

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Angela Luiza Astolfi

**Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa algal e amido e
uso do resíduo do processo de fermentação para obtenção de biopeptídios**

Passo Fundo

2019

Angela Luiza Astolfi
Engenheira de Alimentos

Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa algal e amido e uso do resíduo do processo de fermentação para obtenção de biopeptídios

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla
Linha de pesquisa: Processos Biotecnológicos e não Convencionais na Produção de Alimentos e Ingredientes.

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

A856s Astolfi, Angela Luiza
Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa algal
e amido e uso do resíduo do processo de fermentação para
obtenção de biopeptídios / Angela Luiza Astolfi. – 2019.
121 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Profª. Dra. Luciane Maria Colla.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Biocombustíveis. 2. Spirulina. 3. Biomassa
– Fermentação. 4. Amido – Fermentação. I. Colla,
Luciane Maria, orientadora. II. Título.

CDU: 620.91

Catálogo: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINAVETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

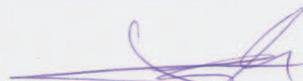
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Sacarificação e fermentação simultânea de biomassa algal e amido e uso do resíduo
do processo de fermentação para obtenção de biopeptídeos

Elaborada por
Angela Luiza Astolfi

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

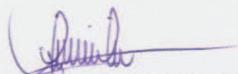
Comissão Examinadora



**Jorge Alberto Vieira Costa, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)**



**Luciane Maria Colla, Dra., UPF
(Coorientadora)**



Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF



Helen Treichel, Dra., UFFS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2019**

*Dedico esta conquista
a Eduardo Saccardo, uma pessoa especial na minha
vida
e a minha família, por todo apoio e incentivo.*

Obrigada por sempre estarem ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e abençoar esta etapa da minha vida.

A Eduardo meu porto seguro que sempre me incentivou com muita alegria, sabedoria e amor nesses últimos anos.

Aos meus familiares Cezer, Salete, Júlio, Rubens, Elis e em especial minha irmã Viviane pela amizade, por cada palavra de incentivo e por me ajudar não só nesta conquista como em tantas outras da minha vida.

Aos meus Professores orientadores: Dr. Jorge A. V. Costa e a Dr^a Luciane M. Colla pela oportunidade, paciência e conhecimento compartilhado na realização deste trabalho. Obrigada, vocês fazem a diferença na ciência e na pesquisa.

Aos bolsistas de iniciação científica Vítor e Maycon pela disponibilidade, garra e confiança durante os experimentos.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LABIO) em especial a Ana Cláudia, Alan e Elionio pelo conhecimento e ajuda compartilhada.

As minhas amigas da turma de mestrado de 2017 pela companhia e amizade.

Ao Alessandro e Sandy pela ajuda, conhecimento e disponibilidade na realização da eletroforese.

A Universidade de Passo Fundo - UPF, em especial, o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ao laboratório de aulas práticas, ao CEPA, professores e funcionários por possibilitarem minha formação.

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

A CAPES, órgão concessor da bolsa de mestrado que possibilitou a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que convivi durante esses dois anos que de alguma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos muito obrigada!

“Os problemas significativos com os quais nos
deparamos não podem ser resolvidos no
mesmo nível de pensamento em que
estávamos quando eles foram criados.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A *Spirulina platensis* se destaca entre as microalgas por ser considerada segura para o consumo humano. É reconhecida como uma fonte não convencional de proteínas em função da sua constituição favorável deste nutriente (46 a 63%), possuindo concentração superior à das carnes e da soja. Além disso, apresenta potencial como matéria-prima para a produção de bioetanol, podendo apresentar entre 8,0 e 14,0% de carboidratos em cultivos sem a finalidade de acúmulo deste componente. O processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) vem se destacando na produção de etanol principalmente devido a um menor consumo de energia, maior rendimento de etanol, redução do tempo de processo, menores riscos de contaminação e redução na inibição do produto final. O resíduo formado nesse processo apresenta alto teor proteico e quando hidrolisado obtém biopeptídeos que podem ser uma alternativa para serem incorporados no consumo de alimentos ou rações de animais com maior valor nutritivo, além da sua capacidade antioxidante. Neste sentido, abrange-se o conceito de Biorrefinarias, no qual refere-se ao uso das biomassas e seus resíduos, utilizando matérias-primas de fontes renováveis, de forma integrada e diversificada para a produção de biocombustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse no mercado industrial, com a geração mínima de resíduos e de emissão de gases nocivos. Objetivou-se realizar a SSF da biomassa de *Spirulina platensis* e amido de milho para produção de bioetanol e utilizar os resíduos do processo para a obtenção de biopeptídeos. O trabalho foi dividido em duas etapas, sendo a primeira a produção de bioetanol variando a temperatura e as concentrações de amido de milho e de *Spirulina* avaliando a concentração de açúcares redutores e de etanol durante o processo de SSF. Encontrada a melhor condição foram avaliadas concentrações de enzima de 1, 0,5 e 0,25% para o aumento de escala na produção de bioetanol. O aumento de escala foi de 10 vezes maior e ocorreu em Biorreator no qual gerou resíduo proteico que em uma segunda etapa foi hidrolisado com enzima protease e avaliado quanto a sua capacidade antioxidante, alterações dos grupos funcionais, estabilidade térmica e massa molecular. A melhor condição de produção de bioetanol produziu 73 g.L⁻¹ de etanol em 30 °C e ao aumentar a escala de produção de bioetanol utilizando a menor concentração de enzima observou-se que o rendimento de bioetanol se manteve. O resíduo apresentou alto teor de proteínas e quando foi submetido a hidrólise obtve-se alto grau de hidrólise expondo os biopeptídeos que apresentaram inibição do radical ABTS de 32%. Os resultados de estabilidade térmica revelaram que em relação a biomassa de *Spirulina* e ao resíduo os biopeptídeos apresentaram maior estabilidade térmica. A análise de eletroforese comprovou que as proteínas foram hidrolisadas e os biopeptídeos apresentaram massa molecular menor de 5 kDa, indicando que estes podem ser adionados como um ingrediente funcional tornando um alimento de alto valor agregado. Diante disso, este estudo demonstrou que é possível desenvolver uma biorrefinaria integrada produzindo bioetanol e utilizando o resíduo para a produção biopeptídios no qual é considerado um coproduto de alto valor agregado podendo ser uma alternativa para serem incorporados no consumo de alimentos fornecendo funcionalidade e maior valor nutritivo, agregando assim maior viabilidade e sustentabilidade no processo.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Biorrefinaria. Bioetanol. Biopeptídeos.

ABSTRACT

Spirulina platensis stands out among microalgae because it is considered safe for human consumption. It is recognized as an unconventional source of protein, due to its favorable constitution of this nutrient (46 to 63%), having a higher concentration than meat and soy. In addition, it presents potential as a raw material for the production of bioethanol, being able to present between 8.0 and 14.0% of carbohydrates in crops without the purpose of accumulation of this component. The process of saccharification and simultaneous fermentation (SSF) has been highlighted in ethanol production mainly due to lower energy consumption, higher ethanol yield, shorter process time, lower risk of contamination and reduction in inhibition of final product. The residue formed in this process presents high protein content and when hydrolyzed it obtains biopeptides that can be an alternative to be incorporated in the consumption of foods or rations of animals with greater nutritive value, besides its antioxidant capacity. In this sense, the concept of Biorefineries, which refers to the use of biomass and its residues, using raw materials from renewable sources, is integrated and diversified for the production of biofuels, chemicals, energy and other materials of interest in the industrial market, with the minimum generation of waste and the emission of noxious gases. The objective of this study was to perform the SSF of *Spirulina platensis* biomass and corn starch to produce bioethanol and to use the process residues to obtain biopeptides. The work was divided in two stages, the first one being the production of bioethanol varying the temperature and the concentrations of corn starch and *Spirulina* evaluating the concentration of reducing sugars and ethanol during the SSF process. The best condition was found to have enzyme concentrations of 1, 0.5 and 0.25% for the scaling up of bioethanol production. The increase of scale was 10 times higher and occurred in Bioreactor in which generated protein residue that in a second step was hydrolyzed with protease enzyme and evaluated for its antioxidant capacity, changes in functional groups, thermal stability and molecular mass. The best bioethanol production condition produced 73 g.L⁻¹ ethanol at 30 °C and by increasing the bioethanol production scale using the lowest enzyme concentration the bioethanol yield was maintained. The residue presented a high protein content and when it was submitted to hydrolysis it was obtained a high degree of hydrolysis exposing the biopeptides that showed inhibition of the ABTS radical of 32%. The results of thermal stability revealed that in relation to *Spirulina* biomass and to the residue the biopeptides presented greater thermal stability. The electrophoresis analysis showed that the proteins were hydrolyzed and the biopeptides presented molecular mass less than 5 kDa, indicating that these can be added as a functional ingredient making a food of high added value. Therefore, this study demonstrated that it is possible to develop an integrated biorefinery producing bioethanol and using the residue for the production biopeptides in which it is considered a high value-added co-product and can be an alternative to be incorporated into food consumption providing functionality and higher nutritional value, thus adding greater viability and sustainability in the process.

Keywords: *Spirulina platensis*. Biorefinery. Bioethanol. Biopeptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto microscópica da microalga <i>Spirulina</i>	27
Figura 2 - Esquematização do ciclo de uma biorrefinaria.	29
Figura 3 - Produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas.	30
Figura 4 - Representação das cadeias de amilose e amilopectina.	32
Figura 5 - Via metabólica da fermentação de etanol em <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 6 - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupos R).	40
Figura 7 - Esquema da metodologia experimental.	43
Figura 8 - Influência da concentração da biomassa de <i>Spirulina</i> na concentração de açúcares redutores das enzimas α -amilase e amiloglicosidase.	59
Figura 9 - Perfil da produção de bioetanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados com (a) 5% de amido + 15% <i>Spirulina</i> , (b) 10% de amido + 10% <i>Spirulina</i> e (c) 15% de amido + 5% <i>Spirulina</i> , respectivamente, na temperatura de 30 °C.	61
Figura 10 - Perfil da produção de bioetanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados com (a) 5% de amido + 15% <i>Spirulina</i> , (b) 10% de amido + 10% <i>Spirulina</i> e (c) 15% de amido + 5% <i>Spirulina</i> , respectivamente, na temperatura de 40 °C.	63
Figura 11 - Perfil da produção etanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios variando concentração de enzima, na temperatura de 30 °C.	66
Figura 12 - Perfil da produção etanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados em biorreator.	68
Figura 13 - Grau de hidrólise do resíduo da produção de bioetanol e obtenção de peptídeos.	70
Figura 14 - Porcentagem de inibição do radical ABTS ao longo da hidrólise do resíduo da produção de bioetanol.	72
Figura 15 - Coeficiente de correlação (R^2) entre o potencial antioxidante e o grau de hidrólise.	73
Figura 16 - Análise de FTIR para <i>Spirulina</i> , Resíduo e Peptídeo.	74
Figura 17 - Análise Termogravimétrica (TGA) da <i>Spirulina</i> sp, resíduo e biopeptídeos.	76
Figura 18 - SDS-PAGE das proteínas presentes no padrão, na biomassa da <i>Spirulina</i> (S), no resíduo (R) e no biopeptídeo (P).	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes da biomassa microalgal e aplicações.....	26
Tabela 2 - Variação das concentrações de amido de milho, biomassa de <i>Spirulina</i> e da temperatura.....	47
Tabela 3 - Quantidade de cada enzima em relação a quantidade de carboidrato.....	48
Tabela 4 - Caracterização química da biomassa <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	57
Tabela 5 – Atividade enzimática das enzimas α -amilase e amiloglicosidase em diferentes substratos.....	58
Tabela 6 - Eficiência de hidrólise (EH) da biomassa microalgal de <i>Spirulina</i> com enzimas amilolíticas.....	60
Tabela 7 - Eficiência de Pré-hidrólise (2 h) e eficiência de etanol SSF.....	64
Tabela 8 - Eficiência de Pré-hidrólise (2 h) e eficiência de etanol para os ensaios de concentração de enzima.....	67
Tabela 9 – Caracterização química do resíduo da SSF realizada em biorreator.....	69
Tabela 10 - Calorimetria exploratória diferencial da <i>Spirulina</i> sp, do resíduo e do peptídeo..	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	MICROALGAS	25
2.1.1	A microalga <i>Spirulina platensis</i>	27
2.2	BIOMASSAS E BIORREFINARIA	28
2.3	BIOETANOL PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF).....	31
2.3.1	Enzimas envolvidas na produção de bioetanol.....	34
2.4	PROTEÍNAS DE MICROALGAS	36
2.4.1	Composição em Aminoácidos	37
2.5	PEPTÍDIOS BIOATIVOS	38
2.5.1	Fracionamento e caracterização dos peptídeos bioativos.....	40
2.5.1.1	<i>Protease</i>	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	MICROALGA <i>SPIRULINA</i> SP.....	43
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	43
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS AMILOLÍTICAS.....	44
3.4	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	45
3.5	PRODUÇÃO DE BIOETANOL PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF)	46
3.5.1	Microrganismo e preparo do inóculo	46
3.5.2	Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)	47
3.5.3	Variação da concentração de enzima para aumento de escala na produção de bioetanol.....	49
3.5.4	Aumento de escala para a produção de bioetanol.....	49
3.5.5	Cálculos de eficiência na produção de bioetanol	50
3.6	OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS.....	51
3.6.1	Caracterização química do resíduo	51
3.6.2	Hidrólise proteica	51

3.6.3	Determinação do grau de hidrólise das proteínas	52
3.6.4	Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS.....	52
3.6.5	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.6.6	Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).....	53
3.6.7	Eletroforese	54
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	ETAPA 1: PRODUÇÃO DE BIOETANOL ATRAVÉS DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SILMUTÂNEAS.....	57
4.1.1	Caracterização química da biomassa algal	57
4.1.2	Atividades das enzimas amilolíticas e a influência da concentração de substrato sobre a hidrólise microalgal	58
4.1.3	Sacarificação e fermentação silmultânea utilizando biomassa de <i>Spirulina</i> sp e amido de milho na produção de bioetanol	61
4.1.4	Estudo de concentração de enzima para aumento de escala	66
4.1.5	Aumento de escala para a produção de bioetanol a partir da biomassa de <i>Spirulina</i> sp com adição de amido de milho.....	68
4.2	ETAPA 2: PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO BIOMASSA DE <i>SPIRULINA</i> SP ADICIONADA DE AMIDO DE MILHO	69
4.2.1	Caracterização química do resíduo.....	69
4.2.2	Grau de hidrólise	70
4.2.3	Atividade antioxidante	71
4.2.4	Avaliação de espectroscopia na região do infravermelho	74
4.2.5	Estabilidade Térmica.....	75
4.2.6	Eletroforese	77
5	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO.....	93
	ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da sociedade nos próximos séculos é conciliar o crescente aumento da população com o aumento da oferta por alimentos saudáveis e energia para suprir as necessidades industriais. Além disso, a qualidade sanitária, nutricional e funcional dos alimentos consumidos tem sido buscada diariamente pelos consumidores que em paralelo também se preocupam com os impactos ambientais causados com os processos de produção e com o destino final dos resíduos.

Nos últimos anos, discute-se o conceito de refinarias de alimentos a fim de que as diferentes fontes de biomassa possam ser convertidas em uma variedade de produtos, como uma alternativa para a redução dos custos dos processos e dos produtos, resultando na oferta para os consumidores atendendo as necessidades desejadas, incluindo a sustentabilidade.

As biomassas renováveis estão se destacando como uma fonte de matéria-prima com grande potencial no conceito das biorrefinarias. No Brasil a produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas como o milho e a cana-de-açúcar já estão utilizando este conceito, cujo o objetivo principal é diminuir o consumo de reservas de combustíveis fósseis, produzir coprodutos de alto valor agregado e ainda com a utilização dos produtos fornecidos dessas matérias-primas vegetais ou até mesmo as algas é possível diminuir os gases do efeito estufa (GEEs) uma vez que para o crescimento e desenvolvimento destas fontes de matérias-primas é necessário o dióxido de carbono (CO₂).

A microalga *Spirulina platensis* se destaca como uma biomassa com grande potencial no conceito das biorrefinarias. Devido aos seus altos teores de proteína ou de carboidrato, recentemente vem sendo estudada para a produção de biocombustíveis de terceira geração, que quando combinados com a produção de coprodutos de alto valor agregado, pode se obter ingredientes funcionais, como os antioxidantes podendo ser aplicados em alimentos (ZHU et al., 2014; DE OLIVEIRA, 2016).

A terceira geração de biocombustíveis a partir de biomassa algal vem sendo indicada como uma ótima alternativa. Não necessita de grandes áreas agricultáveis para sua produção, pode se desenvolver em ampla variedade de ambiente, inclusive em águas residuais, apresenta alta absorção CO₂ e principalmente não compete com a produção de alimentos (SIRAJUNNISA; SURENDRIRAN, 2016).

Um dos avanços mais importantes relacionados ao processo de produção de bioetanol é a implementação e desenvolvimento da sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), no qual a degradação enzimática do amido é combinado com a fermentação da glicose obtida a partir

da hidrólise dos polissacarídeos, tornando o processo com menor consumo de energia, maior rendimento de etanol, redução de tempo de processo, menores riscos de contaminação e redução na inibição do produto final (CHEN; LI, 2013).

Um fator importante que deve ser levado em consideração é que a SSF utilizando microalgas gera uma grande quantidade de resíduo com alto valor proteico, sendo este com elevado valor comercial. O uso deste coproduto pode ser destinado para a obtenção de biopeptídios podendo viabilizar economicamente o processo como um todo.

A indústria de alimentos tem interesse em coprodutos, principalmente aqueles que fornecem funcionalidade aos alimentos, promovendo a saúde do consumidor, como os suplementos dietéticos ou preparações farmacêuticas contendo peptídeos bioativos (SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2014). Os peptídeos bioativos são considerados como componentes de alimentos funcionais podendo exercer atividades reguladoras no organismo humano, como imunológicas, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas e anti-hipertensivas (RIZZELLO et al., 2016).

A presente dissertação se enquadra na linha de pesquisa de “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes”, dentro do projeto de pesquisa de “Produção de alimentos, ingredientes e produtos de interesse industrial por bioprocessos”, pois a proposta deste estudo foi utilizar a biomassa microalgal de *Spirulina platensis* e amido de milho para realizar a produção de bioetanol e a partir do resíduo do processo de SSF foram obtidos biopeptídeos. Este estudo é de grande interesse para a sociedade, contribuindo para meio ambiente por apresentar opções de matérias-primas para a produção de bioetanol que ao mesmo tempo poderá utilizar o resíduo gerado na etapa do processo de SSF, que possui alto grau proteico na obtenção de biopeptídeos que podem ser incorporados na alimentação humana de forma a enriquecê-la nutricional e funcionalmente.

Neste contexto o objetivo desta dissertação foi realizar a SSF da biomassa de *Spirulina platensis* e amido de milho para produção de bioetanol e utilizar os resíduos do processo para a obtenção de biopeptídeos. Tendo como objetivos específicos: a) avaliar a concentração de substrato para o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF); b) avaliar os percentuais de *Spirulina* e amido de milho e de temperatura no processo de SSF; c) verificar a melhor concentração de enzima para aumento de escala; d) aumentar de escala a produção de bioetanol; e) avaliar a eficiência da pré-hidrólise e do bioetanol obtido do processo de SSF; f) produzir hidrolisados proteicos a partir do resíduo formado; g) avaliar a atividade antioxidante, estabilidade térmica e massa molecular dos biopeptídeos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As algas podem ser classificadas em microalgas e macroalgas. As microalgas são organismos unicelulares, autotróficos, que utilizam a luz solar, a água e o CO₂ atmosférico para o seu crescimento (KRÖGER; MÜLLER, 2012).

As microalgas possuem vantagens quando comparadas com as macroalgas. Elas possuem maior produtividade de açúcar, devido, principalmente, ao rápido crescimento celular. Além disso, o principal monossacarídeo derivado dos carboidratos dos seres microscópicos é a glicose. Já nas macroalgas encontram-se alginato e manitol, os quais, são mais difíceis de fermentar, sendo mais desafiador converter macroalgas em etanol (HO et al., 2013).

Em contraste com as plantas aquáticas, as microalgas não têm embriões, raízes, caules e folhas reais. Elas têm a competência para usar água, luz solar e CO₂ para sintetizar a biomassa através da fotossíntese (ZHU, 2015). O que poderá afetar a obtenção da biomassa e de produtos metabólicos das microalgas são interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Em condições ótimas para seu crescimento, as microalgas se desenvolvem abundantemente e são capazes de normalmente dobrar a biomassa dentro de 24 h, ou até em 3,5 h na fase de crescimento exponencial (CHISTI, 2007).

A produção de biomassa de microalgas pode ser realizada em diversos sistemas, com volume variando desde mililitros até bilhões de litros. As microalgas são cultivadas em sistemas fechados ou abertos, que são aerados ou expostos ao ar para permitir que as cepas capturem CO₂ da atmosfera para crescimento celular (MORAIS, 2015). A forma mais simples são os sistemas abertos de cultivo, sendo os mais conhecidos as lagoas abertas rasas e os *raceways*, nestes são adicionados nutrientes para o início dos cultivos. Estes são mais utilizados por se caracterizarem como uma forma mais barata de implantação, porém apresentam baixo rendimento de produção devido a dificuldades em se controlar parâmetros como: temperatura, luminescência entre outros (HUNDT; REDDY, 2011). Os sistemas de cultivo fechado são constituídos por fotobiorreatores em uma matriz de tubos transparentes expostos a luz e neste é adicionado de forma constante uma fonte de dióxido de carbono e nutrientes. Este sistema é muito utilizado em indústrias, onde o dióxido de carbono é produzido em outros processos e posteriormente incorporado ao sistema (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em qualquer estação do ano, pois esses microrganismos toleram grandes variações de temperatura para seu cultivo. Além disso, podem

crescer utilizando o CO₂, como única fonte de carbono pelo metabolismo autotrófico, ou utilizar fontes de carbono orgânicas, como glicose e glicerol pelo metabolismo heterotrófico (ANDRADE; COSTA, 2008).

A biomassa de microalgas é composta de três componentes principais: proteínas, carboidratos e lipídios (JEGATHESE; FARID, 2014). Devido a estes componentes e dos subprodutos destes, a biomassa de microalgas está sendo cada vez mais estudadas por vários pesquisadores devido a sua variabilidade de aplicação como está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes da biomassa microalgal e aplicações.

Componentes	Aplicações	Microalga	Referência
Aminoácidos e Proteínas	Nutrição Humana e Animal, Antioxidantes	<i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i>	BATISTA et al., (2013)
Carboidratos	Bioetanol, Bioplásticos, Blocos construtores Químicos	<i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i>	MARGARITES, (2014); MORRENO et al., (2015)
Lipídeos	Biodiesel e Bioquerosene, Biossurfactantes, Lubrificantes Polímeros	<i>Chlorella</i>	SURENDHIRA N et al., (2014)
Biomassa	Biogás e energia, Fertilizantes, Biofixação de CO ₂ e tratamento de efluentes	<i>Spirulina</i>	COSTA et al., (2008)
Pigmentos	Nutrição Humana e animal, Biomédica (corantes) Exemplos: Ficocianina, Astaxantina, Cataxantina	<i>Spirulina</i>	REDDY et al., (2003)
Ácidos graxos poli-insaturados	Nutrição Humana e Animal, Cosméticos	<i>Spirulina</i>	SAJILATA; SINGHAL; KAMAT, (2008)

Além desse potencial energético, as microalgas possuem um potencial para a redução dos gases responsáveis pelo efeito estufa devido ao sequestro de CO₂. A partir desta matéria-prima existe um potencial de se obter rendimentos mais elevados na síntese de biodiesel e bioetanol comparado as outras diversas matérias-primas, proporcionando redução de cerca de 25% dos custos de produção.

2.1.1 A microalga *Spirulina platensis*

Os primeiros relatos do uso da *Spirulina* na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos, as quais são conhecidas como sendo do gênero *Spirulina* (RICHMOND, 1990).

Desde 1981 a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita pelo FDA (Food Drug Administration), como sendo fonte de proteínas, vitaminas e minerais, podendo ser legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada, livre de contaminantes e de adulteração (FOX, 1996).

A *Spirulina* ou também chamada de *Arthrospira*, (Figura 1) pertence ao reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família *Oscillatoriaceae* de cor verde azulada (TORTORA et al., 2007). Apresenta forma de tricomas cilíndricos multicelulares, com 1 a 12 mm de diâmetro, e se dispõe na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento. Através da fotossíntese, a *Spirulina* converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (TOMASELLI, 1997). As microalgas são de características fotoautotrófica, ou seja, utilizam energia luminosa na fotossíntese para o seu próprio desenvolvimento, no entanto estudos reportam o crescimento de algumas espécies de *Spirulina* em cultivos mixotróficos e heterotróficos, os quais utilizam fontes orgânicas de carbono (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004).

Figura 1 - Foto microscópica da microalga *Spirulina*.



Fonte: Lundquist et al., (2010).

A composição centesimal da *Spirulina platensis* é variável, depende das condições de cultivo, mas em base seca, geralmente apresenta elevado teor proteico (46% a 63%), carboidratos (8% a 14%) e lipídios (4% a 9%) (BECKER, 2007).

As proteínas da microalga *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptofano, fenilalanina e valina) que representam 47% do peso total das proteínas (DILLON et al., 1995).

Esta espécie é rica em vitaminas A, na forma de betacaroteno; vitamina C; vitaminas do grupo B (particularmente a vitamina B12); o ácido fólico e vitamina E. A microalga também contém vários pigmentos, tais como β -caroteno, ficocianina, clorofila, responsáveis pela ação antioxidante com efeitos significativos na eliminação de radicais livres e polissacarídeos (CHU et al., 2010; ESTRADA et al., 2001). Além do alto valor nutricional, a *Spirulina* também tem efeito biológico, imune, anti-viral e propriedades anti-câncer (KHAN, 2005).

O uso de microalgas, assim como a *Spirulina*, é legalmente autorizado como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sem efeitos tóxicos ao organismo (BELAY et al., 1993), pois é classificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), garantindo o uso nas áreas de alimentos, farmacêutica, médica e nutrição animal (MENDONÇA; DRUZIAN; NUNES, 2012).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite a comercialização de *Spirulina* desde que o produto final no qual a microalga tenha sido adicionada, seja isolada ou em mistura, esteja devidamente registrado e se enquadre nas categorias de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde ou substâncias bioativas, além disso, deve apresentar especificações dos ingredientes, incluindo a identificação da espécie de alga e seu local de cultivo (ANVISA, 2009).

A *Biomass Algae Organization* tem reportado seiscentas empresas nos Estados Unidos focadas no desenvolvimento de produtos de microalgas. Simultaneamente, o governo investe a cada ano no desenvolvimento de novas energias a partir destes organismos. A cianobactéria *Spirulina* tem uma produção mundial anual de 3.000 toneladas de biomassa em massa seca, e a partir desta biomassa, são gerados cosméticos e produtos de consumo humano e animal; outro produto que gera grande lucro é o ômega-3, vendido a valores acima de 160 US\$/kg (OILGAE, 2015).

