

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

Marilda Ferreira dos Santos

**Prospecção de bactérias produtoras de amilases para sacarificação de
microalgas**

Passo Fundo
2018

Marilda Ferreira dos Santos
Tecnóloga em Agropecuária: Agroindústria

**Prospecção de bactérias produtoras de amilases para sacarificação de
microalgas**

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

Orientador: Prof. Dr. Christian Oliveira
Reinehr

Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e
não convencionais na produção de alimentos e
ingredientes

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

S237p Santos, Marilda Ferreira dos
Prospecção de bactérias produtoras de amilases para
sacrificação de microalgas / Marilda Ferreira dos Santos. –
2018.
97 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Christian Oliveira Reinehr.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Bactérias. 2. Amilases. 3. Spirulina. 4. Biocombustíveis.
I. Reinehr, Christian Oliveira, orientador. II. Título.

CDU: 664

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

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

**Prospecção de bactérias produtoras de amilases para sacarificação de
microalgas**

Elaborada por
Marilda Ferreira dos Santos

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

Comissão Examinadora



Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)



Luciane Maria Colla, Dra., UPF



Ana Cláudia Freitas Margarites, Dra., UPF

Passo Fundo, RS, Brasil
2018

Dedico aos meus três anjos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por proporcionar em minha jornada mais este desafio.

Ao meu “recomeço” pelo seu apoio, carinho, paciência infinita e compreensão. Chicletinho, muito obrigada por estar comigo neste período!

Ao meu irmão Adilson e sua família, Joana, Kiko, Rosália, Leidiane, Franciele e meu cachorro Tchuco,...sem vocês não estaria aqui escrevendo estas palavras.

Ao PPGCTA por aceitar a minha candidatura, e em especial ao Prof. Dr. Christian por ter me selecionado, pela sua extrema paciência (indian's language), sua dedicação de tempo, ensinamentos, por todo o conhecimento repassado e confiar em minha capacidade. Prof. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas Cassiane, Ricardo, Dulce, Bernardo, Fernanda, Gustavo, João, Clarice, Nara e Sonara pela paciência em suportar minha instabilidade, disposição, ajuda e principalmente a amizade.

Aos meus colegas do PPGCTA que tive imenso prazer de conviver Cindiele e Eliônio, ambos me salvaram em muitos momentos sempre com sorriso no rosto. Admiro vocês!

Aos coabitantes do laboratório de fermentações Prof. Dra. Ana Margarites, Tainara, Grazielle, Alan, Júlia... enfim todos me ajudaram em diversos momentos deste período, contribuindo com suas experiências e conhecimento, obrigada pelo carinho e amparo.

A doutoranda Éllen Rofrigues pela disponibilidade, por toda ajuda recebida, paciência e repasse de seus conhecimentos.

Aos meus “Ic's” Fábio e Djuliane pela contribuição na parte prática deste trabalho, pela disponibilidade e apoio, ficou lembranças das risadas e agradável convivência. Obrigada!

Sou grata a todos que participaram diretamente ou indiretamente nesta dissertação.

Muito obrigada a todos!

Deus nos concede, a cada dia, uma página de
vida nova no livro do tempo.
Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa
conta.

Chico Xavier

RESUMO

Pesquisas relacionadas aos processos de produção de biocombustíveis através de microalgas designados de biocombustíveis de terceira geração, estão ganhando espaço no mundo em virtude da sua maior sustentabilidade, já que não competem diretamente com a produção de alimentos por áreas cultiváveis. A *Spirulina platensis* é uma microalga cuja composição química é conhecida, possuindo considerável potencial para a produção de biocombustíveis. Para que o processo seja viabilizado é necessário que os carboidratos presentes na microalga sejam transformados em açúcares fermentescíveis, sendo que a hidrólise da biomassa de microalgas pode ser realizada de maneira química ou enzimática. A hidrólise enzimática é considerada um processo mais conveniente em relação aos demais métodos, pois podem ser utilizadas enzimas produzidas por microrganismos, como fungos e bactérias. Inúmeros microrganismos estão no solo e na água, apresentando características específicas e distintas, de acordo com as condições e nutrientes disponíveis para se desenvolver. Objetivou-se a seleção de bactérias que produzam enzimas amilolíticas específicas para a hidrólise dos carboidratos da microalga *Spirulina platensis*. A pesquisa iniciou-se no estudo do pré-tratamento químico-físico da microalga, adaptação, crescimento e identificação dos microrganismos, a produção de extrato enzimático, caracterização e aplicação na microalga *Spirulina platensis*. Em relação aos pré-tratamentos os que mais disponibilizaram carboidratos foram pré-tratamento ácido a 6% de concentração liberando cerca de 60% de carboidratos e pré-tratamento alcalino a 12% disponibilizando 50% de carboidratos contidos na microalga. A partir das colunas de Winogradsky usadas para desenvolvimento de bactérias com caráter amilolítico, de 45 colônias isoladas 97% apresentaram características amilolíticas, sendo selecionadas qualitativamente 10 bactérias com maior potencial amilolítico. Estas foram submetidas a fermentação por período de 7 dias para produção de enzimas sendo, selecionadas 4 bactérias com maior atividade enzimática em menor tempo de incubação. Os extratos enzimáticos brutos demonstraram ser termoestáveis, sendo 2 com atividade enzimática residual acima de 60% a temperatura de 95°C. Os extratos foram avaliados em diferentes condições de pH sendo, que em pH 5,5 e 6,5 obtiveram atividade residual superior aos demais avaliados. Respectivamente os extratos enzimáticos bruto e purificado passaram por avaliações de transições eletrônicas e transições vibracionais demonstrando moléculas constituintes de proteínas e que possuíam composição orgânica semelhante. Os extratos enzimáticos brutos e purificados foram avaliados em biomassa *Spirulina platensis* por um período de 48h sendo que, um dos extratos obteve de 1,67 g/L de açúcares redutores em 24 h. Conclui-se que os extratos adquiridos possuem potencial amilolítico na biomassa tanto quanto em amido, demonstrando caráter termoestável em altas temperaturas, tornando inclusive estas enzimas passíveis para usos distintos, não apenas para sacarificação de microalgas.

Palavras-chave: bactérias, extrato enzimático, *Spirulina platensis*

ABSTRACT

Research related to the production processes of biofuels through microalgae called third generation biofuels are gaining space in the world due to their greater sustainability, since they do not compete directly with the production of food by arable areas. *Spirulina platensis* is a microalgae whose chemical composition is known, with considerable potential for the production of biofuels. For the process to be viable it is necessary that the carbohydrates present in the microalga are transformed into fermentable sugars, and the hydrolysis of the microalgae biomass can be carried out in a chemical or enzymatic way. Enzymatic hydrolysis is considered to be a more convenient process compared to other methods, since enzymes produced by microorganisms such as fungi and bacteria can be used. Numerous microorganisms are in soil and water, presenting specific and distinct characteristics, according to the conditions and nutrients available to develop. The objective of this work was to select bacteria that produce specific amyolytic enzymes for the hydrolysis of the carbohydrates of the *Spirulina platensis* microalgae. The research began in the study of the microalgae chemical pre-treatment, adaptation, growth and identification of the microorganisms, the production of enzymatic extract, characterization and application in the microalga *Spirulina platensis*. In relation to the pre-treatments the ones that made the most carbohydrates were acid pre-treatment at 6% concentration, releasing about 60% carbohydrates and 12% alkali pre-treatment, providing 50% carbohydrates contained in the microalga. From the Winogradsky columns used for the development of amyolytic bacteria, from 45 isolated colonies, 97% had amyolytic characteristics, and 10 bacteria with a higher amyolytic potential were selected qualitatively. These were submitted to fermentation for 7 days for the production of enzymes, being selected 4 bacteria with higher enzymatic activity in a shorter incubation time. The crude enzymatic extracts showed to be thermostable, 2 with residual enzymatic activity above 60% at 95 ° C. The extracts were evaluated in different pH conditions, being that at pH 5.5 and 6.5 they obtained residual activity superior to the others evaluated. Respectively the crude and purified enzymatic extracts underwent evaluations of electronic transitions and vibrational transitions demonstrating molecules constituent of proteins and that they had similar organic composition. The crude and purified enzymatic extracts were evaluated in biomass *Spirulina platensis* for a period of 48h and one of the extracts obtained 1.67 g / L of reducing sugars in 24 h. It is concluded that the extracts obtained have amyolytic potential in the biomass as well as in starch, demonstrating a thermostable character at high temperatures, even making these enzymes suitable for different uses, not only for saccharification of microalgae.

Key words: bacteria, enzymatic extract, *Spirulina platensis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema das possíveis rotas da transformação de microalgas para produção de bioenergia.....	26
Figura 2 - Resumo global da produção de etanol a partir de microalgas.....	28
Figura 3- Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas.....	33
Figura 4 - Delineamento da pesquisa.....	37
Figura 5 – Delineamento da produção de enzima	43
Figura 6- Efeito da temperatura sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento ácido....	50
Figura 7 - Efeito da concentração de ácido sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento ácido.....	51
Figura 8 - Efeito da temperatura sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento alcalino.	52
Figura 9 - Rendimento de extração de carboidratos após pré-tratamentos.	53
Figura 10 - Aspecto das colunas de Winogradsky com pré-tratamento.	56
Figura 11 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes das colunas de Winogradsky adicionadas com <i>Spirulina platensis</i> submetidas a pré-tratamento ácido.....	57
Figura 12 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes das colunas de Winogradsky adicionadas de microalga <i>Spirulina platensis</i> submetida a pré-tratamento básico.	58
Figura 13 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes da coluna de Winogradsky adicionados de <i>Spirulina platensis</i> sem pré-tratamento.....	58
Figura 14 - Atividade enzimática do crescimento dos microrganismos selecionados.	61
Figura 15 - Atividade específica dos extratos	62
Figura 16 - Espectro de infravermelho dos extratos brutos.	63
Figura 17 - Espectro de infravermelho dos extratos purificados.....	64
Figura 18 - Espectros de varredura dos extratos purificados com sulfato de amônio.	65
Figura 19 - Desempenho dos extratos brutos a 90°C.....	67
Figura 20 - Desempenho dos extratos brutos a 95°C.....	68
Figura 21 - Comportamento dos extratos brutos em diferentes condições de pH.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental estabelecido para avaliar o efeito do pré-tratamento ácido e da temperatura sobre a biomassa da microalga <i>Spirulina platensis</i>	39
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental estabelecido para avaliar o efeito do pré-tratamento alcalino e da temperatura sobre a biomassa da microalga <i>Spirulina platensis</i> .	39
Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos no pré-tratamento ácido.	49
Tabela 4 - Análise de variância do pré-tratamento ácido.	50
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial e resultados obtidos no pré-tratamento alcalino.	51
Tabela 6 – Análise de variância do pré-tratamento alcalino.	52
Tabela 7 – Caracterização físico-química da biomassa <i>Spirulina platensis</i>	53
Tabela 8 – Diâmetro dos halos formados nas bactérias pré-selecionadas.	59
Tabela 9 – Classificações preliminares das bactérias pré-selecionadas.	59
Tabela 10 – Atividade enzimática dos extratos.	62
Tabela 11 – Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 5,5.	70
Tabela 12 – Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 7,0.	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	MICROALGAS.....	23
2.1.1	Microalga <i>Spirulina platensis</i>	24
2.1.2	Microalgas como fonte de energia renovável alternativa	25
2.1.3	Produção de etanol a partir de microalgas	27
2.1.4	Pré-tratamento da biomassa de microalgas.....	29
2.2	ENZIMAS.....	30
2.2.1	Amilases.....	31
2.3	PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS	32
2.3.1	Enzimas sacarificantes de microalgas	34
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>.....	38
3.1.1	Caracterização da biomassa da microalga <i>Spirulina platensis</i>	38
3.1.2	Pré-tratamento ácido e alcalino	38
3.2	ADAPTAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	39
3.2.1	Caracterização físico-química do solo e da água	39
3.2.2	Montagem das colunas de Winogradsky	40
3.2.3	Isolamento dos microrganismos.....	41
3.2.4	Seleção preliminar de bactérias com atividade amilolítica.....	41
3.2.5	Identificação das bactérias	41
3.3	PRODUÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	42
3.3.1	Produção da enzima.....	42
3.3.2	Purificação do extrato enzimático bruto	43
3.3.3	Determinação da atividade sacarificante	43
3.3.4	Determinação da atividade enzimática específica.....	44
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	45
3.4.1	Avaliação dos extratos quanto à temperatura e ao pH	45
3.5	AÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE A BIOMASSA DA MICROALGA <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>.....	46

3.5.1	Determinação da atividade sacarificante dos extratos sobre a microalga.....	47
3.6	TRATAMENTO DOS DADOS.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>.....	49
4.1.1	Pré-tratamentos ácido e básico.....	49
4.2	ADAPTAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	54
4.2.1	Montagem das colunas de Winogradsky	55
4.2.2	Isolamento dos microrganismos.....	56
4.2.3	Seleção preliminar de bactérias com atividade amilolítica.....	57
4.3	PRODUÇÃO DA ENZIMA	60
4.3.1	Produção do extrato enzimático	60
4.3.2	Purificação do extrato enzimático	61
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	63
4.4.1	Estabilidade em relação à temperatura	66
4.4.2	Avaliação da atividade enzimática em relação ao pH	68
4.5	AÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE A BIOMASSA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>.....	70
5	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	83
	APÊNDICE B – RESULTADO DO TESTE DE LUGOL NOS DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS	95
	APÊNDICE C – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS MICRORGANISMOS NÃO SELECIONADOS	97

1 INTRODUÇÃO

O consumo de energia para os processos humanos aumenta diariamente, sendo parte desta energia proveniente de resíduos fósseis. Em função disto há uma necessidade cada vez maior de investigar novas formas e fontes de energia a partir de matérias-primas alternativas. O bioetanol é um biocombustível proveniente da fermentação de matérias-primas vegetais, tais como milho e cana-de-açúcar. Embora ele seja considerado uma fonte de energia renovável, ocorre a competição direta com a produção de alimentos devido à sua forma de produção, com a utilização de grandes áreas cultiváveis.

Uma fonte alternativa para a produção de bioetanol pode ser a biomassa de microalgas, sendo este combustível então conhecido como bioetanol de terceira geração. As microalgas são microrganismos encontrados principalmente em ambientes aquáticos, sendo produtores primários de energia devido a suas elevadas taxas de fotossíntese e não necessitando de área de produção extensa. Uma microalga com potencial para estudo é a *Spirulina platensis*, a qual é caracterizada como cianobactéria filamentosa e apresenta um teor de carboidratos entre 10 % a 20 %. Entretanto, se o cultivo for efetuado de maneira adequada o teor de carboidratos pode aumentar significativamente, proporcionando um maior rendimento em açúcares.

O processo de produção de bioetanol através da biomassa de microalgas é realizado por fermentação e, para que a mesma ocorra é necessária a hidrólise dos carboidratos das microalgas, pois estes estão ligados à parede celular e é imprescindível a sua disponibilização para que se tornem carboidratos fermentescíveis para as leveduras. A hidrólise dos carboidratos das microalgas pode ser realizada de modo químico ou enzimático, sendo que o processo enzimático é considerado um método mais promissor, gerando menores volumes de resíduos neste processo. Este processo utiliza enzimas sacarificantes transformando polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, sendo que as enzimas são produzidas preferencialmente por microrganismos.

A diversidade de microrganismos contidos nos solos e nas águas é primordial para o ciclo sustentável dos ecossistemas, sendo elementares no processo de fragmentação, decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes. Nesta diversidade encontram-se microrganismos capazes de degradar diferentes tipos de polissacarídeos, através de enzimas amilolíticas. Amilases bacterianas podem ser produzidas por diferentes espécies de microrganismos, sendo as derivadas do gênero *Bacillus* as mais abrangentes. As bactérias amilolíticas são vastas no meio ambiente, entretanto as enzimas microbianas produzidas

atualmente focam a hidrólise do amido, proveniente de culturas por exemplo de trigo e milho e microalgas não apresentam os seus carboidratos neste mesmo tipo de estrutura sendo necessário buscar uma enzima que possui melhor eficiência no processo de hidrólise do polissacarídeos sintetizados por estas.

Para produzir enzimas bacterianas de carácter amilolítico provenientes de um ambiente fechado e com adição de biomassa de *Spirulina platensis*, é necessário alguns parâmetros tecnológicos, como um pré-tratamento da biomassa, tempo de inoculação no meio estudado, coleta e investigação das características das colônias de microrganismos, produção dos microrganismos selecionados em maior escala, produção dos extratos enzimáticos e avaliação dos mesmos.

Esta pesquisa está vinculada ao projeto “Produção de alimentos, ingredientes e produtos de interesse industrial por bioprocessos do PPGCTA-UPF”, buscando enzimas de interesse como elemento significativo no processo de sacarificação da microalga *Spirulina platensis*.

Esta pesquisa possui a intenção de contribuir na área de ciência e tecnologia na procura de microrganismos submetidos a um ambiente controlado, com capacidades catalisadoras de substratos almejados, neste caso a procura de bactérias produtoras de amilases.

O objetivo foi selecionar bactérias produtoras de amilases provenientes do ambiente com potencial para sacarificação de microalgas.

Os objetivos específicos desta pesquisa consistiram em:

- a) Avaliar os efeitos ocasionados no pré-tratamento de *Spirulina platensis* sobre a liberação de carboidratos;
- b) Induzir o crescimento de bactérias amilolíticas em ambiente com adição de microalga pré-tratada;
- c) Isolar e selecionar bactérias produtoras de amilases;
- d) Avaliar o comportamento dos extratos enzimáticos frente ao pH e temperaturas;
- e) Avaliar a eficiência catalítica na microalga *Spirulina platensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

O termo microalga inclui organismos de dois grupos: procariontes e eucariontes sendo que as microalgas procariontes também são conhecidas como algas azuis, cloroxibactérias, cianobactérias ou cianófitas e as microalgas eucariontes são chamadas de algas verdes ou clorófitas e diferenciam-se das cianobactérias por apresentarem núcleo e organelas envolvidos por membranas, cromossomos e células individuais geralmente maiores que as das cianófitas (ANDRADE et al., 2014).

As microalgas (cianobactérias) pertencem o domínio bactéria e são filogeneticamente afastadas das algas eucariontes, se diferenciam-se das bactérias por possuírem clorofila α ao invés de bacterioclorofila e apresentarem fotossistemas I e II, possibilitando a realização de fotossíntese; possuem coloração azulada nas células oriundo da presença de pigmentos azuis e vermelhos, que mascaram a coloração verde da clorofila. São encontradas principalmente em ambientes aquáticos, podendo ser marinho ou continental, ou subaéreos, pois apresentam grande versatilidade na adaptação em diversos ecossistemas (ANDRADE et al., 2014).

De acordo com Richmond (2004) as microalgas utilizam a fotossíntese para converter a luz solar e dióxido de carbono em carboidrato para serem utilizadas como fonte de energia sendo que, grande parte das microalgas crescem exclusivamente na fotossíntese, porém, algumas podem utilizar em carbono orgânico quando a luz solar não está disponível. Consideradas como microrganismos fotossintéticos procarióticos ou eucarióticos de crescimento rápido, estas podem viver em condições adversas devido à sua estrutura multicelular unicelular ou simples (MUSSATO et al., 2010).

Microalgas convertem a luz solar, água e CO₂ em biomassa composta principalmente por carboidratos, proteínas e óleos e podem duplicar a sua biomassa em períodos tão curtos como 3,5 h apresentando taxas elevadas de crescimento em meios de cultura mais acessíveis (CHISTI, 2007).

Fotossíntese de microalgas é semelhante a que ocorrem em plantas superiores, são mais eficientes conversores de energia solar devido à sua estrutura menos complexa outrossim, como as microalgas possuem tamanho microscópico e crescem em cultura líquida, os nutrientes podem ser mantidos em condições controladas, proporcionando os benefícios de níveis

elevados de produtividade contínua controlada, semelhantes aos obtidos em fermentações microbianas (WALKER, 2005).

As microalgas podem fornecer uma quantidade considerável de substâncias úteis, incluindo os substancias que podem ser convertidos em biocombustíveis, pigmentos e corantes, alimentos e rações, biopolímeros, biofertilizantes, pesticidas, nutracêuticos e compostos farmacológicos. Microalgas podem ser usadas no tratamento de águas residuais e na detenção da acumulação de dióxido de carbono no ambiente (RICHMOND, 2004).

2.1.1 Microalga *Spirulina platensis*

A microalga *Spirulina* é um organismo que é encontrado em diversas regiões distintas, sendo o seu primeiro isolamento efetuado por Turpin, em 1827. Espécies de *Spirulina* foram encontradas em vários ambientes: solo, areia, pântanos, água salobra, água do mar e de água doce. Este organismo é capaz de se adaptar à diferentes habitats e coloniza determinados ambientes em que a vida de outros microrganismos é, se não impossível, muito difícil. A *Spirulina* é considerada uma cianobactéria multicelular, filamentosa e que sob o microscópio aparece como filamentos azuis-verdes compostas de células cilíndricas dispostas em não ramificadas, a sua forma helicoidal das tricomas é característica do seu gênero, sendo estes os parâmetros variáveis de acordo com a espécie (CIFERRI, 1983).

Conforme Vonshak (1997) *Anthrospira platensis* (popularmente conhecida como *Spirulina platensis*) é uma cianobactéria que se destaca de outras devido ao perfil proteico que fica em torno de 70% e também ser uma fonte de compostos biologicamente ativos como o ácido γ -linoleico, vitaminas e pigmentos; e também formada por células dispostas ao longo de um filamento em espiral com até 1,0 mm de comprimento.

De acordo com Schmitz (2012), o principal metabolismo da *Spirulina platensis* é a fotossíntese, sendo a luz solar como sua principal fonte de energia. Através da fotossíntese esta microalga converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio. Os nutrientes necessários para desenvolvimento são fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e outros oligoelementos sendo que, os principais fatores físico-químicos que afetam o crescimento são luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, sendo que os fatores biológicos referem-se às taxas metabólicas da espécie cultivada.

