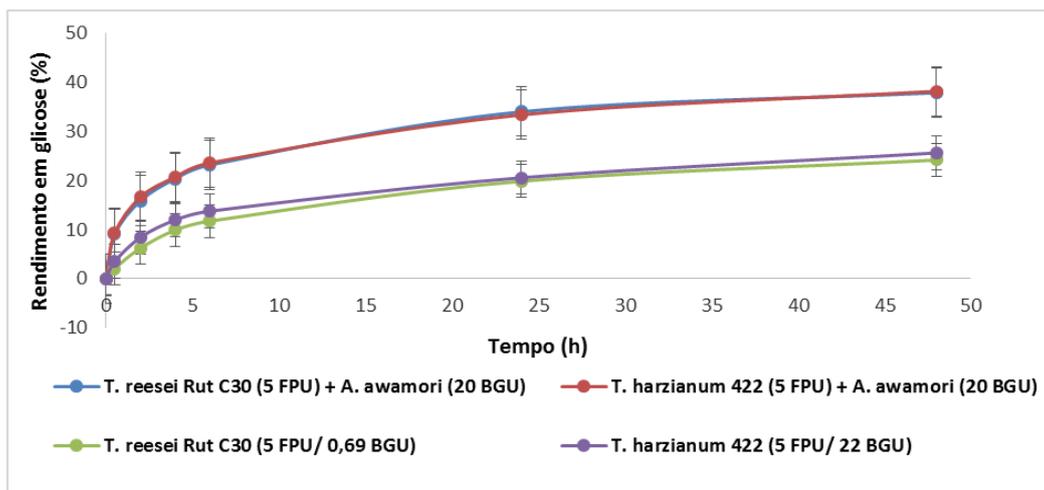
O aumento de rendimento da hidrólise enzimática causado pelo pré-tratamento em moinho de bola ocorreu, provavelmente, devido ao aumento da área superficial, melhorando a interação das enzimas com o substrato.

Figura 1 - Rendimento de glicose para hidrólise enzimática da biomassa algal antes (linhas pontilhadas) e depois (linhas cheias) do pré-tratamento em moinho de bola com enzimas do *T. reesei* RUT C30, *A. awamori* e misturas de ambas.



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

Figura 2 - Rendimento em glicose da hidrólise da microalga íntegra utilizando as enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30, *T. harzianum* 422 e *A. awamori*.

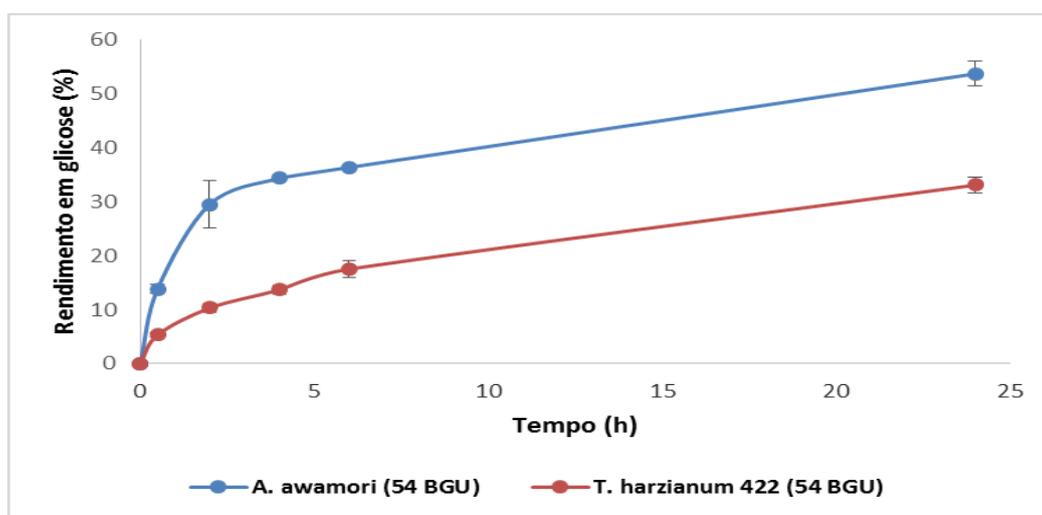


Conforme mostra a Figura 2, a presença das enzimas de *A. awamori* é importante para a hidrólise da biomassa íntegra, gerando um aumento maior que 10 % no rendimento de hidrólise enzimática quanto comparado à hidrólise utilizando as enzimas separadamente. As enzimas dos fungos *T. reesei* RUT C30 e *T. harzianum* 422 não geraram diferença nos

rendimentos de hidrólise entre si, apesar da maior carga de  $\beta$ -glicosidase no preparado do *T. harzianum*. Esse resultado leva a crer que a  $\beta$ -glicosidase produzida por *A. awamori* possui maior afinidade pelo material da microalga, sendo importante na hidrólise do mesmo.

Para testar essa hipótese, foi realizado um experimento comparando os diferentes perfis enzimáticos obtidos padronizando-se as cargas de  $\beta$ -glicosidase produzidas por *T. harzianum* e por *A. awamori*. A Figura 3 apresenta os rendimentos de glicose obtidos com preparados de *A. awamori* e de *T. harzianum*.

Figura 3 - Rendimento em glicose da hidrólise da microalga íntegra utilizando as enzimas dos fungos *T. harzianum* 422 e *A. awamori*.



O rendimento em glicose utilizando o sobrenadante do cultivo de *A. awamori* foi maior ao obtido com o *T. harzianum* 422. Esses resultados indicam que a  $\beta$ -glicosidase de *A. awamori* é a mais indicada para a hidrólise da biomassa algal.

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados podemos concluir que o pré-tratamento em moinho de bolas é eficiente para a biomassa algal, aumentando significativamente o rendimento da hidrólise enzimática.

A presença de exoglucanases para ser desnecessária para a hidrólise da microalga, uma vez que o preparado de *A. awamori* foi capaz de hidrolisar a biomassa moída e apresentou apenas uma pequena redução no rendimento final na hidrólise da biomassa íntegra. O preparado enzimático de *Aspergillus awamori* foi mais eficiente na hidrólise da microalga do que o preparado produzido por *T. harzianum* 422 em condições de mesma carga de  $\beta$ -glicosidase.

## 5. REFERÊNCIAS

NORTHCOTE, D.H., GOULDING, K.J., HORNE, R.W. The Chemical Composition and Structure of the Cell Wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Journal*, 70 (3), 391-397. 1958.

POWELL, E.E., HILL, G.A. Economic assessment of an integrated bioethanol-biodiesel-microalgal fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 1340-1348. 2009.

SHEEHAN, J. Engineering direct conversion of CO<sub>2</sub> to biofuel. *Nature Biotechnology*, 27, 1128–1129. 2009.

SPOLAORE, P., JOANISS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2), 87–96. 2006.

VAN WYCHEN, S., LAURENS, L.M.L. Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-5100-60957. 2013.