2.2 BIOMASSAS E BIORREFINARIA

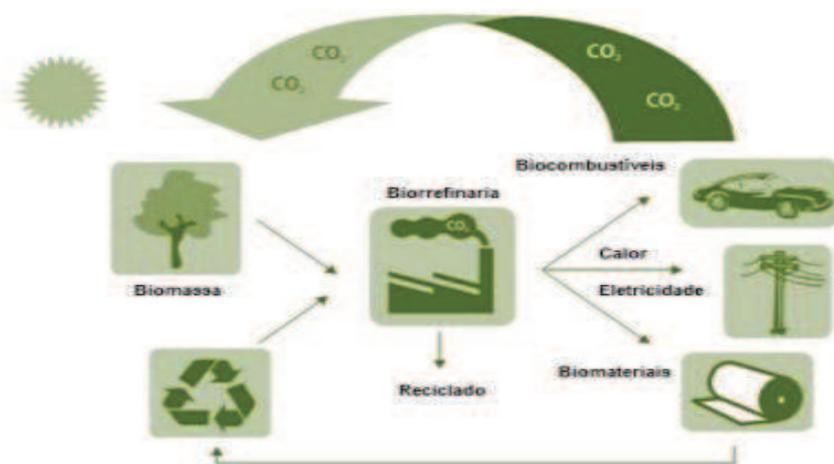
As necessidades de reduzir as emissões de gases do efeito estufa e de buscar a sustentabilidade na produção de energia e combustíveis fazem com que a utilização de biomassas para esses fins se torne uma opção interessante. As biomassas se utilizadas eficientemente passam a ser de grande importância, e é neste âmbito que o conceito de

biorrefinaria se aplica (GHATAK, 2011). O termo biorrefinaria é relativamente novo, referindo-se ao uso das biomassas e seus resíduos, portanto matérias-primas de fontes renováveis, de forma integrada e diversificada para a produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse no mercado industrial, com a geração mínima de resíduos e emissões de gases nocivos.

Uma biorrefinaria pode ser uma instalação industrial ou até mesmo um processo, que tem como característica o processamento de biomassa com a geração de produtos ou materiais energéticos (IEA, 2009). Operando com o objetivo do desenvolvimento sustentável haveria geração nula de resíduos, assim, o que seria resíduo de uma linha de processamento passa a ser matéria-prima para outros processos, permitindo a total utilização dos componentes da biomassa (CHERUBINI, 2010). As instalações de uma biorrefinaria de processamento podem converter sustentavelmente a biomassa ou seus resíduos em vários produtos: energia, insumos químicos, biocombustível, biomateriais e químicos que podem ser aplicados em uma vasta área industrial.

A Figura 2 apresenta um esquema simplificado do ciclo de materiais e energia em uma biorrefinaria.

Figura 2 - Esquemática do ciclo de uma biorrefinaria.



Fonte: ASSUNÇÃO, 2010.

As fontes renováveis de matérias-primas ricas em carbono para as biorrefinarias provêm de cinco setores diferentes: agrícola (lavouras dedicadas e resíduos); aquícola (algas); florestal (resíduos); industrial (sobras e resíduos dos processos) e domiciliar (esgoto e resíduos sólidos do município) (KAMM; KAMM, 2004).

Uma biorrefinaria de algas apresenta diversas vantagens, como alta eficiência fotossintética, não-competição para lavouras e tolerância a águas residuais durante o cultivo (ZHU; KETOLA, 2012). Além de apresentarem uma das fontes renováveis mais promissoras pela sua capacidade de captura do CO₂ atmosférico durante a fotossíntese.

A produção de bioetanol por microalgas pode ser realizada, por três rotas:(i) A primeira é a forma mais comum, a biomassa é exposta a uma hidrólise enzimática e posterior fermentação com leveduras. (ii) A segunda maneira é caracterizada por utilizar vias metabólicas em condições escuras, similares a produção de biohidrogênio. (iii) A terceira forma é a foto fermentação, 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 otimizações dos processos, como o uso de engenharia metabólica e genética para redirecionar as vias bioquímicas existentes nas microalgas e ser mais eficiente na produção (SILVA; BERTUCCO, 2016).

Assim, a biomassa de microalgas pode ser empregada em um contexto de biorrefinaria, porém ainda se encontra em fase inicial de desenvolvimento a produção de bioetanol algal devido a limitações como a colheita, quantidade significativa de carboidratos, alta produtividade, custo de produção e aumento de escala (KUMAR; SINGH, 2019).

Em contrapartida, as fontes de matérias-primas para o bioetanol de primeira geração (Figura 3) já estão bem consolidadas se encaixando em um contexto de biorrefinaria. Segundo dados EERE em 2018 os Estados Unidos e o Brasil produziram 85% do etanol mundial. A grande maioria do etanol dos EUA é produzida a partir do milho, enquanto o Brasil usa principalmente a cana-de-açúcar (KUMAR; SINGH, 2019).

A Figura 3 apresentada a classificação dos biocombustíveis de acordo com a fonte de matéria-prima utilizada na produção.

Figura 3 - Produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas.



Fonte: Adaptado de SIRAJUNNISA; SURENTHIRAN, (2016).

A matéria-prima de segunda geração são alguns tipos de biomassa lignocelulósica como palha, bagaço de cana, madeira, resíduos agrícolas e industriais. Os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos são celulose, hemicelulose, lignina, extratos e cinzas. E os chamados de terceira geração, utilizam como matérias-primas fontes antes nunca exploradas, como por exemplo, as microalgas (SIRAJUNNISA; SURENDHIRAN, 2016).

As justificativas para a produção de biocombustíveis microalgais em relação as demais fontes de biomassa é que o bioetanol de terceira geração pode ser realizado em terras com baixo potencial agrícola, não afetam o fornecimento de alimento; consomem menos água que outros cultivos; podem crescer em diferentes ambientes, impróprios para outras espécies; podem ser cultivadas usando águas residuais liberadas por diferentes indústrias; tem o potencial de produzir coprodutos de alto valor (SIRAJUNNISA; SURENDHIRAN, 2016).

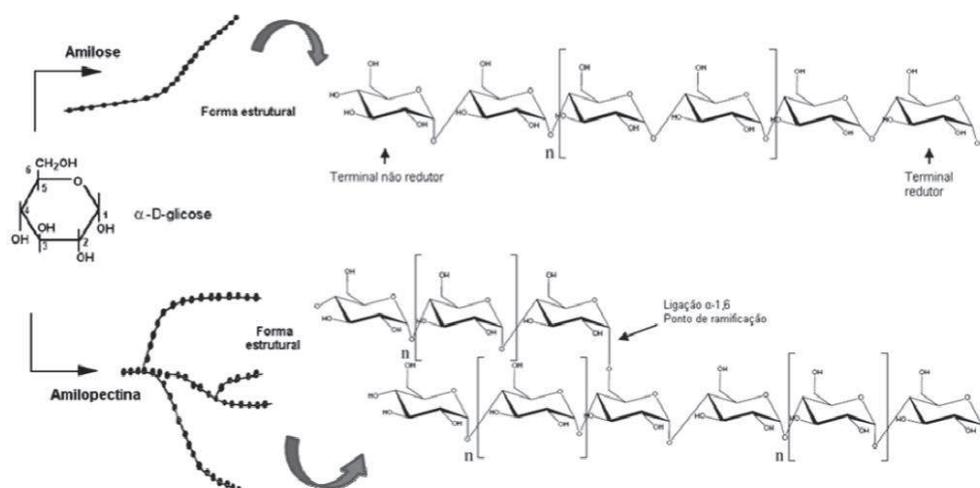
2.3 BIOETANOL PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF)

Uma limitação da produção de bioetanol através de carboidratos microalgais e biomassas amiláceas é que as leveduras podem fermentar somente açúcares simples, tais como glicose, frutose, entre outros. Logo, os carboidratos têm primeiro de ser hidrolisados (sacarificados) para açúcares simples, de modo que possam ser fermentados pelas leveduras (TASIC et al., 2009).

Os polissacarídeos na biomassa de microalgas e de amiláceos são principalmente amido e celulose (com a ausência de lignina), assim eles são mais facilmente hidrolisados em monossacarídeos do que outros materiais lignocelulósicos (HO et al, 2013).

O amido (Figura 4), é um homopolissacarídeo ramificado de unidades D-glicose, constituído por duas porções distintas, sendo: α -amilose, que é um polímero linear no qual as moléculas de glicose encontram-se unidas por ligações do tipo α -1,4 entre as unidades de glicose e que corresponde tipicamente a 15-30 % da massa total do amido; e a amilopectina, que representa a região ramificada do amido, devido a presença de ligações do tipo α -1,6 (CORRADINI et al., 2005).

Figura 4 - Representação das cadeias de amilose e amilopectina.



Fonte: Adaptado de MURPHY (2000) e CASTRO et al., (2011).

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 menos acessíveis aos microrganismos que irão realizar a fermentação como processo subsequente. A sacarificação geralmente é caracterizada por um passo que limita a velocidade de produção de biocombustíveis. A hidrólise dos polissacarídeos pode ser realizada de duas principais formas: a hidrólise química e hidrólise enzimática (SCIPIONI, 2011).

Embora a hidrólise química (ácida ou alcalina) seja mais rápida, mais fácil e mais barata do que outros tipos de hidrólise, as condições ácidas podem levar a decomposição dos açúcares em compostos indesejados que inibem a fermentação realizada no processo seguinte de produção (MOXLEY; ZHANG, 2007; GIRIO et al., 2010; HARUN et al., 2010).

Em contrapartida a hidrólise enzimática está sendo muito utilizada pelas indústrias na produção de etanol a partir de amiláceos. A característica mais importante da catálise enzimática é sua especificidade, muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato (CINELLI, 2012).

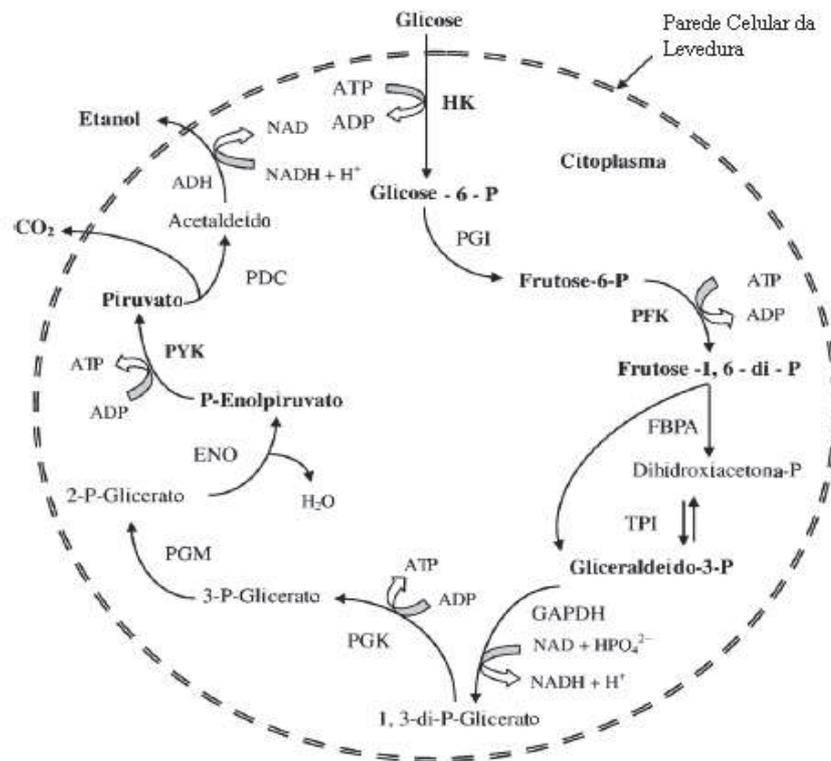
Após sacarificada a biomassa, a fermentação alcoólica ocorrerá no interior de microrganismos capazes de converter açúcares assimiláveis em etanol, através de uma série de reações bioquímicas, reguladas enzimaticamente (MATSUDO et al., 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um anaeróbio facultativo, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose, atuando como um agente fermentador. Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das

condições ambientais em que a levedura se encontra. Enquanto em aerobiose, uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO_2 , H_2O e outras substâncias orgânicas; em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO_2 , processo denominado fermentação alcoólica. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA et al., 2001).

A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (Figura 5), (BAI et al., 2008).

Figura 5 - Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*.



Fonte: BAI et al., (2008).

A produção de bioetanol podem ser realizadas de formas diferentes: pela Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF sigla em inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation*) na qual as etapas de sacarificação e fermentação são realizadas separadamente, em temperaturas distintas e favoráveis para cada processo, 45-50 °C para hidrólise e cerca de 30-32 °C para

fermentação (BRETHAUTER; WYMAN, 2010) e ao contrário da SHF, na Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF sigla em inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente em uma única etapa no mesmo reator (GAUSS., 1976; NIKOLIC et al., 2010).

A utilização do processo de SSF vem se destacando frente a SHF, principalmente devido a um menor consumo de energia, maior rendimento de etanol, redução do tempo de processo, menores riscos de contaminação e redução na inibição do produto final (MOJOVIC et al., 2006; MARQUES et al., 2008; LOACES et al., 2017).

No entanto, as principais limitações do processo SSF são as diferentes temperaturas que ocorrem na hidrólise enzimática da biomassa (45-50 °C) e os microrganismos da fermentação que atuam em temperaturas mais baixas em relação ao processo de hidrólise enzimática (30 °C).

Akhtar et al. (2017) estudaram a produção de etanol com palha de arroz utilizando SSF com uma enzima celulase parcialmente estabilizada de *B. subtilis* NA15, onde o rendimento ótimo de etanol (0,38 g/g), foi obtido a pH 4,5 e 30 °C com carga de substrato de 11% (p/v) na presença de concentração de enzima a 0,5% (v/v) e volume de inóculo de 8% (v/v) após 24 h.

Estudos realizados por Loaces et al. (2017) com SHF e SSF testadas para a produção de etanol a partir de *Arundo donax* (cana-do-reino), utilizando a cepa de *Escherichia coli* ET04 e enzimas comerciais, obtiveram 24 e 25 g.L⁻¹ de etanol em SHF e SSF respectivamente.

Estudos recentes através da engenharia genética e metabólica tem demonstrado o uso de leveduras termotolerantes que podem sofrer fermentação a temperaturas acima de 40 °C sendo alternativas adequadas para desenvolver o processo de SSF (BENJAPHOKEE et al., 2012).

2.3.1 Enzimas envolvidas na produção de bioetanol

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

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

As amilases pertencem à classe das hidrolases e catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; GUANDALINI, 2007).

Os fatores que tornam atrativos o uso dessa enzima são a alta especificidade, condições suaves de reação exigidas, termoestabilidade, fácil manipulação dos microrganismos produtores da enzima e elevada produtividade (SEN et al., 2014; KUMAR et al., 2013).

As principais fontes de obtenção da alfa-amilase comercial são a partir dos microrganismos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, e sendo também produzida via microrganismos recombinantes como: *Thermoactinomyces sp.* (doador do gene) e, como organismo hospedeiro, *Bacillus amyloliquefaciens* (BON et al., 2008).

No processo de hidrólise enzimática do amido, a alfa-amilase é responsável pela liquefação do material, sendo otimizada em condições de 90 °C de temperatura e com pH 7, liberando os compostos para sacarificação e posterior fermentação etanólica (TALEKAR et al., 2013; WARREN et al., 2011; WOLT; KARAMAN, 2007).

A enzima amiloglucoamilase ou amiloglicosidase também é obtida por microrganismos, em seu formato comercial, sendo os principais: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* e *Rhizopus oryzae* (BON et al., 2008).

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. As enzimas amilolíticas da classe das hidrolases podem ser classificadas em três grupos (VAN DER MAAREL et al., 2002; IUBMB, 2017):

a) Endoamilases: catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 no interior do polímero de forma randômica, gerando oligossacarídeos lineares e ramificados. Dentre estas, a mais conhecida é a α -amilase (EC 3.2.1.1.). Os produtos finais de hidrólise da α -amilase são oligossacarídeos com comprimento variável e uma configuração α , a partir de seu ataque randômico a moléculas com pelo menos três unidades de glicose.

b) Exoamilases: agem nas extremidades das cadeias de amilose e amilopectina catalisando a hidrólise tanto exclusivamente sobre ligações α -1,4, quanto sobre ligações α -1,4 e α -1,6. Entre as principais pode-se citar:

i. A β -amilase (EC 3.2.1.2) atua somente sobre ligações α -1,4, a partir de terminais não redutores das cadeias, e o principal produto de hidrólise liberado é a β -maltose (dissacarídeo de glicose);

ii. A glucoamilase (EC 3.2.1.3), cujo nome sistemático é glucana 1,4- α -glicosidase, também denominada 1,4- α -D glucanaglucohidrolase, amiloglicosidase, exo-1,4- α -glicosidase, maltase ácida e α -amilase lisossômica, atua sobre ligações α -1,4, liberando unidades de glicose dos terminais não redutores das cadeias. Possui também capacidade de atuar sobre ligações α -1,6;

iii. A α -glicosidase (EC 3.2.1.20), também conhecida como maltase, glicoinvertase, glicoseidosucrase, glucoamilase-maltase. Ataca preferencialmente oligossacarídeos (a hidrólise de polissacarídeos ocorre com taxas mais lentas), liberando moléculas de α -D-glicose de seus terminais não redutores;

iv. A exo-maltotetrahidrolase libera unidades de maltotriose (três unidades de glicose), maltohexaose (seis unidades de glicose) e, principalmente, maltotetraose (quatro unidades de glicose) dos terminais não redutores das cadeias polissacarídicas de amido;

A α -amilase maltogênica ou 1,4- α -D glucanamaltotetrahidrolase, atua nas ligações α -1,4 liberando unidades de α -maltose dos terminais não redutores de cadeias poliméricas e oligoméricas.

c) Enzimas desramificadoras: catalisam a hidrólise exclusivamente de ligações α -1,6 presentes nos pontos de ramificação da amilopectina.

2.4 PROTEÍNAS DE MICROALGAS

As principais fontes de proteínas consumidas pelos seres humanos são de origem animal e vegetal, sendo o restante destacadas como fontes proteicas não convencionais, as quais podem ser obtidas de microrganismos cultivados em meios de cultivo variados (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

A biomassa de microalgas é rica em proteínas (46 a 63%) que competem favoravelmente, em termos de quantidade e qualidade, com proteínas alimentares convencionais, como soja (cerca de 30%), ovos (12%) e carnes (16 a 22%), tornando os organismos unicelulares uma fonte promissora de proteína alimentar (BATISTA et al., 2013; GRAZIANI et al., 2013).

As proteínas são polímeros complexos, formados fundamentalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. São formadas de um grande número de unidades

fundamentais chamadas de aminoácidos (compostas por 21 aminoácidos diferentes) que estão ligados entre si por ligações peptídicas (DAMODARAN et al., 2010).

As proteínas pertencem à classe dos peptídeos, pois são formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Uma ligação peptídica é a união do grupo amino (-NH₂) de um aminoácido com o grupo carboxila (-COOH) de outro aminoácido, através da formação de uma amida.

Todas as proteínas produzidas biologicamente podem ser utilizadas como proteínas alimentares. As proteínas alimentares são disponíveis em abundância e caracteriza-se pela fácil digestão, adequabilidade nutricional, não toxicidade e podem ser utilizadas de forma funcional em produtos alimentícios (DAMODARAN et al., 2010).

Além disso, as proteínas de *Spirulina platensis* podem ser hidrolisadas a peptídeos bioativos que tem recebido muita atenção devido aos seus benefícios na área de saúde e sua atividade biológica (VO; RYU e KIM, 2013). Pode apresentar atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), antiproliferativo, anticoagulante, antidiabética e antiobesidade (BETORET et al., 2011; RAJANBABU; CHEN, 2011; NAJAFIAN; BABJI, 2012). Assim, estes peptídeos podem atuar como uma valiosa fonte para o desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos (NGO et al., 2012).

2.4.1 Composição em Aminoácidos

Todas as proteínas são essencialmente compostas dos mesmos 21 aminoácidos primários; entretanto, algumas não contêm todos os 21. As diferenças estruturais e funcionais das proteínas são determinadas, principalmente, pela sequência de aminoácidos, que se unem através de ligações amida, para formar sua molécula. Literalmente, bilhões de proteínas com propriedades únicas podem ser sintetizadas pela alteração da sequência de aminoácidos, do tipo de proporção dos aminoácidos e do comprimento da cadeia polipeptídica (DAMODARAN et al., 2010).

Os aminoácidos podem ser classificados quanto à capacidade do organismo humano em sintetizá-los. Dessa forma, podem ser: aminoácidos essenciais, não essenciais e condicionalmente essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que precisam ser fornecidos pela dieta, pois seus esqueletos de carbono não podem ser sintetizados em quantidades suficientes pelo organismo. Já os aminoácidos não essenciais são produzidos em

quantidades suficientes pelo organismo, seja a partir de outros aminoácidos ou outros metabólitos nitrogenados complexos (SILVA et al., 2012).

É importante ressaltar que as proteínas das microalgas contêm perfis de aminoácidos essenciais nas proporções recomendadas pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) (FAO, 1973), podendo ser comparada com proteínas padrões (HABIB, 2008).

Machado et al. (2017) avaliaram o perfil de aminoácidos em *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* por cromatografia líquida de alta eficiência e pode-se observar que os aminoácidos essenciais das proteínas das microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*, respectivamente com percentuais mais pronunciados, foram Leucina (4,96%; 4,75%), Lisina (2,85%; 4,16%); Valina (3,64%; 3,29%); Fenilalanina (2,61%; 2,81%), Treonina (2,65%; 2,40%) e Isoleucina (2,22%; 2,21%). Já os aminoácidos essenciais com índices químicos menores foram metionina (1,01%; 1,13%) e triptofano (0,77%; 0,46%). O estudo demonstrou que as quantidades de aminoácidos estão conforme as recomendações da FAO/WHO/UNU (1998), para as quantidades necessárias de aminoácidos para um adulto.

2.5 PEPTÍDIOS BIOATIVOS

O uso de proteínas primárias como fonte de alimentação para humanos como precursoras de peptídeos bioativos não parece ser sustentável, especialmente devido aos desafios atuais de segurança alimentar. Portanto, há uma necessidade de identificar novas fontes de proteína sustentáveis e otimizar a tecnologia para seu isolamento e aplicações apresentando-se um nicho de mercado (EJIKE et al., 2017).

Uma área de foco atual é a valorização de produtos secundários ricos em proteínas da indústria agro-alimentar, especialmente soro lácteo, oleaginosas e processamento de peixe. Além desses, as microalgas marinhas foram identificadas como fontes de proteína atraentes e sustentáveis para a produção em escala industrial de peptídeos bioativos (EJIKE et al., 2017).

As proteínas são fundamentadas como fonte essencial de aminoácidos, mas recentemente tem-se reconhecido outras funcionalidades *in vivo* por meio de peptídeos biologicamente ativos.

Os biopeptídeos são definidos como fragmentos de proteínas que apresentam benefícios à saúde do ser humano. Os biopeptídeos contêm de 3 a 20 resíduos de aminoácidos e normalmente são inativos dentro da sequência da molécula de proteína. Assim, as proteínas

precisam ser hidrolisadas para que ocorra a liberação dos fragmentos bioativos contidos nas mesmas (KORHONEN, 2009).

Os fragmentos bioativos podem ser libertados por: (i) hidrólise enzimática através de ação de protease gastrointestinal, (ii) hidrólise enzimática microbiana durante a fermentação, ou (iii) processamento proteolítico utilizando enzimas exógenas (SAMARAKOON; JEON, 2012).

Quando liberados da proteína, os biopeptídios podem exercer várias funções no organismo humano, tais como a atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina ECA, antioxidante, antitrombótica, hipoglicêmica, hipocolesterolêmica e antimicrobiana entre outros (TOLDRÁ et al, 2017), por estes benefícios há um grande interesse na aplicação em alimentos, tornando-os funcionais.

Numerosos estudos já foram realizados em peptídeos bioativos derivados de proteínas animais, especialmente de caseínas, que parecem ser proteínas com alto potencial funcional. Mais recentemente, a comunidade científica investiga a possibilidade de obter peptídeos bioativos de plantas. Em particular, a identificação de peptídeos bioativos derivados de proteínas alimentares vegetais segue com o crescente interesse da comunidade científica e da opinião pública em relação aos alimentos vegetais, devido à sua maior sustentabilidade em relação aos alimentos animais e ao aumento das necessidades de dietas saudáveis e equilibradas (RIZZELLO et al, 2016).

O meio marinho fornece metade da biodiversidade global total. Os recursos biológicos marinhos são investigados como fonte de novos compostos para aplicações farmacêuticas e nutracêuticas. Devido à natureza competitiva e agressiva dos habitats, as espécies marinhas desenvolvem moléculas bioativas específicas e potentes (ANEIROS; GARATEIX, 2004).

Em um estudo de Ko et al. (2012), obtiveram peptídeos derivados de *Chlorella* sp. e demonstraram poderosa capacidade antioxidante *in vitro* e em ensaios baseados em células. A hidrólise peptídica da *Chlorella ellipsiodes* produziu um pentapeptídeo (Leu-Asn-Gly-Asp-Val-Trp) com potente capacidade de eliminação de radicais livres. Verificou-se que o peptídeo tinha radical de peróxido e radicais de DPPH eliminando atividades antioxidantes *in vitro* e atividade de eliminação de radicais intracelulares em células de rim de macaco.

O aumento da expectativa de vida e as crescentes informações divulgadas sobre saúde, leva os consumidores a procurar cada vez mais uma alimentação saudável para a prevenção das doenças (DEL RÉ et al, 2012). Surge assim, a própria exigência do consumidor a reforçar o mercado potencial dos antioxidantes naturais, uma vez que existe grande desconforto de uma

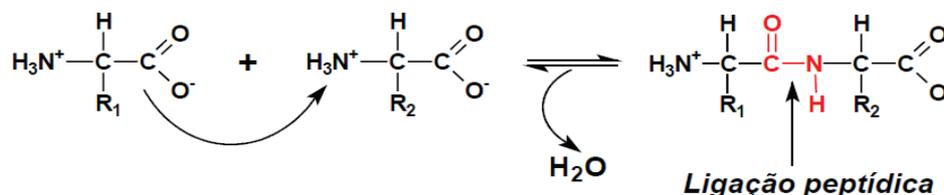
parcela da população em não adquirir o consumo de alimentos industrializados, cuja produção reconhecidamente envolva o emprego de substâncias ou aditivos sintéticos (VALENTÃO et al., 2002; AMAROWICZ et al., 2004).

Paralelamente, os avanços da ciência permitem um melhor conhecimento sobre as propriedades dos alimentos (DEL RÉ et al, 2012). Assim, tornam-se interessantes pesquisas com este componente bioativo natural, uma vez que possui vários benefícios á saúde humana, podendo ser substituído pelas substâncias sintéticas nas indústrias alimentícias.

2.5.1 Fracionamento e caracterização dos peptídeos bioativos

Diversos estudos são encontrados na literatura sobre hidrólise enzimática de proteínas. A hidrólise protéica baseia-se na clivagem das ligações peptídicas, originando peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (Figura 6). Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos basicamente por três métodos: hidrólise alcalina, hidrólise ácida e hidrólise enzimática (CAMPBELL; FARRELL, 2007; NELSON; COX, 2011).

Figura 6 - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupos R).



Fonte: DAMODARAN et al., 2010.