Os carboidratos são uma ampla categoria de compostos que engloba açúcares (monossacarídeos) e os seus polímeros (di-, oligo- e polissacarídeos), sendo os carboidratos reservados em espécies diferentes de microalgas como as cianobactérias sintetizam glicogênio

que são (polissacarídeos da maioria das algas azuis), as algas vermelhas sintetizam o amido (híbrido de amido e glicogênio) e algas verdes acumulam polissacarídeos do tipo amilopectina. (NAKAMURA et al., 2005).

De acordo com Shekharam et al. (1987) os principais monômeros de açúcares pertencentes na microalga *Spirulina platensis* é 7% de xilose com , 9.3% de manose, 54.4% de glicose e 22.3% de ramosa.

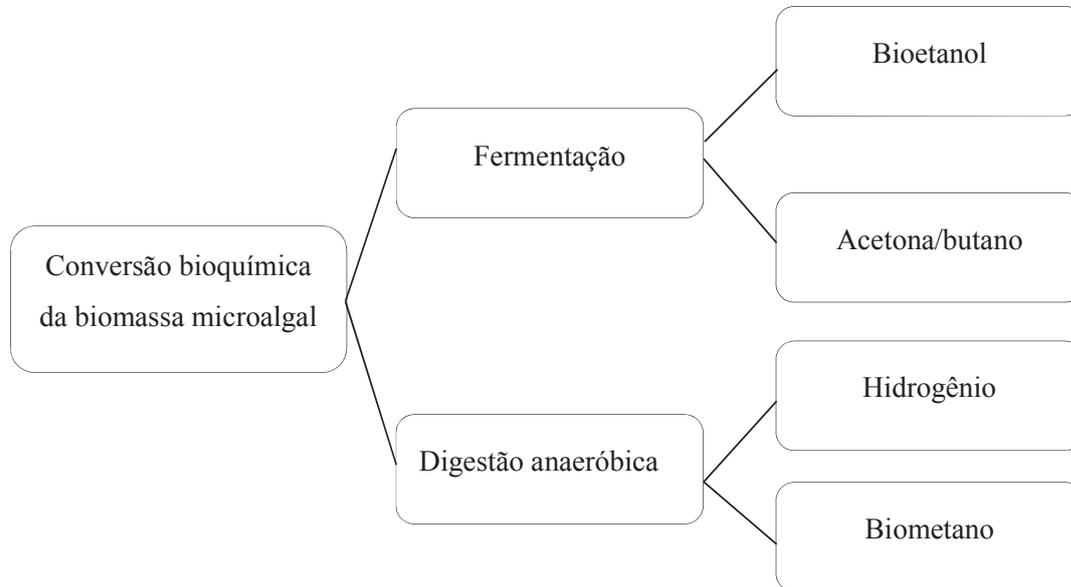
2.1.2 Microalgas como fonte de energia renovável alternativa

O conceito de biorrefinarias possui como objetivo de substituir produtos e processos baseados em fontes de matérias-primas não renováveis (exemplo, petróleo) por produtos e processos que utilizem a biomassa renovável como matéria-prima. O desenvolvimento de novas tecnologias que busquem o aproveitamento de todo o potencial econômico e energético da biomassa é importante, sendo considerada, a sustentabilidade das cadeias produtivas passando por uma avaliação dos impactos ambientais, econômicos e sociais. Setores como o energético e químico são os que melhor se enquadram para aproveitar as possibilidades técnicas e econômicas das biorrefinarias como o primeiro, por meio da produção de biocombustíveis e da geração de energia elétrica e, o segundo pela obtenção de produtos químicos de alto valor (VAZ JR, 2011).

A Empresa de Pesquisa Energética (EPE) disponibilizou para consulta o relatório síntese do balanço energético nacional de edição 2016, apresentando detalhes a contabilização da oferta, transformação e consumo final de produtos energéticos no Brasil, tendo por base o ano de 2015. Com base nesse relatório divulgou que a matriz energética brasileira ficou mais limpa, com alta de 77,1% na geração de energia eólica e consumo 18,6% maior de etanol, ao mesmo tempo em que o consumo de gasolina caiu 9,5% (BRASIL, 2016).

O estudo dos metabólitos produzidos por microalgas tem permitido avanço em pesquisas relacionadas a novas fontes de energia renovável. Microrganismos têm sido estudados e utilizados como matéria-prima para produção de biocombustíveis, tais como biodiesel e bioetanol, sendo um considerável número de espécies de microalgas que se tem mostrado a habilidade de produzir gás hidrogênio a partir de energia solar e gás metano a partir da fermentação da sua biomassa, sendo também explorado pelo homem para geração de energia. Uma maneira simplificada da conversão da biomassa de microalgas em biocombustíveis é exposta na Figura 1 (ANDRADE et al., 2014).

Figura 1 - Esquema das possíveis rotas da transformação de microalgas para produção de bioenergia



Fonte: Tsukahara et al. (2005) e Wang et al.(2008) apud Andrade et al.(2014).

A conversão de microalgas em biocombustíveis pode ser classificada como processo de conversão bioquímica e termoquímica. Os processos de conversão bioquímicos de biocombustível são transesterificação e a fermentação, o que produz respectivamente o biodiesel e bioetanol. Processos termoquímicos são categorizados como pirólise, liquefação (produz óleo combustível), a gaseificação (produz gás) e a hidrogenação com finalidade de melhorar as propriedades de biocombustível (SUALI et al., 2012).

Biorefinarias de microalgas desenvolvem a transformação da biomassa destes organismos em combustíveis, sendo os carboidratos à base de microalgas, que consiste principalmente em celulose e amido sem lignina, tornando-os úteis como fontes de carbono sendo facilmente disponíveis para a indústria de fermentação, bem como produções de biobutanol e bioetanol. Os principais carboidratos das microalgas são glicose, amido, celulose entre outros polissacarídeos, dentre estes a glicose ou amido de microalgas são as mais utilizadas para a produção de biocombustíveis (CHEW et al., 2017).

2.1.3 Produção de etanol a partir de microalgas

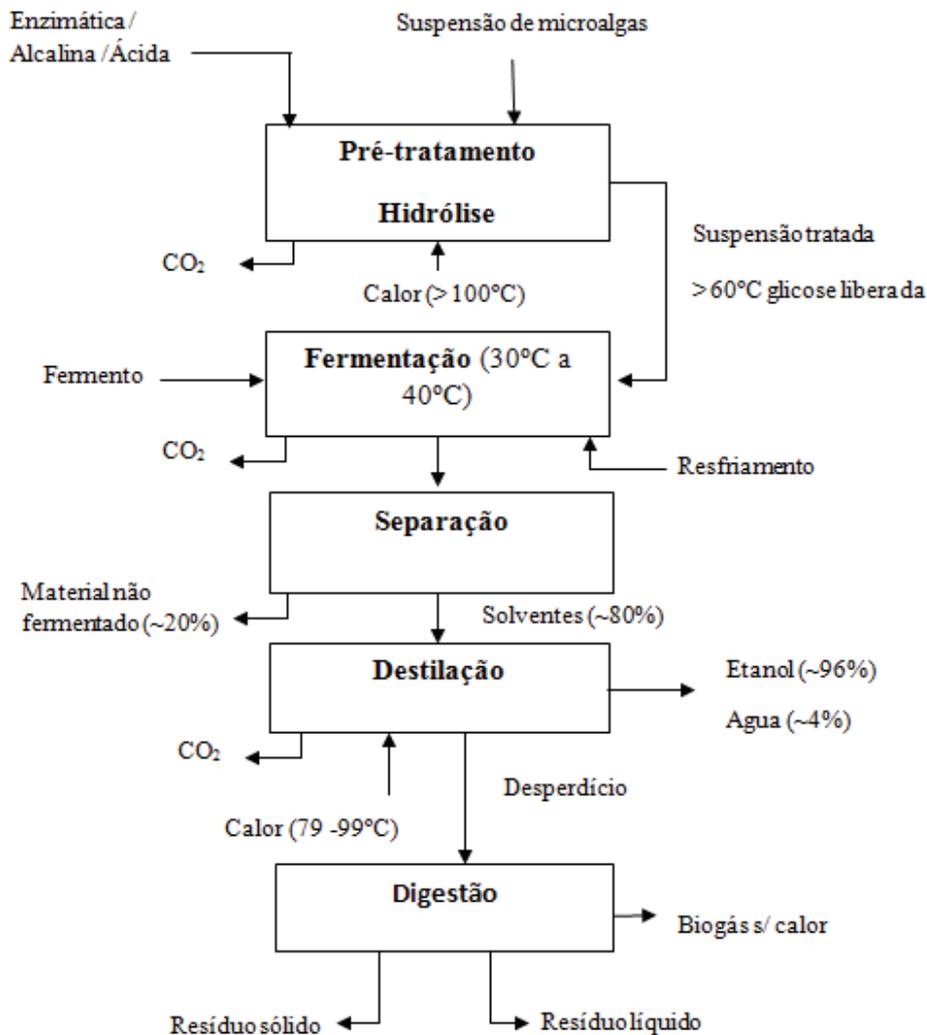
No ano de 2015 o governo do Brasil estabeleceu uma adição de 27% de etanol na gasolina sendo que, esta medida levou em consideração o abastecimento adequado de combustível em todo o território brasileiro, a existência de etanol suficiente para atender a demanda no período de entre safra da produção de cana-de-açúcar e ainda a importância de se elevar o uso de combustível renovável. (BRASIL,2015).

O uso de bioetanol como combustível de transporte pode auxiliar na redução do acúmulo de CO₂ de duas maneiras distintas, deslocando o uso de combustíveis fósseis e reciclando o CO₂ que é liberado quando é queimado como combustível (MUSSATTO et al., 2010).

A cianobactéria *Arthrospira platensis* possui taxas de crescimento consideravelmente altas, contudo o típico teor de carboidratos de *A. platensis* é de 10% a 20%, porém com limitação de fósforo e nitrogênio o conteúdo de carboidratos pode chegar a 60% a 65% na biomassa seca. A biomassa de *A. platensis* enriquecida após sofrer limitações de nutrientes exibe uma capacidade de bio-floculação rápida, sendo uma característica considerada essencial na colheita de biomassa. Inicialmente os polímeros devem ser hidrolisados para açúcares simples, de modo que estes podem ser fermentados pelas leveduras etanologênicas. Variados métodos de hidrólise foram desenvolvidos e utilizados para a sacarificação de carboidratos da biomassa de microalgas, tais como métodos físicos, químicos e enzimáticos (MARKOU et al., 2013).

A produção de biocombustível derivado de microalgas obtidas por meio de fermentação do amido, açúcar e celulose contida na biomassa microalgas é realizada conforme Figura 2 (SUALI et al.,2012).

Figura 2 - Resumo global da produção de etanol a partir de microalgas



Fonte: Adaptado de SUALI et al., 2012.

Bioquimicamente há quatro principais reações envolvidas na fermentação do bioetanol sendo, o primeiro passo um processo de glicólise, onde uma molécula de açúcar, especificamente glicose ($C_6H_{12}O_6$), é dividido em duas moléculas de piruvato (CH_3COCOO^-). A glicólise causa a redução das coenzimas: duas moléculas de difosfato de adenosina (ADP) são reduzidas a duas moléculas de ATP e duas moléculas de nicotinamida Adenina dinucleótido (NAD^+) são reduzidos a duas moléculas de NADH. Este processo também produz água e íons hidrogênio (H^+). Como segunda etapa ocorre conversão de CH_3COCOO^- em acetaldeído (CH_3CHO), catalisado pela piruvato descarboxilase, que produz CO_2 e H^+ . O terceiro passo é a conversão do CH_3CHO produzido em segundo passo para o etanol ($C_2H_5O^-$) com o auxílio da coenzima NADH que foi produzida durante o processo de glicólise, e conclui com o ânion

etanol possui propriedades semelhantes às convencionais, onde o etanol é protonado por hidrogênio para produzir etanol (C_2H_5OH). Sendo que o processo de fermentação, o CO_2 é produzido como produto secundário (SUALI et al., 2012).

2.1.4 Pré-tratamento da biomassa de microalgas

Um método de romper as paredes das células das microalgas é a realização de um pré-tratamento da biomassa microalgal e posteriormente uma sacarificação desta, sendo que este rompimento fornece matéria-prima para o processo de fermentação. A liberação de carboidratos em açúcares fermentescíveis ocorre pela hidrólise química, física, enzimática e a junção de dois métodos, atribuindo uma hidrólise como parcial (pré-tratamento) e outra com objetivo de extração maior.

O pré-tratamento da biomassa de microalga é considerado uma etapa importante, pois com isso os açúcares fermentáveis são lançados e disponibilizados para o processo de hidrólise sendo que, este tratamento contribui significativamente no custo da produção de bioetanol, porém este processo deve ser de execução acessível e não deve degradar os açúcares fermentáveis (HARUN et al., 2011).

O pré-tratamento considerado deve satisfazer os seguintes requisitos: melhorar a formação de açúcares ou a capacidade de formar posteriormente açúcares por meio de hidrólise, evitar a degradação ou perda de carboidrato, evitar a formação de subprodutos inibidores da hidrólise e subsequente do processo de fermentação e ser rentável (SILVERSTEIN, 2004 apud MAGRO et al., 2016).

O pré-tratamento ácido é mais utilizado em macroalgas proporcionando eficiência diferenciada na conversão de celulose e nas microalgas para romper células das cianobactérias. Durante o pré-tratamento, vários parâmetros influenciam significativamente na quantidade de açúcares fermentáveis liberados, como o tempo, temperatura e concentração de ácidos. Na biomassa de microalgas os carboidratos são aprisionados na parede celular e estes devem ser liberados para posteriormente convertidos em açúcares simples (HARUN et al., 2011).

O pré-tratamento alcalino é de aplicação similar ao pré-tratamento ácido, sendo relatado como um método preferível devido a temperaturas e pressões mais baixas, reduzindo o grau de inibição durante a fermentação e atuando com custo inferior com outros métodos de pré-tratamentos (HARUN et al., 2011).

Os métodos de pré-tratamento físicos incluem homogeneização de alta pressão, micro-ondas, ultrassom e aplicação de calor. Parâmetros que devem ser avaliados no pré-tratamento de

biomassa de microalgas são: o custo com eletricidade, reagentes alcalino e/ou ácido, temperatura e tempo alcançado durante o processo, no caso de pré-tratamento enzimático o tipo de enzimas utilizadas (celulases, amilases), adição de tensoativos durante a hidrólise e matéria prima utilizada (HERNÁNDEZ et al.,2015).

2.2 ENZIMAS

Enzimas são definidas como biocatalisadores na natureza, produzidos por células vivas para provocar reações bioquímicas específicas, geralmente formando parte dos processos metabólicos da célula sendo específicas em sua ação em substratos (ABD-EHALEM et al., 2015).

Enzimas são proteínas, consideradas substâncias sólidas, de difícil cristalização devido sua complexa estrutura, porém há exceções onde algumas são solúveis em água e álcool diluído e quando solubilizadas são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. As enzimas são inativadas pelo calor e devido a isto são consideradas uma propriedade significativa deste composto em relação a tecnologia (BOBBIO;BOBBIO, 2003).

A denominação enzima (palavra que em grego significa “em leveduras” foi dada por Khune em 1878, época em que se acreditava que enzimas só eram ativas nas células vivas, o que permaneceu até 1897, quando Buchner observou que o extrato obtido por prensagem de células de leveduras ainda possuía a propriedade de fermentar sacarose (BOBBIO;BOBBIO,2003)

A principal função das enzimas é aumentar a velocidade das reações. Caso houvesse ausência das enzimas, as reações metabólicas não ocorreria a velocidades significativas em condições fisiológicas. Reações enzimáticas são entre 10^3 a 10^{20} vezes mais rápidas do que as correspondentes não catalisadas. Define-se um catalisador com uma substancia que acelera a obtenção do equilíbrio. Enzimas são altamente específicas para os reagentes, ou substratos, porém este grau de especificidade varia (MORAN et al., 2013).

As enzimas são capazes de realizar uma grande quantidade de reações químicas, isso se deve a sua estrutura globular que se entrelaçam e se dobram uma ou mais cadeias polipeptídicas, possuindo um pequeno grupo de aminoácidos para formar o sítio ativo, sendo este o local onde adere o substrato e inicia-se a reação enzimática (AGUSTÍ, 2013).

Enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reações que catalisam sendo as oxirredutases que catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons, transferases que transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre as

moléculas, hidrolases catalisando reações de hidrólise em ligação covalente, as liases ocorrendo adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação, isomerases com reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos e as ligases que ocorre a condensação de duas moléculas, necessitando de energia, geralmente do ATP. (MONTEIRO;SILVA, 2009; AGUSTÍ,2013).

Enzimas podem fazer mais além de aumentar a velocidade de uma reação isolada, pode também combinar ou acoplar das reações que normalmente ocorreriam separadas, tal propriedade permite que a energia que se ganha em uma reação seja utilizada para a outra (MORAN et al., 2013). Em relação a outros catalisadores, as enzimas possuem diferenciações que se destacam para sua utilização sendo produtos naturais biológicos e biodegradáveis, possuem alta especificidade nas reações, não são consumidas durante o processo, conseguem aumentar a velocidade das reações por diminuir a energia de ativação, são estéreos seletivos e atuam em pH e temperaturas brandas (MONTEIRO;SILVA, 2009).

2.2.1 Amilases

Alfa amilases são enzimas pertencentes ao grupo de hidrolases, as quais são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula de amido em ligações em amido formando produtos de baixo peso molecular, como a glicose, maltose e unidades de maltotriose (SOUZA et al., 2010).

As amilases podem ser divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de uma forma aleatória no interior da molécula de amido. Ocorrendo a formação de oligossacarídeos lineares e ramificados de vários comprimentos da cadeia. As exoamilases hidrolisam-se a partir da extremidade não redutora, resultando sucessivamente em produtos finais curtos (GUPTA et al., 2003)

Na hidrólise do amido, a α -amilase (endo-amilase) realiza os primeiros ataques nas ligações α 1,4-glicosídicas internas de amido separando a amilase e amilopectina, no qual a amilase se rompe a maltose, glicose e amilopectina, e a amilopectina é rompida novamente formando dextrina sem limites (CHUN-YEN et al., 2013).

São produzidas por diversos organismos como, plantas, microrganismos e até o homem; sendo que em microrganismos há diferenças na produção enzimática e a obtenção destas enzimas difere entre si, de acordo com suas características físico químicas e como atuam sobre os substratos (TAFARRELLO, 2004; SILVA, 2009). As enzimas amilase são altamente

instáveis e perdem a sua propriedade em várias condições, incluindo temperatura elevada, pH extremo e diferentes produtos químicos utilizados na reação (PAUL et al., 2017).

De acordo com Souza et al. (2010) amilases estão entre as enzimas mais importantes e consideradas de grande valia para a biotecnologia, constituindo uma classe de enzimas industriais tendo cerca de 25 % do mercado mundial de enzima. Atualmente há um grande número de amilases microbianas disponíveis comercialmente.

Enzima α -amilase atua, isolada ou simultaneamente, com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de sementes de cereais são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto as de origem microbiana são empregadas em processos onde são necessárias a sacarificação e a liquefação do amido (SPIER, 2005).

2.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

Na produção de enzimas microbianas, os microrganismos possuem atividade ideal nas condições similares as que permitem crescimento celular ótima. As enzimas são secretadas pela célula no meio extracelular (produção extracelular) ou são retidas dentro das células (enzimas intracelulares). Para produção de enzimas extracelulares a mesma ocorre tanto durante a fase logarítmica quanto em fase estacionária do crescimento, sendo que, enzimas intracelulares são produzidas apenas em crescimento logarítmico e são liberadas apenas quando a célula sofre lise na fase estacionária ou declínio (FELLOWS, 2006).

As amilases de microrganismos têm um amplo espectro de aplicações industriais sendo mais estáveis do que quando preparados com plantas e animais. Como vantagem da utilização de microrganismos para a produção de grandes quantidades de amilases é a economia, pois há capacidade de produção e o fato de que os microrganismos são fáceis de manipular para se obter enzimas de características desejadas (SOUZA et al., 2010)

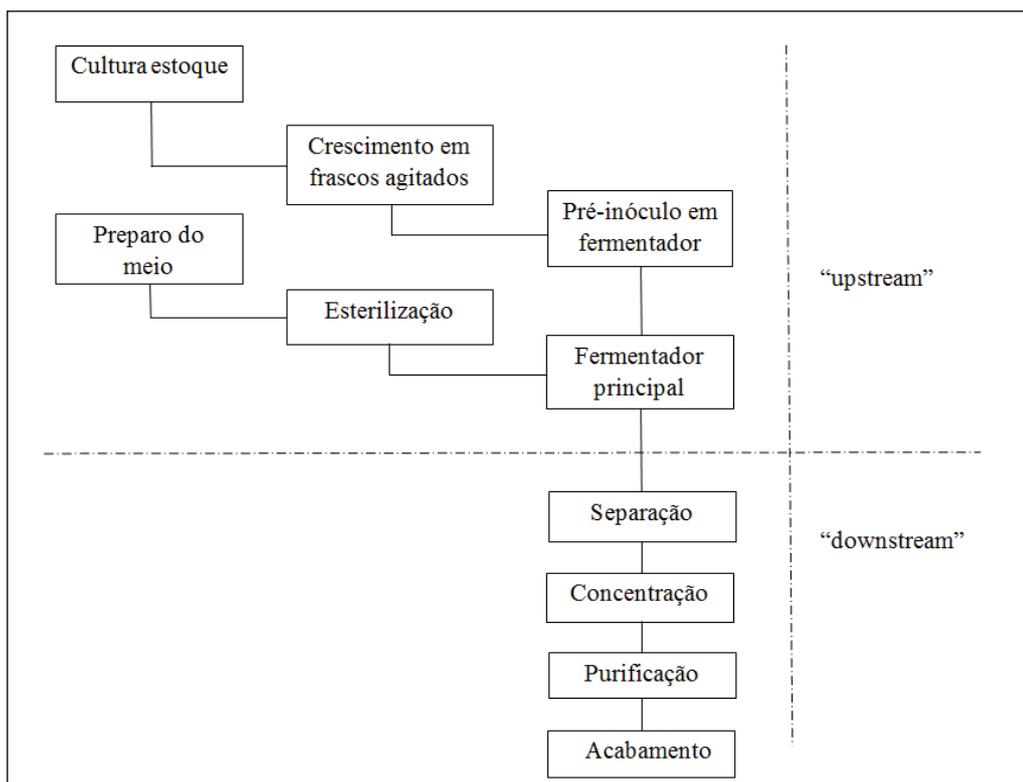
Amilases são de ocorrência ubíqua, no entanto, as fontes microbianas são as mais preferidas para a produção em larga escala. Há um grande número de α -amilases microbianas comercializadas com aplicações em diferentes setores industriais (GUPTA et al., 2003).

Bactérias cultivadas ou fungos utilizados como fonte de amilases é preposto devido à sua plasticidade e disponibilidade. As amilases bacterianas são geralmente optadas para o processamento de amido sendo as espécies *Bacillus* tais como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. macerans*, *B. megaterium* e *B. amyloliquefaciens* destacam-se como produtores de α -amilase no caso de ser termoestável utilizando fermentação submersa ocorrendo serem

amplamente utilizados para a produção comercial de amilases para várias aplicações (ABD-EHALEM et al, 2015; ENSHASY,2007).

Para uma produção comercial de enzimas a partir de microrganismos, de acordo com Fellows (2006) deve-se observar os seguintes parâmetros: como os microrganismos devem crescer em substrato barato, substratos disponíveis devem ser de fácil aquisição e quantidades adequada e qualidade uniforme, microrganismos devem produzir alto rendimento e pouco tempo, métodos de recuperação devem ser simples e baratos e a preparação da enzima deve ser estável. Lima et al. (2001) demonstra na Figura 3 um conjunto de processos necessários a produção de enzimas comerciais, sendo considerado (neste caso) o processo fermentativo como referência sendo realizada por fermentação submersa.

Figura 3- Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas



Fonte: Adaptado de Lima et al. ,(2001).

2.3.1 Enzimas sacarificantes de microalgas

O processo de sacarificação de microalgas e macroalgas se diferenciam pelas características que cada organismo possui como sua estrutura da parede celular, procariotos ou eucariotos, pigmentação, composição química, entre outros pois não existe uma padronização de como se desenvolver este processo.

Alguns estudos já demonstram resultados de enzimas provenientes de microrganismos com capacidade de sacarificar os carboidratos de microalgas, como no caso da hidrólise enzimática de *Chlorococcum sp.* usando celulase obtida a partir de *Trichoderma reesei*. Neste estudo foi obtido um teor de glicose de 64,2% a uma temperatura de 40 °C, pH 4,8, e uma concentração de substrato de 10 g/L de biomassa de microalgas (HARUN et al., 2011).

Estudo realizado por Choi et al. (2010) a biomassa da *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90 foi convertida em uma matéria-prima fermentável por duas enzimas hidrolíticas comerciais provenientes de microrganismos, a α -amilase termoestável proveniente da *B. licheniformis origin* e amiloglicosidade de origem da *Aspergillus niger* obtendo como resultado, 235 mg de etanol produzido a partir de 1,0 g de biomassa de algas a partir de hidrólise com posterior fermentação.

No estudo de Kima et al. (2014) foi realizado o cultivo da microalga *C. vulgaris* em condição de estresse para aumentar o teor de carboidratos, sendo que o cultivo foi realizado com limitação de nitrogênio ocorrendo aumento do teor de carboidratos de 16% para 22,4% em base seca. Foram efetuados métodos de pré-tratamento e as enzimas foram utilizadas para aumentar os rendimentos de sacarificação. A pectinase de *Aspergillus aculeatus* apresentou sacarificação 79% após 72 h a 50 °C. Usando fermentação contínua com levedura imobilizada, o hidrolisado de microalgas foi convertido em etanol, com um rendimento de 89%.

Como objetivo de identificar uma nova fonte de enzimas com melhor eficiência amilolítica na hidrólise de glicogênio cianobacteriano Lee et al. (2015) isolaram uma estirpe da espécie de *Trichoderma* J113 e determinaram que este fungo apresentou elevada atividade amilolítica, sendo composta por duas grandes amilases: Ayt40 e Ayt70, que foram determinadas como uma α -amilase e uma glucoamilase, respectivamente. O grupo de enzima amilolíticas aumentou a capacidade hidrolítica incluindo uma solução de manganês, obtendo como resultado uma conversão de 8,3 g/L de açúcar redutor com Mn^{2+} em comparação com apenas 5,1 g/L sem Mn^{2+} em 240 min de reação e uma amostra com concentração de 20g/L.

Lee et al. (2013) avaliaram enzimas comerciais de sacarificação quanto à sua capacidade de hidrolisar a biomassa residual de *Dunaliella tertiolecta* sendo a AMG 300L

(amiloglucosidase), Celluclast 1,5L (endocelulase), Novoprime B957 (endocelulase) e Viscozyme L (contém arabanase, celulase, beta-glucanase, hemicelulase) foram testados como o biocatalisador para sacarificação. Como resultados a sacarificação enzimática utilizando AMG 300L produziu 21,0 mg/mL de açúcar redutor com um rendimento de 42% (v/v) com base na biomassa residual em um pH 5,5 e 55 ° C.

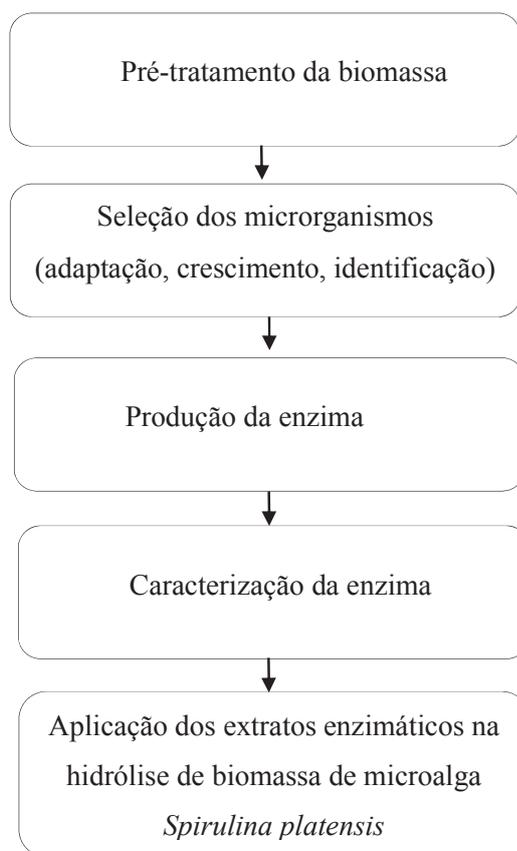
A hidrólise enzimática não possui uma similaridade entre as microalgas, tratamentos similares não atuam de maneira igualitária, conforme demonstrado em Hernandez et al. (2015). Neste foram estudadas *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus almeriensis* sendo submetidas a diversos pré-tratamentos. O tratamento enzimático foi realizado por enzimas comerciais para hidrólise de celulose (Celluclast 1,5 L e Novozyme) e hidrólise por amilase (Liquozyme SC DS e Spirizyme). Os autores utilizaram enzimas diferentes e conforme semelhanças nos polissacarídeos da composição na parede celular de *N. gaditana* e *S. almeriensis*, podendo ser celulose e hemicelulose e sendo que a parede celular da *C. sorokiniana* possui maior concentração de polissacarídeos facilmente degradáveis. Modificaram o tempo de incubação utilizados nos tratamentos enzimáticos sendo superiores aos especificados nos protocolos enzimáticos com finalidade de assegurar a conclusão do processo enzimático e a libertação da concentração máxima de açúcares.

Em seu estudo Hernández et al. (2015) avaliaram combinação de pré-tratamentos químico e enzimático para *Chlorella sorokiniana* e *Nannochloropsis Gaditana*. A combinação produziu 128 e 129 mg/g, respectivamente e na *Scenedesmus almeriensis* a maior concentração de monossacáridos (88 mg / g).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho visou à seleção de bactérias produtoras de amilases específicas para hidrólise dos carboidratos da *Spirulina platensis*, sendo o delineamento experimental apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Delineamento da pesquisa



Inicialmente foi realizado um estudo para avaliar o efeito dos pré-tratamentos físico e químico da biomassa da microalga *Spirulina platensis* sobre a liberação dos seus carboidratos. Em uma segunda etapa foram preparadas diversas colunas de Winogradsky com solo e água, incorporando como principal fonte de carbono para as bactérias a biomassa da microalga em diferentes situações, a fim de induzir os microrganismos presentes a produzirem enzimas específicas para a hidrólise dos carboidratos presentes. Os microrganismos foram isolados e avaliado o potencial dos mesmos para a produção de amilases. Na terceira etapa do trabalho as enzimas foram produzidas em maior escala, sendo então testadas quanto à estabilidade térmica

e ao pH, e os microrganismos que apresentaram maior potencial amilolítico foram identificados. Na última etapa foi avaliada a atividade enzimática sobre a biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

3.1 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Para avaliar o efeito do pré-tratamento físico e químico sobre a liberação dos carboidratos da microalga *Spirulina platensis* foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2² com pontos centrais.

A microalga *Spirulina platensis* foi cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo, oriunda de cultivo em tanques abertos.

3.1.1 Caracterização da biomassa da microalga *Spirulina platensis*

A biomassa da microalga *Spirulina platensis* utilizada no pré-tratamento para inoculação na coluna de Winogradsky e a biomassa utilizada nos testes de hidrólise foram caracterizadas quanto ao teor de carboidratos pelo método de Dubois et al. (1956), teor de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951), lipídios pelo método de Folsch et al. (1957), umidade de acordo com AOAC (2005) e cinzas através de carbonização das amostras em bico de Bunsen e colocadas em forno mufla a 550°C até obtenção de massa cinza branca.

3.1.2 Pré-tratamento ácido e alcalino

Os pré-tratamentos ácido e alcalino foram realizados utilizando uma suspensão de biomassa de 5 g/L, sendo preparado no meio ácido ou alcalino correspondendo aos ensaios das tabelas 2 e 3, a suspensão submetida a agitação de 200 rpm por 10 min e aquecida em estufa por um 30 min, com posterior resfriamento até temperatura ambiente e centrifugação 4000 rpm por 10 min.

A partir do sobrenadante da solução obtido no processo de centrifugação foi realizada a determinação de carboidratos pelo método de Dubois (1956). As Tabelas 1 e 2 apresentam as matrizes dos planejamentos experimentais reais e codificados utilizados, tendo como fatores de estudo a concentração de ácido e/ou base e a temperatura, sendo os níveis das variáveis baseados em pesquisa realizada por Harun et al. (2011).

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental estabelecido para avaliar o efeito do pré-tratamento ácido e da temperatura sobre a biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

Ensaio	Concentração de H ₂ SO ₄ (%) (x ₁)	Temperatura (°C) (x ₂)
1	2 (-1)	80 (-1)
2	6 (+1)	80 (-1)
3	2 (-1)	120 (+1)
4	6 (+1)	120 (+1)
5	4 (0)	100 (0)
6	4 (0)	100 (0)

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental estabelecido para avaliar o efeito do pré-tratamento alcalino e da temperatura sobre a biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

Ensaio	Concentração de NaOH (%) (x ₁)	Temperatura (°C) (x ₂)
1	4 (-1)	80 (-1)
2	12 (+1)	80 (-1)
3	4 (-1)	120 (+1)
4	12 (+1)	120 (+1)
5	8 (0)	100 (0)
6	8 (0)	100 (0)

3.2 ADAPTAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para a obtenção de bactérias produtoras de enzimas amilolíticas específicas para a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa de *Spirulina platensis* foram montadas colunas de Winogradsky.

O solo e a água foram coletados na área do Zoológico da Universidade de Passo Fundo, sendo os mesmos caracterizados em relação aos nutrientes presentes.

3.2.1 Caracterização físico-química do solo e da água

Após a coleta o solo foi submetido a secagem a 50°C por período de 48 h, peneirado e homogeneizado e caracterizado. A água ficou mantida sob refrigeração até o momento da montagem das colunas. O solo foi avaliado quanto ao pH, teor de fósforo, nitrogênio total e carbono orgânico presentes, técnicas descritas em Tedesco et al. (1995).

A água que foi coletada e refrigerada até análises de pH, teor nitrogênio total, matéria orgânica e fosforo (APHA,1991).

3.2.2 Montagem das colunas de Winogradsky

A coluna de Winogradsky é considerada um modelo de ecossistema microbiano que possui vantagens em ser utilizado como um sistema para estudar dinâmicas microbianas, interações e diversidade sendo, um ecossistema autossustentável, fechado, dependente apenas da entrada de luz como uma fonte de energia exógena que permite estudos de curto e longo prazo. Se preparadas a partir da mesma fonte de sedimento formam comunidades reprodutíveis, que podem ser mantidas e manipuladas em condições controladas com formação de gradientes por tempo e espaço proporcionando uma oportunidade para avaliar o desenvolvimento, a alteração e a resposta da comunidade microbiana às variáveis ambientais (ESTEBAN, 2015).

A construção das colunas de Winogradsky foi realizada em frascos herméticos de vidro com capacidade de 2 L, sendo que inicialmente foram colocados aproximadamente 300 g de solo seco na coluna, após foi adicionado cerca de 100 mL de água e estes homogeneizados, colocando-os na parte inferior do frasco formando uma mistura compactada. A seguir, em 500 g de solo seco adicionou-se a microalga submetida aos pré-tratamentos, equivalente a 1% de biomassa de *Spirulina platensis* em relação ao solo seco, sendo adicionada a biomassa e o sobrenadante do pré-tratamento, após colocou-se aproximadamente 125 mL de água.

De acordo com Madigan et al. (2016) as colunas podem ser suplementadas com um composto não habitual, quando se deseja testar a hipótese da existência naquele inóculo de um organismo ou organismos capazes de degradá-lo.

Posteriormente foram adicionados cerca de 500 mL de água para finalizar a montagem da coluna de Winogradsky, sendo fechadas com gaze e armazenadas sob iluminação natural e em temperatura ambiente.

Foram construídas 5 colunas distintas, sendo que a biomassa de *Spirulina platensis* que foi incorporada a cada uma foi proveniente das seguintes situações:

- a) Uma coluna com biomassa sem pré-tratamento;
- b) Uma coluna com biomassa pré-tratada que apresentou o maior grau de hidrólise no pré-tratamento ácido;
- c) Uma coluna com biomassa pré-tratada que apresentou o menor grau de hidrólise no pré-tratamento ácido;
- d) Uma coluna com biomassa pré-tratada que apresentou o maior grau de hidrólise no pré-tratamento alcalino;
- e) Uma coluna com biomassa pré-tratada que apresentou o menor grau de hidrólise no pré-tratamento alcalino.

O processo de verificação de crescimento de bactérias almeçadas foi efetuado aproximadamente 90 dias após a montagem das colunas de Winogradsky, sendo então realizado o isolamento dos microrganismos presentes nas colunas.

3.2.3 Isolamento dos microrganismos

Foram retirados dos frascos amostras com cerca de 1 mL na fase líquida, na fase aerada e na fase compactada da coluna, sendo estes diluídos em solução salina 0,85% até 10^{-4} . Das diluições seriadas foi inoculados 0,100 μ L inoculados em placas de Petri com meio específico sendo espalhadas com alças de Drigalsky.

O meio específico continha CaCl_2 0,05g/L, NH_4Cl 0,10 g/L, MgSO_4 0,05 g/L, K_2PO_4 0,40 g/L, ágar bacteriológico 15 g/L e solução de amido de 1% de conforme descrito por Jesus (2013). Posteriormente as placas de Petri foram incubadas a 37°C por período de 24 horas.

As colônias selecionadas foram isoladas pelo método de esgotamento por estrias, e incubadas a 37°C , por 48 horas. Após período de incubação, as colônias foram repicadas e isoladas em placas de petri e tubos de ensaio contendo o meio de crescimento para manutenção.

3.2.4 Seleção preliminar de bactérias com atividade amilolítica

As colônias bacterianas foram submetidas a teste de verificação de atividade amilolítica determinada através da formação de halo transparente em torno das colônias, com a adição de 2 mL de solução de lugol (I_2 0,5 g, KI 1,0 g e 300 mL de H_2O destilada) sobre a placa de Petri conforme descrito por Jesus (2013) e Tafarello (2004).

O meio utilizado continha amido (amilose e amilopectina), e o lugol em contato com amido reage, tornando azul onde há composição desta substâncias. Se a colônia inoculada for de caráter promissor na produção de enzimas amilolíticas, esta hidrolisa a amilose e a amilopectina, transformando-as em moléculas menores, sendo que essas moléculas não formam cor em contato com o lugol, ficando da cor de meio que foram inoculadas.

3.2.5 Identificação das bactérias

As cepas foram parcialmente caracterizadas pelo método de coloração de Gram, sendo verificado o aspecto das colônias e características morfológicas em microscopia ótica.

3.3 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS AMILOLÍTICAS

As bactérias que apresentaram o maior potencial de atividade amilolítica foram utilizadas para a produção de enzimas amilolíticas em meio líquido.

3.3.1 Produção da enzima

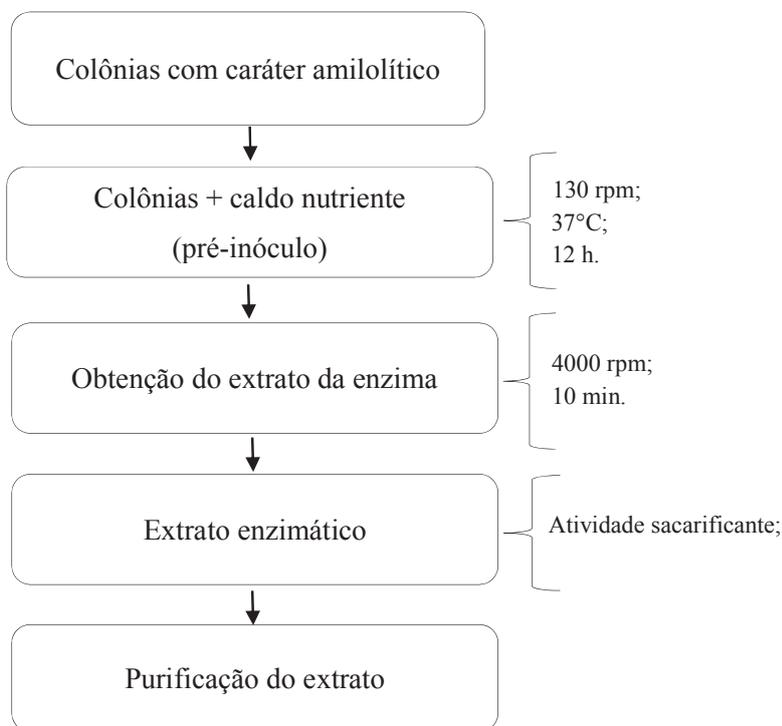
Os microrganismos selecionados foram inoculados em erlenmeyers contendo meio PC (peptona C, extrato de levedura e glicose como fonte de carboidratos), para melhor desenvolvimento das bactérias. A incubação foi realizada a 37^oC pelo período de 12 horas, com agitação de 130 rpm, sendo este cultivo denominado pré-inóculo.

O crescimento bacteriano no pré-inóculo foi determinado pela turbidez das suspensões bacterianas conforme escala na tabela de MacFarland (0,4 corresponde a absorbância 0,669 em comprimento de onda de 660 nm, proporcional a $1,2 \times 10^9$ UFC/mL) conforme Moubayed et al. (2016); Tehran- Mahjoubin et al.(2016).

Após o preparo do pré-inóculo este foi adicionado em erlenmeyers (10% v/v) com meio contendo peptona C, extrato de levedura e 2% de amido como fonte de carboidratos. O cultivo foi mantido por 48 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas para avaliação da produção de enzimas amilolíticas.

As amostras coletadas (4 mL) foram centrifugadas a 4000 rpm por período de 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade enzimática (Figura 5), Este foi designado como extrato bruto enzimático.

Figura 5 – Delineamento da produção de enzima



3.3.2 Purificação do extrato enzimático bruto

No extrato bruto obtidos dos cultivos, foi adicionado sulfato de amônio até 80% de saturação (que corresponde a 56,5g de sulfato de amônio a cada 100 mL de extrato bruto). O sulfato de amônio foi adicionado lentamente no extrato enzimático sob agitação e resfriamento, após a adição do sal a mistura foi condicionada em repouso *overnight* a 4°C. Após período de reação, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por período de 30 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em água destilada e a solução obtida utilizada para determinação da atividade enzimática. Este extrato foi designado como extrato purificado.

3.3.3 Determinação da atividade sacarificante

A determinação da atividade enzimática do extrato bruto e purificado foi efetuada pela produção de açúcares redutores, conforme Miller (1959).

De acordo com Rodrigues (2016), o método consiste em inocular 1 mL de extrato enzimático em 1 mL de solução de amido 1 % preparado em tampão fosfato 0,5 M e pH 7,0.

Esta mistura foi incubada por 30 min a 37°C. Após adicionou-se 2 mL de NaOH 1 mol/L e colocou-se em banho termostatzado a 100°C para estagnar a reação enzimática, e posterior banho de gelo. Foi retirado 1 mL desta solução e adicionado de 1 mL de reagente de DNS (ácido dinitrosalicílico) em um tubo de ensaio, seguido de banho termostatzado a 100°C por 5 min e posterior banho de gelo. A mistura foi avolumada até 10 mL e a leitura da absorbância será feita em 546 nm. Para determinação do branco (açúcares redutores iniciais) foi realizado adicionando 1 mL de solução tampão fosfato 0,5M e pH 7,0 sem a adição de amido e 1 mL extrato enzimático e submetido aos mesmos procedimentos descritos no método.