O fracionamento de hidrolisados proteicos é importante uma vez que a maioria dos peptídeos com propriedades biológicas estão presentes em misturas complexas contendo um grande número de frações de proteínas. No hidrolisado completo, os peptídeos bioativos estão presentes juntamente com aminoácidos livres e outras ligações peptídicas (POULIOT et al., 2006).

A maneira mais comum de obter os peptídeos bioativos é o uso de proteases específicas ou múltiplas. As enzimas geralmente requerem menos tempo para gerar um grau de hidrólise e a sua reação pode ser controlada, proporcionando perfis de peso molecular reprodutíveis e composição de peptídeos. Conseqüentemente, as enzimas apresentam especificidade de

substrato que permite o desenvolvimento de hidrolisados de proteínas com características químicas e nutricionais bem definidas (CASTRO et al., 2011).

Os hidrolisados proteicos possuem muitos usos em alimentos para fins especiais, como alimentos geriátricos, formas infantis não alérgicas, bebidas para esportistas e alimentos dietéticos. Como podem ser digeridos com facilidade, devido à elevada digestibilidade, eles também são muito aplicados em formulações infantis (DAMODARAN et al., 2010).

2.5.1.1 *Protease*

As enzimas proteolíticas ou proteases são uma classe única de enzimas com capacidade de catalisar a quebra das ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas, possuem grande importância fisiológica e comercial. Essas enzimas causam reações irreversíveis, que do ponto de vista biológico podem ser importantes em processos fisiológicos, patológicos e tecnológicos (BARRET et al., 2001). Estas enzimas são classificadas no grupo das peptidases (EC 3.4.x.x). Dentre essas, pode-se citar as endopeptidases (EC 3.4.21.x – 3.4.24.x) e as exopeptidases, como, por exemplo, aminopeptidases (EC 3.4.11.x), carboxipeptidases (EC 3.4.15.x – 3.4.18.x), peptidilpeptidases (EC 3.4.15.x), entre outras (IUBMB, 2017).

As proteases são constituintes essenciais em todas as formas de vida, incluindo os procaríotos, os fungos, as plantas e os animais (KUMAR; TAKAGI, 1999). As enzimas proteases estão envolvidas em processos biológicos essenciais, tais como a coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos, catabolismo de proteínas, processamento e transporte de proteínas secretoras através da membrana (MAURER, 2004).

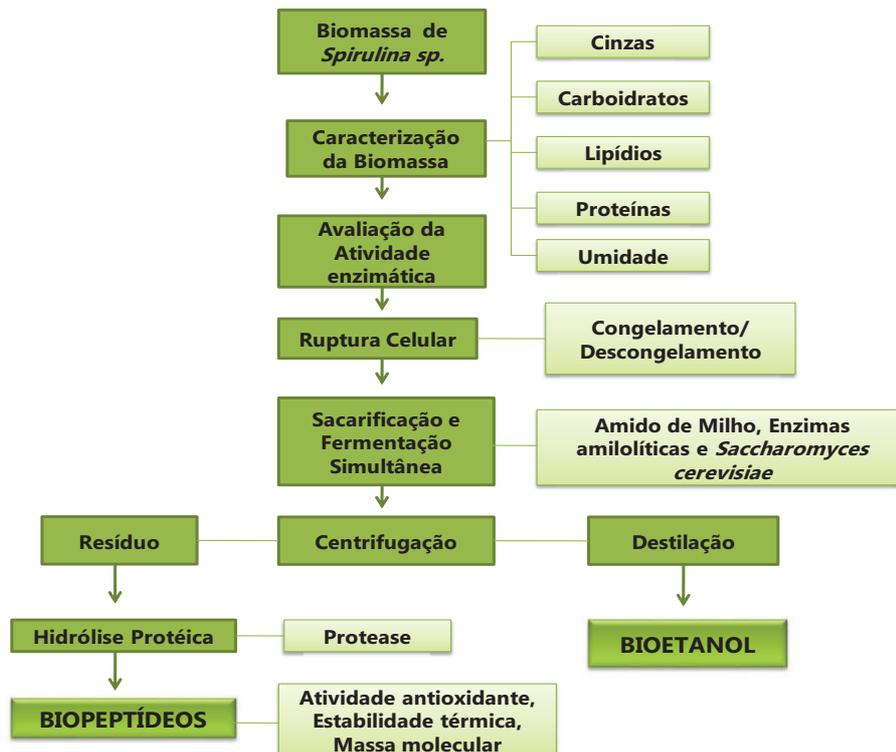
As proteases têm enormes aplicações em diferentes indústrias, como lavanderias e detergentes, processamento de alimentos, couro, produtos farmacêuticos, têxteis, seda, fabricação de cerveja, fotografia, padaria, lácteos, biorremediação, biossíntese e biotransformação (GUPTA et al., 2003).

Neste estudo a enzima protease foi utilizada na etapa da obtenção de biopeptídeos. A obtenção destes foi a partir do resíduo da produção de bioetanol utilizando amido de milho e a microalga *Spirulina* na qual apresenta elevado teor proteico facilitando a obtenção de hidrolisados proteicos que podem ser adicionados em alimentos tornando-os com uma qualidade maior nos aspectos de nutrição e funcionalidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 7 apresenta as etapas da metodologia utilizada para alcançar os objetivos propostos.

Figura 7 - Esquema da metodologia experimental.



3.1 MICROALGA *Spirulina sp.*

A microalga *Spirulina sp.* LEB 18 utilizada na forma seca, foi cedida dos 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.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa de *Spirulina* seca foi caracterizada através da quantificação dos teores de carboidratos, proteínas, lipídeos, cinzas e umidade. Para tanto, 5 mg de biomassa foram suspensas em 10 mL de água destilada e submetidas à ruptura celular em autoclave por 20

min a 121 °C. Após realizada a ruptura celular foi determinado o teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al. 1956) (ANEXO A). O teor de proteínas da biomassa algal foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951) (ANEXO B). A quantificação de lipídeos foi realizada através do método de Folch et al. (1957) modificado por Colla et al. (2004), (ANEXO C). 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).

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

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ENZIMAS AMILOLÍTICAS

As enzimas utilizadas para a sacarificação da biomassa microalgal foram a α -amilase (Liquozyme[®] Supra 2.2X) e amiloglicosidase (AMG[®] 300L) cedidas pela *Novozymes Latin América*.

A determinação das atividades das enzimas nos substratos compostos pela biomassa de *Spirulina* sp. e do amido foram realizadas segundo estudos de Rempel et al. (2018), utilizando-se as condições ótimas de pH (5,5) e temperatura (50 °C) determinadas para ambas as enzimas (α -amilase e amiloglicosidase). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a que libera 1 μ mol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ (ALVA et al., 2007).

A atividade enzimática em amido foi realizada através uma solução de amido 1% em tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L em pH 5,5. As enzimas foram diluídas na proporção 1:2000 (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L. Foram adicionados 4 mL da solução de amido e 1 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados em mesa agitadora por 1 hora em temperatura de 50 °C. A reação foi realizada em tubos de ensaios e em triplicada.

Para a determinação da atividade enzimática em *Spirulina* sp, uma suspensão de 10% (m/v) em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5 foi previamente submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento de 24 h cada ciclo, seguido de gelatinização a 100 °C por 10 minutos. Para a reação enzimática, um volume de 4 mL desta suspensão foi adicionado de 1 mL de cada extrato enzimático diluídas na proporção 1:2000 (v/v) e incubados em banho termostático a 50 °C por 60 min (REMPEL et al. 2018).

Após as reações enzimáticas, estas foram inativadas em banho maria a 100 °C, posteriormente retirou-se 1 mL dos tratamentos para a precipitação das proteínas, utilizando 0,4

mL de cada solução de Carrez I e II, (solução 15% de ferrocianeto de potássio e solução 30% de sulfato ou acetato de zinco, respectivamente), avolumando-se a 10 mL em balão volumétrico. As suspensões foram centrifugadas por 10 minutos a 3640 g e filtradas obtendo um extrato clarificado. Deste, foram retirados 4 mL e adicionado de 1 mL de DNS e 1 mL de NaOH 1 mol/L para determinação de açúcares redutores. A reação foi conduzida em banho termostático a 100 °C por 5 minutos, sendo paralisada com o resfriamento da solução em banho de gelo e após a adição de 4 mL de água destilada. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 546 nm, contra um branco reacional de 4 mL de água destilada, 1 mL de DNS e 1 mL de NaOH (MILLER, 1959). A concentração de açúcares redutores (AR) gerados foi calculada a partir de uma curva padrão de glicose anidra preparada nas mesmas condições do ensaio.

3.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Foram realizados ensaios a fim de verificar a influência da concentração da biomassa sobre a hidrólise enzimática. Suspensões de 5%, 10%, 20% e 30% (m/v) de *Spirulina* em tampão fosfato 0,2 M pH 5,5 foram preparadas. Realizou-se o rompimento celular por congelamento e descongelamento e a gelatinização do amido microalgal em banho termostático a 100 °C por 10 min. Após, volumes de 4 mL destas suspensões foram adicionados das enzimas alfa-amilase e amiloglicosidase na proporção de 1% (v/v) em tubo ensaio e incubados em banho termostático a 50 °C por 1 h (REMPEL et al., 2018).

A determinação dos açúcares redutores foi realizada nos tempos inicial e após 60 min de sacarificação. As enzimas foram inativadas em banho termostático a 100 °C, 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 3640 g por 10 min. Após foi realizada uma filtração, e uma alíquota de 4 mL do filtrado foi adicionado de 1 mL de NaOH 1M e seguiu-se o método do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As determinações analíticas foram realizadas em triplicata.

A eficiência de hidrólise (EH) foi calculada a partir da Equação 1:

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

Sendo:

EH (%): Eficiência de hidrólise;

AR_{após hidrólise} (g.L⁻¹): Açúcares redutores obtidos após hidrólise;

m_{biomassa} (g): Massa de *Spirulina* utilizada na sacarificação;

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

1,1: Fator de conversão do amido em glicose;

V (L): Volume final dos ensaios.

O ensaio que apresentou maior eficiência de hidrólise e melhor facilidade de manuseio devido à viscosidade entre as diferentes concentrações, foi definida como a concentração de biomassa ótima para a produção de bioetanol no processo de sacarificação e fermentação simultânea.

3.5 PRODUÇÃO DE BIOETANOL PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF)

3.5.1 Microrganismo e preparo do inóculo

Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Sua ativação foi realizada em meio contendo 20 g.L⁻¹ de glicose, 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (BRINGHENTI; CABELLO, 2005). O meio foi preparado em frascos de erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL⁻¹ de meio, autoclavado e posterior incubação shaker por 48 h a 150 rpm e 30 °C.

Os inóculos foram preparados utilizando meio contendo 3% da biomassa da microalga hidrolisada, 20 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 20 g.L⁻¹ de peptona, autoclavado e incubado em shaker por 10 h a 150 rpm e 32 °C. (BRINGHENTI; CABELLO, 2005).

As fermentações foram iniciadas com razão de inoculação de 10%, utilizando um inóculo previamente preparado em fase logarítmica de cultivo (10 h) em absorbância a 610 nm.

3.5.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Após definida a melhor concentração de biomassa de *Spirulina* para a hidrólise dos carboidratos microalgal (20%), observou-se que a baixa concentração de carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. (11%) resultou uma baixa conversão de açúcares redutores e, portanto, baixa conversão em bioetanol. Neste sentido, definiu-se adicionar uma fonte de carboidratos de fácil conversão e a biomassa de *Spirulina* sp. atuar como fonte de nutrientes e de carboidratos durante a fermentação.

O milho é uma boa fonte de carboidratos apresentando em sua composição cerca de 71,7% de amido (KUMAR; SINGH, 2019). No Brasil a produção de milho vem crescendo a cada ano, principalmente na região sul e centro-oeste que lidera a produção do milho atingindo 47.895,2 mil toneladas na safra de 2018/2019. No total o Brasil produziu na última safra cerca de 91.652,3 mil toneladas, enquanto que os Estados Unidos lideram como os maiores produtores do grão no mundo com 371.517 mil toneladas (CONAB, 2019).

Desta forma, definiu-se variar as concentrações de amido de milho e da biomassa de *Spirulina* sp. conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Variação das concentrações de amido de milho, biomassa de *Spirulina* e da temperatura.

Ensaio	Concentração de Amido (%)	Concentração de <i>Spirulina</i> (%)	Carboidrato Total (%)*	Carboidrato (g CHO/L)	Temperatura (°C)
1	5	15	6,68	66,8	30
2	10	10	11,12	111,2	30
3	15	5	15,56	155,6	30
4	5	15	6,68	66,8	40
5	10	10	11,12	111,2	40
6	15	5	15,56	155,6	40

*levando em consideração a concentração de carboidrato presente na biomassa de *Spirulina* de 11,23%.

Além das concentrações de substratos para o processo de SSF, a eficiência de bioetanol pode ser afetada pela temperatura do processo, uma vez que as leveduras atuam em temperaturas mais baixas se comparado com a temperatura ótima de atuação das enzimas amilolíticas. Neste caso variou-se duas temperaturas para o processo de SSF, uma a 30 °C por ser mais próxima da temperatura ótima da levedura e a outra a 40 °C por se aproximar da temperatura ótima de atuação das enzimas α -amilase e amiloglucosidase (50 °C). Os ensaios

foram realizados em duplicata e o total da concentração das biomassas para todos os ensaios foi de 20%.

Devido às diferenças entre as temperaturas do processo de sacarificação (50 °C), e fermentação (30 °C), realizou-se a pré-hidrólise do substrato na temperatura ótima da atuação da enzima α -amilase. Por esta ser uma endoenzima, é capaz de hidrolisar as cadeias de forma aleatória no interior do polímero, diminuindo a viscosidade e ocorrendo a liquefação do meio, facilitando a atuação da enzima amiloglicosidase que por sua vez é uma exoenzima e ataca seus substratos de forma ordenada a partir das extremidades das cadeias (PANDEY et al., 2005). Assim para todos os ensaios foi realizada uma etapa de pré-hidrólise com a enzima α -amilase por 2 horas a uma temperatura de 50 °C e após adicionou-se a enzima amiloglicosidase na temperatura de cada ensaio.

Utilizou-se 0,15 mL de extrato enzimático de cada enzima/g de carboidrato presente no ensaio (Tabela 3). Os ensaios foram realizados em mesa agitadora a 130 rpm em erlenmeyers de 500 mL, com um volume de trabalho de 300 mL.

Tabela 3 - Quantidade de cada enzima em relação a quantidade de carboidrato.

Ensaio	Carboidrato Total (%)	Volume de enzima adicionada em 100 mL
1	6,68	1,002
2	11,12	1,668
3	15,56	2,334
4	6,68	1,002
5	11,12	1,668
6	15,56	2,334

As suspensões de *Spirulina* foram conduzidas à etapa de ruptura celular da biomassa (congelamento e descongelamento por 24/24h), sendo adicionadas posteriormente as concentrações de amido de milho conforme cada ensaio. O pH dos meios foram ajustados para 5,0.

Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min, promovendo a gelatinização do amido e dos carboidratos microalgais. Após arrefecimento, realizou-se a etapa de pré-hidrólise (α -amilase) (durante 2 h) e ao término foi adicionada a enzima amiloglicosidase e os inóculos da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 de forma concomitante.

Foram coletadas amostras no tempo zero, após 2 horas de pré-hidrólise e a cada 12 horas para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e concentração de etanol. Os ensaios foram encerrados após a estabilização da concentração de bioetanol e de AR.

A concentração de AR foi quantificada pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959). A determinação da concentração de etanol foi realizada através destilação da amostra por microdestilador de bancada da marca Tecnal modelo TE-012, seguido do procedimento da reação do etanol com dicromato de potássio a 60 °C por 30 minutos. Após foram determinadas as absorbâncias das amostras por espectrofotômetro a 600 nm, contra um branco reacional (SALIK; POVH, 1993).

3.5.3 Variação da concentração de enzima para aumento de escala na produção de bioetanol

Com o objetivo de aumentar de escala a produção de bioetanol, foram realizados testes para diminuir a concentração das enzimas α -amilase e amiloglicosidase. Neste sentido realizou-se 3 sacarificações e fermentação simultâneas em duplicata variando a concentração das enzimas em: 1%, 0,5% e 0,25%. Os ensaios foram realizados na condição do ensaio 3 (15% de amido + 5% de *Spirulina* a 30 °C) no qual apresenta um total de 15,56% de carboidratos. As SSF foram realizadas em erlenmeyers de 500 mL, com um volume de trabalho de 200 mL. As demais etapas seguiram sendo realizadas como nos ensaios descritos anteriormente.

Foram coletadas amostras no tempo zero, após 2 horas de pré-hidrólise e a cada 24 horas para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e concentração de etanol. Os ensaios foram encerrados após 72 horas de SSF.

A concentração de AR foi quantificada pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959). A concentração de etanol foi quantificada através do método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas (SALIK; POVH, 1993).

3.5.4 Aumento de escala para a produção de bioetanol

O aumento de escala para a produção de bioetanol a partir da biomassa *Spirulina* sp. adicionada de amido de milho foi realizado em Biorreator Tec Bio Flex, nas condições dos melhores resultados obtidos nos ensaios realizados anteriormente.

O meio com a concentração definida de *Spirulina* sp. passou pelo processo de ruptura celular, congelamento e descongelamento por 24/24h, adicionado o amido de milho e após foi esterilizado em autoclave por 121 °C por 20 minutos. Arrefecido o meio, foi montado o Biorreator, ajustados os parâmetros e adicionado a enzima α -amilase por 2 horas na temperatura

de 50 °C com agitação de 100 rpm. Passada esta etapa de pré-hidrólise foi adicionada a enzima amiloglucosidase e a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 na sua fase exponencial de crescimento. Ajustada a temperatura para o melhor resultado obtido nos ensaios anteriores e a agitação para 80 rpm.

O volume de trabalho foi de 3 L e foram controlados durante o processo de SSF os parâmetros de: pH, temperatura e agitação (80 rpm) e acompanhado o oxigênio dissolvido (OD).

Foram coletadas amostras no tempo zero, após 2 horas de pré-hidrólise e a cada 12 horas para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e concentração de etanol. Os ensaios foram encerrados após 60 horas de SSF.

Ao término da SSF foi realizada uma centrifugação a 3640 g por 15 min, separando o resíduo do fermentado. Este resíduo gerado do processo de SSF foi estudado para a produção de biopeptídeos.

3.5.5 Cálculos de eficiência na produção de bioetanol

Para todos os ensaios da produção de bioetanol utilizando o processo de SSF foram calculados eficiência na formação de etanol e a eficiência de pré-hidrólise através da Equação 2.

$$EPH (\%) = \frac{AR_{gerado\ em\ 2h} \left(\frac{g}{L}\right)}{\frac{(m_{biomassa}) \times (CHO) \times 1,1}{v}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

EPH (%): Eficiência de pré-hidrólise;

AR_{gerado em 2h} (g.L⁻¹): Açúcares redutores obtidos após hidrólise (g.L⁻¹);

CHO (g.L⁻¹): Carboidratos presentes na SSF (g.L⁻¹);

1,1: Conversão de carboidratos em g.L⁻¹ de glicose.

V (L): Volume dos ensaios.

A eficiência (η) na formação de etanol foi obtida através da Equação 3 (HANG; LEE; WOODAMS, 1981).

$$\eta (\%) = \frac{\Delta E}{0,511 \times (CHO) \times 1,1} \times 100 \quad (3)$$

Sendo,

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

CHO: Concentração de carboidratos presente na fermentação (g.L^{-1});

1,1: Conversão de carboidratos em g.L^{-1} de glicose.

3.6 OBTENÇÃO DE BIOPEPTÍDEOS

3.6.1 Caracterização química do resíduo

Os resíduos da produção de bioetanol no Biorreator Tec Bio Flex foram caracterizados quanto ao teor de proteína, carboidratos, lipídeos, umidade e cinzas utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). Para a determinação da quantidade de proteína presente foi utilizado o método de determinação de nitrogênio total micro-Kjeldahl com o fator de conversão de 6,25. Cinzas pelo método gravimétrico em mufla ($550\text{-}600\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o teor de umidade pelo método gravimétrico em estufa ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os lipídeos foram extraídos empregando a metodologia de Soxhelt. Os carboidratos foram determinados por diferença. A determinação de proteína foi avaliada no início e no fim processo SSF com o intuito de subtrair o valor da proteína presente na levedura e nas enzimas adicionadas. Além disso os valores de proteína serviram como base de cálculo para a quantidade de enzima que foi necessária para ocorrer a hidrólise proteica.

3.6.2 Hidrólise proteica

A hidrólise proteica foi realizada no resíduo oriundo do processo de sacarificação e fermentação simultânea. A enzima protease (Protemax[®] 580L) é uma serino-peptidase e foi utilizada para obter os hidrolisados proteicos cedida pela *Prozyn BioSolutions for Life*.

A determinação da atividade da protease foi realizada segundo o método descrito por Ma et al. (2007), a partir de uma curva padrão de tirosina, sendo 1 U de atividade enzimática definido como a quantidade de enzima que libera $1\mu\text{g}$ de tirosina por minuto, expressa em U.mL^{-1} .

Os parâmetros de hidrólise enzimática utilizados neste trabalho foram de acordo com Lisboa et al., (2014). Para a obtenção dos hidrolisados foram utilizados $15,4\text{ g}$ de resíduo da SSF em 100 mL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio ($\text{pH } 9,5$) e 5 U.mL^{-1} de enzima. A

quantidade de resíduo foi calculada em relação a porcentagem de proteína presente e de acordo com Silva (2017) que utilizou 2% de proteína da biomassa de *Spirulina* sp. para a hidrólise enzimática utilizando a mesma enzima deste trabalho.

Após, os ensaios foram incubados em incubadora orbital a 180 rpm em temperatura ótima de atividade da enzima (60 °C). Alíquotas foram retiradas a cada hora para quantificação do grau de hidrólise, em um total de 8 h de reação. A enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min.

3.6.3 Determinação do grau de hidrólise das proteínas

A determinação do grau de hidrólise (GH) foi determinada no tempo inicial e após a cada 1 h até 8 h de hidrólise. Transcorrido cada tempo, alíquotas de 1 mL do hidrolisado foram adicionadas de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e deixadas em repouso por 10 min. Após, foram centrifugadas por 5 min a 5000 rpm para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis do sobrenadante utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina.

O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994) com modificações, sendo expresso pela quantidade de proteínas solúveis no TCA antes e após a adição da enzima em relação à quantidade de proteína total presente na amostra, e calculado segundo a Equação 4.

$$GH (\%) = \left(\frac{(PS_t - PS_{t_0})}{P_{total}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Sendo, o branco, PS_{t_0} corresponde à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25 % antes da adição da enzima; PS_t é a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_{total} é a quantidade de proteína total na amostra determinada pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005).

3.6.4 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS

O método ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico) descrito por Re et al., (1999), determina a atividade antioxidante total pela captura do radical livre $ABTS^+$. Consiste na geração do radical livre $ABTS^+$, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da

reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 734 nm. Ao adicionar um antioxidante, ocorre a redução do $ABTS^+$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional.

O radical catiônico ABTS foi preparado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7mmol/L) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L), ambas soluções dissolvidas em água a uma razão de 1:1 (v/v). Essa solução permaneceu em repouso no escuro, a temperatura ambiente, entre 12 a 16 h antes da utilização.

O espectrofotômetro foi zerado com metanol a 734 nm para a leitura das amostras. Para a leitura da absorbância do ensaio branco (ABS_{branco}) em espectrofotômetro, 200 μ L deste radical formado foi diluído em etanol 96° até obter uma absorbância de 0,70 nm (+- 0,05 nm) a um comprimento de onda de 734 nm.

Em ambiente protegido da luz, foram adicionados 10 μ L das amostras em 1000 μ L do radical ABTS diluído, seguido de homogeneização em agitador por 5 segundos e permaneceu em repouso no escuro por 6 min para reagir. Após foram realizadas as leituras das absorbâncias ($ABS_{amostra}$), em triplicata, utilizando cubeta de 1mL.

O percentual de inibição do radical ABTS foi calculada a partir da Equação 5:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \times 100 \right) \quad (5)$$

3.6.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O hidrolisado proteico, o resíduo da produção de bioetanol e a biomassa de *Spirulina* sp. foram analisados por FTIR com um instrumento modelo Cary 630 da *Agilent Technologies* em que as amostras foram pressionadas sobre um cristal Zn-Se e a transmitância registrada em uma faixa de 4000 a 650 cm^{-1} .

3.6.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para avaliar a desnaturação térmica de proteínas. A desnaturação térmica induz a picos endotérmicos pronunciados, estes representam os pontos de máxima absorção de energia calorífica pelas amostras (CHRONAKIS, 2001).

A termogravimetria (TGA) é um sistema capaz de medir continuamente a massa de um

material enquanto este é submetido a uma programação controlada de temperatura. É um método termoanalítico que permite verificar as alterações que o aquecimento pode causar nas substâncias, como modificações da estrutura molecular, além de estabelecer a faixa de temperatura em que as mesmas sofrem processos de decomposição (GIRON, 2002).

A microalga *Spirulina*, o hidrolisado e o resíduo da produção de bioetanol foram analisados quanto à estabilidade térmica (DSC) e perda de massa (TGA) e as curvas termogravimétricas e calorimétricas foram obtidas em um simulador de análise térmica (STA 6000, Perkin Elmer).

3.6.7 Eletroforese

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, o resíduo da produção de bioetanol e os peptídeos foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970).

3.6.7.1 Preparo das amostras

Primeiramente foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) e 100 µL de água destilada em 200 µL das amostras, em tubos de centrífuga do tipo eppendorfs. Esta solução foi armazenada em freezer durante uma noite “overnight”. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e retirado o sobrenadante, tomando cuidado para que o pellet não fosse desfeito. Posteriormente fez-se a adição de 100 µL de uma solução aquosa gelada de acetona 90% (6 °C), a fim de lavar o pellet sem desfazê-lo, sendo este centrifugado como na etapa anterior. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90% gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso com 50 µL do tampão da amostra (β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos e armazenadas em geladeira.

3.6.7.2 Preparo do gel de resolução 15%

Em um béquer foram adicionados 4,925 mL de acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8), 5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, 75 µL da solução de persulfato de amônio 10% e 5 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED). Após serem misturados foram transferidos para

as placas de eletroforese, deixando aproximadamente 2,5 cm da borda livre. O restante da placa foi completado com água destilada para formar uma linha reta sobre o gel, e este foi deixado polimerizar por 40 minutos em temperatura ambiente. Após a polimerização do gel a água foi retirada.

3.6.7.3 Preparo do gel de empilhamento 12%

Em um béquer foi adicionado 0,6 mL de acrilamida:bis acrilamida (30:0,8), 2,5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, 1,925 mL de água destilada, 75 µL da solução de persulfato de amônio 10% e 7,5 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Após serem misturados foram transferidos para a placa de eletroforese, sobre o gel de resolução que já estava polimerizado. Após foi aplicado ao gel de empilhamento o pente para a formação dos poços e após para a aplicação das amostras. Depois da completa polimerização do gel de empilhamento, o pente foi retirado.