Os resultados de absorbância foram transformados em açúcares redutores através da uma curva padrão de glicose.

1 U unidade ou atividade enzimática foi definido como 1 mg de açúcar redutor por litro de meio por minuto nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada conforme a equação 1.

$$AA = \frac{[AR]}{V \times t} \quad (1)$$

Sendo:

AA: atividade amilolítica (U)

AR: açúcares redutores formados – açúcares redutores iniciais

V: volume de extrato enzimático utilizado (mL)

t: tempo de reação (min)

3.3.4 Determinação da atividade enzimática específica

A determinação da proteína foi realizada com o propósito de verificar a atividade específica (U/mg proteína) dos extratos enzimáticos sendo, que foi realizado nos extratos brutos e purificados. O método de determinação de proteínas por Kjeldahl (AOAC, 2005).

A atividade específica dos extratos enzimáticos foram calculados de acordo com a equação 2.

$$AE = \frac{[AA]}{[Proteína]} \quad (2)$$

Sendo:

AE = Atividade específica (U/mg proteína)

AA = Atividade amilolítica (U/mL extrato)

Proteína = Concentração de proteína no extrato enzimático (mg proteína/mL extrato)

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Os extratos enzimáticos, o extrato bruto e o extrato purificado foram submetidos a avaliação em FTIR - Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (equipamento FTIR Cary 630 da empresa Agilent Technologies) afim de verificar a presença de bandas representativas de proteínas e o extrato purificado submetido a avaliação UV/VIS – Espectrofotometria no Ultravioleta Visível para verificar picos de absorção significativas.

3.4.1 Avaliação dos extratos quanto à temperatura e ao pH

O extrato bruto enzimático foi avaliado quanto ao pH e estabilidade à temperatura, sendo estes parâmetros considerados fatores que influenciam na velocidade das reações enzimáticas.

A reação enzimática é realizada dentro de limites estreitos de pH, sendo que cada reação possui um pH ótimo no qual a enzima apresenta atividade máxima, valores extremos de pH desnaturam proteínas, inativando-as (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Os extratos brutos obtidos dos microrganismos com maior potencial de produção de enzimas amilolíticas foram submetidos a temperatura (90°C e 95°C) onde, foi fracionada uma quantidade de 5 mL de extrato bruto em tubos de ensaio e acondicionados a banho termostatizado com temperatura avaliada, a cada período estipulado retirava-se 1 mL deste extrato e adiciona-se em solução tampão pH 7 com 1% de amido, submetendo essa solução a 37°C por 30 minutos para averiguação da atividade enzimática, após período foi determinada a atividade sacarificante do extrato, as análises realizadas em triplicata.

Para determinação de pH ótimo de atuação dos extratos enzimáticos brutos, foi produzido soluções tampões com pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 e 8.0 e nestes adicionados o equivalente a 1% de amido. Acondicionou-se em tubos de ensaio 1 mL com solução tampão desejada e 1 mL do extrato enzimático bruto, homogeneizou-se e foram submetidos a 37°C por um período de 30 minutos para averiguação da atividade enzimática, após determinado a atividade sacarificante dos extratos sendo, realizados em triplicata.

A atividade enzimática foi avaliada de acordo com a quantidade de açúcares redutores que liberou após 30 minutos de ensaio enzimático.

3.5 AÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE A BIOMASSA DA MICROALGA *Spirulina platensis*

Para avaliação dos extratos enzimáticos sobre a biomassa da microalga, é necessário um pré-tratamento para romper a parede celular e disponibilizar os carboidratos a ação das enzimas.

O pré-tratamento da suspensão da microalga *Spirulina platensis* (7% m/v) em solução tampão, foi realizado por congelamento/descongelamento e posterior processo de gelatinização a temperatura de 100 °C, durante 10 min em banho termostatizado conforme estudo por Rempel (2018).

Estudos mais recentes divulgam que o pré-tratamento realizado com processo de congelamento e descongelamento é considerado eficiente. De acordo com Rempel (2018) o processo de congelamento/descongelamento é suficiente para alcançar altos níveis de ruptura celular na microalga *Spirulina platensis*. De acordo com Chang et al. (2011) os métodos que envolvem ciclos de congelamentos e descongelamentos são considerados métodos aceitáveis e com altas eficiências. O congelamento a temperaturas de -20 °C forma cristais de gelo, fazendo com que a água se expanda e ocasionando a quebra das paredes celulares, e liberação dos compostos intracelulares.

Após o processo de gelatinização resfriou-se a solução até temperatura estipulada e foi introduzido 10% (v/v) de extrato bruto e/ou extrato purificado para averiguação da atividade enzimática destes extratos. Esta mistura ficou sob temperatura específica e agitação em banho termostatizado (100 rpm) e a avaliação da atividade enzimática ocorreu em coleta no tempo 0 e 24 horas.

As soluções tampão analisadas foram em pH 7,0 e pH 5,5 sendo, que o pH 7 não possui cargas que podem interferir no comportamento da enzima, e o pH 5,5 foi definido conforme Nguyen et al. (2002); Wanderley et al. (2004) apud Rodrigues (2016).

No estudo realizado por Rodrigues (2016) a temperatura utilizada para a hidrólise da biomassa de microalgas foi de 50°C, e nas maiorias enzimas amilases comerciais como exemplo, AMG 300 e Liquozyme essa temperatura é considerada ótima de ação, conforme esses fatores foi estipulado 50°C como temperatura a ser averiguada.

Após a avaliação de temperatura nos extratos enzimáticos utilizando amido, determinou-se ao ensaio enzimático com *Spirulina platensis* a 60°C sendo, considerada uma temperatura mediana em relação ao comportamento do extrato em temperaturas elevadas.

3.5.1 Determinação da atividade sacarificante dos extratos sobre a microalga

A atividade enzimática dos extratos brutos e purificados provenientes da fermentação das cepas selecionadas foi através da determinação de açúcares redutores liberados, conforme Miller (1959).

O extrato após a hidrólise foi submetido a centrifugação por 10 min e retirado 1 mL de seu sobrenadante, neste é adicionado 0,4 mL de Carrez I e 0,4 mL de Carrez II, a mistura foi avolumada para 10 mL e filtrada 2 vezes. Retirou-se 1 mL do resultado da filtração e adicionou-se 1 mL de reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) e colocou-se em banho termostático a 100° por 5 min, realizou-se choque térmico com banho de gelo e após avoluma-se até 10 mL com água destilada e a leitura da absorbância foi feita em 546 nm, avaliando-se os resultados com uma curva padrão.

3.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância e posterior teste de comparação de médias de Tukey ao nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

4.1.1 Pré-tratamentos ácido e básico

A biomassa da microalga *Spirulina platensis* submetida ao pré-tratamento obteve reação diferenciada, no momento de acrescentar à solução ácida, instantaneamente alterou sua coloração ficando tom mais amarelo, sendo que permaneceu a coloração verde na biomassa submetida ao pré-tratamento alcalino. Essa reação pode ser avaliada como degradação da clorofila presente na microalga *Spirulina platensis*, onde Von Elbe (2000) apud Streit et al. (2005), relata que a decomposição das clorofilas é afetada pelo pH sendo que o pH alcalino (9,0) torna a clorofila mais estável ao calor, quando comparada ao pH ácido (3,0) pois os íons positivos minimizam a permeabilidade da membrana, que entra em equilíbrio com as cargas negativas diminuindo, dessa forma, a degradação das clorofilas.

Os ensaios ácidos e alcalinos foram realizados de acordo com um planejamento 2², no qual foi possível obter os seguintes resultados de extração de carboidratos apresentados Tabela 3.

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental e resultados obtidos no pré-tratamento ácido.

Ensaio	Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	Temperatura (°C)	Concentração de carboidratos (mg/g) *
1	2	80	134,47 ± 4,65 ^d
2	6	80	166,04 ± 5,70 ^c
3	2	120	191,00 ± 6,38 ^b
4	6	120	268,60 ± 7,33 ^a
5	4	100	192,12 ± 5,92 ^b
6	4	100	190,07 ± 6,92 ^b

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

A análise de variância com os dados adquiridos do pré-tratamento ácido está apresentada na Tabela 4.

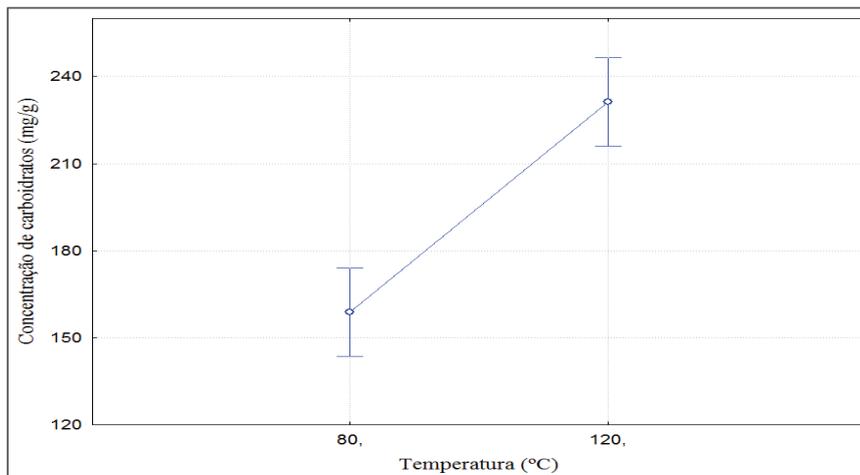
Tabela 4 - Análise de variância do pré-tratamento ácido.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Probabilidade $p < 5$
Concentração de ácido (%)	1668,72	1	1668,72	67,50	0,0145
Temperatura (°C)	5249,00	1	5249,00	212,32	0,0046
Relação ácido e temperatura	139,24	1	139,24	5,63	0,1410

Houve diferença significativa ($p < 0,005$) entre os pré-tratamentos sendo que, ambas variáveis (concentração do ácido e temperatura) influenciaram na extração de carboidratos.

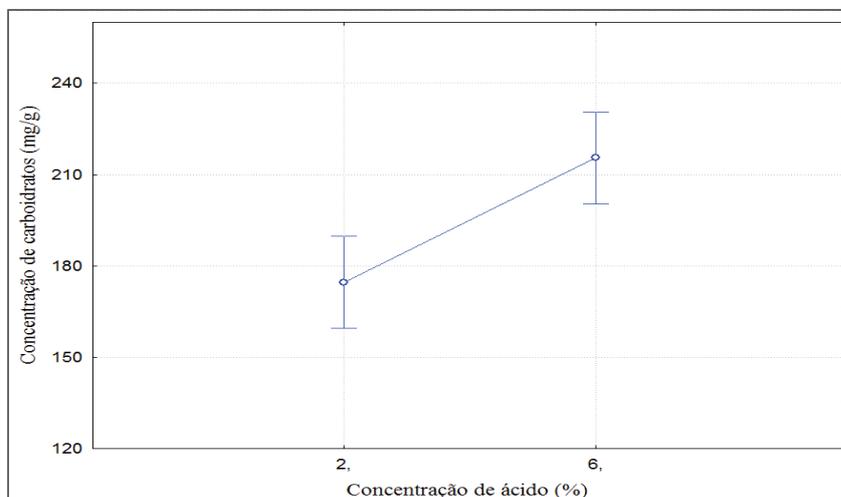
A temperatura foi mais relevante na disponibilização de carboidratos do que a concentração do ácido, havendo uma extração maior com a temperatura mais elevada, conforme observado na Figura 6.

Figura 6- Efeito da temperatura sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento ácido.



Em relação à concentração do ácido utilizado no pré-tratamento, obteve-se comportamento similar ao que ocorreu na temperatura. Quando a biomassa da microalga foi submetida às concentrações mais elevadas de ácido houve maior disponibilização de carboidratos. A Figura 7 demonstra a extração de carboidratos sob as diferentes concentrações de ácido.

Figura 7 - Efeito da concentração de ácido sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento ácido.



Hernandez et al. (2015) avaliaram o pré-tratamento químico em três microalgas diferentes, sendo elas a *C. sorokiniana*, *N. gaditana* e *S. almeriensis* com concentrações de 4, 7 e 10% de H_2SO_4 , por 30 min a $120^\circ C$, ocorrendo um concentração de carboidratos 84, 93 e 55 mg/g respectivamente, valores inferiores com o pré-tratamento ácido utilizado no ensaio com *Spirulina platensis* (134,47 a 257,59 mg/g), o que pode ser justificado pelo fato que o rompimento da parede celular varia de espécie, assim como a concentração de açúcares iniciais.

Os resultados do pré-tratamento alcalino estão apresentados na Tabela 5. A análise de variância está apresentada na Tabela 6.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial e resultados obtidos no pré-tratamento alcalino.

Ensaio	Concentração de NaOH (%)	Temperatura ($^\circ C$)	Concentração carboidrato (mg/g)*
1	4	80	$204,65 \pm 3,70$ ^{a,b}
2	12	80	$225,26 \pm 9,22$ ^a
3	4	120	$174,17 \pm 8,06$ ^{c,d}
4	12	120	$163,84 \pm 7,96$ ^d
5	8	100	$193,60 \pm 3,83$ ^{b,c}
6	8	100	$199,56 \pm 5,45$ ^{b,c}

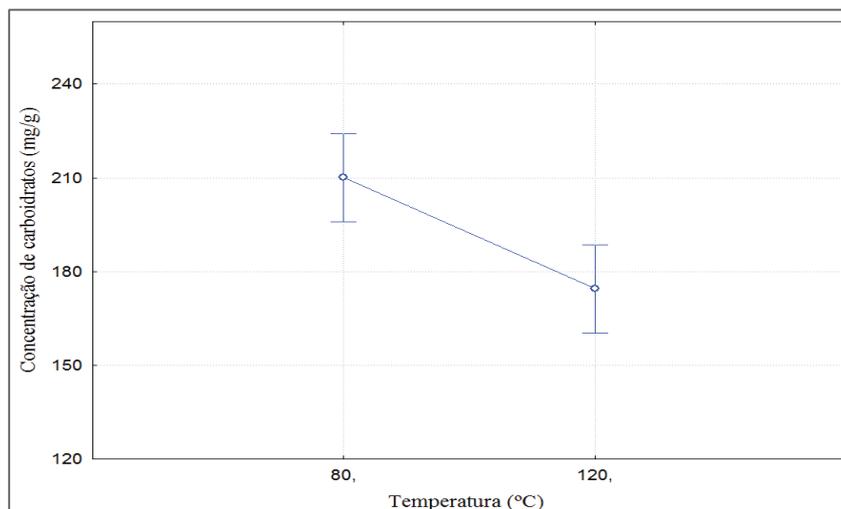
* resultados de médias \pm desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

Tabela 6 – Análise de variância do pré-tratamento alcalino.

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	Probabilidade $p < 5$
Concentração de base (%)	31,92	1	31,92	1,48	0,3471
Temperatura (°C)	1267,36	1	1267,36	58,98	0,0165
Relação base e temperatura	26,21	1	26,21	1,22	0,3845

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os ensaios em relação a concentração da solução alcalina, mas a variável temperatura influenciou na extração de carboidratos ($p < 0,05$) conforme Figura 8.

Figura 8 - Efeito da temperatura sobre a extração de carboidratos no pré-tratamento alcalino.



Harun et al. (2011) avaliaram o pré-tratamento na microalga *Chlorococcum infusionum*, com a finalidade de produção de bioetanol, realizando os pré-tratamentos durante 30, 45 e 60 min, e nas temperaturas de 80°C, 100°C e 120°C, semelhante ao utilizado nesse trabalho, e a concentração de 0,75% a 3% de solução alcalina. Os autores obtiveram 283,22 mg/g de açúcares redutores com 0,75% de solução alcalina a 80°C por 30 min e 350 mg/g a 120°C por 30 min com mesma concentração de solução alcalina sendo que, com 2% de solução alcalina a 80°C por 30 min resultou 186,06 mg/g de açúcares redutores e 163,00 mg/g de açúcares redutores a 120° por 30 min.

O pré-tratamento ácido proporcionou maior grau de extração de carboidratos, porém com à alta concentração e alta temperatura e o pré-tratamento alcalino obteve extração de carboidratos cerca de 15% menor que o pré-tratamento ácido.

A *Spirulina platensis* utilizada no pré-tratamento é a proveniente da pesquisa de Salla (2016) onde seu cultivo obteve alto teor de carboidratos e demais constituintes demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização físico-química da biomassa *Spirulina platensis*.

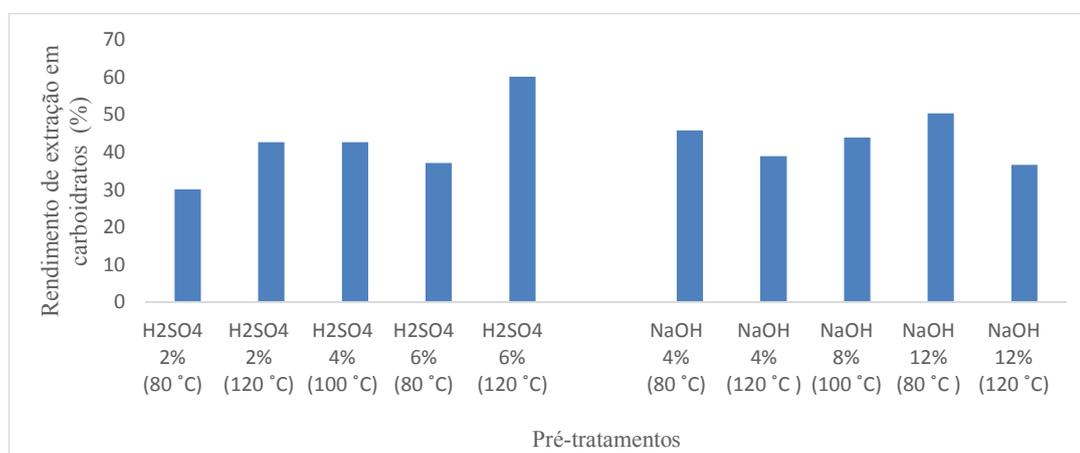
Microalga <i>Spirulina platensis</i> LEB 52	
Carboidratos (%)	44,60 ± 1,31
Lipídeos (%)	5,65 ± 0,28
Proteínas (%)	37,63 ± 1,06
Cinzas (%)	8,29 ± 0,24
Umidade (%)	8,57 ± 0,65

* resultados de médias ± desvio padrão

Fonte: Salla, 2016.

Comparando-se os pré-tratamentos na extração de carboidratos da microalga *Spirulina platensis* (Figura 9), obteve-se porcentagens aproximadas, destacando o pré-tratamento ácido com 60,22 % de extração em relação a quantidade total de carboidratos caracterizados e o pré-tratamento básico com 50,50 % de extração, sendo este cálculo realizado de acordo com o teor de carboidratos constituintes da composição da microalga *Spirulina platensis* de Salla (2016) e os valores adquiridos com o pré-tratamento.

Figura 9 - Rendimento de extração de carboidratos após pré-tratamentos.



A ruptura da parede celular é específica para cada espécie de microalga, como cada um tem uma parede particular que pode conferir mais ou menos a resistência ao estresse mecânico e químico.

Conforme Vonshak (1997) a microalga *Spirulina platensis* possui uma parede celular multicamadas com cerca de 40-60nm, e uma camada densa correspondente ao peptidoglicano.

Pesquisa realizada por Hoiczky et al. (2000) considera que apesar da estrutura global gram-negativa, a camada de peptidoglicano encontrada na cianobactéria é consideravelmente mais espessa do que a da maioria das bactérias gram-negativas, este descreveu que em estirpes unicelulares a espessura da parede celular como *Synechococcus* é cerca de 10 nm, em espécies filamentosos como *Phormidium uncinatum* atingindo 15 a 35 nm e mais do que 700 nm, em grandes cianobactérias como *princeps Oscillatoria*.

Conforme os resultados descritos anteriormente, foi definido o ensaio de maior extração e menor extração do pré-tratamento ácido e para o pré-tratamento básico foi definido o ensaio de segundo maior extração por estar estatisticamente igual ao de maior extração e utilizar a temperatura mais baixa fator de maior relevância no pré-tratamento básico e de menor extração.

4.2 ADAPTAÇÃO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O solo usado nas colunas de Winogradsky apresentou os seguintes resultados: pH $6,73 \pm 0,315$, carbono total $11,52\% \pm 0,3$, fósforo $4,80 \text{ mg} \pm 0,22$ e nitrogênio $0,084\% \pm 0,90$.

De acordo com Tedesco et al. (1995) o teor de fósforo é baixo, o pH possui neutralidade não necessitando correção, o nitrogênio apresenta baixa concentração e o teor de carbono é considerado alto. Estas avaliações condizem com o solo coletado, pois provém de área arbórea, sem devastação e teor orgânico alto.

Para que os nutrientes contidos no solo fiquem disponíveis para serem utilizados é necessário um pH mais próximo a neutralidade, não necessitando correção do mesmo. Para conseguir bactérias produtoras de amilases, de acordo com Jesus (2013), o substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio para o crescimento celular, sendo ambos nutrientes fornecidos pela *Spirulina platensis* conforme resultados na tabela 8

A água adquirida do lago do antigo zoológico da universidade apresentou pH $6,7 \pm 0,225$, fósforo e nitrogênio não significativos, e matéria orgânica de $2,97 \text{ mg/L} \pm 0,2$, considerada água com pouco teor orgânico.

A matéria orgânica diretamente nos remete a verificação de disponibilização de carbono para a microbiota existente no solo, ao acrescentar mais fonte de carbono através do pré-

tratamento da *Spirulina platensis* obtém um fonte diferencial de carbono existente disponível para microbiota nas colunas de Winogradsky.