3.6.7.4 Aplicação das amostras

Após a polimerização do gel as amostras foram adicionadas. No primeiro poço foram adicionados 15 µL do padrão de massa molar (Fermentas Life Sciences), e para os outros poços foram adicionados 20 µL das amostras. A célula de eletroforese foi acomodada na cuba de eletroforese vertical e preenchida com tampão de corrida (contendo: 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada) de modo a cobrir os poços do gel de empilhamento. A cuba foi fechada e ligada a uma fonte de alimentação de energia com corrente constante de 30 A e uma voltagem de 250 V, num tempo de aproximadamente 1 hora para as amostras percorrerem o gel.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com a solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% durante uma noite. Posteriormente o gel foi descorado com aquecimento em água destilada em microondas até a perfeita visualização das bandas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey foram realizadas utilizando o software Statistica® 7.0 em nível de confiança de 95%, ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ETAPA 1: PRODUÇÃO DE BIOETANOL ATRAVÉS DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SILMUTÂNEAS

4.1.1 Caracterização química da biomassa algal

A Tabela 4 apresenta a caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 em base seca.

Tabela 4 - Caracterização química da biomassa *Spirulina* sp. LEB 18.

Componentes	Base Seca (g/100g)
Proteína	74,53 ± 0,81
Carboidratos	11,23 ± 0,08
Lipídios	2,89 ± 0,48
Cinzas	14,11 ± 0,01

Resultados de média ± desvio padrão.

Dentre todos os componentes da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 se destaca o alto teor de proteína. Se comparada com base na legislação brasileira para produtos proteicos de origem vegetal, a qual define que a proteína concentrada de soja deve conter no mínimo 68,0% de proteínas em base seca (BRASIL, 2005), a fração proteica neste estudo indica ser uma boa fonte alimentar podendo ser considerada um concentrado proteico.

É importante destacar que, dependendo do meio de cultivo, podem ocorrer variações nos percentuais dos seus principais componentes das microalgas, em destaque o teor de proteínas e carboidratos (COLLA et al., 2007). A biomassa deste trabalho apresenta baixos teores de carboidratos, devido ao cultivo não ter como principal objetivo o acúmulo de carboidratos na biomassa, o que deverá apresentar influência no rendimento de bioetanol.

Braga et al. (2018) apresentaram estratégias para estimular o alto teor de carboidratos no cultivo da microalga *Spirulina* visando posteriormente obter altos rendimentos de bioetanol.

Resultados de caracterização química semelhantes foram encontrados por Silva (2017) que utilizou a mesma biomassa deste trabalho, com valores de 65,2% de proteínas, 11,05% de carboidratos, 2,64% de lipídios e 13,65% de cinzas.

4.1.2 Atividades das enzimas amilolíticas e a influência da concentração de substrato sobre a hidrólise microalgal

As atividades das enzimas α -amilase e amiloglucosidase avaliadas em soluções de substratos de amido 1% e de *Spirulina* 10% estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade enzimática das enzimas α -amilase e amiloglucosidase em diferentes substratos.

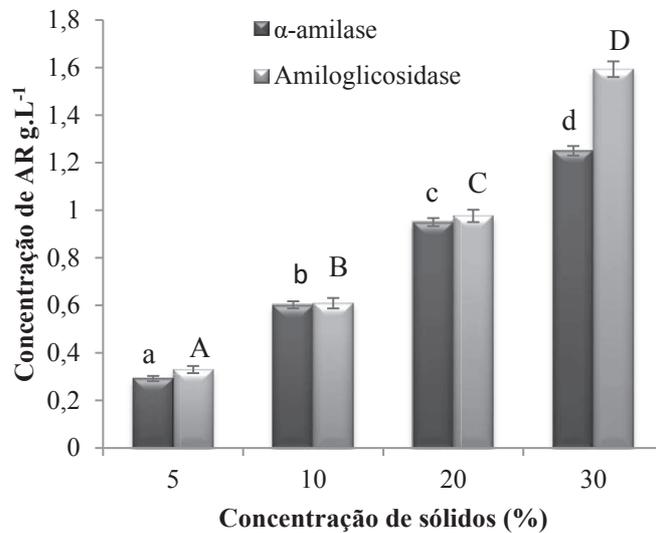
Subtrato (%)	α -amilase (U/mL)	Amiloglucosidase (U/mL)
Amido	0,92±0,03	5,11±0,05
<i>Spirulina</i>	0,62±0,06	3,15±0,09

Resultados de média \pm desvio padrão.

Pode se observar que para ambos os substratos a enzima α -amilase apresenta menor atividade enzimática se comparada com a amiloglucosidase. Os resultados estão de acordo com Frota (2018) e Rempel (2018) que investigaram o efeito do pH e da temperatura para essas mesmas enzimas e obtiveram valores aproximados a este estudo sendo que para o substrato amido obtiveram 0,97 U/mL para a enzima α -amilase e 5,90 U/mL para a enzima amiloglucosidase. Já para o substrato da biomassa de *Spirulina* os valores obtidos por Rempel (2018) são maiores se comparados com este trabalho, 3,27 e 16,01 U/mL para α -amilase e amiloglucosidase, respectivamente. Essas diferenças entre os valores com a biomassa de *Spirulina* podem estar relacionadas com a quantidade de carboidrato presente nas amostras, uma vez que a biomassa deste trabalho apresenta baixo teor de carboidratos.

A Figura 8 apresenta as concentrações de açúcares redutores em função das concentrações de biomassa de *Spirulina* de 5, 10, 20 e 30% utilizando as enzimas amilolíticas.

Figura 8 - Influência da concentração da biomassa de *Spirulina* na concentração de açúcares redutores das enzimas α -amilase e amiloglicosidase.



Letras minúsculas iguais na mesma barra não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança entre as concentrações da enzima α -amilase. Letras maiúsculas iguais na mesma barra não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança entre as concentrações da enzima amiloglicosidase. (Média \pm DP).

Observa-se que com o aumento da concentração de substrato a quantidade de açúcares redutores liberados aumentaram para ambas as enzimas avaliadas. As enzimas α -amilase e amiloglicosidase apresentaram 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, gerará maior concentração de etanol após o processo de fermentação alcoólica.

Guilherme et al. (2014) realizaram experimentos com aumento da carga de substrato 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. Neste estudo a influência na concentração de substrato na liberação de açúcares redutores com uso de 30% de biomassa de *Spirulina* não foi suficiente para causar este efeito negativo.

Observando a Figura 8, a quantidade de açúcares redutores liberados com a enzima amiloglicosidase é maior se comparados aos liberados com o uso da α -amilase. Isso se deve ao fato que as enzimas α -amilases hidrolisam ligações α -1,4 dos polissacarídeos que possuem três

ou mais unidades de D-glucose em união α -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 α -1,4 e α -1,6 apresentando assim, maior liberação de açúcares redutores (PANDEY et al., 2005).

A Tabela 6 apresenta a eficiência de hidrólise (EH) para cada concentração de substrato e para cada enzima, calculada através da Equação 1.

Tabela 6 - Eficiência de hidrólise (EH) da biomassa microalgal de *Spirulina* com enzimas amilolíticas.

Concentração de Substrato (%)	EH (%) α -amilase	EH (%) Amiloglicosidase
5	0,96 \pm 0,002	1,09 \pm 0,007
10	1,99 \pm 0,005	2,01 \pm 0,022
20	3,13 \pm 0,008	3,22 \pm 0,005
30	4,12 \pm 0,002	5,25 \pm 0,033

Resultados de média \pm desvio padrão.

Deve-se levar em consideração que a sacarificação foi em um tempo reacional de apenas 1 hora, sendo assim pode não ter havido a sacarificação completa dos polissacarídeos presentes na biomassa microalgal, mas é possível observar que a maior eficiência de hidrólise verificada foi com a enzima amiloglicosidase com uma concentração de 30% de biomassa microalgal.

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 biomassa microalgal apresentar a melhor concentração para a obtenção de açúcares diretamente fermentescível, observou-se que havia dificuldade de manuseio e de difusão do meio, dificultando o processo de sacarificação.

Neste sentido optou-se que para os ensaios de sacarificações e fermentações simultâneas utilizar a concentração de 20% seria mais viável. Além disso, ao observar as baixas eficiências de hidrólise pelo fato da biomassa microalgal apresentar baixo teor de carboidratos, decidiu-se adicionar uma fonte alternativa de carboidratos que no Brasil apresenta-se em larga escala de produção de matéria prima, com alta concersão de carboidratos em açúcares fermentecíveis e com baixo custo de produção, o milho vem se destacando como fonte de matéria para a produção de bioetanol no Brasil. Assim, com a adição de amido de milho como fonte principal de carboidratos a biomassa microalgal axiliará como fonte de vários micronutrientes que a mesma

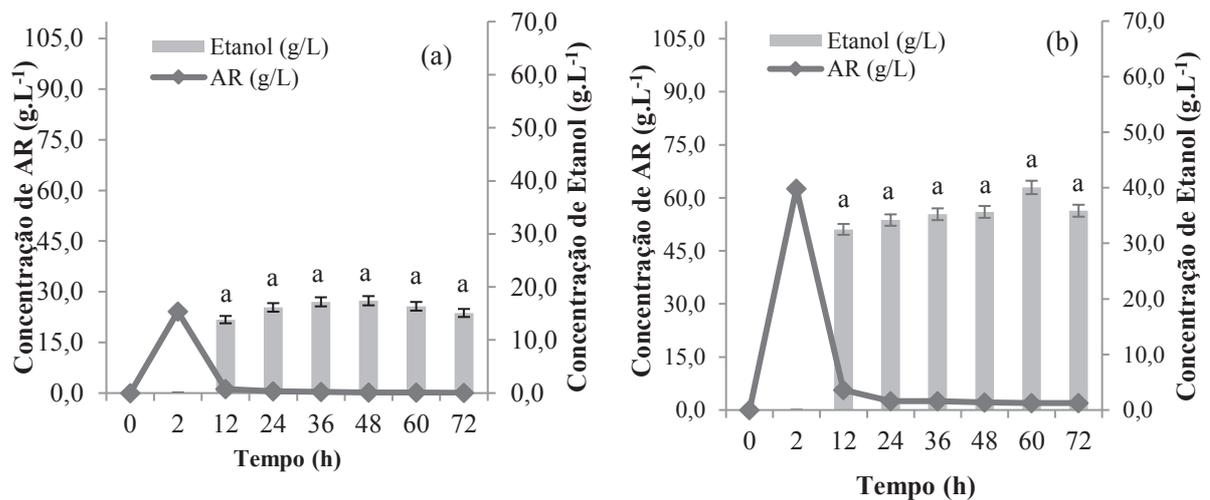
possui, que são interessantes para satisfazer as necessidades da nutrição do meio durante a fermentação.

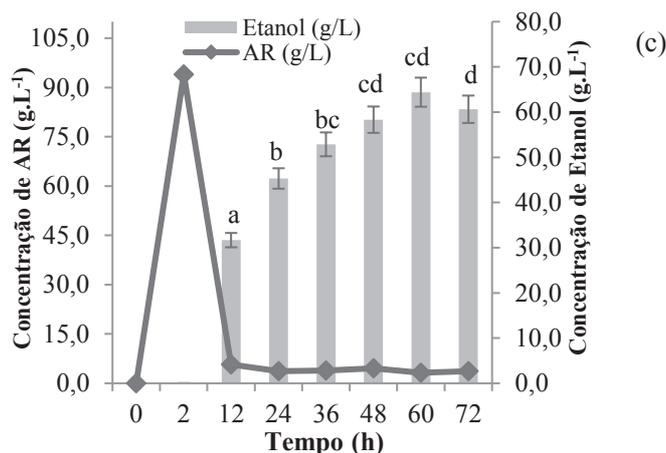
Rempel (2018) realizou o processo de sacarificação separada da fermentação com e sem a adição de macro e micronutrientes ao mosto e verificou que não há necessidade de adição de nutrientes durante a fermentação alcoólica. Os resultados mostraram que somente com a biomassa de *Spirulina* é o suficiente para a suplementação do mosto, pois não houve aumento da multiplicação da levedura com a suplementação de nutrientes.

4.1.3 Sacarificação e fermentação simultânea utilizando biomassa de *Spirulina* sp e amido de milho na produção de bioetanol

A Figura 9 apresenta os resultados de concentração de bioetanol e concentração de açúcares redutores obtidas ao longo das 72 h de processo de sacarificação e fermentação simultâneas, utilizando 0,15 mL de enzima/g de carboidrato e em temperatura de 30 °C. Para as duas primeiras horas foram realizados em todos os ensaios a etapa de pré-hidrólise com a enzima α -amilase (50 °C) e após adicionada a enzima amiloglucosidase e a levedura.

Figura 9 - Perfil da produção de bioetanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados com (a) 5% de amido + 15% *Spirulina*, (b) 10% de amido + 10% *Spirulina* e (c) 15% de amido + 5% *Spirulina*, respectivamente, na temperatura de 30 °C.





Em cada figura e em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Ao comparar os ensaios (a), (b) e (c) no qual apresentavam 66,8, 111,2 e 155,6 g.L⁻¹ de carboidratos respectivamente, observa-se que quanto maior a quantidade de carboidrato no ensaio, maiores foram as concentrações de açúcares redutores após as 2 h de pré-hidrólise devido à fonte de carboidrato ser maior e a enzima α -amilase estar atuando em sua temperatura ótima de 50 °C.

A inoculação da levedura ocasiona a redução da concentração de açúcares redutores já no tempo de 12 h chegando próximo a zero na maioria dos ensaios a 30 °C. Segundo Eklund e Zacchi (1995) esta é uma das características das sacarificações e fermentações simultâneas e que apresentam vantagens se comparado com o processo de sacarificação e fermentação separadas (SHF) pois estas apresentam altas concentrações de glicose e podem vir a inibir a fermentação do bioetanol durante o processo.

Assim conforme foram sendo sacarificados o amido de milho e o amido microalgal, as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por estarem em sua fase exponencial de crescimento e em temperatura ótima (30 °C) utilizou os açúcares redutores para sua própria multiplicação e produção de etanol, e não apresentou inibição pelo produto formado.

Singh et al. (2018) durante o processo de SSF a partir da microalga *Chlorella* sp., observaram uma tendência semelhante de diminuição na concentração de açúcares redutores. Os autores iniciaram a SSF apresentando uma concentração 100 g.L⁻¹ de AR e ao final do processo 98,8% de AR tinham sido consumidos.

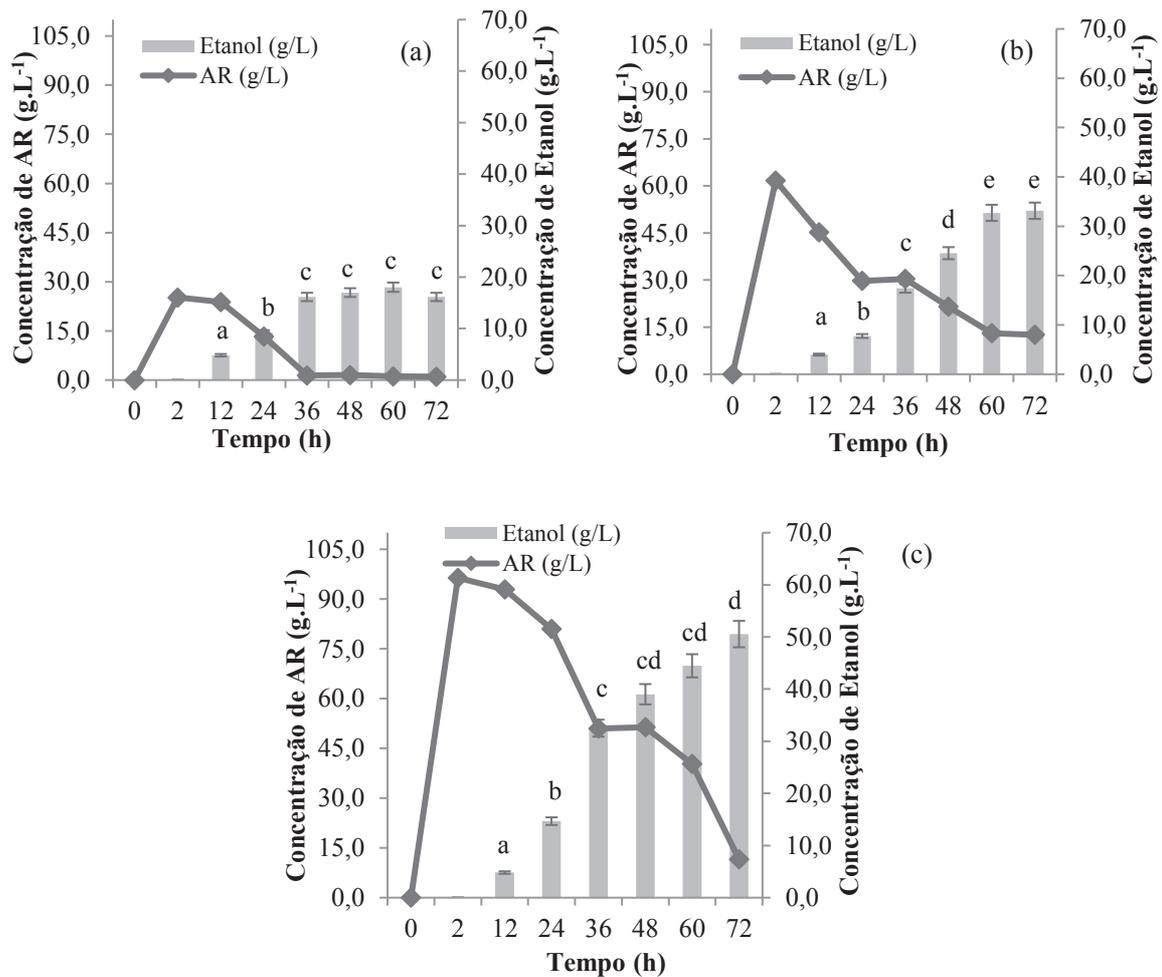
Pode-se observar que o ensaio realizado 5% de amido + 15% *Spirulina* (a) e o ensaio com 10% de amido + 10% *Spirulina* (b) na temperatura de 30 °C não apresentaram diferença

significativa entre os tempos de SSF para a produção de bioetanol. Nestes ensaios a produção de bioetanol a partir das 12 h até o período final manteve-se constante durante toda a SSF.

Já para o ensaio com 15% de amido + 5% *Spirulina* (c) pode-se observar que houve diferença significativa no período inicial de 12 a 24 h e após a medida que a fermentação progrediu com 48 e 60 h a concentração de bioetanol aumentou chegando ao máximo de 64,4 g.L⁻¹ e não apresentou diferença significativa para ambos os tempos. Ao avaliar os 3 ensaios na condição de temperatura de 30 °C, observa-se que o ensaio “c” com 15% de amido + 5% *Spirulina* apresentou a maior quantidade de bioetanol ao longo do processo de SSF.

A Figura 10 apresenta os resultados de concentração de bioetanol e concentração de açúcares redutores ao longo do processo de SSF utilizando temperatura de 40 °C.

Figura 10 - Perfil da produção de bioetanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados com (a) 5% de amido + 15% *Spirulina*, (b) 10% de amido + 10% *Spirulina* e (c) 15% de amido + 5% *Spirulina*, respectivamente, na temperatura de 40 °C.



Em cada figura e em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

Pode-se observar que entre os ensaios realizados na temperatura de 30 °C e os ensaios realizados a 40 °C, estes apresentaram maiores concentrações de AR após as 12 h de SSF independente da concentração utilizada. As altas concentrações de AR podem estar relacionadas com a temperatura que estes ensaios ocorreram, no qual estão fora da temperatura ótima da levedura, porém mais próxima da temperatura ótima da ação das enzimas amilolíticas (50 °C). Neste caso supõe-se que a levedura não se adaptou e seu desenvolvimento de células e a formação de produto foram afetadas.

Assim observa-se que em exceto os ensaios com 5% de amido + 15% *Spirulina* nas temperaturas de 30 ou de 40 °C obtiveram concentrações próximas de bioetanol, porém com a temperatura de 30 graus a maior concentração de etanol pode ser atingida em apenas 12 h. Já para o ensaio com 40 graus, maiores rendimentos de bioetanol são encontrados a partir de 36 h.

Para os ensaios com 10% de amido + 10% *Spirulina* (b) e 15% de amido + 5% *Spirulina* (c) em temperatura maior, a produção de bioetanol aumentou gradativamente conforme o decorrer do processo, no entanto, nesta condição de temperatura (40 °C) a produção de bioetanol nas primeiras horas e a medida que a fermentação progrediu até 72 h foram mais baixas em relação aos ensaios com temperatura de 30 °C.

O ensaio 3 apresentou a maior concentração em g.L⁻¹ de bioetanol se comparado com os demais ensaios. Neste mesmo ensaio foi obtida a maior eficiência de etanol, 73,64% (Tabela 7). Estes valores justificam-se pelo fato deste apresentar maior concentração de carboidrato e ser realizado na temperatura de 30 °C, beneficiando o desenvolvimento da levedura e formação de produto. A Tabela 7 apresenta a eficiência da etapa de pré-hidrólise após 2 h de sacarificação e a eficiência de etanol em cada ensaio.

Tabela 7 - Eficiência de Pré-hidrólise (2 h) e eficiência de etanol SSF.

Ensaio	Eficiência de Pré-hidrólise (EPH)	Eficiência de Etanol (η)
1	34,03±1,16 ^a	46,35±2,79 ^a
2	53,67±1,85 ^A	64,10±2,01 ^{bc}
3	56,28±2,66 ^A	73,64±0,72 ^c
4	36,88±2,17 ^a	51,08±3,57 ^{ab}
5	52,52±2,47 ^A	53,02±0,67 ^{ab}
6	58,43±3,62 ^A	57,80±3,12 ^{ab}

Ensaio 1 - 5% de amido + 15% *Spirulina* a 30°C. **Ensaio 2** - 10% de amido + 10% *Spirulina* a 30°C. **Ensaio 3** - 15% de amido + 5% *Spirulina* a 30°C. **Ensaio 4** - 5% de amido + 15% *Spirulina* a 40°C. **Ensaio 5** - 10% de amido + 10% *Spirulina* a 40°C. **Ensaio 6** - 15% de amido + 5% *Spirulina* a 40°C. *Média ± desvio padrão, (n = 2). Letras minúsculas, maiúsculas e maiúsculas em negrito iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança entre as eficiências de pré-hidrólise e eficiências de etanol.

Observa-se na Tabela 7, que a eficiência de pré-hidrólise em 2 h na temperatura ótima da enzima (50 °C) apresentaram eficiências estatisticamente iguais para as mesmas concentrações de fontes de carboidratos.

Para os ensaios 3 e 6 com 15% de amido + 5% *Spirulina* aproximadamente 60% dos polissacarídeos foram hidrolisados durante a pré-hidrólise. A pré-hidrólise auxiliou positivamente no processo de SSF, pois a transformação dos polissacarídeos em glicose é uma fonte de nutrição inicial importante para o desenvolvimento da levedura.

Ye et al. (2018) realizaram a produção de bioetanol com duas fontes de matérias primas, utilizando o processo de SSF realizou uma pré-sacarificação por duas horas e obteve maiores rendimentos e principalmente reduziu a dificuldade de transferência de massa na carga de sólidos com a atuação das enzimas de liquefação.

Cotana et al. (2015) realizaram a etapa de pré-hidrólise por 24 h a 50 °C e garantiu uma alta concentração de glicose para iniciar a fermentação com o inocúlo de levedura e em paralelo o meio apresentou uma boa liquefação da biomassa que garantiu uma eficiente transferência de massa.

Neste trabalho, foi perceptível após a pré-hidrólise a redução da viscosidade do meio. Este fato está relacionado com a enzima α -amilase que 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 desta 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 a adição de outra enzima (REGULY, 1996).

A enzima amiloglucosidase que foi adicionada juntamente com o inocúlo de levedura, teve como principal papel atuar sobre ligações α -1,4 e α -1,6, porém de forma mais lenta, atuando em substratos pré-hidrolisados pela α -amilase e também nas que não passaram pela ação da α -amilase, realizando a transformação das dextrinas em glicose de forma mais rápida apesar de estar atuando fora da sua temperatura ótima (REGULY, 1996).

As duas maiores eficiências de etanol (Tabela 7) foram obtidas nas temperaturas de 30 °C nos ensaios 2 e 3. A temperatura de 30 °C para a levedura *S. cerevisiae* CAT-1 se apresentou melhor se comparada com os ensaios realizados na temperatura de 40 °C, indicando que esta cepa de levedura não suporta altas temperaturas.

Edgardo et al. (2008) realizaram a seleção de cepas de leveduras termotolerantes para a produção de bioetanol em processo de SSF e conseguiram realizar o processo mais próximo da temperatura ótima da enzima tornando o processo mais eficiente.

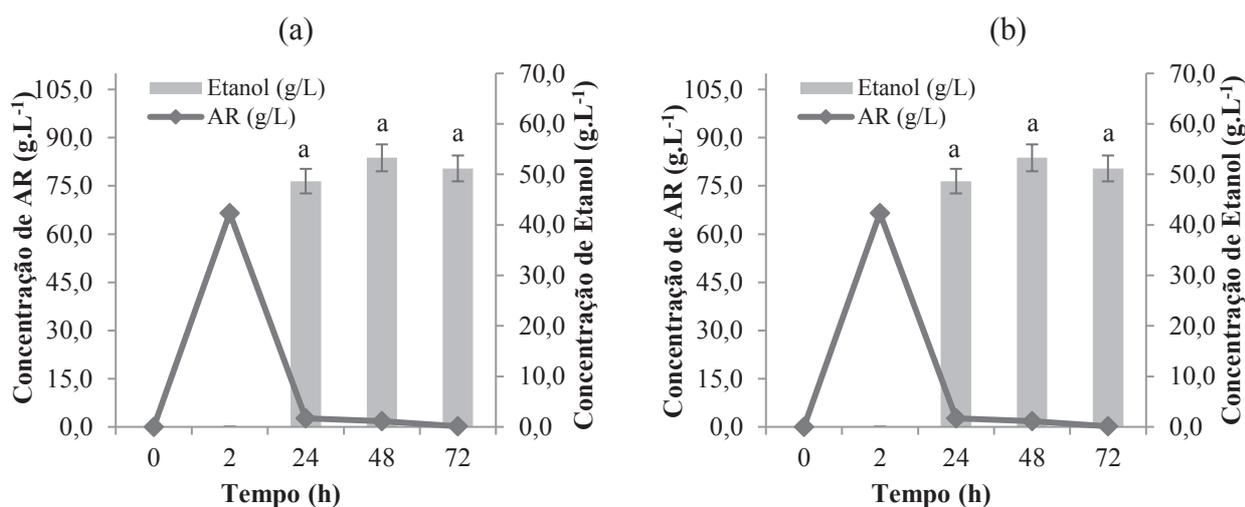
El-Dalatony et al. (2016) utilizando biomassa de microalga para a produção de bioetanol, imobilizou a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e realizou o processo de SSF por 7 vezes obtendo uma eficiência de etanol de 79,5%.

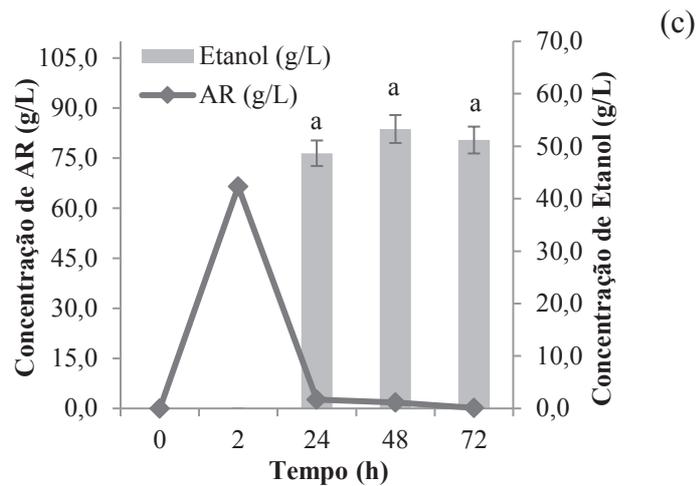
Como para o processo em SSF requer uma condição intermediária de temperatura para as enzimas e para a levedura adicionada, a pré-hidrólise na temperatura ótima da enzima neste trabalho foi essencial para obter maiores rendimentos de bioetanol.

4.1.4 Estudo de concentração de enzima para aumento de escala

Buscando aumentar a escala de produção de bioetanol observou-se que seria necessário um grande volume de enzima. Neste sentido diminuir custos com as enzimas para o aumento de escala na produção de bioetanol é imprescindível. A Figura 11 apresenta as SSF que foram realizadas variando as concentrações de cada enzima. Os ensaios ocorreram na melhor condição encontrada de 15% de amido + 5% *Spirulina* e em temperatura de 30 °C realizando a etapa de pré-hidrólise de duas horas com a enzima α -amilase em temperatura de 50 °C.

Figura 11 - Perfil da produção etanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios variando concentração de enzima, na temperatura de 30 °C.





(a) - 1% de enzima α -amilase e 1% de amiloglicosidase, (b) - 0,5% de enzima α -amilase e 0,5% de amiloglicosidase e (c) - 0,25% de enzima α -amilase e 0,25% de amiloglicosidase. Em cada figura e em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média \pm DP).

A concentração de etanol entre os tempos avaliados para as diferentes concentrações de enzimas não se deferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre todos os ensaios de SSF.

A Tabela 8 apresenta as eficiências de pré-hidrólise e as eficiências de etanol nas diferentes concentrações de enzimas avaliadas.

Tabela 8 - Eficiência de Pré-hidrólise (2 h) e eficiência de etanol para os ensaios de concentração de enzima.

Concentração de Enzima	Eficiência de Pré-hidrólise (EPH)	Eficiência de Etanol (η)
1%	51,70 \pm 1,61 ^a	64,76 \pm 1,92 ^a
0,5%	51,55 \pm 3,89 ^a	61,88 \pm 2,69 ^a
0,25%	40,51 \pm 1,58 ^a	60,92 \pm 2,69 ^a

Resultados de média \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa entre si ao nível de 95% de confiança.

Pode se observar que não diferença significativa entre as concentrações avaliadas de enzima para as eficiências de pré-hidrólise e as eficiências de etanol, portanto é lucrativo utilizar a concentração menor de enzima, visando economia da mesma e tornando o processo viável em escalas maiores.

Existem vários trabalhos na literatura relatando que o processo de SSF utiliza menor quantidade enzimas se comparado com o processo SHF.

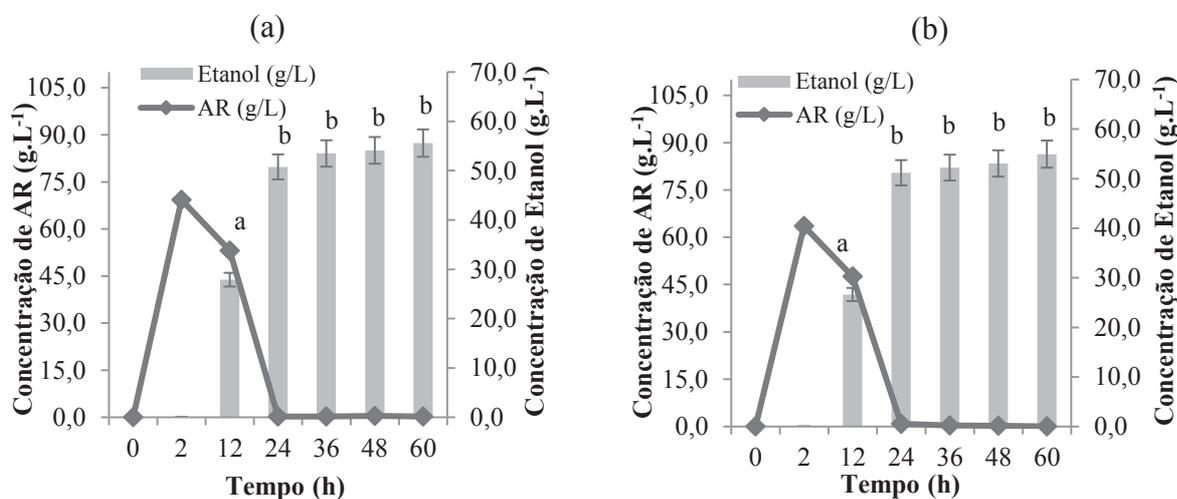
Rempel (2018) em seu estudo utilizando o processo de SHF na produção de bioetanol a partir da biomassa de *Spirulina* sp. com 55% de carboidratos utilizou 1% (v/v) das enzimas α -amilase e amiloglucosidase.

Além de diminuir os custos, segundo Carrillo et al (2005) os excessos de enzima limitam o processo de difusão da enzima no substrato e conseqüentemente, a formação de glicose. Santos et al (2010) observaram este fenômeno quando realizaram hidrólises do bagaço de cana-de-açúcar, com diferentes cargas enzimáticas. Devido a este fato, eles optaram por utilizar uma carga enzimática menor na etapa de sacarificação e fermentação simultâneas.

4.1.5 Aumento de escala para a produção de bioetanol a partir da biomassa de *Spirulina* sp com adição de amido de milho

A Figura 12 apresenta o aumento de escala para a produção de bioetanol em Biorreator com 15% de amido + 5% *Spirulina* a 30 °C.

Figura 12 - Perfil da produção etanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados em biorreator.



Em cada figura e em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

É possível observar que as duplicatas produziram em média 55 g.L⁻¹ de etanol e ambas apresentaram após 2 h de pré hidrólise uma concentração média de 70 g.L⁻¹ de açúcares redutores.

As SSF em biorreator apresetaram uma eficiência média de pré hidrólise de 40,18% e uma eficiência média de etanol de 62,94%. Ao comparar a eficiência de etanol e a eficiência de

pré-hidrólise realizada no biorreator e em erlenmeyer durante o estudo das concentrações de enzima (Tabela 8) se apresentam semelhantes, indicando que o aumento de escala de 10 vezes maior não ocasionou alterações durante o processo de SSF.

Ainda observando a Figura 12, após 24 h de SSF a produção de bioetanol não apresentou diferença significativa entre os demais tempos avaliados, concluindo que 24 h de SSF é o suficiente para obter altos rendimentos de bioetanol em um único biorreator.

Chen et al (2018) utilizaram as misturas de 20% amido de milho e 10% de palha de milho em processo de SSF por 120 horas e obtiveram 104,89 g.L⁻¹ de etanol e um rendimento de processo de 80,47% de etanol após 48 horas de processo se mantendo constante até 120 horas.

Neste sentido a sacarificação e fermentação simultâneas se apresenta como um bom processo para a produção de bioetanol em larga escala, uma vez que produto é produzido em um único biorreator diminuindo custos com biorreatores, tempo e concentração de enzima.

Além disso, neste trabalho não foi necessário a adição de fontes de nutrientes durante o processo de SSF, uma vez que além da biomassa de *Spirulina* sp. apresentar fonte de carbono proporciona nutrientes disponíveis suficientes para a nutrição da levedura durante o processo fermentativo evidenciado pelos estudos de Rempel (2018).

4.2 ETAPA 2: PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS A PARTIR DO RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO BIOMASSA DE *SPIRULINA* SP ADICIONADA DE AMIDO DE MILHO

4.2.1 Caracterização química do resíduo

A caracterização química do resíduo oriundo da produção de bioetanol realizado em biorreator com concentrações de 15% de amido + 5% *Spirulina* a 30 °C utilizando o processo de sacarificação e fermentação simultâneas esta apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 – Caracterização química do resíduo da SSF realizada em biorreator.

Componentes	Base Úmida (g/100g)	Base Seca (g/100g)
Proteína	13,69±0,74	61,25±0,74
Carboidratos*	1,38±0,02	6,17±0,02
Lipídeos	3,41±0,12	15,25±0,12
Cinzas	3,87±1,54	17,31±1,54
Umidade	77,65±1,36	-

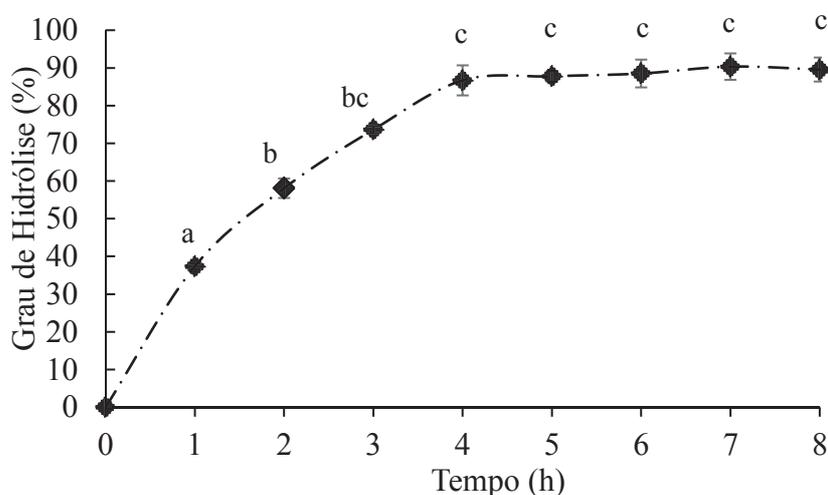
Resultados de média ± desvio padrão. *Resultado obtido por diferença.

Observa-se que este resíduo apresenta uma quantidade significativa de proteína, levando em consideração que além da proteína da biomassa microalgal, há a presença das proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e das enzimas. Neste sentido foi avaliada a quantidade de proteína antes de adicionar as enzimas amilolíticas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de SSF e obtido uma média de 3,90 g/100g de proteína em base úmida. Assim, durante o processo de produção de bioetanol obteve-se maior teor de proteína, gerando um resíduo com maior valor proteico.

4.2.2 Grau de hidrólise

Os resultados de grau de hidrólise (GH) do resíduo da produção de bioetanol estão apresentados na Figura 13 no qual foram avaliados por 8 h de reação.

Figura 13 - Grau de hidrólise do resíduo da produção de bioetanol e obtenção de peptídeos.



Na linha, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

A hidrólise enzimática apresentou maior GH em 4 h de reação (86%) e após manteve-se constante ao longo das 8 h de reação. Observa-se que como não houve diferença significativa após as 4 h de hidrólise, considera-se que este tempo é o suficiente para obter-se o maior rendimento de grau de hidrólise.

Rendimentos elevados são requeridos quando se trata da obtenção de produtos de alto valor agregado, ao contrário de produtos de baixo valor agregado, em que elevada produtividade é mais importante (PEREIRA, 2016).

O alto rendimento do GH pode ser explicado pela acessibilidade da protease às proteínas, visto que a enzima necessita ligar-se à superfície da molécula para ter acesso às ligações peptídicas e iniciar a hidrólise (PEREIRA, 2016). A hidrólise enzimática das proteínas envolve uma mudança estrutural, onde a proteína é gradualmente clivada em unidades menores de peptídeos (MARTINS et al., 2009). Após para a quantificação do grau de hidrólise, ao adicionar o ácido tricloroacético resulta na precipitação parcial ou total de proteínas não hidrolisadas, produzindo uma concentração mais elevada de aminoácidos livres solúveis e peptídeos de menor peso molecular presentes no sobrenadante (CARREIRA et al., 2003).

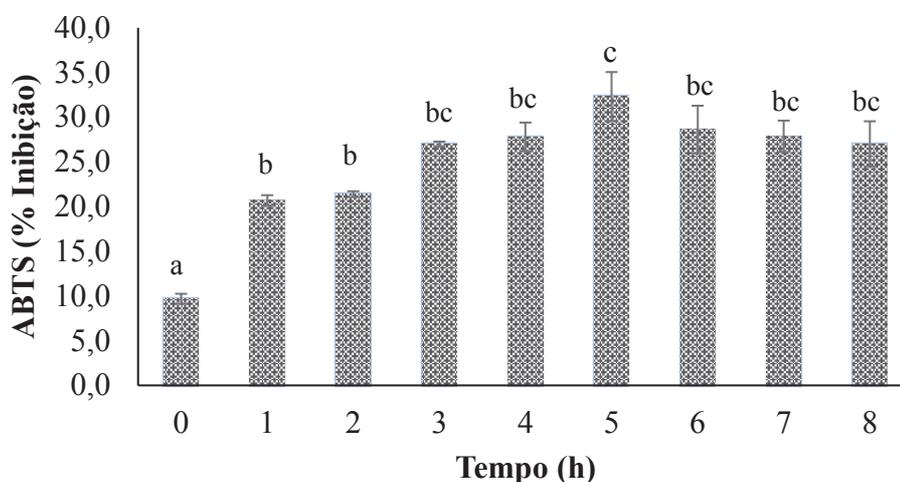
Peptídeos de menor peso molecular são desejados pois melhoram suas propriedades funcionais como a digestibilidade, solubilidade e capacidade de retenção de água (DAMODARAM et al., 2010).

Vários estudos recentes confirmaram a aplicabilidade de peptídeos promovendo a saúde a partir de alimentos funcionais: Silva (2016) ao isolar os peptídeos da microalga *Spirulina* sp. e ao adicionar em *snacks* evidenciou propriedades antioxidantes apresentando um alimento saudável para o consumo humano. Chatterjee, Kanawjia e Khetra (2016) mostraram que a adição de um hidrolisado de proteína de soro de leite a um iogurte aumentou significativamente a enzima conversora da angiotensina e atividade antioxidante confirmando a manutenção da estabilidade do peptídeo durante o processamento e dentro da matriz de alimentar.

4.2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante durante a hidrólise do resíduo da produção de bioetanol, determinada pela inibição do radical ABTS está apresentada na Figura 14.

Figura 14 - Porcentagem de inibição do radical ABTS ao longo da hidrólise do resíduo da produção de bioetanol.



Em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

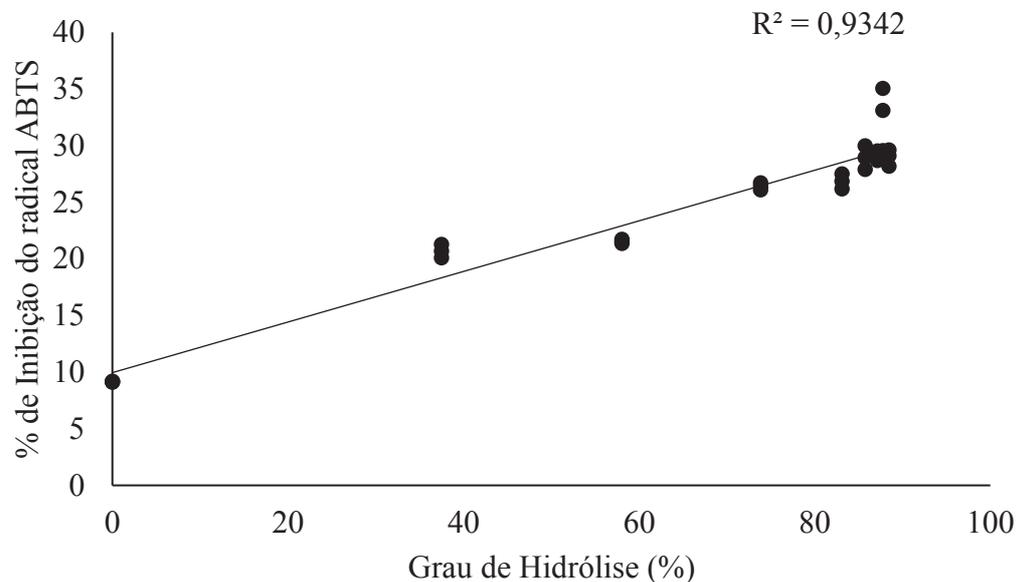
Analisando a Figura 14 verifica-se que com uma duas de hidrólise enzimática com a enzima protease atuando sobre o resíduo da produção de bioetanol apresentou aproximadamente 22% de inibição do radical ABTS. Após observa-se que a porcentagem de inibição se manteve estatisticamente igual até o período de 4 h de reação, enquanto que em 5 h de grau de hidrólise apresentou a maior porcentagem (32%) de inibição do radical ABTS sendo diferente estatisticamente de todos os demais tempos de hidrólise.

Para os demais tempos analisados após as 5 h de GH não apresentaram diferença estatística para a inibição do radical ABTS. O tempo inicial de GH se apresentou diferente estatisticamente dos demais tempos apresentando baixa atividade antioxidante se comparado com os demais tempos de GH. Neste sentido, para alcançar maior atividade antioxidante nos biopeptídeos é importante manter 5 h de reação mesmo que com 4 h seja alcançado o maior GH.

Portanto observa-se que há uma correlação entre o GH e a atividade antioxidante ao decorrer da reação de hidrólise. Segundo Elias et al (2008) o aumento da atividade antioxidante é decorrente das mudanças na estrutura da proteína resultantes do processo de hidrólise enzimática, expondo os peptídeos com propriedades antioxidantes, os quais reagem mais efetivamente com os radicais que na proteína intacta.

A Figura 15 apresenta o coeficiente de correlação (R^2) entre o potencial antioxidante e o grau hidrólise.

Figura 15 - Coeficiente de determinação (R) entre o potencial antioxidante e o grau de hidrólise.



Observa na Figura 15 que conforme aumenta o GH aumenta o potencial antioxidante concluindo que houve a hidrólise enzima e que os peptídeos com propriedades antioxidantes foram liberados.

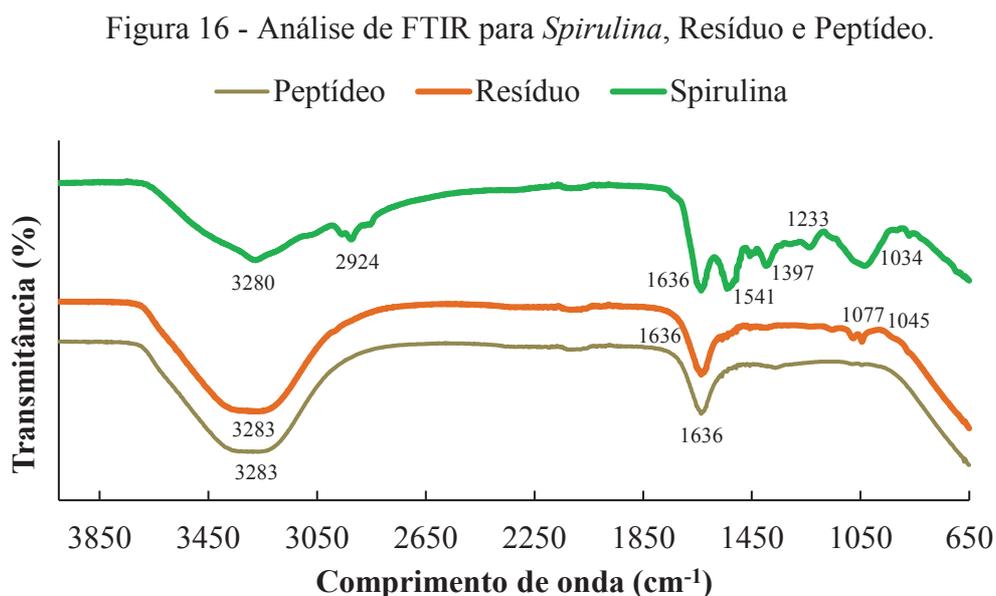
Lisboa et al. (2016) e Costa et al. (2019) afirmam que a hidrólise enzimática da *Spirulina* LEB 18 foi importante para a liberação de biopeptídeos que estavam inativos na biomassa não hidrolisada, mas que apresentavam alta atividade antioxidante. As autoras ainda afirmam que os hidrolisados com alto grau de hidrólise, apresentam maior quantidade de peptídeos de baixo peso molecular e, conseqüentemente, maior potencial de inibição em relação aos hidrolisados com baixo GH.

Costa et al. (2019) ao hidrolisar a biomassa da *Spirulina* LEB 18 obtiveram um GH de 61,9% e uma porcentagem de inibição do radical ABTS de 21,3%. Estes resultados estão semelhantes com este trabalho que apresentou maior GH e conseqüentemente maior atividade antioxidante, em relação ao estudo de Costa et al (2019).

Desta forma, a hidrólise enzimática das proteínas presentes no resíduo da produção de bioetanol gerou um perfil de peptídeos capazes de inibir o radical ABTS demonstrando que a partir de um resíduo é possível obter uma fonte de biopeptídeos com potencialidade de ser aplicado em sistemas alimentares e biológicos apresentando benefícios para a saúde humana, uma vez que antioxidantes sintéticos adicionados em alimentos possuem atividade carcinogênica e sua aplicação na indústria de alimentos ainda é maior e predominante com relação aos bioativos de fonte natural (BOZKURT, 1995).

4.2.4 Avaliação de espectroscopia na região do infravermelho

A Figura 16 apresenta a análise de FTIR que foi utilizada para avaliar a diferença dos grupos funcionais presentes na biomassa de *Spirulina* sp. em relação ao resíduo e ao peptídeo obtido pela hidrólise proteica.



A análise de infravermelho com transformada de Fourier para a microalga *Spirulina* apresentou em sua composição picos referentes à presença de proteínas em 3280 cm⁻¹ e 2924 cm⁻¹, esta banda observada na *Spirulina* são atribuídas à vibração de estiramento -NH de amina secundária (proteína) e grupos funcionais -OH (hidroxilo) presentes na proteína da *Spirulina* (SUGANYA et al., 2015).

As bandas observadas na biomassa de *Spirulina* em 1541 cm⁻¹, 1397 cm⁻¹, 1233 cm⁻¹ podem ser atribuídas de amida I que resulta das vibrações de estiramento C=O das ligações peptídicas, amida II, que resulta da curvatura do N-H e vibrações de estiramento C-N e a cadeia lateral de proteína COO⁻ e a banda amida III estão presentes, respectivamente (BATALLER e CAPAREDA, 2018).

Bataller e Capareda (2018) avaliaram a microalga *Spirulina plantensis* através do FTIR apresentando semelhanças de bandas características de carboidratos, C-O e C-C, que é observada em 1034 cm⁻¹ e também a banda de característica lipídica que é observada em 1653cm⁻¹ apresentando possível sobreposição com a amida I.

As áreas de algumas bandas (Figura 15) observados na *Spirulina* foram alteradas após a produção de bioetanol e da hidrólise protéica. A área da banda 3283 cm^{-1} do resíduo e do peptídeo aumentou ao ser hidrolisada se comparando com o pico da *Spirulina*.

Observa-se que em exceto a banda 1636 cm^{-1} que permaneceu no peptídeo, no resíduo e na *Spirulina*, as demais bandas desapareceram ao hidrolisar a biomassa microalgal, tanto com as enzimas amilolíticas quanto com a enzima protease. Isso indica que houve hidrólise nos polissacarídeos liberando principalmente glicose e demais produtos fermentecíveis (banda 1034 cm^{-1}). Além disso, ocorreu a clivagem das ligações peptídicas no resíduo em aminoácidos livres e outras ligações peptídicas de menor peso molecular (bandas 1541 cm^{-1} , 1397 cm^{-1} , 1233 cm^{-1}) através do mecanismo de ação da enzima utilizada (serino-peptidase) no processo de hidrólise, na qual age no átomo de carbono da carbonila presente na ligação peptídica.

Neste sentido os espectros de FTIR mostraram um resultado muito importante em termos da eficiência da hidrólise de proteínas e dos carboidratos observando a ausência de bandas características destes componentes a partir da análise do peptídeo, afirmando que o uso de espectros de FTIR é uma boa ferramenta para avaliar a diferença dos grupos funcionais confirmando que ocorreram hidrólises durante os processos.

4.2.5 Estabilidade Térmica

A biomassa de *Spirulina*, o resíduo e os peptídeos foram analisados termicamente e os resultados estão apresentados na Tabela 10 e na Figura 16, respectivamente.

Tabela 10 - Calorimetria exploratória diferencial da *Spirulina* sp, do resíduo e do peptídeo.

Tratamentos	Tp (°C)	ΔH (J/g)
<i>Spirulina</i> sp.	76,36	151,44
Resíduo	96,71	1388,58
Peptídeo	101,48	2248,98

Tp: temperatura do pico; ΔH: entalpia.

As temperaturas envolvidas no processo de desnaturação das proteínas da *Spirulina* foi $76,36\text{ °C}$, já para o resíduo a temperatura de desnaturação foi a $96,71\text{ °C}$ enquanto que o peptídeo apresentou desnaturação em $101,48\text{ °C}$. Observa-se que ao hidrolisar as proteínas do resíduo a temperatura de desnaturação aumentou para o peptídeo, sendo está uma vantagem

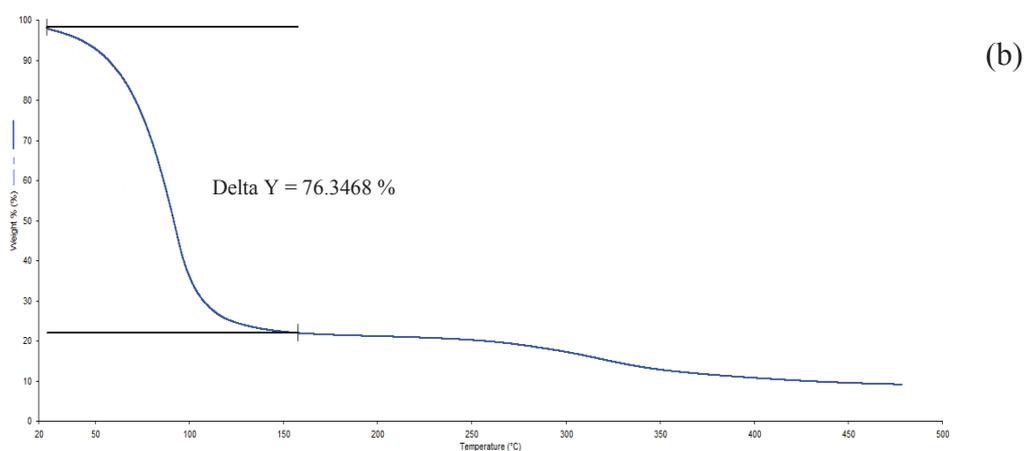
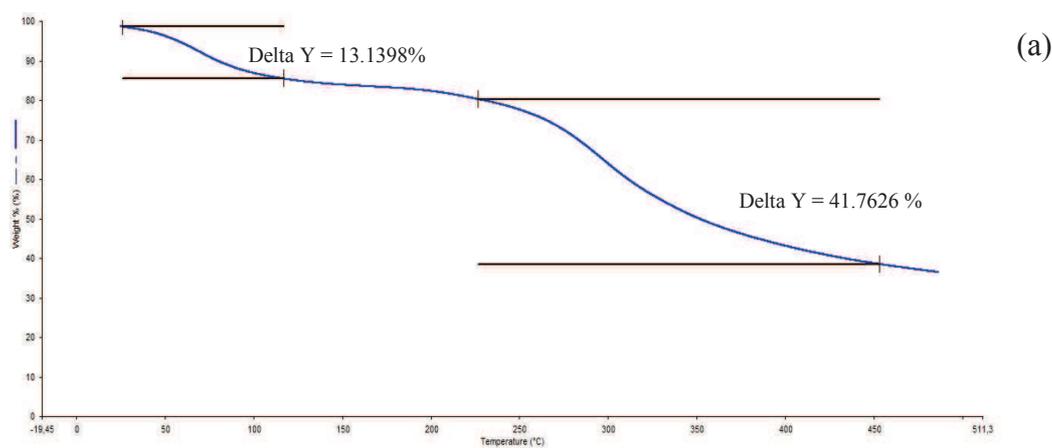
quando este for aplicado em alimentos que requerem altas temperaturas durante o processamento.