4.2.1 Montagem das colunas de Winogradsky

A montagem das colunas de Winogradsky foi realizada com a implantação de três matérias-primas distintas, o solo, água e a biomassa da microalga *Spirulina platensis*.

Os pré-tratamentos ácidos (2% a 80°C e 6% a 120°C) da biomassa da *Spirulina platensis* apresentaram pH 0,47 e 0,01 respectivamente, sendo adicionado solução básica de mesma concentração do ensaio, até obtenção de pH neutro. Os pré-tratamentos alcalinos (4% a 80°C e 12% a 120°C) da biomassa da *Spirulina platensis* apresentaram pH 13,43 e 13,72 respectivamente, sendo adicionado solução ácida de mesma concentração do ensaio, até obtenção de pH neutro. Para acrescentar a microalga submetida ao pré-tratamento ácido e alcalino na coluna de Winogradsky, houve a necessidade de neutralizar o pH desta biomassa imersa em solução.

A formação de sal com a neutralização da solução proveniente do pré-tratamento com a biomassa da microalga pode alterar o desenvolvimento dos microrganismos que estão presentes no solo e na água, em Yan et al. (2015) estudos demonstraram que a salinidade reduz a atividade microbiana, a biomassa microbiana e altera a estrutura da comunidade microbiana, a redução da biomassa microbiana ocorre pelo efeito osmótico resultando em ressecamento e lise de células.

No decorrer da neutralização a biomassa ficou mais densa, formando pequenos flocos. Esta reação de floculação no momento da neutralização é, segundo Perez et al. (2017) é influenciado pelo valor de pH da suspensão de microalgas, sendo que aumento no pH pode causar a formação instantânea de flocos, com isso o fenômeno de floculação pode ser devido à neutralização de células de microalgas carregadas negativamente conforme à redução da repulsão eletrostática.

As colunas de Winogradsky foram montadas de acordo com a temperatura que foram submetidas os pré-tratamentos da microalga *Spirulina platensis*.

Na primeira semana após a montagem da coluna observou-se uma modificação na coloração interna, com escurecimento da água, sendo que a primeira coluna a apresentar tal característica foi a de tratamento ácido e após de tratamento básico. Este escurecimento perdurou pelos primeiros dias da montagem da coluna retornando as características iniciais. A Figura 11 apresenta o comportamento de uma das colunas de Winogradsky durante o período.

A coluna com a microalga sem processo de pré-tratamento permaneceu com as mesmas características em todo o período de crescimento bacteriano.

Figura 10 - Aspecto das colunas de Winogradsky com pré-tratamento.

(a) tempo: 0 dias ; (b) tempo: 10 dias; (c) tempo: 20 dias; (d) tempo: 60 dias; (e) tempo: 90 dias



As colunas de Winogradsky ficaram noventa dias para crescimento bacteriano, sendo avaliado o pH semanalmente observando que permaneceu próximo a neutralidade, onde a coluna com a microalga sem tratamento apresentou pH 6 e as colunas contendo os pré-tratamento em pH 7.

4.2.2 Isolamento dos microrganismos

Transcorrido o período de crescimento de microrganismos nas colunas de Winogradsky, foram selecionadas três regiões distintas para coleta de solo contidos em cada coluna. Devido

as colunas possuírem o mesmo tamanho, foi estipulado a mesma altura de coleta para todas as colunas.

Após a inoculação das diluições de cada amostra foi verificado crescimento bacteriano acentuado nas placas com as primeiras diluições. A terceira diluição apresentou quantidade de colônias ideal para isolamento sendo selecionadas três colônias distintas para isolamento das bactérias de cada coluna.

4.2.3 Seleção preliminar de bactérias com atividade amilolítica

Dos 45 microrganismos avaliados, apenas uma não possuiu caráter amilolítico, pertencendo ao ambiente central da coluna de Winogradsky com *Spirulina platensis* sem pré-tratamento (Apêndice B). As demais possuem caráter amilolítico, sendo visível a capacidade de cada bactéria em hidrolisar o amido que contém no meio pois, quanto maior a região sem coloração azul em torno da colônia, mais promissora é a bactéria.

Destes ensaios, foram selecionadas duas colônias de cada coluna com formação de halos maiores, para realizar o teste de coloração de Gram a forma auxiliando na identificação da bactéria, com intuito de submetê-las a crescimento para produção de enzima. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os resultados do teste de lugol nas colônias isoladas pré-selecionadas.

Figura 11 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes das colunas de Winogradsky adicionadas com *Spirulina platensis* submetidas a pré-tratamento ácido.

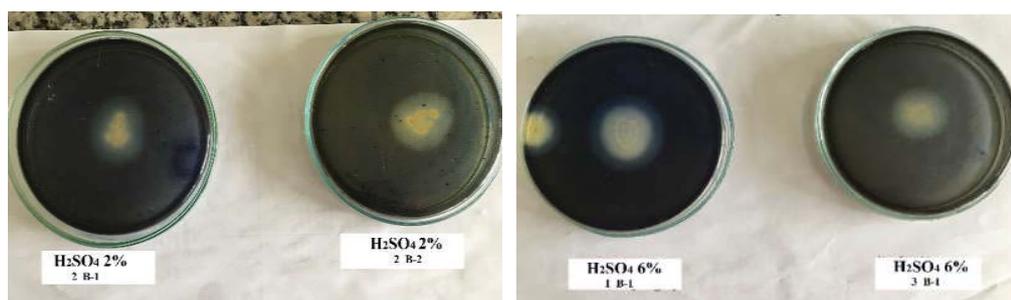


Figura 12 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes das colunas de Winogradsky adicionadas de microalga *Spirulina platensis* submetida a pré-tratamento básico.

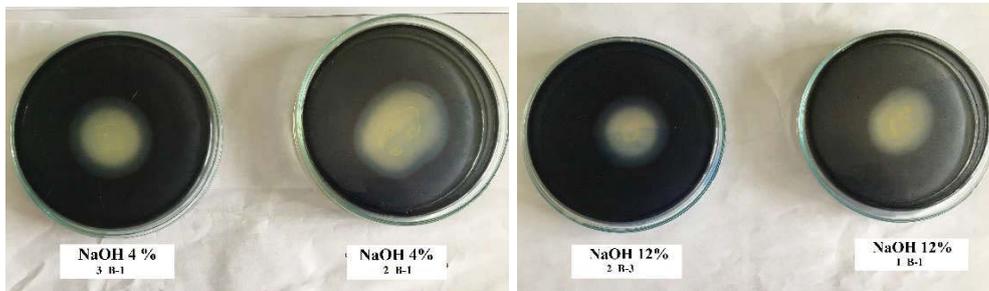


Figura 13 - Colônias isoladas submetidas ao teste de lugol provenientes da coluna de Winogradsky adicionados de *Spirulina platensis* sem pré-tratamento.



Todas as colunas demonstraram ser promissoras quanto à adaptação de microrganismos produtores de amilases, destacando-se as colunas com microalga *Spirulina platensis* submetidas a pré-tratamento alcalino, em ambas concentrações. Nestas é possível visualizar o potencial em produção de amilases, devido a formação de halos de diâmetros maiores que os demais. Confirmado nas medições dos halos formados descritos na tabela 8.

Tabela 8 – Diâmetro dos halos formados nas bactérias pré-selecionadas.

Microrganismo	Origem	Diâmetro (cm)
1	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com H ₂ SO ₄ 2%	1,5
2	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com H ₂ SO ₄ 2%	1,8
3	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com H ₂ SO ₄ 6%	2,3
4	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com H ₂ SO ₄ 6%	2,2
5	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com NaOH 4%	3,0
6	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com NaOH 4%	3,8
7	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com NaOH 12%	2,9
8	Coluna de Winogradsky com microalga pré-tratada com NaOH 12%	3,1
9	Coluna de Winogradsky com microalga sem pré-tratamento	3,1
10	Coluna de Winogradsky com microalga sem pré-tratamento	3,0

Nas colunas que continham a microalga exposta a pré-tratamentos ácidos, um dos microrganismos selecionados obteve característica promissora, embora menores que os halos obtidos nas colunas adicionadas de microalgas com pré-tratamento alcalino.

Na coluna preparada com a microalga sem nenhum processo de pré-tratamento foram obtidas respostas consideráveis quanto a capacidade amilolítica, sendo os resultados semelhantes as colunas que continham microalgas com pré-tratamento alcalino.

A Tabela 9 apresenta as classificações preliminares das 10 primeiras colônias selecionadas.

Tabela 9 – Classificações preliminares das bactérias pré-selecionadas.

Microrganismo	Classificação de Gram	Forma
1	Positivo	Cocos
2	Positivo	Cocos
3	Positivo	Bacilos
4	Positivo	Bacilos
5	Positivo	Bacilos
6	Positivo	Bacilos
7	Positivo	Bacilos
8	Negativo	Bacilos
9	Negativo	Bacilos
10	Negativo	Bacilos

De acordo com os resultados dos testes de coloração de Gram e morfológicos verificase um maior número de bactérias Gram positivas e forma de bacilos sendo evidente a coloração violeta na parede celular das bactérias pré-visualizadas.

A α -amilase pode ser produzida por diferentes espécies de microrganismos, mas as bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas para aplicações comerciais para processos industriais tais como nas indústrias de alimentos, fermentação, têxteis e papel.(SOUZA,2010)

4.3 PRODUÇÃO DA ENZIMA

4.3.1 Produção do extrato enzimático

O processo de fermentação foi realizado com as bactérias pré-selecionadas (Figuras 14, 15 e 16) por um período de 7 dias a 37°C e 130 rpm com intuito de avaliar a cinética de produção de enzimas.

O desempenho das suspensões bacterianas obtiveram características distintas, algumas obtiveram atividade enzimática em períodos maiores, outras obtiveram atividade enzimática mais baixa que as demais (Apêndice C) e algumas atingiram um nível de atividade enzimática e preservaram no decorrer do período.

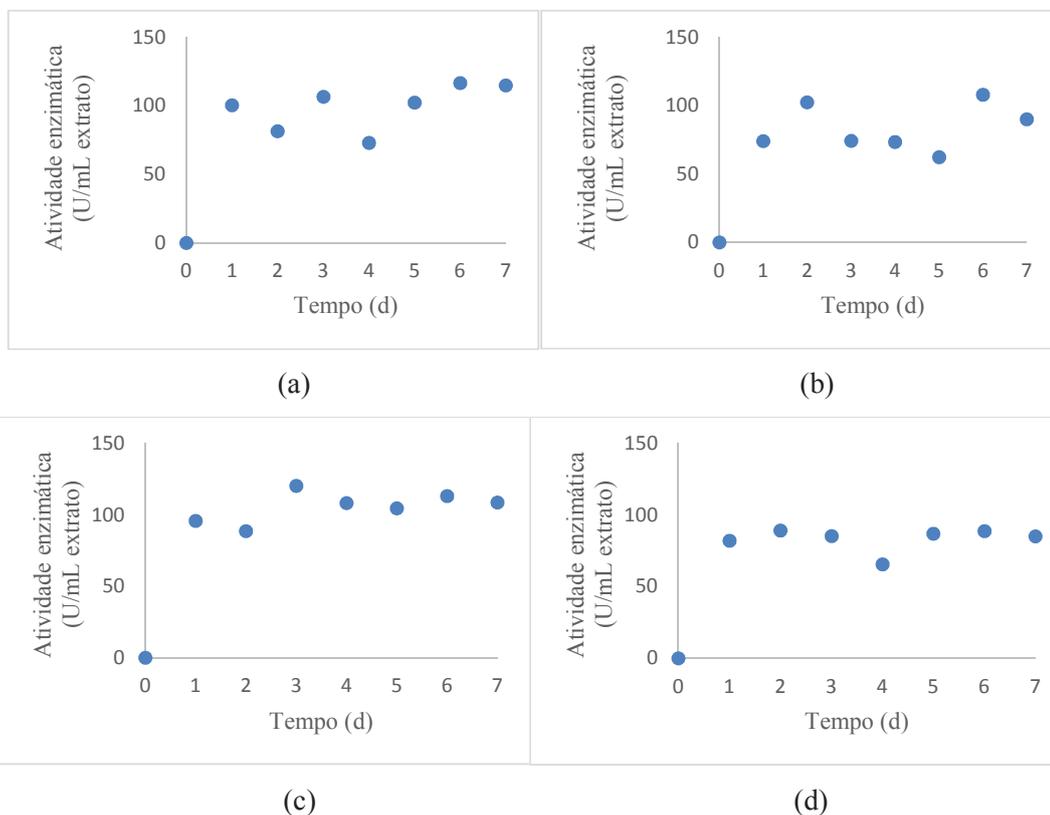
Deste ensaio foram selecionadas 4 suspensões bacterianas que obtiveram atividade significativa no período de 48 horas para produção do extrato enzimático (Figura 15).

No período de 48 horas os 4 microrganismos selecionados obtiveram atividade enzimática mais relevante que os demais, e mantiveram-se constantes durante todo o decorrer do período. Nos demais microrganismos verificados, alguns obtiveram atividade enzimática superior aos 4 selecionados porém, a atividade com mais destaque ocorreu em período maior que as demais inviabilizando a produção de extrato enzimático e, em outros casos a atividade enzimática ficou inferior em relação aos selecionados.

As bactérias que obtiveram uma atividade relevante no período de 48 horas, foram provenientes dos ensaios de origem das colunas de Winogradsky com pré-tratamento H₂SO₄ 6% 1-B1 (bactéria 3), NaOH 4% 3-B1(bactéria 5), NaOH 12% 2-B3 (bactéria 7) e Branco 2-B1(bactéria 9), sendo denominadas de extrato bruto 1, extrato bruto 2, extrato bruto 3 e extrato bruto 4 respectivamente.

Figura 14 - Atividade enzimática do crescimento dos microrganismos selecionados.

(a) microrganismo 3; (b) microrganismo 5; (c) microrganismo 7; (d) microrganismo 9



4.3.2 Purificação do extrato enzimático

Os extratos adquiridos pela fermentação foram submetidos a purificação com sulfato de amônio, sendo um processo de purificação baseado na solubilidade.

Para o processo de purificação o extrato bruto foi ressuspendido em duas quantidades de água, a primeira o equivalente a o mesmo volume que o extrato inicial e a segunda o equivalente a 10% do volume total. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade enzimática dos extratos.

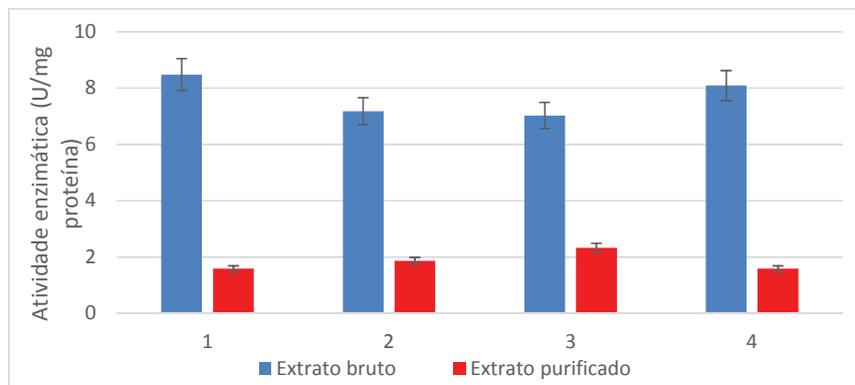
Extratos	Atividade do extrato bruto (U/mL)*	Atividade do extrato purificado (ressuspensão total) (U/mL)*	Atividade do extrato purificado (ressuspensão 10%) (U/mL)*
1	37,77 ± 3,21 ^a	19,72 ± 1,31 ^{a,b}	142,86 ± 2,37 ^a
2	33,23 ± 0,45 ^a	22,75 ± 1,63 ^a	106,71 ± 3,95 ^c
3	32,54 ± 3,01 ^a	20,53 ± 0,99 ^{a,b}	114,25 ± 0,59 ^b
4	39,56 ± 2,75 ^a	18,75 ± 1,46 ^b	116,55 ± 1,48 ^b

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Verificou que o extrato purificado ressuspensionado com apenas 10% de seu volume inicial triplicou a atividade enzimática concentrando o extrato ocorrendo o inverso o qual foi ressuspensionado no mesmo volume do extrato bruto diminui a atividade enzimática.

A atividade específica do extrato enzimático bruto e do extrato purificado ressuspensionado em água de mesma proporção que o volume inicial é apresentado Figura 16.

Figura 15 - Atividade específica dos extratos



Em estudo realizado por Rodrigues (2016) obtendo extratos enzimáticos provenientes de microrganismos, obteve em seu extrato bruto e extrato purificado com sulfato de amônio uma atividade enzimática específica de 7,52 U/mg_{proteína} e 7,93 U/mg_{proteína} respectivamente, sendo estudo proveniente de extrato enzimático da fermentação de fungos e com meio com nutrientes com mínima inserção de componentes proteicos.

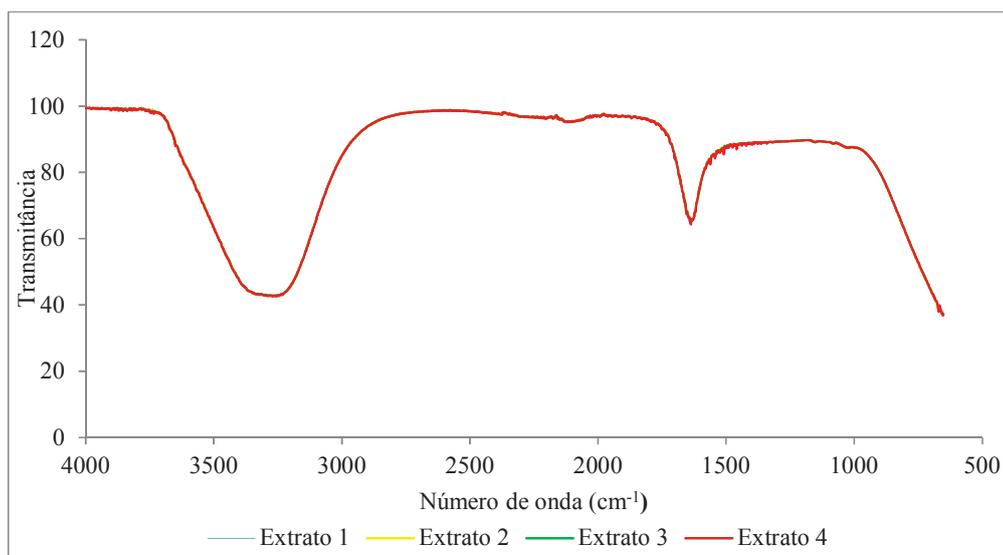
A avaliação da atividade enzimática específica dos extratos brutos 1, 2, 3 e 4 foram equivalentes a 8,48 U/mg_{proteína}, 7,18 U/mg_{proteína}, 7,03 U/mg_{proteína} e 8,09 U/mg_{proteína} respectivamente, sendo valores próximos ao estudo de Rodrigues (2016).

A atividade enzimática específica dos extratos purificados com sulfato de amônio 1, 2, 3 e 4 ressuspensos ao mesmo volume inicial foram equivalentes 1,58 U/mg_{proteína}, 1,86 U/mg_{proteína}, 2,32 U/mg_{proteína} e 1,42 U/mg_{proteína}, a concentração de proteínas neste extrato foi aproximadamente quatro vezes maior que no extrato bruto indicando que ocorreu precipitação das proteínas que continha o meio de fermentação devido o mesmo possuir componentes proteicos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Para avaliar a composição de substâncias orgânicas e verificação da presença de grupos componentes das enzimas, o extrato bruto foi submetido a análise FTIR (Figura 17).

Figura 16 - Espectro de infravermelho dos extratos brutos.



A análise de espectroscopia de infravermelho nos extratos brutos resultou similaridade entre os quatro extratos em sua composição confirmando que devido a produção dos extratos serem iguais, ou seja, mesmo meios para o pré-inóculo e fermentação, iguais rotações, pH dos meios e submissão de temperatura.

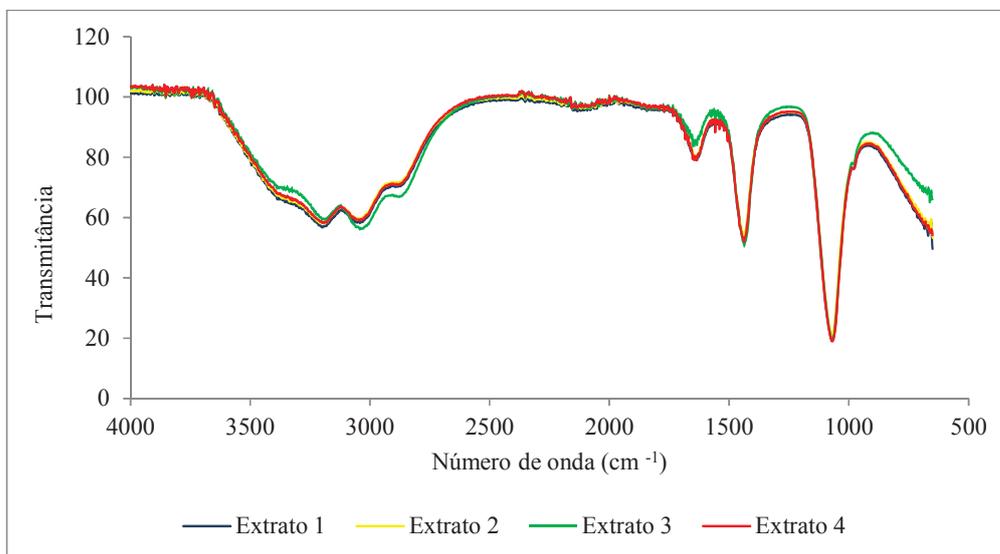
Neste espectro observam-se duas bandas que são a de faixa 3350 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹ medianas que corresponde a presença amidas primárias e secundárias, e uma banda estreita e curta na faixa de 1650 cm⁻¹ a 1550 cm⁻¹ que corresponde a amidas associadas, conforme Lopes (2004).

Verificando os extratos e a presença dos grupos orgânicos, em ambos há a presença de compostos nitrogenados.

O extrato bruto passou por um processo de purificação, sendo denominado extrato purificado, este também foi submetido à avaliação de composição orgânica para verificar o impacto desta purificação (Figura 17).

Com a avaliação dos extratos purificados, ocorreu que todos são considerados muito próximos em sua composição orgânica, porém é mais visível que o processo de purificação nestes alterou um pouco a detecção dos componentes, mas as bandas mais significativas permaneceram iguais.

Figura 17 - Espectro de infravermelho dos extratos purificados.



No extrato enzimático purificado, ocorreram bandas médias na faixa de absorção e intensidade em 3380 cm^{-1} a 2950 cm^{-1} que corresponde ao grupo de amins primárias e secundárias e íons de amônio associado a amidas (LOPES, 2004).

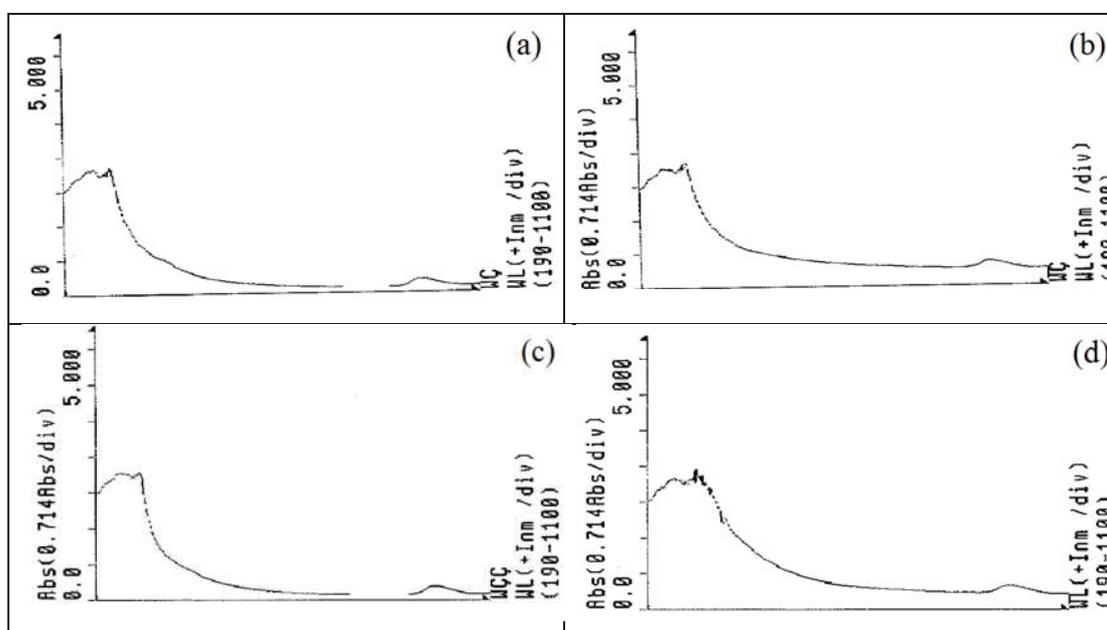
De acordo com Lopes (2004), as bandas na faixa de 1610 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} de bandas curtas corresponde amidas terciárias ou ligações (C=N), na banda 1430 cm^{-1} média apresenta compostos aromáticos e a banda mais expressiva na faixa de 1100 cm^{-1} a 1050 cm^{-1} indica a presença de ligação O-H sendo álcool, a presença destes compostos se deve a dissolução do extrato enzimático em água, ocorrendo a presença de outros componentes.

A adição de sulfato de amônio para precipitar a proteína ocasionou juntamente com a água alterações na composição orgânica do extrato purificado em relação ao extrato bruto sendo visível a exposição de mais bandas em relação ao extrato bruto.

O extrato purificado com sulfato de amônio foi submetido a espectrofotometria de varredura para verificação da absorção dos compostos em UV/VIS (Figura 19).

Figura 18 - Espectros de varredura dos extratos purificados com sulfato de amônio.

(a) extrato enzimático purificado 1; (b) extrato enzimático purificado 2; (c) extrato enzimático purificado 3; (d) extrato enzimático purificado;



A espectroscopia ultravioleta e visível (UV-VIS) fornece informações sobre grupos aromáticos e outros sistemas conjugados em compostos orgânicos, é usada para estudar as mudanças conformacionais nas proteínas, como estas mudam em condições diferenciais. Quando uma proteína sofre uma mudança conformacional (devido à ligação de um ligando, por exemplo), a alteração resultante em torno de um aminoácido aromático ou cromossomo de coenzima pode causar o efeito UV espectro da proteína a ser alterada (SODERBERG,2016).

As enzimas são proteínas que catalisam reações bioquímicas, e proteínas absorvem a luz na faixa UV devido à presença de aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina, todos os quais são cromóforos e muitas coenzimas também são UV-ativos. (SODERBERG, 2016)

Em ambos extratos, ocorreram poucas diferenças, sendo possível observar em todas um pico absorção na faixa entre 235 a 295 nm. Skoog (2007) demonstra características de absorção de alguns cromóforos sendo, para nitrato ($C_2H_5ONO_2$) cerca de 270 nm, compostos nitroderivados (CH_3NO_2) na faixa de 280 nm e grupo carbonilas entre 186 a 280 nm.

Essa semelhança entre nos extratos verificados nos ensaios de transições eletrônicas (UV-VIS) e transições vibracionais (FTIR) pode ser esclarecido por Salva (1990) apud Taffarello (2004) que descreveu que um microrganismo que sintetiza alfa-amilase em meio de cultura composto por glicose como única fonte de carbono, essa enzima é constitutiva para a linhagem, diferenciando-se de enzimas indutivas que são obtidas quando o microrganismo cresce em meio de cultura composto por carboidratos com ligações glicosídicas α -1,4. Em linhagens produtoras de alfa-amilase a presença destes compostos não impulsiona um crescimento padronizado das linhagens, e nem a segurança de produção da enzima

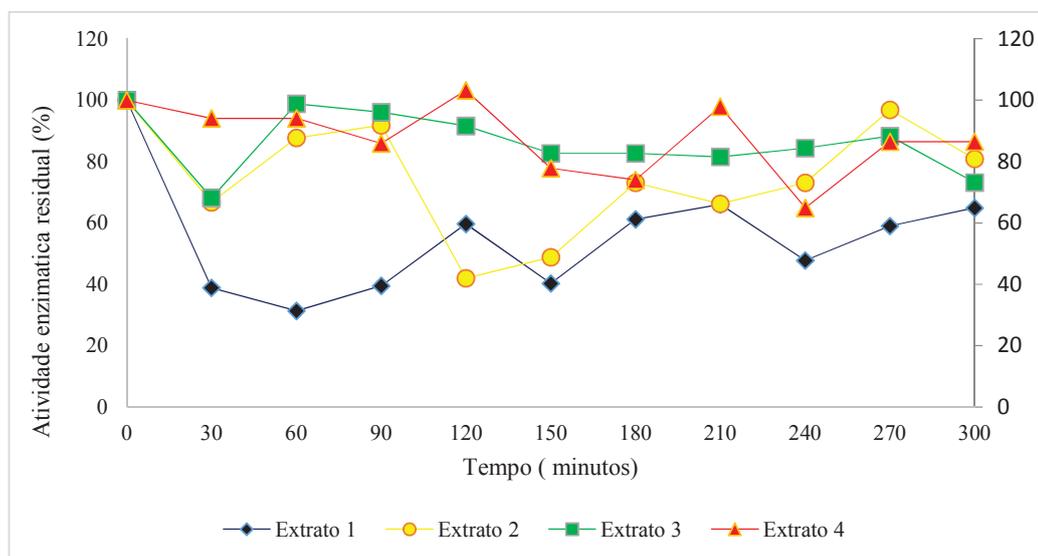
Um fator que ocorreu na semelhança entre os extratos brutos selecionados (1,2,3 e 4) pode provir do meio de cultivo que continha fonte de carbono variável, ocorrendo crescimento e atividade enzimática variável.

Fatores extrínsecos e intrínsecos propícios ao crescimento microbiano e a produção de enzimas amilolíticas são tão variáveis quanto ao número de microrganismos produtores desta enzima, não pode-se generalizar a determinação de temperatura, pH, atividade de água e disponibilidade de nutrientes, sendo que estes microrganismos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes. (TAFFARELLO, 2004).

4.4.1 Estabilidade em relação à temperatura

Os extratos brutos enzimáticos passaram por análise de atividade enzimática residual após serem submetidas $90^\circ C$ por um período de 5 horas, sendo retirados amostras por um período de 30 minutos, mantendo atividade residual durante o tempo estudado (Figura 20).

Figura 19 - Desempenho dos extratos brutos a 90°C



O extrato 1 demonstrou uma atividade residual abaixo dos demais extratos, porém ainda manteve sua atividade enzimática ficando cerca de 50% em relação ao início do processo.

Os extratos 1 e 2 promoveram comportamento semelhantes, porém mantiveram atuação no decorrer do período e, os extratos 3 e 4 mantiveram a sua atividade enzimática permanecendo acima de 65% em todo o percorrer do período.

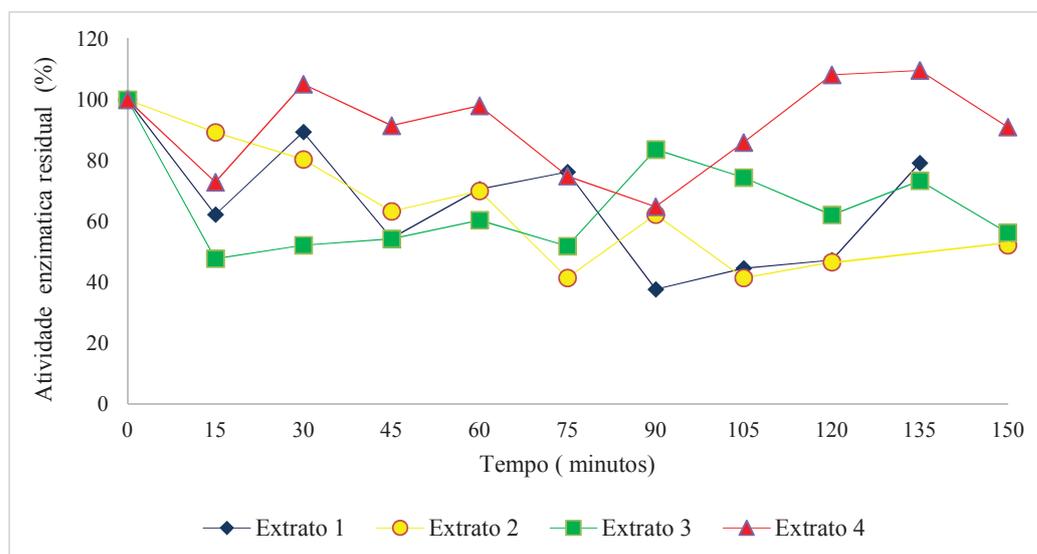
O efeito da temperatura é complexo e pode haver diversas causas, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada aumentando a formação de complexo enzimático, porém o aumento contínuo pode ocorrer uma inativação gradativa até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor. (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Em estudo realizado por Freitas (2014), o microrganismo avaliado apresentou temperatura ótima de 70 °C e a enzima mostrou mais de 90% de termoestabilidade até 55 °C, por 1 h, sendo um microrganismo de outra classe microbiológica, porém foi considerado sua capacidade termoestável.

Taffarello (2014) utilizou bactérias em seu experimento e a estabilidade do extrato bruto foi cerca de 100% a 50°C por período de 8 horas, a 60°C a enzima permaneceu ativa em 90% no período de 90 minutos, e em 70, 80 e 90°C a enzima manteve sua atividade porém acrescida de íons cálcio.

Os extratos foram submetidos a 95°C por período de 2 horas e 30 minutos para avaliar seu comportamento sob influência de temperatura próximo ao ponto de ebulição da água. (Figura 21).

Figura 20 - Desempenho dos extratos brutos a 95°C.



O extrato 4 obteve comportamento mais característico de termoestabilidade em ambas temperaturas, sendo que em alguns períodos de tempo obteve uma atividade enzimática maior que a atividade inicial adquirido no início do processo.

Uma forma de ativar a ação enzimática decorre de quanto maior a temperatura, mais fácil reação, pois ativa os compostos da reação e quanto maior o tempo do extrato estiver sob a temperatura perde-se a água e mais concentrado fica o substrato.

As amilases termoestáveis são produzidas por um pequeno número de organismos mesofílicos, sendo que a velocidade de uma reação enzimática mediada por uma enzima termofílica dobra, aproximadamente, a cada aumento de 10° C na temperatura, para considerar que a enzima é estável a elevadas temperaturas, a velocidade de reação pode ser aumentada grandemente ao se operar a uma temperatura relativamente elevada (CARVALHO, 2007), este fator pode esclarecer o comportamento dos extrato 4 que manteve sua atividade ao decorrer do tempo e demonstrando atividade superior ao inicial em algumas coletas.

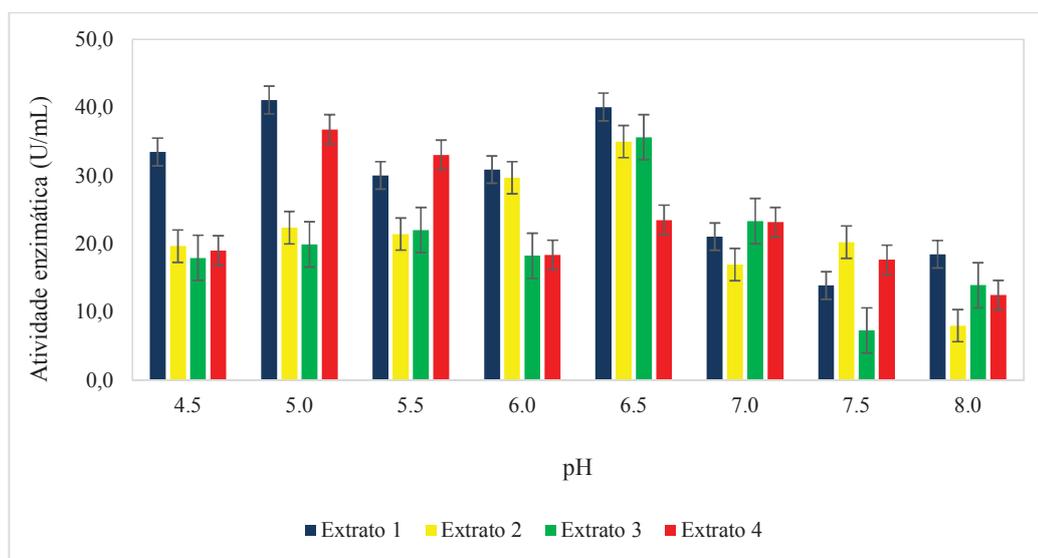
4.4.2 Avaliação da atividade enzimática em relação ao pH

Conforme Bobbio; Bobbio (2003) cada reação enzimática possui um pH ótimo, sendo que para a maioria das enzimas situa-se entre 4,0 e 8,0. A influência do pH na atividade enzimática ocorre sobre os grupos dissociáveis de aminoácidos sendo, alguns podem fazer parte do sítio ativo ou serem relevantes na manutenção da estrutura espacial das moléculas. A cada

valor de pH alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados e existe uma concentração hidrogênica que propicia determinado arranjo destes grupos, levando a enzima a melhor conformação para exercer desempenho catalítico. (BORZANI, 2001).

Os extratos brutos foram submetidos a pH na faixa de 4,5 a 8,0 com soluções tamponadas contendo 1% de amido com os respectivos pH's (Figura 22).

Figura 21 - Comportamento dos extratos brutos em diferentes condições de pH.



Fonte: Autor, 2017.

A verificação do pH demonstra rendimento mais eficiente em pH 5,0 em dois extratos (extrato 1 e 4) e rendimento eficiente em pH mais próximo a neutralidade (6,5) sendo estes três extratos avaliados com comportamento semelhantes e significativos.

O extrato enzimático 1 obteve maior atividade enzimática nos pH's 5,0 e 6,5, esta distinção de comportamento ao pH ocorreu em Freitas (2014) que caracterizou parcialmente alfa-amilase provenientes de *Syncephalastrum racemosum* que apresentou atividade ótima entre pH 4,0 e 5,5.

Estudo realizado por Souza et al.(2010) demonstra uma faixa ampla de pH na atividade enzimática o qual, pode-se observar que em grande parte enzimas amilases provenientes das bactérias possuem sua atividade ótima próxima ao pH neutro.

4.5 AÇÃO DOS EXTRATOS SOBRE A BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Os extratos brutos e extratos purificados demonstraram atividade enzimática no amido, demonstrando capacidade hidrolítica. Estes foram então submetidos a avaliação de sua capacidade na microalga *Spirulina platensis*.

Conforme Rempel (2018) para adquirir uma maior exposição dos carboidratos presentes na parede celular da microalga *Spirulina platensis* pode-se utilizar como pré-tratamento processo de congelamento/descongelamento da biomassa microalgal sendo que, utilizando este método adquiriu-se após o processo uma entre concentração de 0,81 g/L e 0,89 g/L de açúcares redutores.

Os extratos bruto e purificados foram avaliados em sua atuação na microalga *Spirulina platensis* inserida em solução tampão pH 5,5 sob agitação de 100 rpm a 50°C (Tabela 11).

Tabela 11 – Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 5,5.

Extratos	Açúcares redutores (g/L)*		
	0 h	24 h	48h
Extrato bruto 1	0,81 ± 0,01	1,29 ± 0,05 ^a	0,63 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 1	0,81 ± 0,01	0,66 ± 0,01 ^c	0,72 ± 0,01 ^a
Extrato bruto 2	0,81 ± 0,01	0,71 ± 0,08 ^{b,c}	0,60 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 2	0,81 ± 0,01	0,88 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,01 ^a
Extrato bruto 3	0,81 ± 0,01	1,34 ± 0,08 ^a	0,65 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 3	0,81 ± 0,01	0,63 ± 0,03 ^c	0,67 ± 0,01 ^{b,c}
Extrato bruto 4	0,81 ± 0,01	1,16 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,03 ^{a,b}
Extrato purificado 4	0,81 ± 0,01	0,61 ± 0,01 ^c	0,65 ± 0,03 ^c

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Neste ensaio o extrato bruto 1 e 3 obteve uma maior extração de açúcares redutores (1,3 g.L⁻¹) em 24 horas de hidrólise sendo que, este valor diminui em 48 horas, segundo Taherzadeh e Karimi (2007) apud Rodrigues (2016) este comportamento pode ser atribuído a contaminação ao longo do processo de hidrólise enzimática pois, o tempo de hidrólise é longo e a solução torna-se uma fonte disponível para microrganismos indesejados.

Em estudo realizado por Rodrigues (2016), em condições semelhantes (pH 5,5 e temperatura 50°C) porém, foi realizado com enzima livre proveniente de microrganismo que

foi purificada com microfiltração e enzima imobilizadas também de mesma origem o qual, obteve 1,87 g.L⁻¹ e 1,49 g.L⁻¹ respectivamente no período de 24 h e 2,71 g.L⁻¹ e 1,89 g.L⁻¹ respectivamente no período de 48 h.

O processo de purificação realizado neste estudo é mais eficiente da pesquisa do presente trabalho porém, a quantidade de biomassa de microalgas foi valores menores e consequentemente a menor disponibilidade de carboidratos.

Os extratos bruto e purificados foram avaliados em sua atuação na microalga *Spirulina platensis* inserida em solução tampão pH 7,0 sob agitação de 100 rpm a 60°C (Tabela 12).

Tabela 12 – Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 7,0.

Extratos	Açúcares redutores (g/L) *		
	0 h	24 h	48h
Extrato bruto 1	0,89 ± 0,01	1,44 ± 0,02 ^b	1,29 ± 0,02 ^b
Extrato purificado 1	0,89 ± 0,01	0,97 ± 0,01 ^d	0,94 ± 0,02 ^c
Extrato bruto 2	0,89 ± 0,01	1,46 ± 0,01 ^b	1,27 ± 0,06 ^b
Extrato purificado 2	0,89 ± 0,01	1,00 ± 0,01 ^d	0,83 ± 0,07 ^{c,d}
Extrato bruto 3	0,89 ± 0,01	1,31 ± 0,02 ^c	1,26 ± 0,02 ^b
Extrato purificado 3	0,89 ± 0,01	0,90 ± 0,02 ^e	0,85 ± 0,01 ^{c,d}
Extrato bruto 4	0,89 ± 0,01	1,67 ± 0,02 ^a	1,53 ± 0,04 ^a
Extrato purificado 4	0,89 ± 0,01	0,95 ± 0,01 ^{d,e}	0,80 ± 0,04 ^d

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

As respostas entre os extratos brutos e extratos purificados foram semelhantes na atividade enzimática, ocorrendo baixa atividade enzimática para a microalga porém, no ensaio com pH neutro ocorreu maior atividade, que complementa a caracterização do extrato bruto em amido quando verificado sua atuação em diferentes pH o qual um dos picos mais destacados ocorreu em pH 6,5.

Neste ensaio a quantidade de açúcares redutores se manteve constante no período de 48 h, nos extratos brutos e purificados inoculados destacando uma maior extração no período de 24 h no extrato bruto 4 de 1,7 g.L⁻¹ de açúcares redutores.

Os quatro extratos enzimáticos selecionados obtiveram ação sobre a microalga *Spirulina platensis*, sendo interessante uma purificação mais eficiente para aperfeiçoar a atuação das enzimas microbianas na sacarificação dos carboidratos presentes na microalga.

A possibilidade de utilizar os extratos enzimáticos microbianos é de interesse biotecnológico na produção de biocombustíveis provenientes de microalgas. Este tipo de produção no momento encontra-se em processo de estudos porém, é uma alternativa de produzir biocombustíveis de matéria-prima mais sustentável.