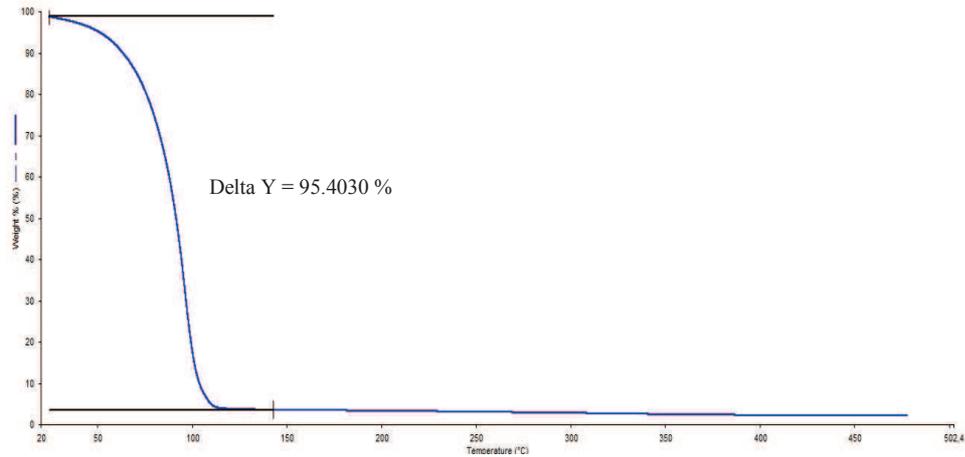
A entalpia envolvida no processo (ΔH) foi maior no peptídeo (2248,98 J/g), enquanto que para a *Spirulina* sp. foi de 151,44 J/g, demonstrando que com o processo de hidrólise enzimática a energia necessária para que ocorresse a desnaturação aumentou, melhorando a estabilidade térmica (TRIVEDI et al., 2015).

Este aumento da estabilidade pode ser decorrente das estruturas mais simples da proteína (ausência das estruturas terciárias e quaternárias) das ligações peptídicas e composição de aminoácidos mais estáveis presentes na fração de menor peso molecular, aumentando a estabilidade das moléculas diante do aumento de temperatura (SILVA, 2017).

A Figura 17 apresenta as análises termogravimétricas para a *Spirulina* sp, resíduo e biopeptídeo.

Figura 17 - Análise Termogravimétrica (TGA) da *Spirulina* sp, resíduo e biopeptídeos.





(c)

Termogramas de TGA da (a) *Spirulina* sp. (b) Resíduo, (c) Peptídeo.

A análise de TGA exibiu a perda de massa em duas fases para a biomassa de *Spirulina* sp. A primeira houve uma perda menor de 13,13% em uma faixa de temperatura de 30 a 125 °C e a segunda fase uma perda maior de massa igual a 41,76% em temperaturas mais elevadas (230 a 453 °C).

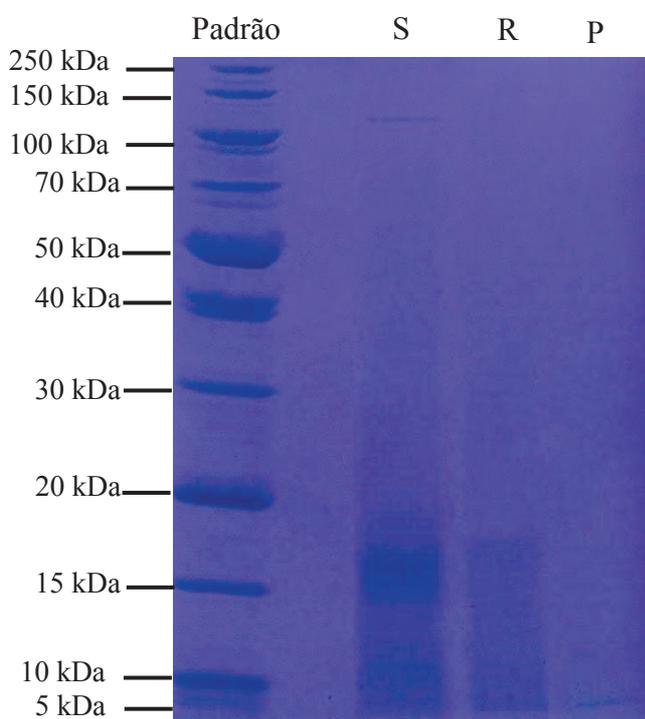
Segundo Jesus et al. (2019) que avaliaram a biomassa de *Spirulina* sp LEB-18 e também identificaram 2 fases envolvendo a perda de massa, a primeira na faixa de 90 °C envolvendo a desidratação e desvolatilização e a segunda associada a decomposição dos compostos presentes na faixa de 350 °C.

A perda de massa para o resíduo foi de 76,34% enquanto que para o peptídeo a perda de massa foi maior (95,40%) se comparado com a biomassa da microalga e com o resíduo. Esta perda de massa é caracterizada pela quantidade de água, logo, a perda depende fortemente do teor de umidade da amostra. Ainda assim os peptídeos podem ser adicionados em processos que envolvam temperaturas de até 100 °C garantindo suas propriedades e demonstrando o potencial de aplicação em alimentos funcionais.

4.2.6 Eletroforese

Na Figura 18 está apresentado a análise por SDS-PAGE da biomassa da *Spirulina*, do resíduo e do biopeptídeo.

Figura 18 - SDS-PAGE das proteínas presentes no padrão, na biomassa da *Spirulina* (S), no resíduo (R) e no biopeptídeo (P).



Fonte: O autor (2019).

A análise por SDS-PAGE da biomassa de *Spirulina* sp., do resíduo e dos biopeptídeos permitiu observar que houve diminuição da massa molecular das proteínas.

Para a biomassa de *Spirulina* sp observa-se várias bandas de peso molecular de 100 kDa, 15 kDa, 10 kDa e 5 kDa. O mesmo pode ser observado nas bandas detectadas para o resíduo em exceto a banda de peso molecular 100 kDa.

Já para os peptídeos não houve a detecção de bandas maiores que 5 kDa, indicando que é possível haver peptídeos com massa molecular menor que 5 kDa. Essas mudanças ocorridas no peso molecular são devido a ação da enzima protease durante o processo de grau de hidólise gerando peptídeos de diferentes tamanhos e sequência de aminoácidos, o que pode determinar a capacidade antioxidante (Figura 14) (LISBOA et al., 2016).

Vizcaíno et al. (2019) ao realizarem a análise por SDS-PAGE mostrou que em geral as proteínas das quatro microalgas estudadas foram hidrolisadas por proteases digestivas podendo ser adicionadas em rações de peixes.

Desta forma, com a análise por SDS-PAGE permitiu confirmar que ocorreu a hidrólise das proteínas que estavam presentes no resíduo da produção de bioetanol e que naquela forma intacta a massa molecular era maior e apresentava pouca atividade antioxidante.

5 CONCLUSÕES

O bioetanol de *Spirulina* sp. adionado de amido de milho produzido através do processo de sacarificação e fermentação simultânea se apresentou como uma boa forma para diminuir os impactos ambientais e suprir a demanda energética de combustíveis utilizando biomassas de fontes renováveis.

Com a utilização de diferentes configurações de carboidratos foi possível chegar a eficiências de 73,6% de bioetanol, diminuir o volume de enzima no processo de SSF e aumentar a escala de produção em 10 vezes sem baixar significativamente o rendimento.

O resíduo da etapa de produção de bioetanol da microalga adicionada de amido de milho pode ser usado para a obtenção de biopeptídeos que apresentou resultados elevados de hidrólise. O baixo peso molecular e a estabilidade frente a temperaturas maiores bem como a capacidade antioxidante que o biopeptídeo apresentou, leva a ser considerado uma boa opção de antioxidante natural.

Diante disso, este estudo demonstrou que é possível desenvolver uma biorrefinaria integrada produzindo bioetanol e utilizando o resíduo para a produção biopeptídios no qual é considerado um coproduto de alto valor agregado podendo ser uma alternativa para serem incorporados no consumo de alimentos fornecendo funcionalidade e maior valor nutritivo, agregando assim maior viabilidade e sustentabilidade no processo.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, N., GOYAL, D., GOYAL, A., Characterization of microwave-alkali-acid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Energy Conversion and Management** v.141p. 133–144, 2017.
- 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.
- ANDRADE M. R., COSTA J.A.V. Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência agrotecnologia**. v.32, p. 1551-15562, 2008.
- ANEIROS, A., & GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological 326 properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography B**, 803, 41-53, 2004.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. VII - Lista dos Novos Alimentos aprovados. Maio. 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm>. Acesso em: 11 abr 2018.
- AMAROWICZ, R., PEGG, R. B., RAHIMI-MOGHADDAM, P., BARL, B., WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. **Food Chemistry**, v.84, n.4, p.551- 62, 2004.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- ASSUNÇÃO, F. C. R. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, 2010.
- BAI, F. W., ANDERSON, W. A. e MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, n.1, p.89-105. 2008.
- BARRET, A. J., RAWLINGS, N. D., O'BRIEN, E. A. The Merops database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BATALLER, B. G.; CAPAREDA, S. C. A rapid and non-destructive method for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis* via Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal Research**, v. 32, p. 341-352, 2018.
- BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, p. 164-173, 2013.
- BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.

BRAGA, V. D. S.; MASTRANTONIO, D. J. D. S.; COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 221–226, 2018.

BRASIL. Resolução RDC no 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3b43f08047457c0188d5dc3fbc4c6735/RDC_268_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 mai. 2018.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

BENJAPHOKEE S, HASEGAWA D, YOKOTA D, ASVARAK T, AUESUKAREE C, SUGIYAMA M., Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **New Biotechnol**; v. 29 p. 379–86, 2012.

BETORET, E.; BETORET, N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2001.

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.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro, Ed. Interciência, 2008.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRETHAUTER, S.; WYMAN, C. E., Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, **Bioresource Technology**, v. 10, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 20, n.2, p.36-52, 2005.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica: Bioquímica básica**. São Paulo. Thomson, 5ª ed., 2007.

CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; LOPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3360-3364, 2005.

CARREIRA, R. L., ORNELLAS, C. B. D., MORAIS, H A., MOTTA, S., SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. **Ciência agrotecnologia**, v.27, n.2, p.414-421, 2003.

CASTRO, A. M., DE ANDREA, T. V., CARVALHO, D., TEIXEIRA, M., CASTILHO, L. R. e FREIRE, D. M. G. Valorization of Residual Agroindustrial Cakes by Fungal Production of Multienzyme Complexes and Their Use in Cold Hydrolysis of Raw Starch. **Waste and Biomass Valorization**, p.291-302. 2011.

CASTRO, H. C., ABREU, P. A., GERALDO, R. B., MARTINS, R. C. A., DOS SANTOS, R., LOUREIRO, N. I. V., CABRAL, L. M., & RODRIGUES, C. R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, p. 165–181, 2011.

CHATTERJEE, A.; KANAWJIA, S. K.; KHETRA, Y. Properties of sweetened indian yogurt (mishti dohi) as affected by added tryptic whey protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n.1, p. 824-831, 2016.

CHERUBINI, F., The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy conversion and management**, v.51, p. 1412 - 1421, 2010.

CINELLI, A.B. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. (Dissertação de Mestrado) p.39. Programa de Engenharia Química - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p. 294-306., 2007.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

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

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

COSTA J.A.V., SANTANA B. F., ANDRADE R. M., LIMA B. M., FRANCK T. D. Microalga biomass and biomethane production in the south of brazil. **Journal of Biotechnology**. v. 136, p.430, 2008.

COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; DA ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina sp.* LEB18. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 173-178, 2019.

CORRADINI, E., LOTTI, C., MEDEIROS, E. S. D., CARVALHO, A. J. F., CURVELO, A. A. S. e MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, p.268-273. 2005.

COTANA, F.; CAVALAGLIO, G.; GELOSIA, M.; COCCIA, V.; PETROZZI, A.; INGLES, D.; POMPILI, E. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 424-432, 2015.

CHEN H, LI G. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v 74, p 121-126, 2013.

CHEN P. C., HUANG X. J. e XU Z. K. Utilization of a biphasic oil/aqueous cellulose nanofiber membrane bioreactor with immobilized lipase for continuous hydrolysis of olive oil. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 407, 2014.

CHEN, S.; XU, Z.; LI, X.; YU, J.; CAI, M.; JIN, M. Integrated bioethanol production from mixtures of corn and corn stover. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 18-25, 2018.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina sp.* Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzymes and Microbial Technology**, v.34, n.5, p.461-465, 2004.

CHRONAKIS, I. S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain Pacifica): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 888–898, 2001.

CHU, W. L.; LIM, Y.W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P. E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2010.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed, pp.900, 2010.

DE JESUS, C. S.; ASSIS, D. D. J.; RODRIGUEZ, M. B.; MENEZES-FILHO, J. A.; COSTA, J. A. V.; FERREIRA, E. D. S.; DRUZIAN, J. I. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of *Spirulina sp.* LEB-18 cultures under outdoor conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1106-1114, 2019.

DE OLIVEIRA, F. M. **O que os antioxidantes fazem por nós?**. Disponível em: <<http://www.anutricionista.com/o-que-os-antioxidantes-fazem-por-nos.html>>. Acesso em: 15 out. 2016.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DILLON, J.C; PHUN, A.P; DUBACQ, J.P Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World review of nutrition and dietetics**, v.77, p. 32-46, 1995.

DOS SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparison of SHF and SSF processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n.4, São Paulo, 2010.

DU, Z. **Thermochemical conversion of microalgae for biofuel production**. A dissertation submitted to the faculty of university of mines ota 2013.

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.

EDGARDO, A.; CAROLINA, P.; MANUEL, R.; JUANITA, F.; JAIME, B. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 120-123, 2008.

EERE. **Global ethanol production**. 2018. Disponível em: <<https://www.afdc.energy.gov/data/search?q¼ethanol>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

EL-DALATONY, M. M.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; KIM, H.; SALAMA, E.; JEON, B. Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 98–105, 2016.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 8 maio 2008.

EKLUND, R.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbial Technology**. v. 17: p. 255–259, 1995.

EJIKE, C.C., COLLINS, S. A., BALASURIYA, N., SWANSON, A. K., MASON, B., CHIBUIKE C. Udenigwe Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. **Trends in Food Science & Technology** 2017.

ESTRADA, J. E.; BESCO'S, P. B.; DEL FRENO, A.M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v 56, p. 497-500, 2001.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. **Aquatic photosynthesis**. BlackwellScience, Oxford, UK, 375p, 1997.

FAO/WHO (Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization). **Energy and protein requirement**. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee (Vol. 52). Geneva, Switzerland: FAO. (1973).

FROTA, E. G. **Coimobilização de amilases em matriz porosa de gelatina e alginato de cálcio reticulados**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Passo Fundo, Brasil, 2018.

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.

FOX, R. D. **Spirulina Production e potencial**. France: Edisud, p. 232, 1996.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p 4775–4800, 2010.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 335-357, 2002.

GHATAK, H. M. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 15, 4042–4052, 2011.

GRAZIANI, G., SCHIAVO, S., NICOLAI, M. A., BUONO, S., FOGLIANO, V., PINTO A. C., G. POLLIOAC, A. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food e Function**, v.4, p.144-152, 2013.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansiopliae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP, 2007.

GUILHERME, A. DE A., DE SOUZA, L. P. DANTAS, P. V. F, DOS SANTOS, E. S., FERNANDES, F. A., DE MACEDO, N, G. R. Estudo do processo sacarificação e fermentação simultânea (sfs) em biorreator em batelada alimentada visando a redução de custos da produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. e CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, n.11, p.1599-1616, 2003.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. **A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. FAO Fisheries and Aquaculture Circular. N° 1034. p. 33 Roma, FAO, 2008.

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.; FORDE, G.M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, 199-203, 2010.

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

HO S. H., CHEN C. Y., CHANG J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalgae *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresour Technology**, v. 113, p. 244 - 252, 2012.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76–79, 1994.

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.

IEA, WORLD. Biorefineries: Co-production of food, feed, chemicals, materials, fuels, power and heat from biomass. Energy Outlook, **International Energy Agency**, 2009.

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

IUBMB. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse: Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Acesso em: Julho / 2017.

JEGATHESE, S. FARID, M., Microalgae as a renewable source of energy: a niche opportunity. **Journal Renew Energy**, p 1-10, 2014.

JESUS, S. C; ASSIS, J. D; RODRIGUES, B. M; FILHO, M. A; COSTA, V. A. J; FERREIRA, S. E; DRUZIAN, I. J. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of *Spirulina* sp. LEB-18 cultures under outdoor conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1106-1114, 2019.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 137-145, 2004.

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, P.S. Nutritional and therapeutic potencial of spirulina. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 373-379, 2005.

KIM K, KIM EJ, RYU BG, PARK S, CHOI YE, YANG JW. A novel fed-batch process based on the biology of *Aurantiochytrium* sp. KRS101 for the production of biodiesel and docosahexaenoic acid. **Bioresour Technol** v.135 p. 74-269, 2013.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177-187, 2009.

KO, S. C., KIM, D., JEON, Y. J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2294–2302, 2012.

KROGER M, MULLER-LANGER F. Review on possible algal-biofuel production processes. **Biofuels** v.3 p. 33- 49, 2012.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17 p. 561- 594, 1999.

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.

KUMAR, N.M.; KARTHIKEYAN, S.; JAYARAMAN, G. Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 2, p. 38–44, 2013.

KUMAR, D.; SINGH, V. Chapter 22-Bioethanol production from corn. In: SERNASALDIVAR, S. O. **Corn: Chemistry and Technology**. 3. ed. p. 615-631, 2019.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P. COSTA, J. A. V. Utilisation Of Spirulinasp. And Chlorellapyrenoidosa Biomass For The Productionof Enzymatic Protein Hydrolysates. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n.5, p. 29-38, 2014.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina sp.* LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 79-86, 2016.

LI, J., YING LIU, JAY J. MICHAL, C., DAROCH, M., Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. **New Biotechnology** v. 32, p. 589-595, 2015.

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.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, 2007.

MACHADO, A.R; GRAÇA, C.S; ASSIS, L.M; SOUZA-SOARES, L.A; Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina sp.* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, p. 264-278, 2017.

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.

MARQUES S., ALVES L., ROSEIRO J.C., GÍRIO F.M. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v 32(5), p 400–406, 2008.

MARTINS, V. G., COSTA, J. A. V., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

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.

MAURER, K.H. Detergent proteases. **Current Opinion in Microbiology**. v. 15 p. 330-334, 2004.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L. Prospecção Tecnológica da Utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, p. 44-52, 2012.

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

MOJOVIC' L., NIKOLIC' S., RAKIN M., VUKAŠINOVIC' M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**, v 85(12–13), p 1750–1755, 2006.

MORAIS, E. G.; **Cultivo de microalgas utilizando efluentes da indústria bioenergética e avaliação da conversão em biodiesel**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2015.

MORRENO, P.; YAÑES, N.; CARDOZO, M.; MARINNY, H. E.; COMBARIZA, Y.; GUZMAN, C. Influence of nutritional and physicochemical variables on PHB production from raw glycerol obtained from a Colombian biodiesel plant by a wild-type *Bacillus megaterium* strain. **New Biotechnology**. v. 32, p. 682-689, 2015.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y. H. P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684–3688, 2007.

MURPHY, P. Starch. In: G. O. Phillips e P. A. Williams (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. New York: CRC Press LLC Corporate Blvd, 2000.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S.A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, p. 178 – 185, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. São Paulo. Artmed, 5ª Ed., 2011.

NIKOLIĆ, S., MOJOVIĆ L, RAKIN M, PEJIN, D., PEJIN, J. Utilization of microwave and ultrasound pretreatments in the production of bioethanol from corn. **Clean Technol Environ Policy** v. 13 p. 587–594, 2011.

NGO, D. H.; VO, T. S.; NGO, D. N.; WIJESEKARA, I.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 378-383, 2012.

OILALGAE, 2015. Comprehensive Report on Attractive Algae Product Opportunities – Preview (Updated Feb 2015). Disponível em:<https://secure.clixoo.com/purchase/oilgae/alg_pdt/report.html> Acesso em: 06. Jun. 2017.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1ª ed. **New Delhi: Asiatech Publishers**, p. 760, 2005.

PERREIRA, A. M. **Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado protéico a partir de biomassa de *spirulina*** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande, RS, Brasil, 2016.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S. F.; GROLEAU, P. E. Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. In: Mine, Y.; SHAHIDI, F. **Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Diseases**, p. 639-658, 2006.

RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 39-44, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALLA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying a improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V.; BHAT, V. B.; SRINIVAS, P. R.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385–392, 2003.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. 1º ed. Pelotas- RS: Universitária/UFPel, 1996.

REMPEL, A., MACHADO, T. P., COLLA, L. M., TREICHEL, H., COLLA, E., MARGARITES, A., COLLA, M. L. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 163-171, 2018.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press; 1990.

RIZZELLO, G. C., TAGLIAZUCCHI, D., BABINI, E., RUTELLA, S. G., SAA, T. D., GIANOTTI, A., Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549 - 569, 2016.

SÁNCHEZ-RIVERA, L.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; CRUZ-HUERTA, E.; MIRALLES, B.; RECIO, I. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. **Food Research International**, v.63, p. 170 - 181, 2014.

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: **Congresso Nacional da STAB**, Águas de São Pedro, p.262-266, 1993.

SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.S.; KAMAT, M.Y. Fractionation of lipids and purification of g-linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 109, p. 580–586, 2008.

SAMARAKOON, Y., J. JEON. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48 p. 948–960, 2012.

SEN, S.K., DORA, T.K., BANDYOPADHYAY, B., MOHAPATRA, P.K.D., RAUT, S. Thermostable alpha-amylase enzyme production from hot spring isolates *Alcaligenes faecalis* SSB17 – Statistical optimization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 218–226, 2014.

SILVA, A.C.C; FROTA, K.M.G; ARÊAS, J.A; Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Proteína. INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE DO BRASIL. SAO PAULO, V. 20, 2012.

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

SILVA, C. P. **Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo *snack***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UPF, Passo Fundo/RS, 2017.

SINGH, S.; CHAKRAVARTYA, I.; PANDEY, K. D.; KUNDU, S. A development of a process model for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of algal starch to third-generation bioethanol. **Journal Biofuels**, p 1-9, 2018.

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.

SIRAJUNNISA, A. R.; SURENDRHIRAN, D. Algae - A quintessential and positive resource of bioethanol production: a comprehensive review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 66, p. 248–267, 2016.

SUGANYA, K. U.; GOVINDARAJU, K.; KUMAR, V. G.; DHAS, T. S.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 351-356, 2015.

SURENDRHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIRAJUNNISA, A. R. Biodiesel production from marine microalga *Chlorella salina* using whole cell yeast immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1294–1300, 2014.

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.

TAN, C.H.; SHOW, P.L.; CHANG, J-S.; LING, T.C.; LAN, J. C-W. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. **Biotechnol. Adv.**, v. 33, p. 1219-1227, 2015.

TASIĆ, M.B.; KONSTANTINOVIĆ, B.V.; LAZIĆ, M.L.; VELJKOVIĆ, V.B. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p.208–211, 2009.

TOMASELLI, I. **Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)***. In: Thesis. University of Minnesota, Minneapolis, USA, 1997.

TORTORA, G. J. **Microbiology**: an introduction. 9 th.ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2007.

TRIVEDI, M. K.; BRANTON, A.; TRIVEDI, D.; NAYAK, G.; SINGH, R.; JANA, S. Physical spectroscopic and thermal characterization of biofield treated fish peptone. **European Journal of Biophysics**, v. 3, n. 6, p. 51-58, 2015.

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.

VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.17, p.4989- 93, 2002.

VIZCAÍNO, A. J.; SÁEZ M. I.; MARTÍNEZ, T. F.; ACIÉN, F. G.; ALARCÓN, F. J. Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. **Algal Research**, v. 37, p. 145-153, 2019.

VO, T. S.; RYU, B.; KIM, S. K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1336-1346, 2013.

WARREN, F.J., ROYALL, P.G., GAISFORD, S., BUTTERWORTH, P.J., ELLIS, P.R. Binding interactions of α -amylase with starch granules: The influence of supramolecular structure and surface area. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, p.1038–1047. 2011.

WOLT, J.D.; KARAMAN, S. Estimated environmental loads of alpha-amylase from transgenic high-amylase maize. **Biomass and Bioenergy**. v. 31, p. 831–835. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); FOOD AND ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); UNITED NATIONS UNIVERSITY (UNU). **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. Geneva: WHO Press, 1998.

YE, G.; ZENG, D.; ZHANG, S.; FAN, M.; ZHANG, H.; XIE, J.; Ethanol production from mixtures of sugarcane bagasse and *Dioscorea composite* extracted residue with high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 257, p.23–29, 2018

ZHU L, KETOLA T. Microalgae as a biofuel feedstock: risks and challenges. **Journal Sustainable Dev World Ecol**, v.19, p 74-268, 2012.

ZHU, L.D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J.J.; YUAN, Z.H.; WANG, Z.M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.30, p.1035-1046, 2014.

ZHU L,. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.41, p.1376-1384, 2015.