5 CONCLUSÃO

A busca de bactérias produtoras de amilases provenientes de um ambiente modificado propositalmente ocasionou um número significativo de microrganismos produtoras de enzimas amilases sendo estas, de caráter termoestável.

O pré-tratamento ácido (6% a 120°C) disponibilizou maior concentração de carboidratos liberando 268,60 mg/g ; o pré-tratamento alcalino (12% a 80°C) uma extração de 225,26 mg/g de carboidratos.

A partir das 5 colunas de Winogradsky utilizadas isolou-se 45 bactérias e dentre estas obteve-se 44 bactérias com características amilolíticas, destes 10 microrganismos foram selecionados para realizar o processo de fermentação para determinar sua atividade enzimática. Do processo de fermentação foram selecionadas 4 bactérias com atividade enzimática elevada no período de 48 horas.

A atividade enzimática dos extratos brutos selecionados foram mais expressivos em pH 5,5 e pH 6,5. Na realização de análise dos extratos em altas temperaturas, dois destes obtiveram atividade residual acima de 60% em todo o percurso do tempo.

A avaliação da sacarificação da microalga *Spirulina platensis* realizada com extrato bruto e extrato purificado no período de 48 horas obteve até 1,67g/L de açúcares redutores.

A obtenção de energia (biocombustível) proveniente de microalgas ainda necessita de aprimoramento tecnológico, em especial na etapa de sacarificação. As amilases produzidas foram termoestáveis e conseqüentemente de importância em aplicações que necessitem de maior atividade em temperaturas elevadas.

Como continuação deste trabalho sugere-se:

- a) Purificar os extratos enzimáticos com outros métodos;
- b) Caracterizar os microrganismos ;
- c) Avaliar a atividade enzimática sobre a biomassa da microalga em função do pH e temperatura.

REFERÊNCIAS

ABD-ELHALEM, B.T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R.F.; ABOU-TALEB, K.A. Produção de amilases de *Bacillus amyloliquefaciens* sob fermentação submersa utilizando alguns subprodutos agroindustriais. **Anais de Ciências Agrárias**, v. 60, ed.2, p.193-202, 2015.

AGUSTÍ, A.P. **Antioxidantes y enzimas**. Editora Masters. Madrid/Espanha, 2013.

ANDRADE, D.S.; COLOZZI FILHO, A.; **Potencialidade e desafios do cultivo. Microalgas de águas continentais**. Instituto Agronomico do Paraná – IAPAR, vol.1, Londrina/PR, 2014.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20^oEd. Washington, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; **Introdução a química de alimentos**. 3^oed. São Paulo: Livraria Varela, cap. 3, p. 133-134, 2003.

BORZANI, W; SCHMIDELL; W; LIMA, U.A; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, cap.5, p.195, 2001.

BRASIL, Ministério de Minas e Energia, BEN 2016: **Geração eólica cresce 77,1% e consumo de etanol 18,6% em 2015**. Disponível em <<http://www.epe.gov.br/Estudos/Paginas/Balan%C3%A7o%20Energ%C3%A9tico%20Nacional%20%E2%80%93%20BEN/EPEdisponibilizaoRelat%C3%B3rioS%C3%ADntesedoBalan%C3%A7oEnerg%C3%A9ticoNacional%E2%80%93BEN2016.aspx>> Acesso em outubro 2016.

BRASIL, Brasil, **Governo estabelece adição de 27% de etanol na gasolina**. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/adicao-de-27-de-etanol-na-gasolina-e-estabelecida-pelo-governo>> Acesso em junho 2017.

CARVALHO, R.V; CORREA, T.L.R; SILVA,J.C.M; VIANA,A.P; MARTINS, M.L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v 28,p. 380-386,2008.

CIFERRI, O.; Spirulina, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, p. 551-57, 1983.

CHANG, K; THITIKORN-AMORN, HSIEH, J; OU, B; CHEN, S; RATANAKHANOKCHAI, K; HUANG, P; CHEN, S. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 90-95, 2011.

CHEW , K.W.; YAP, J. Y.; SHOW, P.L.; SUAN, N.H.; JUAN, J.C.; LING, J. T.;LEE,D.J.; CHANG, J.S.; Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v.229 p. 53–62, 2017.

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

CHOI, S.P; NGUYEN, M.T.;SIM, S.J.Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.101, p 5330-5336,2010.

CHUN-YEN, C; XIN-QING, Z; HONG-HEI, Y.; SHIH-HSIN, H., CHIEH-LUN, C; DUU-JONG, L; FENG-WU, B; JO-SHU, C;. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v.78, p.1-10, 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.

ENSHASY, H.A. Bioprocess development for the production of α -amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in batch and Fed-batch cultures. **Research Journal of Microbiology**, v.2, p.560 -568, 2007.

ESTEBAN, D.J; HYSAB, B; BARTOW-MCKENNEY, C. Temporal and spatial distribution of the microbial community of Winogradsky columns. **PLoS ONE**, n.10, p.1-21, 2015.

FELLOWS, P.J.; **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2^oed. Porto Alegre: editora Artmed, 2006.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, p. 497-509, 1957.

FREITAS, L.S; MARTINS, E.S; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; HARAPRYA, M.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B.; Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** v.38, p.1599-1616, 2003.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K.; Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal** v.168 p. 1079-1084, 2011.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K.; Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry** v.46 p. 304-309, 2011.

HARUN, R.; JASON, W.S.Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M.K. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy** v. 88 p. 3464-3467, 2011.

HARUN, R; DANQUAHA, M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal** v.168 p.1079-1084, 2011.

HERNANDEZ,D.; RIANO,B.; COCA,M.; GÁRCIA-GONZÁLES,M.C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical,chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanolproduction. **Chemical Engineering Journal** v. 262 p. 939–945, 2015.

HOICZYK, E; HANSEL, A. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. **Journal of Bacteriology**. Vol.182, p.1191-1199,2000.

JESUS. J.G.R. **Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, 2013.

KIMA, K.H.; CHOIB, I.S.; KIMA-HO, M.; WIC, S.G.; BAE, Hyen-Jong. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource Technology** v.153, p.47-54, 2014.

LEE, Y.; OH, C.; HEO, Soo-Jin; KANG, Do-Hyung; SHIN, Won-Bo. Highly Potent Saccharification of *Arthrospira maxima* Glycogen by Fungal Amylolytic Enzyme from *Trichoderma* Species J113. **BioEnergy Research**, v. 8, p. 1868–1876, 2015.

LEE, O.K.; KIM, A.L.; SEONG, D.H.; LEE, C.G.; JUNG, I.T.; LEE, J.W.; LEE, E.Y.; Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v.132, p. 197-201, 2013.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W SCHMIDELL, W.; **Biotecnologia industrial**. Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, cap. 14, p. 355, 381-382, 2001.

LOPES,W.A; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substancias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n.4, p.670-673, 2004.

LOWRY, O.H.;ROSEBRUGH,N.J.;FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**,v.193 ,p.265-275,1951.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A.; **Microbiologia de Brock**.; 14^oed. p. 569-571. Porto Alegre:Artmed, 2016.

MAGRO, F.G; DECESSARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. Produção de Bioetanol utilizando microalgas: Uma Revisão. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 159-174, jan./jun. 2016

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKALIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Appl Microbiol Biotechnol** v.96, p. 631–645, 2012.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. **Energies** n. 6, p. 3937-3950, 2013.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Washington, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTEIRO, V.N; SILVA, R.N. Aplicações industriais na biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos - SENAI**, vol.5, p. 9-23, 2009.

MORAN,L.A.; HORTON, H.B.; SCRIMGEOUR,K.G; PERRY, M.D. **Bioquímica**. 5 ed Editora Person Education do Brasil., São Paulo-SP, 2013.

MOUBAYED,N.M.A.; HOURI, H.J.; KHULAIFI, M.M.A.;FARRAJ, D.AA.AA. Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). **Saudi Journal of biological Sciences**, v.24, p.162-169, 2017.

MUSSATO,S,I.; GRAGONE,G.; GUIMARAES,P,M,R.; SILVA, I,P,A.; CARNEIRO, L,M.; ROBERTO, I.; VICENTE, A.; DOMINGUES,S,L.; TEXEIRA,J,A. Technological trends, global Market, and challenges os bioethanol production. **Biotechnology advances**, v.28, p. 817 – 830,2010.

NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, J.-I.; SAKURAI, A.; INABA, Y.; SUZUKI, E.; SATOKO, N.; FUJIWARA, S.; TSUZUKI, M.; MIYASHITA, H.; IKEMOTO, H.; KAWACHI, M.; SEKIGUCHI, H.; KURANO, N. Some Cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type α -polyglucans instead of glycogen. **Plant Cell Physiol.** v.46, p. 539–545, 2005.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and characterization of amylolytic enzyme from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 345-352, 2002.

PAUL, J. S.; LALL, B. M.; JADHAV, S., K.; TIWARI, K., L. Otimização dos parâmetros e estudo cinético da enzima α -amilase de *Bacillus sp.* MB6 isolado a partir de resíduos vegetais. **Process Biochemistry**, v.52, p. 123-129, 2017.

PEREZ, L., SALGUEIRO, J.L., MACEIRA, R., CANCELA, A., SANCHEZ, A. An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. **Biomass and Bioenergy**, v. 97, p20–26, 2017.L

REMPEL, A. **Produção de bioetanol e biometano a partir da biomassa de *Spirulina sp.*** Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

RICHAMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia** vol. 512 ,p. 33–37, 2004.

RODRIGUES, E.F. **Produção e purificação de enzimas amilolítica para hidrólise enzimática de biomassa de *Spirulina*.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

SALLA, A.C.V. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em meio Zarrouk diluído e adicionado de resíduo de indústria láctea.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

SHEKHARAM, K.M.; VENKATARAMAN, L.V.; SALIMATH, P.V. Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga *Spirulina platensis*. **Phytochemistry** v.6 p. 2267-2269, 1987.

SHIMITZ, R.; MAGRO, C.D.; COLLA, LM.; Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4 (1), p. 48-60,2012.

SILVA, T.M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases *Aspergillus niveus***.(Tese Ciências, Área comparação: Biologia Comparada), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto/SP, 2009.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; CROUCH, S.R. **Principles of instrumental analysis**. 6 edition, Ed. Thomson Brooks. Belmont, CA – USA, 2007.

SODERBERG, T. Organic **Chemistry with a Biological Emphasis**. Chemistry Faculty. University of Minnesota Morris,vol.1, cap.4, p. 220-232. Minnesota,2016. Disponível em <http://digitalcommons.morris.umn.edu/chem_facpubs/1>, Acesso em jan.2018.

SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology** v.41, p.850-861, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -amilase e Amiloglucosidase por Fermentação em Estado Sólido**. 2005, 157p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

STREIT, N.V; CANTERLE, L.P; CANTO, M.W; HECKTHEUER, L.H.H. As clorofilas. **Ciência rural**, v. 35, p.748 – 755, 2005.

SUALI, E.; SARBATLY, R.; Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.16 p. 4316– 4342, 2012.

TAFARRELLO, L.A.B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade de Campinas, Campinas/SP, 2004.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed rev e ampl. - Porto Alegre: Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TEHRAN, M.M.; SHAHNAVAZ, B.; BIRJANDI, R.G.; MASHREGUI, M.; FOOLADI, J.; Optimization of protease production by psychrotrophic *rheinheimera sp.* With response surface methodology. **Applied Food Biotechnology**, v.4, p.235-245, 2016.

VAZ JR., S. **Biorrefinaria: cenários e perspectivas**. Embrapa Agroenergia.; Brasília/DF. 1^oed, p.176 , 2011.

WALKER, T.L.; PURTON, S.; BECKER, D.K. Microalgae as bioreactors. **Plant Cell Rep**, v. 24, p. 628-641, 2005.

WANDERLEY, J. K.; TORRES, G. A. F.; MORAES, P. M. L.; ULHOA, J. C. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 165-169, 2004.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology***. Editora Taylor & Francis e-Library, 1997.

YAN, N.; MARSCHNER, P.; CAO, W.; ZUO, C.; QIN, W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. **International Soil and Water Conservation Research**, v.3 p. 316–323,2015.

APÊNDICE A – Artigo Científico

Prospecção de bactérias produtoras de amilases para sacarificação de microalgas.

Santos, M.F; Reinehr, C.O

Resumo

Uma alternativa para produção de biocombustível de terceira geração é a utilização da biomassa de microalgas, sendo necessário um processo de fermentação e, para que ocorra é necessária a hidrólise dos carboidratos pertencentes à biomassa das microalgas o qual, o processo enzimático é considerado menos agressivo. Microrganismos são seres que estão em constante processo de adaptação e evolução, existe um vasto número destes seres que conseguem produzir de forma intracelular e/ou extracelular enzimas de importância biotecnológica sendo que, enzimas amilases são de interesse industrial pois este grupo é aplicado em diversos setores. Colunas de Winogradsky são ecossistemas fechados capazes de desenvolver vários tipos de bactérias, o desenvolvimento destes microrganismos é conforme a composição nutricional presente. Realizou-se a montagem de 5 colunas contendo solo, água e biomassa de microalga pré-tratada, após 90 dias retirou-se amostras de cada área da coluna e verificou-se os microrganismos destas amostras quanto a sua capacidade amilolítica, dentre 45 microrganismos isolados, 97% apresentaram características de produção de amilases, esta quantidade de bactérias chegou a 4 microrganismos produtores com atividade enzimática significativa em menor tempo de fermentação. Os extratos enzimáticos provenientes dos microrganismos selecionados foram purificados com sulfato de amônio e caracterizados por UV-VIS e FTIR resultando que são constituídos por moléculas de proteínas e apresentam composição orgânica semelhantes. Caracterizou-se que os extratos enzimáticos possuem caráter termoestável a temperatura de 90°C e melhor atividade em pH 5,5 e 6,5. A sacarificação em microalgas realizou-se em pH 5 e 7 sendo que, obteve 1,67g/L de açúcares redutores utilizando extrato enzimático bruto a pH 7. Os extratos adquiridos possuem potencial amilolítico tanto na biomassa de microalgas quanto em amido, tornando enzimas passíveis para usos distintos.

Palavras chaves: microrganismos, extrato enzimático, microalgas.

Abstract

An alternative for the production of third generation biofuels is the use of microalgae biomass. A fermentation process is necessary and hydrolysis of the carbohydrates belonging to the microalgae biomass is necessary. The enzymatic process is considered less aggressive. Microorganisms are beings that are in constant process of adaptation and evolution, there are a vast number of these beings that are able to produce intracellular and / or extracellular enzymes

of biotechnological importance being that, amylases enzymes are of industrial interest because this group is applied in several sectors . Winogradsky columns are closed ecosystems able to develop various types of bacteria, the development of these microorganisms is according to the nutritional composition present. The columns were prepared with soil, water and biomass of pre-treated microalgae, after 90 days samples were taken from each area of the column and the microorganisms of these samples were checked for their amylolytic capacity among 45 isolated microorganisms , 97% presented characteristics of amylases production, this amount of bacteria reached 4 producing microorganisms with significant enzymatic activity in the shortest fermentation time. The enzymatic extracts obtained from the selected microorganisms were purified with ammonium sulphate and characterized by UV-VIS and FTIR resulting that they are constituted by molecules of proteins and have similar organic composition. It was characterized that the enzymatic extracts have a thermostable character at 90°C and better activity at pH 5.5 and 6.5. The saccharification in microalgae was carried out at pH 5 and 7 and obtained 1.67 g / L of reducing sugars using crude enzyme extract at pH 7. The extracts acquired have amylolytic potential in both microalgae and starch biomass, making enzymes susceptible for different uses.

Key words: microorganisms, enzymes, microalgae.

1 Introdução

O consumo de energia para os processos industriais aumenta diariamente, sendo parte desta energia proveniente de resíduos fósseis. Em função disto há uma necessidade cada vez maior de investigar novas formas e fontes de energia a partir de matérias-primas alternativas. Uma fonte alternativa para a produção de bioetanol pode ser o uso da biomassa de microalgas, sendo este biocombustível então conhecido como biocombustível de terceira geração.

Microalgas são cianobactérias que convertem a luz solar, água e CO₂ em biomassa composta principalmente por carboidratos, proteínas e óleos e podem duplicar a sua biomassa em períodos curtos como 3,5 h apresentando taxas elevadas de crescimento em meios de cultura mais acessíveis (CHISTI, 2007).

O processo de produção de bioetanol através da biomassa de microalgas é realizado por fermentação e, para que a mesma ocorra é necessária a hidrólise dos carboidratos das microalgas, pois estes estão ligados à parede celular e é imprescindível a sua disponibilização para que se tornem carboidratos fermentescíveis para as leveduras. A hidrólise dos carboidratos das microalgas pode ser realizada de modo químico ou enzimático, sendo que o processo enzimático considerado um método que gera menos resíduos, este processo utiliza enzimas sacarificantes transformando polissacarídios em açúcares fermentescíveis, sendo que as enzimas são produzidas preferencialmente por microrganismos.

A diversidade de microrganismos contidos nos solos e nas águas é primordial para o ciclo sustentável dos ecossistemas, sendo elementares no processo de fragmentação, decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes. Nesta diversidade encontram-se microrganismos capazes de degradar diferentes tipos de polissacarídeos, através de enzimas amilolíticas.

Coluna de Winogradsky é um ecossistema microbiano que pode ser utilizado como um sistema para estudar dinâmicas microbianas, interações e diversidade. É um ecossistema autossustentável, fechado, dependente apenas da entrada de luz como uma fonte de energia exógena que permite estudos de curto e longo prazo. Quando preparadas a partir da mesma fonte de sedimento formam comunidades reprodutíveis, que podem ser mantidas e manipuladas em condições controladas com formação de gradientes por tempo e espaço proporcionando uma oportunidade para avaliar o desenvolvimento, a alteração e a resposta da comunidade microbiana às variáveis ambientais (ESTEBAN, 2015).

Como propósito se instiga a aquisição de um microrganismo que contenha potencial de hidrolisar os carboidratos da biomassa de microalgas de forma mais específica provenientes de um ecossistema fechado com nutrientes para estimular o desenvolvimento destes.

2 Material e Métodos

2.1 Adaptação e seleção dos microrganismos

Para montagem das colunas de Winogradsky foi caracterizado o solo conforme em Tedesco et al. (1995), a água por métodos descritos em APHA. (1991) e biomassa de microalga *Spirulina platensis* que foi pré-tratada por Dubois et al. (1956); Lowry et al. (1951); Folsch et al. (1957) e AOAC (2005). Os pré-tratamentos foram com reagentes ácidos e alcalinos e, para tais a biomassa seca foi colocada em água destilada contendo reagente formando uma concentração de 5 g/L.

As colunas foram realizadas em frascos herméticos de vidro com capacidade de aproximadamente 2 litros o qual, inicialmente foram colocados de solo e água formando uma mistura compactada, na segunda fase foi adicionada solo misturado com a microalga submetida ao pré-tratamento, equivalente a 1% de biomassa de *Spirulina platensis* e água suficiente para manter essa mistura aerada, e na terceira fase foi adicionado água, as colunas foram fechadas e armazenadas sob iluminação natural e em temperatura ambiente. Ao total foram montadas 5 colunas, 2 com microalga submetida ao pré-tratamento ácido, 2 com microalga submetida ao pré-tratamento alcalino e 1 com microalga sem pré-tratamento.

Após período de 90 dias para desenvolvimento da flora microbiana, foram retirados dos frascos amostras na fase líquida, na fase aerada e na fase compactada da coluna, diluídos em solução salina 0,85% até 10^{-4} , destas diluições inoculou-se em placas de Petri com meio contendo CaCl_2 0,05g/L, NH_4Cl 0,10 g/L, MgSO_4 0,05 g/L, K_2PO_4 0,40 g/L, ágar bacteriológico 15 g/L e solução de amido de 1% de conforme descrito por Jesus (2013). Conseqüentemente as placas de Petri foram incubadas a 37°C por período de 24 horas. As colônias bacterianas formadas foram submetidas a teste de verificação de atividade amilolítica determinada através da formação de halo transparente em torno das colônias, com a adição de 2 mL de solução de lugol (I_2 0,5 g, KI 1,0 g e 300 mL de H_2O destilada) sobre a placa de Petri conforme descrito por Jesus (2013) e Tafarello (2004).

Foi selecionado qualitativamente os microrganismos com formação de maiores halos envolto das colônias, sendo característicos de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas.

2.2 Produção da enzima

Os microrganismos selecionados foram inoculados em meio PC (peptona C, extrato de levedura e glicose como fonte de carboidratos), para desenvolvimento das bactérias. A incubação foi realizada a 37°C pelo período de 12 horas, com agitação de 130 rpm, este processo foi determinado como pré-inóculo. O número de bactérias presentes no pré-inóculo foi determinado pela turvação das suspensões bacterianas conforme escala na tabela de MacFarland, de acordo com essa escala estipulou 0,4 o que corresponde a 1.2×10^9 UFC/m. O processo de fermentação ocorreu por 48 horas a 130 RPM o qual adicionou-se 10% de pré-inoculo em meio contendo 2% amido, peptona C e extrato de carne.

A determinação da atividade enzimática do extrato foi efetuada pela produção de açúcares redutores, conforme Miller (1959).

2.3 Caracterização extrato enzimático

A atividade enzimática dos extratos brutos derivados dos microrganismos com maior potencial de exercerem atividade amilolítica submeteram-se a análise de temperatura e pH, após se determinava a atividade sacarificante do extrato, as análises realizadas em triplicata.

Nos extratos brutos foi realizado um processo de purificação com sulfato de amônio, sendo determinado extrato purificado, este foi analisado em UV/VIS – Espectrofotometria no Ultravioleta Visível e FTIR- Espectrofotometria de Infravermelho transformada de Fourier para

determinação das principais compostos presentes. O extrato bruto também realizou análise de FTIR para averiguar sua composição.