APÊNDICE A – Artigo científico**Sacarificação e fermentação simultânea de *Spirulina platensis* e amido de milho e uso dos resíduos para obtenção de biopeptídios**

Angela Luiza Astolfi^{1*}, Alan Rempel², Vítor Augusto Farina Cavanhi³, Maycon Alves⁴, Luciane Maria Colla¹, Jorge Alberto Viera Costa⁵

¹Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

²Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental

³Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia Química

⁴Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Química

⁵Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

*e-mail: angelaastolfi@hotmail.com

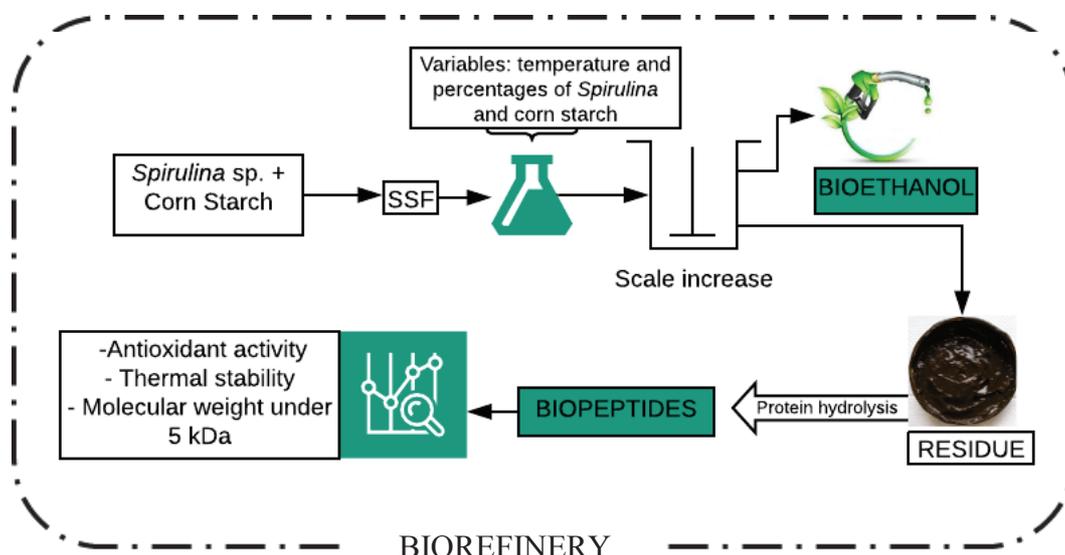
RESUMO - O objetivo deste estudo foi realizar a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) da biomassa de *Spirulina platensis* e amido de milho para produção de bioetanol e utilizar os resíduos do processo para a obtenção de biopeptídeos. A temperatura de processo e os percentuais de *Spirulina* e amido foram utilizados como variáveis no estudo de produção de bioetanol por SSF. As condições experimentais com melhores resultados de sacarificação e produção de etanol foram utilizadas no aumento de escala (10x) em Biorreator. Sendo o resíduo do processo utilizado para a produção de biopeptídios através da hidrólise utilizando protease. Foi avaliada a capacidade antioxidante, as alterações dos grupos funcionais, a estabilidade térmica e a massa molecular dos biopeptídios. Obteve-se 73 g.L⁻¹ de etanol em uma temperatura de processo de 30 °C, mantendo-se o rendimento durante o aumento de escala. O resíduo apresentou alto teor de proteínas (61,25%), sendo obtidos graus de hidrólise de 86%. Os biopeptídeos apresentaram 32% de inibição do radical ABTS e maior estabilidade térmica em relação à biomassa de *Spirulina* e apresentando massa molecular menor de 5 kDa. Demonstramos em nosso trabalho uma alta produção de biopeptídios a partir de resíduos do processo de SSF, os quais podem apresentar inúmeras aplicações na indústria de alimentos. A produção de bioetanol por SSF apresentou bons rendimentos em baixa temperatura e o aumento de escala na produção de bioetanol não afetou os rendimentos de etanol.

PALAVRAS CHAVE: Biorrefinaria; Bioetanol; Biopeptídeos; Antioxidante; Microalga.

HIGHLIGHTS

- Demonstrou-se a SSF da microalga *Spirulina* adicionada de amido com eficiências de 73,64 %;
As eficiências em etanol na SSF foram mantidas no aumento de escala de 10 x em biorreator;
- A biomassa de *Spirulina* sp. atuou como uma fonte de nutrientes durante o processo de SSF;
- Utilizou-se resíduos do processo de SSF para a obtenção de biopeptídios;
- Os biopeptídeos demonstraram atividade antioxidante, estabilidade térmica e peso molecular menor que 5 kDa.

GRAPHICAL ABSTRACT



1 INTRODUÇÃO

O esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, bem como a necessidade de aumentar a segurança energética, de reduzir a dependência do petróleo e de diminuir as emissões de gases de efeito estufa (GEE), levaram a esforços significativos de pesquisa no desenvolvimento de fontes de energia renováveis (KUMAR; SINGH, 2019).

Em resposta ao aumento da demanda de energia renovável, a produção de etanol aumentou consideravelmente em todo o mundo. As principais fontes de matérias-primas que fornecem etanol hoje são o milho e cana-de-açúcar (KUMAR; SINGH, 2019).

Além destes, microalgas também estão sendo investigadas como matéria-prima para a produção de bioetanol de terceira geração. O uso de algas como matéria-prima oferece vantagens adicionais ao minimizar os problemas advindos da disponibilidade de terra e

competição com a produção de alimentos, ter a possibilidade de uso de água residuais durante o cultivo e de capturar CO₂ atmosférico durante a fotossíntese (ZHU; KETOLA, 2012).

A biomassa de microalgas é uma fonte emergente de carboidratos e de proteína sustentáveis que podem atender as demandas globais de consumo de proteína e produção de bioetanol (MUYS et al., 2019). Assim, a biomassa microalgal pode ser empregada em um contexto de biorrefinaria, no qual refere-se ao uso das biomassas a partir de fontes renováveis e seus resíduos, de forma integrada e diversificada para a produção de combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse no mercado industrial, com a geração mínima de resíduos e emissões de gases nocivos.

A biomassa de *Spirulina* sp. pode atuar como uma fonte de nutrientes durante o processo fermentativo, por proporcionar nutrientes para a nutrição da levedura. Além disso, os carboidratos de microalgas apresentam em sua forma amido e celulose e carecem de lignina, o que facilita sua conversão a monossacarídeos em comparação com materiais lignocelulósicos (HO et al, 2013). A hidrólise ou sacarificação são procedimentos que realizam a conversão destes amidos presentes na biomassa em açúcares mais simples, visto que os amidos são estruturas mais complexas e menos acessíveis aos microrganismos que irão realizar a fermentação como processo subsequente.

Um dos avanços mais importantes relacionados ao processo de produção de bioetanol é a implementação e desenvolvimento da sacarificação e fermentação simultâneos (SSF). No qual a degradação enzimática do amido é combinado com a fermentação da glicose obtida a partir da hidrólise dos polissacarídeos (MOJOVIC et al., 2006).

Um fator importante é que a SSF utilizando microalgas gera uma grande quantidade de resíduo com alto valor proteico. O uso deste resíduo pode ser destinado para a obtenção de biopeptídios podendo viabilizar economicamente o processo como um todo.

Estudos recentes confirmaram a aplicabilidade de biopeptídeos promovendo a saúde a partir de alimentos funcionais. Silva (2016) ao isolar os biopeptídeos da microalga *Spirulina* sp. e ao adicionar em *snacks* evidenciou propriedades antioxidantes apresentando um alimento saudável para o consumo humano. Chatterjee, Kanawjia e Khetra (2016) mostraram que a adição de um hidrolisado de proteína de soro de leite a um iogurte aumentou significativamente a enzima conversora da angiotensina e atividade antioxidante confirmando a manutenção da estabilidade do peptídeo durante o processamento e dentro da matriz de alimentar.

Neste sentido, objetivou-se produzir bioetanol por sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa de *Spirulina platensis* adionada de amido de milho, o aumento de

escala de processo e a obtenção de biopeptídeos com potencial antioxidante dos resíduos da produção de bioetanol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Spirulina* sp. LEB 18

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizada na forma seca, foi cedida dos cultivos realizados na planta de produção de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.2 Caracterização da biomassa

Para a quantificação do teor de carboidrato e de proteína 5 mg de biomassa foram suspensa em 10 mL de água destilada e submetida à ruptura celular em autoclave por vinte minutos a 121 °C. O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) e o teor de proteína foi determinado de acordo com Lowry et al. (1951). A concentração lipídica da biomassa foi determinada pelo método de Colla et al. (2004). O teor de umidade e cinzas foi determinado pelos métodos oficiais de análise da AOAC (2000). O teor de carboidratos, proteínas e lipídios foram apresentados em base seca.

2.3 Enzimas

As enzimas utilizadas em nosso trabalho para a produção de bioetanol foram as enzimas α -amilase (Liquozyme[®] Supra 2.2X) obtido de *Bacillus licheniformis* e amiloglicosidase (AMG[®] 300L) obtido de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*, doadas pela Novozymes. Para a obtenção dos biopeptídeos foi utilizada a enzima comercial Protemax 580 L (Prozyn) que é uma endopeptidase de serina de origem bacteriana *Bacillus licheniformis*.

A atividade enzimática das enzimas α -amilase e amiloglicosidase foi definida como a que libera 1 μ mol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, expressa em $U = \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$ (ALVA et al., 2007). Para a enzima protease a atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ g de tirosina por minuto, expressa em $U \cdot \text{mL}^{-1}$ (MA et al., 2007).

2.4 Estratégias para a produção de bioetanol pelo processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Foi utilizada a concentração de 20% (m/v) de biomassa para a sacarificação enzimática e fermentação simultâneas, porém se observou-se que a baixa concentração de carboidratos na

biomassa de *Spirulina* sp. (11%) resultou em rendimentos de etanol baixos (28,1%). Neste sentido, foi adicionado amido de milho que é uma boa fonte de carboidratos de fácil conversão e a biomassa de *Spirulina* sp. atuou como fonte de nutrientes e de carboidratos durante a fermentação.

Além das concentrações de substratos para o processo de SSF, a eficiência de bioetanol pode ser afetada pela temperatura do processo, uma vez que as leveduras atuam em temperaturas mais baixas (30 °C), se comparado com a temperatura ótima de atuação das enzimas amilolíticas (50 °C). Devido às diferenças entre essas temperaturas realizou-se uma pré-hidrólise dos substratos na temperatura ótima da atuação da enzima α -amilase por 2 h a 50 °C e após adicionou-se a enzima amiloglicosidase na temperatura de cada ensaio (Tabela 1) buscando altas eficiências de bioetanol.

A Tabela 1 apresenta o delineamento experimental utilizado para a realização da SSF utilizando-se amido de milho e biomassa de *Spirulina* sp como componente do meio de cultivo.

Tabela 1 - Variação das concentrações de amido de milho, biomassa de *Spirulina* e da temperatura.

Ensaio	Concentração de Amido (%)	Concentração de <i>Spirulina</i> (%)	Carboidrato Total (%)*	Carboidrato (g CHO/L)	Temperatura (°C)
1	5	15	6,68	66,8	30
2	10	10	11,12	111,2	30
3	15	5	15,56	155,6	30
4	5	15	6,68	66,8	40
5	10	10	11,12	111,2	40
6	15	5	15,56	155,6	40

*levando em consideração a concentração de carboidrato presente na biomassa de *Spirulina* de 11,23%.

Devido às diferenças usuais entre as temperaturas do processo de sacarificação (50 °C), e fermentação (30 °C), realizou-se uma pré-hidrólise dos substratos na temperatura ótima da atuação da enzima α -amilase por 2 h a 50 °C e após adicionou-se a enzima amiloglicosidase na temperatura de cada ensaio.

Utilizou-se 0,15 mL de extrato enzimático de cada enzima por grama de carboidrato presente no ensaio. Os ensaios foram realizados em duplicata em mesa agitadora a 130 rpm em erlenmeyers de 500 mL, com um volume de trabalho de 300 mL. As suspensões de *Spirulina* foram conduzidas à etapa de ruptura celular da biomassa pelo método de congelamento e descongelamento por 24/24h (REMPEL et al., 2018), sendo adicionadas posteriormente as

concentrações de amido de milho conforme cada ensaio. O pH dos meios foram ajustados para 5,0.

Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min, promovendo a gelatinização do amido e dos carboidratos microalgais. Após arrefecimento, realizou-se a etapa de pré-hidrólise (α -amilase) (durante 2 h) e ao término foi adicionada a enzima amiloglicosidase e os inóculos da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 com uma razão de inoculação de 10%.

Foram coletadas amostras no tempo zero, após 2 h de pré-hidrólise e a cada 12 h para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e concentração de etanol. Os ensaios foram encerrados após a estabilização da concentração de bioetanol e de AR.

A concentração de AR foi quantificada pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959). A determinação da concentração de etanol foi realizada através destilação da amostra por microdestilador de bancada da marca Tecnal modelo TE-012, seguido do procedimento da reação do etanol com dicromato de potássio e determinadas as absorbâncias das amostras por espectrofotômetro a 600 nm, contra um branco reacional (SALIK; POVH, 1993).

2.4.1 Aumento de escala para a produção de bioetanol

O aumento de escala para a produção de bioetanol a partir da biomassa *Spirulina* sp. adicionada de amido de milho foi realizado em Biorreator Tec Bio Flex, nas condições dos melhores resultados obtidos nos ensaios realizados anteriormente. O volume de trabalho foi de 3 L e foram controlados durante o processo de SSF os parâmetros de: pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e agitação. Com o aumento da escala a quantidade de enzima foi previamente estudada afim de diminuir sua concentração, visando tornar o processo viável em escalas maiores. Neste sentido utilizou-se 0,25 (v.v⁻¹) de cada enzima amilolítica.

Foram coletadas amostras no tempo zero, após 2 horas de pré-hidrólise e a cada 12 horas para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e concentração de etanol. Os ensaios foram encerrados após 60 horas de SSF.

Ao término da SSF foi realizada uma centrifugação a 3640 x g por 15 min, separando o resíduo do fermentado. Este resíduo gerado do processo de SSF foi estudado para a produção de biopeptídeos.

2.4.2 Cálculos de eficiência na produção de bioetanol

Para todos os ensaios da produção de bioetanol utilizando o processo de SSF foram calculados eficiência na formação de etanol e a eficiência de pré-hidrólise através da Equação 1.

$$EPH (\%) = \frac{AR_{gerado\ em\ 2h} \left(\frac{g}{L}\right)}{\frac{(m_{biomassa}) \times (CHO) \times 1,1}{v}} \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

EPH (%): Eficiência de pré-hidrólise;

AR_{gerado em 2h} (g.L⁻¹): Açúcares redutores obtidos após hidrólise (g.L⁻¹);

CHO (g.L⁻¹): Carboidratos presentes na SSF (g.L⁻¹);

1,1: Conversão de carboidratos em g.L⁻¹ de glicose.

V (L): Volume dos ensaios.

A eficiência (η) na formação de etanol foi obtida através da Equação 2 (HANG; LEE; WOODAMS, 1981).

$$\eta (\%) = \frac{\Delta E}{0,511 \times (CHO) \times 1,1} \times 100 \quad (2)$$

Sendo,

ΔE : Variação da concentração de etanol (g.L⁻¹);

CHO: Concentração de carboidratos presente na fermentação (g.L⁻¹);

1,1: Conversão de carboidratos em g.L⁻¹ de glicose.

2.5 Obtenção de biopeptídeos

2.5.1 Caracterização química do resíduo

Os resíduos da produção de bioetanol realizada no Biorreator Tec Bio Flex foram caracterizados quanto ao teor de proteína, lipídeos, umidade e cinzas utilizando a metodologia descrita pela AOAC (2005). Os carboidratos foram determinados por diferença. A determinação de proteína foi avaliada no início e no fim do processo SSF com o intuito de subtrair o valor da proteína presente na levedura e nas enzimas adicionadas. Além disso os valores de proteína serviram como base de cálculo para a quantidade de enzima que foi necessária para ocorrer a hidrólise proteica.

2.5.2 Hidrólise proteica

Os parâmetros de hidrólise enzimática utilizados neste trabalho foram de acordo com Lisboa et al., (2014). Para a obtenção dos hidrolisados foram utilizados 15,4 g de resíduo gerado da SSF em 100 mL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio (pH 9,5) e 5 U.mL⁻¹ da enzima protease. Os ensaios em duplicata foram dispostos em incubadora orbital a 180 rpm em temperatura ótima de atividade da enzima (60 °C). Alíquotas foram retiradas a cada hora para quantificação do grau de hidrólise, em um total de 8 h de reação. A enzima foi inativada termicamente a 85 °C por 10 min.

2.5.3 Determinação do grau de hidrólise das proteínas

O grau de hidrólise (GH) foi determinado entre um período de 0 a 8 h. Transcorrido cada tempo, alíquotas de 1 mL do hidrolisado foram adicionadas de 9 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 6,25% e deixadas em repouso por 10 min. Após, foram centrifugadas por 5 min a 3300 x g para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Determinou-se o teor de proteínas solúveis do sobrenadante utilizando o método de Folin-Lowry, expresso em mg de albumina.

O grau de hidrólise foi estimado segundo o método descrito por Hoyle e Merrit (1994) com modificações, sendo expresso pela quantidade de proteínas solúveis no TCA antes e após a adição da enzima em relação à quantidade de proteína total presente na amostra, e calculado segundo a Equação 3.

$$GH (\%) = \left(\frac{(PS_t - PS_{t0})}{P_{total}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo, o branco, PS_{t0} corresponde à quantidade de proteína solúvel em TCA 6,25% antes da adição da enzima; PS_t é a quantidade de proteína solúvel em determinado tempo após a adição da enzima e P_{total} é a quantidade de proteína total na amostra determinada pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005).

2.5.4 Caracterização dos biopeptídeos

Os biopeptídeos produzidos foram caracterizados através da avaliação do potencial antioxidante pelo método do radical ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico).

O radical catiônico ABTS foi preparado a partir da reação da solução estoque de ABTS (7mmol/L) com a solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L), ambas soluções dissolvidas

em água a uma razão de 1:1 (v/v) (RE et al., 1999). Essa solução permaneceu em repouso no escuro, a temperatura ambiente, entre 12 a 16 h antes da utilização.

O espectrofotômetro foi zerado com metanol a 734 nm para a leitura das amostras. Para a leitura da absorbância do ensaio branco (ABS_{branco}) em espectrofotômetro, 200 μ L deste radical formado foi diluído em etanol 96° até obter uma absorbância de 0,70 nm (+- 0,05 nm) a um comprimento de onda de 734 nm. Em ambiente protegido da luz, foram adicionados 10 μ L das amostras em 1000 μ L do radical ABTS diluído, seguido de homogeneização em agitador por 5 segundos e permaneceu em repouso no escuro por 6 min para reagir. Após foram realizadas as leituras das absorbâncias ($ABS_{amostra}$), em triplicata, utilizando cubeta de 1mL.

O percentual de inibição do radical ABTS foi calculada a partir da Equação (4).

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{ABS_{branco} - ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \times 100 \right) \quad (4)$$

As características da estrutura molecular, estabilidade térmica (DSC) e perda de massa (TGA) para as amostras de hidrolisado proteico, resíduo da produção de bioetanol e da biomassa de *Spirulina* sp., foram analisadas por FTIR com um instrumento modelo Cary 630 da *Agilent Technologies* em que as amostras foram pressionadas sobre um cristal Zn-Se e a transmitância registrada em uma faixa de 4000 a 650 cm^{-1} . As curvas termogravimétricas e calorimétricas foram obtidas em um simulador de análise térmica (STA 6000, Perkin Elmer).

Além dessas análises a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, o resíduo e os biopeptídeos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de LAEMMLI (1970). Foi utilizado um gel de separação a 15%. As proteínas foram coradas com a solução corante 0,1% *Coomassie Brilliant Blue* R-250.

2.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA), Teste de Tukey bem como a comparação de médias entre as amostras foram realizadas utilizando o software Statistica® 7.0 em nível de confiança de 95%, ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização química da biomassa algal

A caracterização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 em base seca apresentou com 74,53% de proteínas, 11,23% de carboidratos, 2,89% de lipídios e 14,11% de cinzas.

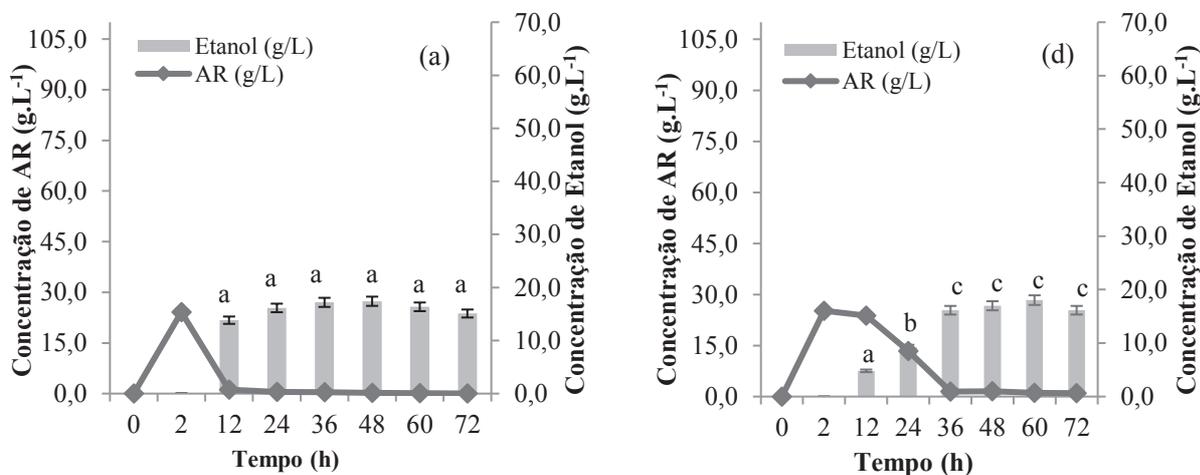
Dentre todos os componentes da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 se destaca o alto teor de proteína. Se comparada com base na legislação brasileira para produtos proteicos de origem vegetal, a qual define que a proteína concentrada de soja deve conter no mínimo 68,0% de proteínas em base seca (BRASIL, 2005), a fração proteica neste estudo indica ser uma boa fonte alimentar podendo ser considerada um concentrado proteico.

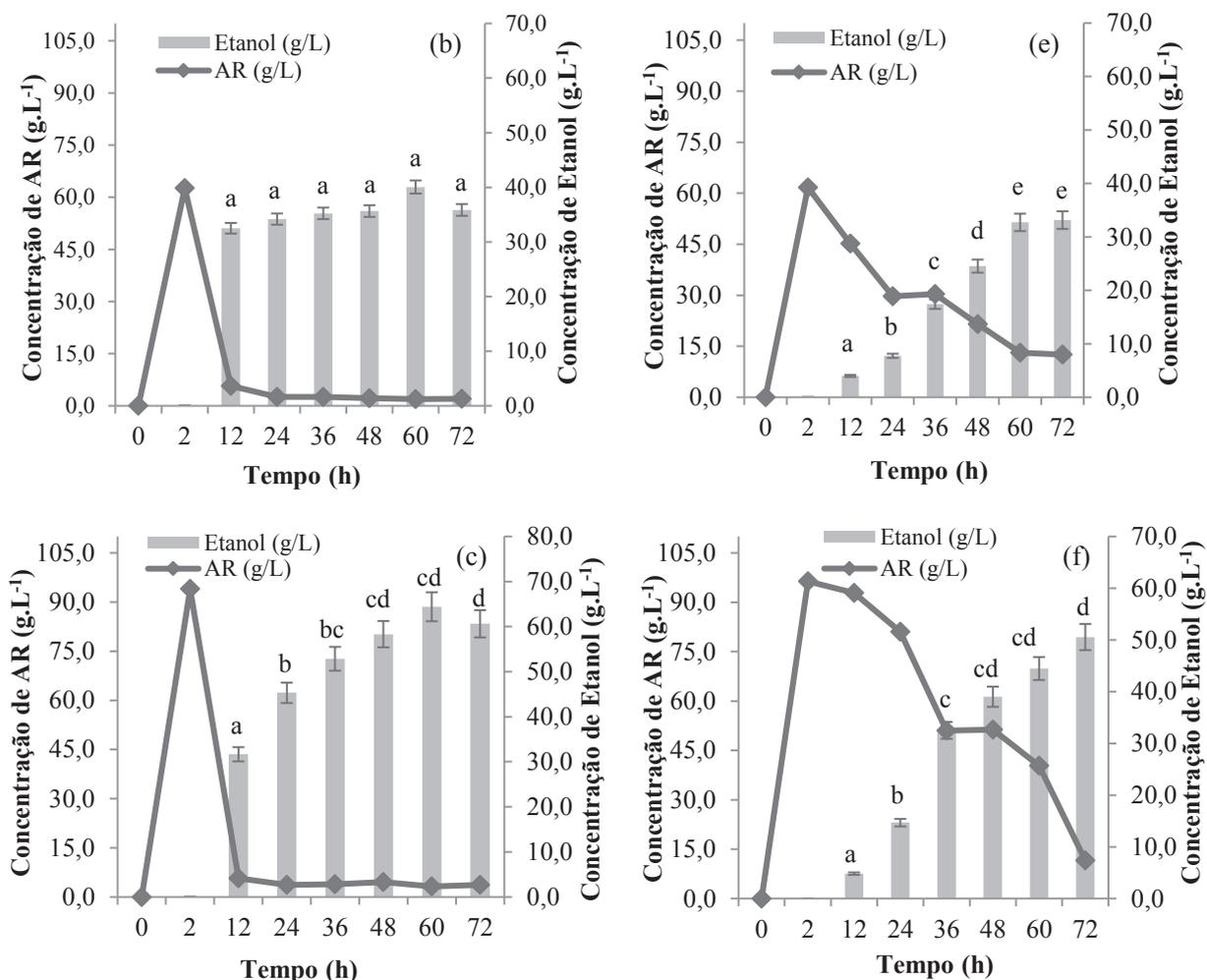
É importante destacar que dependendo do meio de cultivo, podem ocorrer variações na composição química das biomassas, especialmente em relação aos teores de proteínas e carboidratos, no caso da *Spirulina platensis* (SALLA et al., 2016). A biomassa utilizada neste trabalho apresentou baixos teores de carboidratos, devido ao cultivo não ter como principal objetivo o acúmulo de carboidratos na biomassa, o que influenciou no rendimento de bioetanol. Neste sentido a adição de amido de milho em nosso estudo, tornou-se relevante para a produção de bioetanol pelo processo de SSF.

3.2 Sacarificação e fermentação simultânea utilizando biomassa de *Spirulina* sp e amido de milho na produção de bioetanol

A Figura 1 apresenta os resultados de concentração de bioetanol e concentração de açúcares redutores obtidas ao longo das 72 h de processo de sacarificação e fermentação simultâneas, temperatura de 30 e 40 °C.

Figura 1 - Perfil da produção de bioetanol e de açúcares redutores durante o processo de SSF.





(a) 5% de amido + 15% *Spirulina*, (b) 10% de amido + 10% *Spirulina* e (c) 15% de amido + 5% *Spirulina*, respectivamente, na temperatura de 30 °C. (d) 5% de amido + 15% *Spirulina*, (e) 10% de amido + 10% *Spirulina* e (f) 15% de amido + 5% *Spirulina*, respectivamente, na temperatura de 40 °C.

Verificou-se que quanto maior a quantidade de carboidratos no meio de cultivo, maiores foram as concentrações de açúcares redutores após as 2 h de pré-hidrólise devido a fonte de carboidrato ser maior e a enzima α -amilase estar atuando em sua temperatura ótima de 50 °C.

A inoculação da levedura ocasionou a redução da concentração de açúcares redutores já no tempo de 12 h chegando próximo a zero na maioria dos ensaios a 30 °C. Segundo Eklund e Zacchi (1995) esta é uma das características das sacarificações e fermentações simultâneas e que apresentam vantagens se comparado com o processo de sacarificação e fermentação separadas (SHF) pois estas apresentam altas concentrações de glicose e podem vir a inibir a fermentação do bioetanol durante o processo.

Assim conforme foram sendo sacarificados o amido de milho e o amido microalgal, as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por estarem em sua fase exponencial de

crescimento e em temperatura ótima (30 °C) utilizaram os açúcares redutores para seu próprio crescimento e produção de etanol.

Singh et al. (2018) durante o processo de SSF a partir da microalga *Chlorella* sp., produziram 30,47 g.L⁻¹ de bioetanol e observaram uma tendência semelhante de diminuição na concentração de açúcares redutores em 12 h. Os autores iniciaram a SSF apresentando uma concentração 100 g.L⁻¹ de AR e ao final do processo 98,8% de AR tinham sido consumidos.

Já para os ensaios realizados a 40 °C apresentaram maiores concentrações de AR após as 12 h de SSF independente da concentração utilizada de amido e de *Spirulina*. As altas concentrações de AR podem estar relacionadas com a temperatura que estes ensaios ocorreram, no qual estão fora da temperatura ótima da levedura, porém mais próxima da temperatura ótima da ação das enzimas amilolíticas (50 °C). Neste caso supõe-se que a levedura não se adaptou e seu desenvolvimento de células e a formação de produto foram afetadas.

Os ensaios realizados com 5% de amido + 15% *Spirulina* (a) e ensaio com 10% de amido + 10% *Spirulina* (b) na temperatura de 30 °C não apresentaram diferença significativa ($p>0.05$) entre os tempos de SSF para a produção de bioetanol. Nestes ensaios a produção de bioetanol a partir das 12 h até o período final manteve-se constante durante toda a SSF.

Já para o ensaio com 15% de amido + 5% *Spirulina* (c) pode-se observar que houve diferença significativa ($p<0,05$) em relação aos períodos iniciais (12 a 24 h) e nos tempos de 48 a 60 h, observando-se que a concentração de bioetanol aumentou até o máximo de 64,4 g.L⁻¹. Ao compararem-se os 3 ensaios na condição de temperatura de 30 °C, observa-se que o ensaio “c” com 15% de amido + 5% *Spirulina* apresentou a maior geração de bioetanol ao longo do processo de SSF (73,64% de eficiência de conversão). Estes valores justificam-se pelo fato deste apresentar maior concentração de carboidrato e ser realizado na temperatura de 30 °C, beneficiando o desenvolvimento da levedura e formação de produto.

Para os ensaios com 10% de amido + 10% *Spirulina* (e) e 15% de amido + 5% *Spirulina* (f) em temperatura de 40 °C, a produção de bioetanol aumentou gradativamente conforme o decorrer do processo, no entanto, a produção de bioetanol foram inferiores em relação aos ensaios com temperatura de 30 °C.

Tabela 2 - Eficiência de Pré-hidrólise (2 h) e eficiência de etanol SSF.

Ensaio	Eficiência de Pré-hidrólise (EPH)	Eficiência de Etanol (η)
1	34,03 \pm 1,16 ^a	46,35 \pm 2,79 ^a
2	53,67 \pm 1,85 ^A	64,10 \pm 2,01 ^{bc}
3	56,28 \pm 2,66 ^A	73,64 \pm 0,72 ^c
4	36,88 \pm 2,17 ^a	51,08 \pm 3,57 ^{ab}
5	52,52 \pm 2,47 ^A	53,02 \pm 0,67 ^{ab}
6	58,43 \pm 3,62 ^A	57,80 \pm 3,12 ^{ab}

Ensaio 1 - 5% de amido + 15% *Spirulina* a 30 °C. **Ensaio 2** - 10% de amido + 10% *Spirulina* a 30 °C. **Ensaio 3** - 15% de amido + 5% *Spirulina* a 30 °C. **Ensaio 4** - 5% de amido + 15% *Spirulina* a 40 °C. **Ensaio 5** - 10% de amido + 10% *Spirulina* a 40 °C. **Ensaio 6** - 15% de amido + 5% *Spirulina* a 40 °C. *Média \pm desvio padrão, (n = 2). Letras minúsculas, maiúsculas e maiúsculas em negrito iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança entre as eficiências de pré-hidrólise e eficiências de etanol.

Observa-se na Tabela 2, que a eficiência de pré-hidrólise em 2 h na temperatura ótima da enzima (50 °C) apresentaram eficiências estatisticamente iguais para as mesmas concentrações de fontes de carboidratos.

Ye et al. (2018) realizou a produção de bioetanol com duas fontes de matérias primas, utilizando o processo de SSF realizou uma pré-sacarificação por duas horas e obteve maiores rendimentos e principalmente reduziu a dificuldade de transferência de massa na carga de sólidos com a atuação das enzimas de liquefação.

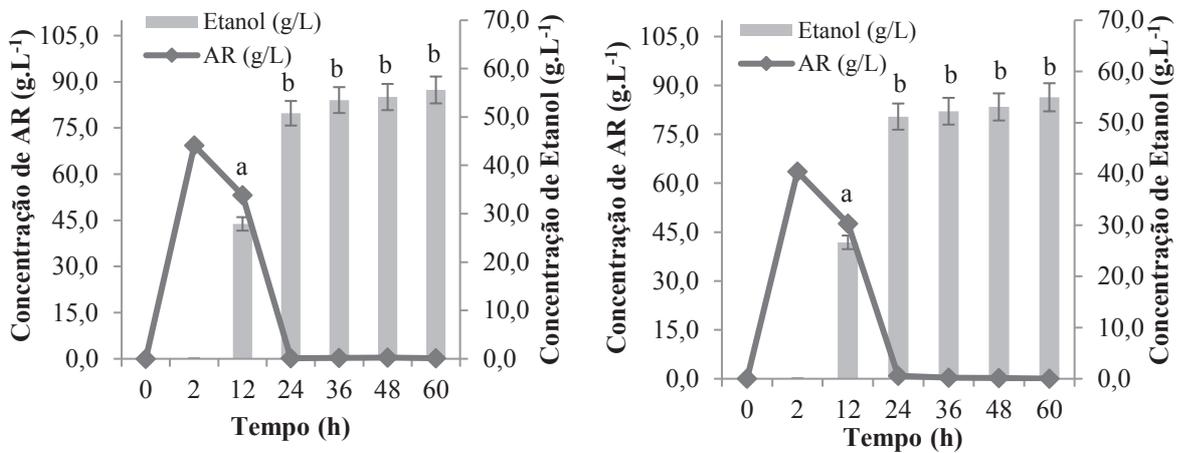
Em um estudo de Cotana et al. (2015) realizou a etapa de pré-hidrólise por 24 h a 50 °C e garantiu uma alta concentração de glicose para iniciar a fermentação com o inocúlo de levedura e em paralelo o meio apresentou uma boa liquefação da biomassa que garantiu uma eficiente transferência de massa.

Além disso, neste trabalho não foi necessário a adição de fontes de nutrientes durante o processo de SSF, uma vez que além da biomassa de *Spirulina* sp. apresentar fonte de carbono proporciona nutrientes disponíveis suficientes para a nutrição da levedura durante o processo fermentativo evidenciado por estudos de Rempel, (2018).

3.3 Aumento de escala para a produção de bioetanol a partir da biomassa de *Spirulina* sp com adição de amido de milho

A Figura 2 apresenta o aumento de escala para a produção de bioetanol em Biorreator com 15% de amido + 5% *Spirulina* a 30 °C.

Figura 2 - Perfil da produção etanol e de açúcares redutores na SSF para os ensaios realizados em biorreator.



Em cada figura e em cada coluna, letras iguais não apresentam diferença significativas entre si a nível de 95% de confiança (Média±DP).

É possível observar que as duplicatas produziram em média 55 g.L^{-1} de etanol e ambas apresentaram após 2 horas de pré-hidrólise uma concentração média de 70 g.L^{-1} de açúcares redutores.

As SSF em biorreator apresentaram uma eficiência média de pré-hidrólise de 40,18% e uma eficiência média de etanol de 62,94%. Ao comparar a eficiência de etanol e a eficiência de pré-hidrólise realizada no biorreator e em erlenmeyers estes apresentam-se semelhantes, indicando que o aumento de escala de 10 vezes maior não ocasionou alterações durante o processo de SSF.

Ainda observando a Figura 2, após 24 h de SSF a produção de bioetanol não apresentou diferença significativa entre os demais tempos avaliados, concluindo que 24 h de SSF é o suficiente para obter altos rendimentos de bioetanol em um único biorreator.

Neste sentido a sacarificação e fermentação simultâneas se apresenta como um bom processo para a produção de bioetanol em larga escala, uma vez que produto é produzido em um único biorreator diminuindo custos com biorreatores, tempo e concentração de enzima.

3.5 Caracterização química do resíduo do bioprocesso

A caracterização química do resíduo oriundo da produção de bioetanol realizado em biorreator com concentrações de 15% de amido + 5% *Spirulina* a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando o processo de sacarificação e fermentação simultâneas esta apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização química do resíduo da produção de bioetanol realizada em biorreator.

Componentes	Base Úmida (g/100g)	Base Seca (g/100g)
Proteína	13,69±0,74	61,25±0,74
Carboidratos*	1,38±0,02	6,17±0,02
Lipídeos	3,41±0,12	15,25±0,12
Cinzas	3,87±1,54	17,31±1,54
Umidade	77,65±1,36	-

Resultados de média ± desvio padrão. *Resultado obtido por diferença.

Observa-se que este resíduo apresenta uma quantidade significativa de proteínas, levando em consideração que além da proteína da biomassa microalgal, há a presença das proteínas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e das enzimas. Ao avaliar a quantidade de proteína no meio fermentativo antes de adicionar as enzimas amilolíticas e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de SSF observou-se em média 3,90 g/100g de proteína em base úmida. Assim, durante o processo de produção de bioetanol obteve-se maior teor de proteína, gerando um resíduo com maior valor proteico.

3.6 Grau de hidrólise

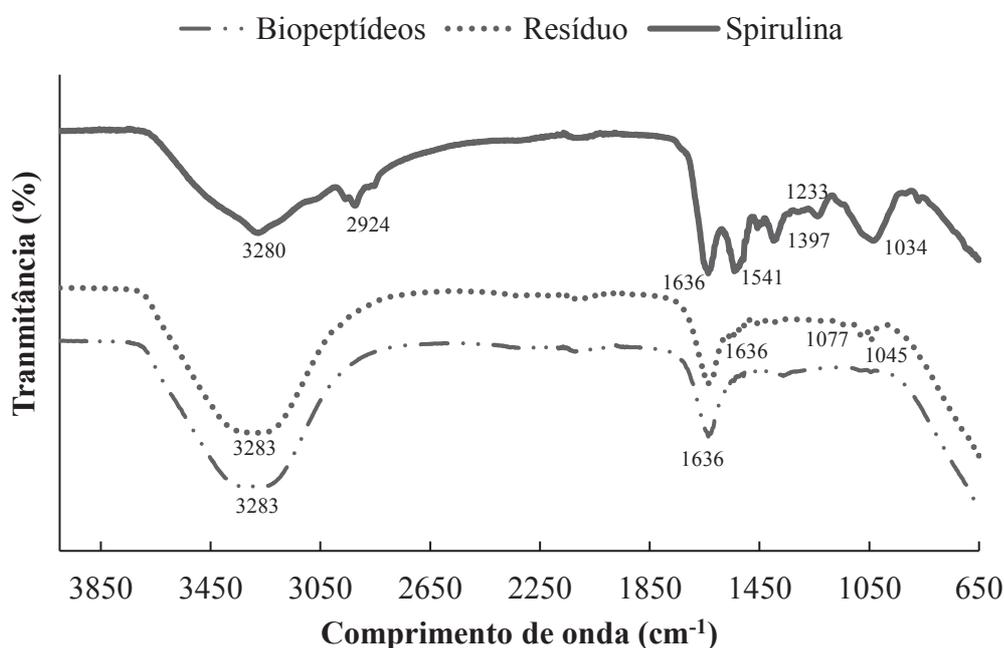
O melhor resultado de grau de hidrólise (GH) foi observado com 4 h de hidrólise e após manteve-se constante ao longo das 8 h de reação, não apresentando diferença significativa.

O alto rendimento do GH pode ser explicado pela acessibilidade da protease às proteínas, visto que a enzima necessita ligar-se à superfície da molécula para ter acesso às ligações peptídicas e iniciar a hidrólise (PEREIRA, 2016). A hidrólise enzimática das proteínas envolve uma mudança estrutural, onde a proteína é gradualmente clivada em unidades menores de peptídeos (MARTINS et al., 2009). Peptídeos de menor peso molecular são desejados pois melhoram suas propriedades funcionais como a digestibilidade, solubilidade e capacidade de retenção de água e atividade antioxidante (DAMODARAM et al., 2010).

3.6.1 Caracterização dos biopeptídeos

A atividade antioxidante determinada pela inibição do radical ABTS ao longo das 8 h de reação apresentou a maior porcentagem de inibição em 5 h de GH chegando a 32% de inibição do radical ABTS sendo diferente estatisticamente de todos os demais tempos de hidrólise.

Observa-se que há uma correlação entre o GH e a atividade antioxidante ao decorrer da reação de hidrólise. Segundo Elias et al (2008) o aumento da atividade antioxidante é decorrente

Figura 4 - Análise de FTIR para *Spirulina*, Resíduo e Peptídeo.

A análise de infravermelho com transformada de Fourier para a microalga *Spirulina* apresentou em sua composição picos referentes à presença de proteínas em 3280 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} , esta banda observada na *Spirulina* são atribuídas à vibração de estiramento -NH de amina secundária (proteína) e grupos funcionais -OH (hidroxilo) presentes na proteína da *Spirulina* (SUGANYA et al., 2015).

As bandas observadas na biomassa de *Spirulina* em 1541 cm^{-1} , 1397 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} podem ser atribuídas de amida I que resulta das vibrações de estiramento C=O das ligações peptídicas, amida II, que resulta da curvatura do N-H e vibrações de estiramento C-N e a cadeia lateral de proteína COO⁻ e a banda amida III estão presentes, respectivamente (BATALLER e CAPAREDA, 2018).

Bataller e Capareda (2018) avaliaram a microalga *Spirulina plantensis* através do FTIR apresentando semelhanças de bandas características de carboidratos, C-O e C-C, que é observada em 1034 cm^{-1} e também a banda de característica lipídica é observada em 1653 cm^{-1} apresentando possível sobreposição com a amida I.

As áreas de algumas bandas (Figura 4) observados na *Spirulina* foram alteradas após a produção de bioetanol e da hidrólise protéica. A área da banda 3298 cm^{-1} do resíduo e do peptídeo aumentou ao ser hidrolisada se comparando com o pico da *Spirulina*.

Observa-se que em exceto a banda 1636 cm^{-1} que permaneceu no peptídeo, no resíduo e na *Spirulina*, as demais bandas desapareceram ao hidrolisar a biomassa microalgal, tanto com as enzimas amilolíticas quanto com a enzima protease. Isso indica que houve hidrólise nos polissacarídeos liberando principalmente glicose e demais produtos fermentescíveis (banda 1034 cm^{-1}). Além disso, ocorreu a clivagem das ligações peptídicas no resíduo em aminoácidos livres e outras ligações peptídicas de menor peso molecular (bandas 1541 cm^{-1} , 1397 cm^{-1} , 1233 cm^{-1}) através do mecanismo de ação da enzima utilizada (serino-peptidase) no processo de hidrólise, na qual age no átomo de carbono da carbonila presente na ligação peptídica.

Ao avaliar a estabilidade térmica da biomassa de *Spirulina*, do resíduo e dos biopeptídeos através da análise de calorimetria exploratória diferencial no qual apresentou temperaturas desnaturação das proteínas para a *Spirulina* de $76,36\text{ }^{\circ}\text{C}$, já para o resíduo a temperatura de desnaturação foi de $96,71\text{ }^{\circ}\text{C}$ enquanto que o biopeptídeo apresentou desnaturação em $101,48\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Observa-se que ao hidrolisar as proteínas do resíduo a temperatura de desnaturação aumentou para o peptídeo, sendo está uma vantagem quando este for aplicado em alimentos que requerem altas temperaturas durante o processamento.

A entalpia envolvida no processo (ΔH) foi maior no peptídeo ($2248,98\text{ J/g}$), enquanto que para a *Spirulina* sp. foi de $151,44\text{ J/g}$, demonstrando que com o processo de hidrólise enzimática a energia necessária para que ocorresse a desnaturação aumentou, melhorando a estabilidade térmica (TRIVEDI et al., 2015).

Este aumento da estabilidade pode ser decorrente das estruturas mais simples da proteína (ausência das estruturas terciárias e quaternárias) das ligações peptídicas e composição de aminoácidos mais estáveis presentes na fração de menor peso molecular, aumentando a estabilidade das moléculas diante do aumento de temperatura (SILVA, 2017).

A análise de TGA exibiu a perda de massa em duas fases para a biomassa de *Spirulina* sp. A primeira houve uma perda menor de $13,13\%$ em uma faixa de temperatura de 30 a $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a segunda fase uma perda maior de massa igual a $41,76\%$ em temperaturas mais elevadas (230 a $453\text{ }^{\circ}\text{C}$).

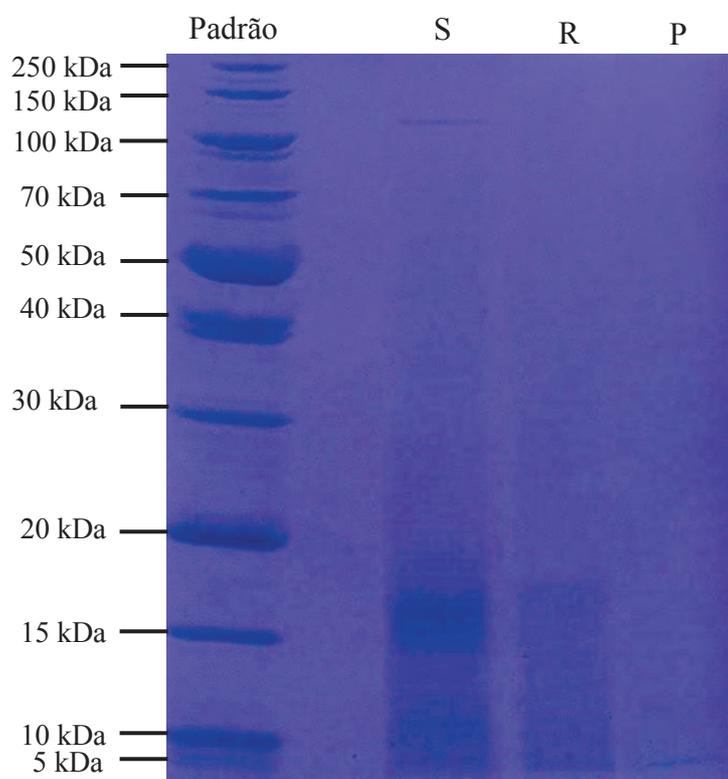
Segundo Jesus et al. (2019) que avaliaram a biomassa de *Spirulina* sp LEB-18 e também identificaram 2 fases envolvendo a perda de massa, a primeira na faixa de $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ envolvendo a desidratação e desvolatilização e a segunda associada a decomposição dos compostos presentes na faixa de $350\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tanto para o resíduo quanto para os biopeptídeos a perda de massa ocorreu em uma apenas fase. No resíduo houve uma perda de massa menor ($76,34\%$) em relação ao o

biopeptídeo (95,40 %) se comparado com a biomassa da microalgal e com o resíduo. Esta perda de massa é caracterizada pela quantidade de água, logo, a perda depende fortemente do teor de umidade da amostra. Ainda assim os peptídeos podem ser adicionados em processos que envolvam temperaturas de até 100 °C garantindo suas propriedades e demonstrando o potencial de aplicação em alimentos funcionais.

A análise por SDS-PAGE da biomassa de *Spirulina* sp., do resíduo e dos biopeptídeos permitiu observar que houve diminuição da massa molecular das proteínas. A análise por SDS-PAGE está apresentada na Figura 5.

Figura 5 – SDS-PAGE das proteínas presentes no padrão, na biomassa da *Spirulina* (S), no resíduo (R) e no biopeptídeo (P).



Para a biomassa de *Spirulina* sp observa-se várias bandas de peso molecular de 100 kDa, 15 kDa, 10 kDa e 5 kDa. O mesmo pode ser observado nas bandas detectadas para o resíduo em exceto a banda de peso molecular 100 kDa.

Já para os peptídeos não houve a detecção de bandas maiores que 5 kDa, indicando que é possível haver peptídeos com massa molecular menor que 5 kDa. Essas mudanças ocorridas no peso molecular são devido a ação da enzima protease durante o processo de grau de hidólise

gerando peptídeos de diferentes tamanhos e sequência de aminoácidos, o que pode determinar a capacidade antioxidante (Figura 3) (LISBOA et al., 2016).

Vizcaíno et al. (2019) ao realizar a análise por SDS-PAGE mostrou que em geral as proteínas das quatro microalgas estudadas foram hidrolisadas por proteases digestivas podendo ser adicionadas em rações de peixes.

Desta forma, com a análise por SDS-PAGE permitiu confirmar que ocorreu a hidrólise das proteínas que estavam presentes no resíduo da produção de bioetanol e que naquela forma intacta a massa molecular era maior e apresentava pouca atividade antioxidante.

4 CONCLUSÃO

Com a utilização do processo de SSF a partir de diferentes fontes de carboidratos, foi possível chegar a eficiências de 73,6% de bioetanol utilizando 15% de amido de milho e 5% de *Spirulina* sp. a uma temperatura 30 °C. Nesta mesma condição foi possível aumentar a escala de produção em 10 vezes sem baixar significativamente o rendimento de bioetanol.

A hidrólise enzimática das proteínas presentes no resíduo da produção de bioetanol gerou um perfil de peptídeos capazes de inibir o radical ABTS demonstrando que a partir de um resíduo é possível obter uma fonte de biopeptídeos com potencialidade de ser aplicado em sistemas alimentares e biológicos apresentando benefícios para a saúde humana, uma vez que antioxidantes sintéticos adicionados em alimentos possuem atividade carcinogênica e sua aplicação na indústria de alimentos ainda é maior e predominante com relação aos bioativos de fonte natural.

Diante disso, este estudo demonstrou que é possível desenvolver uma biorrefinaria integrada produzindo bioetanol da microalga *Spirulina* sp. adicionada de amido de milho produzido através do processo de sacarificação e fermentação simultânea que se apresenta como uma boa forma para diminuir os impactos ambientais e suprir a demanda energética de combustíveis utilizando biomassas de fontes renováveis.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- BATALLER, B. G.; CAPAREDA, S. C. A rapid and non-destructive method **for quantifying biomolecules in *Spirulina platensis*** via Fourier transform infrared-attenuated total reflectance spectroscopy. **Algal Research**, v. 32, p. 341-352, 2018.
- BRAGA, V. D. S.; MASTRANTONIO, D. J. D. S.; COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 221–226, 2018.
- BRASIL. Resolução RDC no 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3b43f08047457c0188d5dc3fbc4c6735/RDC_268_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 mai. 2018.
- COTANA, F.; CAVALAGLIO, G.; GELOSIA, M.; COCCIA, V.; PETROZZI, A.; INGLES, D.; POMPILI, E. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 424-432, 2015.
- COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; DA ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina sp.* LEB18. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 173-178, 2019.
- CHATTERJEE, A.; KANAWJIA, S. K.; KHETRA, Y. Properties of sweetened indian yogurt (mishti dohi) as affected by added tryptic whey protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n.1, p. 824-831, 2016.
- COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen, v. 59, p. 55-59, 2004.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 19 jan. 2019.
- DAMODARAN, S., PARKIN, K. L. FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. São Paulo. 4. Ed. Editora Artmed, pp.900, 2010.

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.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430-441, 2008.

EKLUND, R.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbial Technology**, v. 17: p. 255–259, 1995.

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.

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.

HOYLE, N., MERRITT, J. H. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, p. 76–79, 1994.

JESUS, S. C; ASSIS, J. D; RODRIGUES, B. M; FILHO, M. A; COSTA, V. A. J; FERREIRA, S. E; DRUZIAN, I. J. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of *Spirulina* sp. LEB-18 cultures under outdoor conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 1106-1114, 2019.

KUMAR, D.; SINGH, V. Chapter 22-Bioethanol production from corn. In: SERNASALDIVAR, S. O. **Corn: Chemistry and Technology**. 3. ed. p. 615-631, 2019.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P. COSTA, J. A. V. Utilisation Of *Spirulina* sp. And *Chlorellapyrenoidosa* Biomass For The Production of Enzymatic Protein Hydrolysates. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n.5, p. 29-38, 2014.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V. Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 79-86, 2016.

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.

MA, C.; NI, X.; CHI, Z.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. **Marine Biotechnology**, 2007.

MARTINS, V. G., COSTA, J. A. V., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

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

MUYS, M., SCHWAIGER, B., LESUEUS, C., VANDENHEUVEL, D., VERMEIR, P., VLAEMINCK, S. E. High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *Spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies. **Bioresource Technology**, v. 275, p.247–257, 2019.

MOJOVIC' L., NIKOLIC' S., RAKIN M., VUKAŠINOVIC' M. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**, v 85(12–13), p 1750–1755, 2006.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1^a ed. **New Delhi: Asiatech Publishers**, p. 760, 2005.

PERREIRA, A. M. **Obtenção de concentrado, isolado e hidrolisado protéico a partir de biomassa de *spirulina***, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande, RS, Brasil, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALLA, A; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. 1^o ed. Pelotas- RS: Universitária/UFPel, 1996.

REMPEL, A., MACHADO, T. P., COLLA, L. M., TREICHEL, H., COLLA, E., MARGARITES, A., COLLA, M. L. Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amyolytic enzymes. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 163-171, 2018.

SALLA, C. A; MARGARITES, C. A; SEIBEL, I. F; HOLZ, C. L; BRIÃO, B. V; BERTOLIN, E.T; COLLA, M. L; COSTA, V. A. J. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technolgy**, v. 209, p. 133-141, 2016.

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. **In: Congresso Nacional da STAB**, Águas de São Pedro, p.262-266, 1993.

SILVA, C. P. **Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo *snack***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UPF, Passo Fundo/RS, 2017.

SUGANYA, K. U.; GOVINDARAJU, K.; KUMAR, V. G.; DHAS, T. S.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 351-356, 2015.

SINGH, S.; CHAKRAVARTYA, I.; PANDEY, K. D.; KUNDU, S. A development of a process model for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of algal starch to third-generation bioethanol. **Journal Biofuels**, p 1-9, 2018.

SILVA, C. P. **Peptídeos bioativos da microalga *Spirulina* e sua aplicação em um alimento extrusado tipo *snack***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UPF, Passo Fundo/RS, 2017.

TRIVEDI, M. K.; BRANTON, A.; TRIVEDI, D.; NAYAK, G.; SINGH, R.; JANA, S. Physical spectroscopic and thermal characterization of biofield treated fish peptone. **European Journal of Biophysics**, v. 3, n. 6, p. 51-58, 2015.

VIZCAÍNO, A. J.; SÁEZ M. I.; MARTÍNEZ, T. F.; ACIÉN, F. G.; ALARCÓN, F. J. **Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole**. *Algal Research*, v. 37, p. 145-153, 2019.

ZHU L, KETOLA T. Microalgae as a biofuel feedstock: risks and challenges. **Journal Sustainable Dev World Ecol**, v.19, p 74-268, 2012.

YE, G.; ZENG, D.; ZHANG, S.; FAN, M.; ZHANG, H.; XIE, J.; Ethanol production from mixtures of sugarcane bagasse and *Dioscorea composite* extracted residue with high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 257, p.23–29, 2018.

ANEXOS

ANEXO A - 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 1mL 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 5mL 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 B - 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 C - 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 termostatizado 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, agita-se a amostra com o auxílio de um vortex e aguarda-se 10 minutos. Em seguida, adiciona-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.