3 Resultados e Discussões

3.1 Adaptação e seleção dos microrganismos

O solo usado nas coluna de Winogradsky apresentou os seguintes resultados: pH $6,73 \pm 0,315$, carbono total $11,52\% \pm 0,3$, fósforo $4,80 \text{ mg} \pm 0,22$ e nitrogênio $0,084\% \pm 0,90$. A água apresentou pH $6,7 \pm 0,225$, fósforo e nitrogênio não significativos, e matéria orgânica de $2,97 \text{ mg/L} \pm 0,2$, considerada água com pouco teor orgânico. A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou $44,60 \pm 1,31$ % de carboidratos, $5,65 \pm 0,28$ de lipídeos, $37,63 \pm 1,06$ de proteínas e $8,29 \pm 0,24$ de cinzas.

Os pré-tratamentos químico ácido ocorreu há 2, 4 e 6% de concentração de ácido sulfúrico a temperaturas de 80, 100 e 120°C, sendo o pré-tratamento 6% de ácido a 120°C obteve-se resultado de $268,60 \text{ mg/g}$ de carboidratos disponíveis. Os pré-tratamentos químicos alcalinos foram realizados com 4,8 e 12% de concentração de hidróxido de sódio a temperaturas de 80, 100 e 120 °C obteve-se como resultado $225,26 \text{ mg/g}$ de carboidratos disponíveis.

O desenvolvimento da flora microbiana nas colunas de Winogradsky ocorreu por 90 dias, após foi isolado 9 microrganismos de cada coluna sendo que, dos 45 microrganismos avaliados, apenas um não possuiu caráter amilolítico. Destes foram selecionados 10 microrganismos qualitativamente que possuíram formação de halo transparente maior envolto das colônias para produzir extrato enzimático.

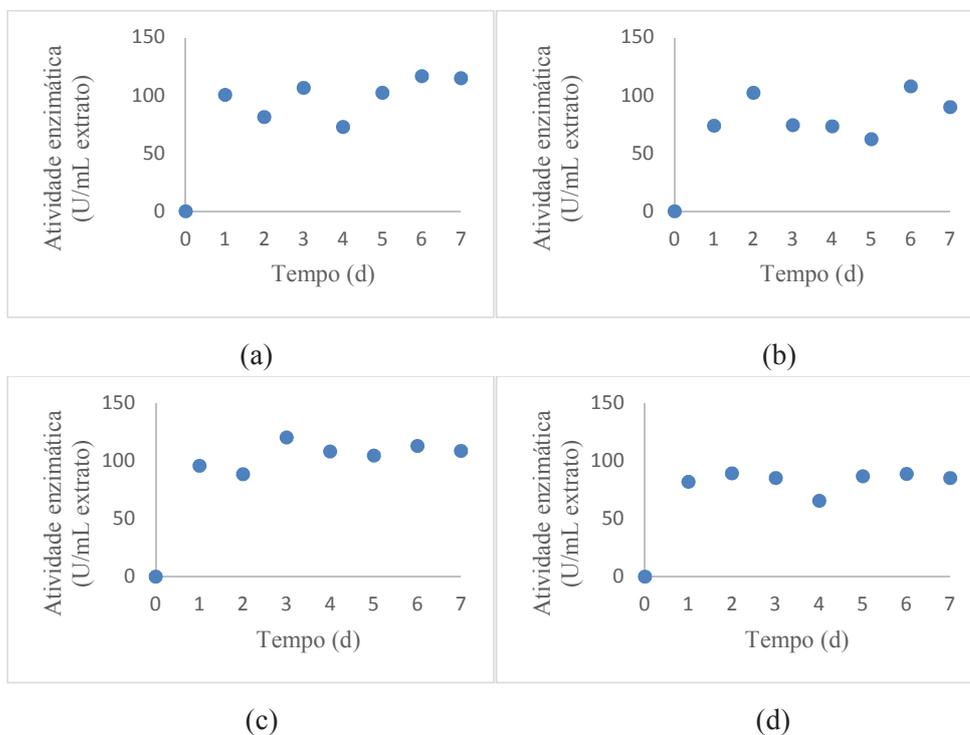
3.2 Produção do extrato enzimático

O processo de fermentação foi realizado com as bactérias pré-selecionadas por um período de 7 dias a 37°C e 130 rpm com intuito de avaliar a atividade enzimática destes no decorrer do tempo. O desempenho das suspensões bacterianas obtiveram características distintas, algumas obtiveram atividade enzimática em períodos maiores, outras obtiveram atividade enzimática mais baixa que as demais e algumas atingiram um nível de atividade enzimática e preservaram no decorrer do período.

Deste ensaio foram selecionadas 4 suspensões bacterianas que obtiveram atividade significativa no período de 48 horas para produção do extrato enzimático (Figura 1).

Figura 1 - Atividade enzimática do crescimento dos microrganismos selecionados.

(a) microrganismo 3; (b) microrganismo 5; (c) microrganismo 7; (d) microrganismo 9



Os quatro microrganismos selecionados foram submetidos a produção de extrato enzimático sendo denominados extrato brutos.

3.3 Caracterização do extrato enzimático

Os extratos brutos submeteram-se ao processo de purificação com sulfato de amônio, sendo estes ressuspensos em duas quantidades de água, a primeira o equivalente a o mesmo volume que o extrato inicial e a segunda o equivalente a 10% do volume total. Os resultados da atividade enzimática nos extratos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade enzimática dos extratos enzimáticos

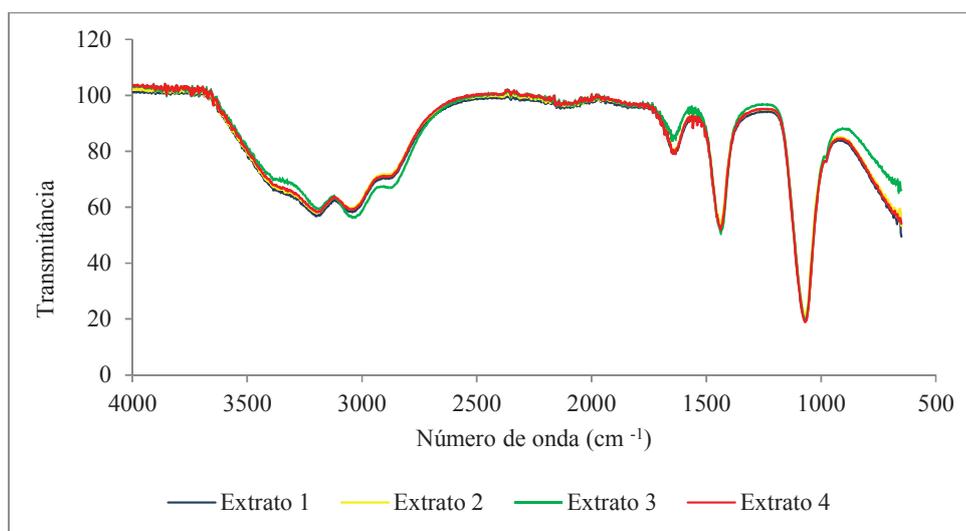
Extratos	Atividade do extrato bruto (U/mL)*	Atividade do extrato purificado (ressuspensão total) (U/mL)*	Atividade do extrato purificado (ressuspensão 10%) (U/mL)*
1	37,77 ± 3,21 ^a	19,72 ± 1,31 ^{a,b}	142,86 ± 2,37 ^a
2	33,23 ± 0,45 ^a	22,75 ± 1,63 ^a	106,71 ± 3,95 ^c
3	32,54 ± 3,01 ^a	20,53 ± 0,99 ^{a,b}	114,25 ± 0,59 ^b
4	39,56 ± 2,75 ^a	18,75 ± 1,46 ^b	116,55 ± 1,48 ^b

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Verificou que o extrato purificado ressuspensionado com apenas 10% de seu volume inicial triplicou a atividade enzimática concentrando o extrato ocorrendo o inverso o qual foi ressuspensionado no mesmo volume do extrato bruto diminui a atividade enzimática.

Os extratos purificados com sulfato de amônio foram avaliados em FTIR e UV/VIS, resultando que todos são considerados muito próximos em sua composição orgânica (Figura 2 e 3).

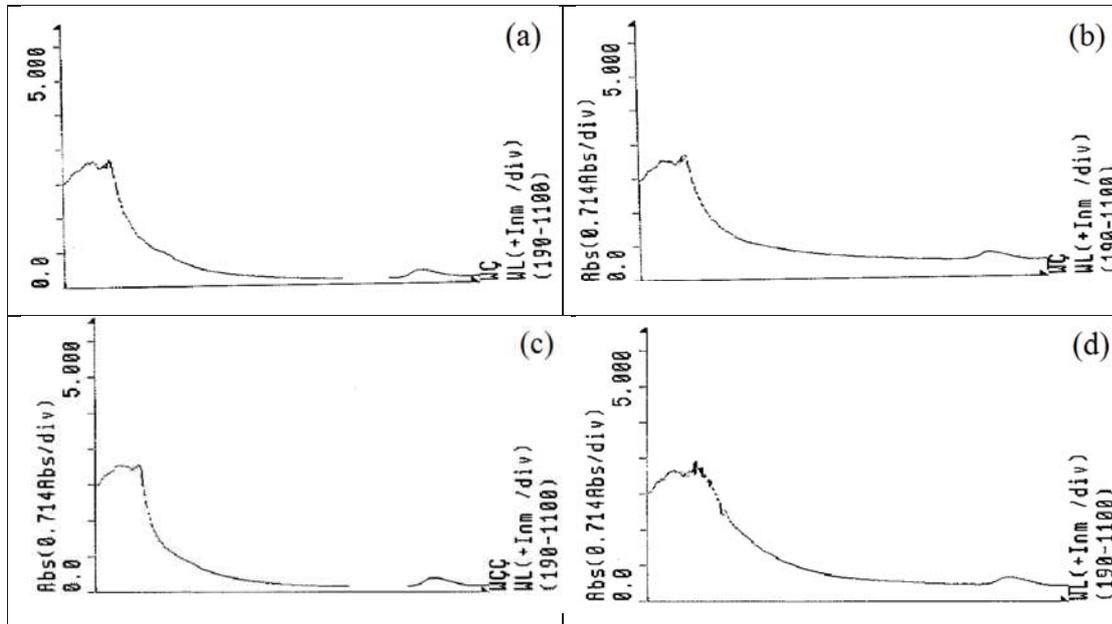
Figura 2 - Espectro de infravermelho dos extratos purificados.



No extrato enzimático purificado, ocorreram bandas médias na faixa de absorção e intensidade em 3380 cm^{-1} a 2950 cm^{-1} que corresponde ao grupo de amins primárias e secundárias e íons de amônio associado a amidas (LOPES, 2004).

De acordo com Lopes (2004), as bandas na faixa de 1610 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} de bandas curtas corresponde amidas terciárias ou ligações (C=N), na banda 1430 média apresenta compostos aromáticos e a banda mais expressiva na faixa de 1100 cm^{-1} a 1050 cm^{-1} indica a presença de ligação O-H sendo álcool, a presença destes compostos se deve-a dissolução do extrato enzimático em água, ocorrendo a presença de outros componentes.

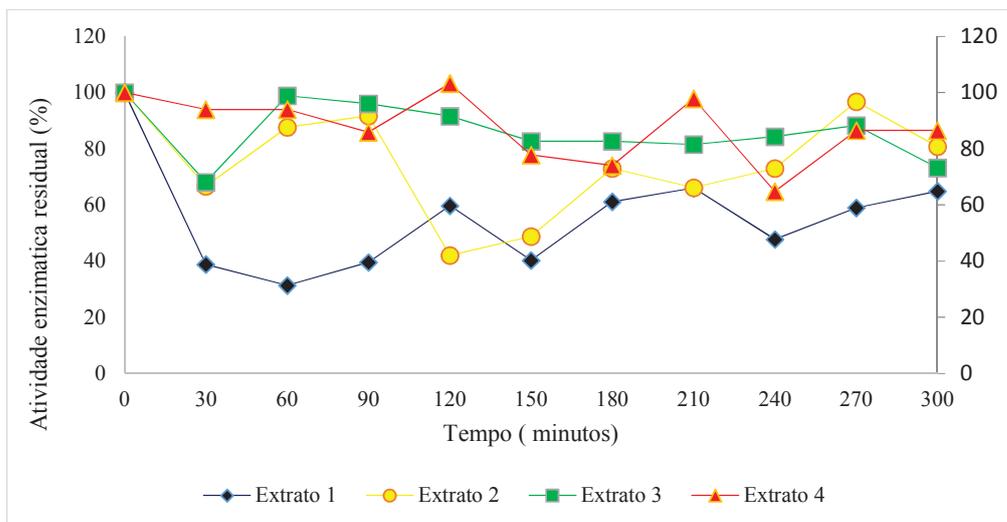
Figura 3 - Espectros de varredura dos extratos purificados com sulfato de amônio.
 (a) extrato enzimático purificado 1; (b) extrato enzimático purificado 2; (c) extrato enzimático purificado 3; (d) extrato enzimático purificado;



Em ambos extratos, ocorreram poucas diferenças significantes, sendo possível observar em todas um pico absorção na faixa entre 235 a 295 nm. Skoog (2007) demonstra características de absorção de alguns cromóforos sendo, para nitrato ($C_2H_5ONO_2$) cerca de 270 nm, compostos nitroderivados (CH_3NO_2) na faixa de 280 nm e grupo carbonilas entre 186 a 280 nm.

Os extratos brutos foram submetidos a $90^\circ C$ por período de 5 horas para avaliar seu comportamento sob influência de temperatura alta. (Figura 4).

Figura 4 - Desempenho dos extratos brutos a $90^\circ C$.



O extrato 1 demonstrou uma atividade residual abaixo dos demais extratos, porém ainda manteve sua atividade enzimática ficando cerca de 50% em relação ao início do processo.

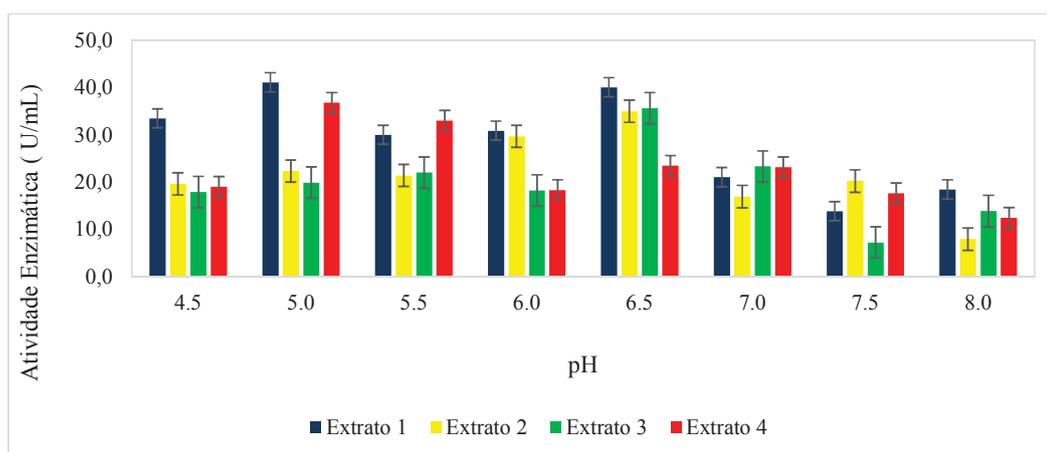
Os extratos 1 e 2 promoveram comportamento semelhantes, porém mantiveram atuação no decorrer do período e, os extratos 3 e 4 mantiveram a sua atividade enzimática permanecendo acima de 65% em todo o percorrer do período.

O efeito da temperatura é complexo e pode haver diversas causas, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada aumentando a formação de complexo enzimático, porém o aumento contínuo pode ocorrer uma inativação gradativa até inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor. (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

As amilases termoestáveis são produzidas por um pequeno número de organismos mesofílicos, sendo que a velocidade de uma reação enzimática mediada por uma enzima termofílica dobra, aproximadamente, a cada aumento de 10° C na temperatura, para considerar que a enzima é estável a elevadas temperaturas, a velocidade de reação pode ser aumentada grandemente ao se operar a uma temperatura relativamente elevada (CARVALHO, 2007), este fator pode esclarecer o comportamento dos extrato 4 que manteve sua atividade ao decorrer do tempo e demonstrando atividade superior ao inicial em algumas coletas.

Os extratos brutos foram submetidos a pH na faixa de 4,5 a 8,0 com soluções tamponadas contendo 1% de amido com os respectivos pH , conforme Figura 5.

Figura 5 - Comportamentos extratos brutos em diferentes condições de pH



A verificação do pH demonstra rendimento mais eficiente em pH 5,0 em dois extratos (extrato 1 e 4) e rendimento eficiente em pH mais próximo a neutralidade (6,5) sendo estes três extratos avaliados com comportamento semelhantes e significativos.

3.4 Ação dos extratos sobre a biomassa de microalgas

Os extratos brutos e extratos purificados demonstraram atividade enzimática no amido, demonstrando capacidade hidrolítica. Estes foram então submetidos a avaliação de sua capacidade na microalga *Spirulina platensis*.

Os extratos bruto e purificados foram avaliados em sua atuação na microalga *Spirulina platensis* inserida em solução tampão pH 5,5 sob agitação de 100 rpm a 50°C (Tabela 2).

Tabela 2 - Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 5,5

Extratos	Açúcares redutores (g/L)*		
	0 h	24 h	48h
Extrato bruto 1	0,81 ± 0,01	1,29 ± 0,05 ^a	0,63 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 1	0,81 ± 0,01	0,66 ± 0,01 ^c	0,72 ± 0,01 ^a
Extrato bruto 2	0,81 ± 0,01	0,71 ± 0,08 ^{b,c}	0,60 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 2	0,81 ± 0,01	0,88 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,01 ^a
Extrato bruto 3	0,81 ± 0,01	1,34 ± 0,08 ^a	0,65 ± 0,01 ^c
Extrato purificado 3	0,81 ± 0,01	0,63 ± 0,03 ^c	0,67 ± 0,01 ^{b,c}
Extrato bruto 4	0,81 ± 0,01	1,16 ± 0,03 ^a	0,72 ± 0,03 ^{a,b}
Extrato purificado 4	0,81 ± 0,01	0,61 ± 0,01 ^c	0,65 ± 0,03 ^c

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Neste ensaio o extrato bruto 1 e 3 obteve uma maior extração de açúcares redutores (1,3 g.L⁻¹) em 24 horas de hidrólise sendo que, este valor diminui em 48 horas, segundo Taherzadeh e Karimi (2007) apud Rodrigues (2016) este comportamento pode ser atribuído a contaminação ao longo do processo de hidrólise enzimática pois, o tempo de hidrólise é longo e a solução torna-se uma fonte disponível para microrganismos indesejados.

Os extratos bruto e purificados foram avaliados em sua atuação na microalga *Spirulina platensis* inserida em solução tampão pH 7,0 sob agitação de 100 rpm a 60°C (Tabela 3).

Tabela 3- Sacarificação da microalga com extratos em solução tampão pH 7,0.

Extratos	Açúcares redutores (g/L) *		
	0 h	24 h	48h
Extrato bruto 1	0,89 ± 0,01	1,44 ± 0,02 ^b	1,29 ± 0,02 ^b
Extrato purificado 1	0,89 ± 0,01	0,97 ± 0,01 ^d	0,94 ± 0,02 ^c
Extrato bruto 2	0,89 ± 0,01	1,46 ± 0,01 ^b	1,27 ± 0,06 ^b
Extrato purificado 2	0,89 ± 0,01	1,00 ± 0,01 ^d	0,83 ± 0,07 ^{c,d}
Extrato bruto 3	0,89 ± 0,01	1,31 ± 0,02 ^c	1,26 ± 0,02 ^b
Extrato purificado 3	0,89 ± 0,01	0,90 ± 0,02 ^e	0,85 ± 0,01 ^{c,d}
Extrato bruto 4	0,89 ± 0,01	1,67 ± 0,02 ^a	1,53 ± 0,04 ^a
Extrato purificado 4	0,89 ± 0,01	0,95 ± 0,01 ^{d,e}	0,80 ± 0,04 ^d

* resultados de médias ± desvio padrão. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Neste ensaio a quantidade de açúcares redutores se manteve constante no período de 48 h, nos extratos brutos e purificados inoculados destacando uma maior extração no período de 24 h no extrato bruto 4 de 1,67 g.L⁻¹ de açúcares redutores.

Conclusão

Amilases com caráter termofílico são de grande interesse no mercado biotecnológico, dentre 45 microrganismos isolados, adquirir 44 com caráter amiloilítico demonstra que o meio em que se desenvolveram influenciou, sendo o carboidrato presente no solo, água e mais da microalga pré-tratada. As enzimas provenientes das bactérias obtiveram atuação em temperaturas elevadas e desenvolvimento em pH 5,5 e 6,5 próximo a neutralidade. A atividade enzimática em microalgas abaixo que em amido, porém deve-se melhorar a purificação dos extratos para obter resultados mais relevantes.

Referências

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20^oEd. Washington, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. Ed. Washington: AOAC, 2005.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; **Introdução a química de alimentos**. 3^oed. São Paulo: Livraria Varela, cap. 3, p. 133-134, 2003.

CARVALHO, R.V; CORREA, T.L.R; SILVA,J.C.M; VIANA,A.P; MARTINS, M.L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v 28,p. 380-386,2008.

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

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.

ESTEBAN, D.J; HYSA,B; BARTOW-MCKENNEY, C. Temporal and spatial distribution of the microbial community of Winogradsky columns. **PLoS ONE**, n.10, p.1-21, 2015.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 22, p. 497-509, 1957.

JESUS. J.G.R. **Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador/BA, 2013.

LOPES, W.A; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substancias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n.4, p.670-673, 2004.

LOWRY, O.H.;ROSEBRUGH,N.J.;FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**,v.193 ,p.265-275,1951.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Washington*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

RODRIGUES, E.F. **Produção e purificação de enzimas amilolítica para hidrólise enzimática de biomassa de Spirulina**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo,2016.

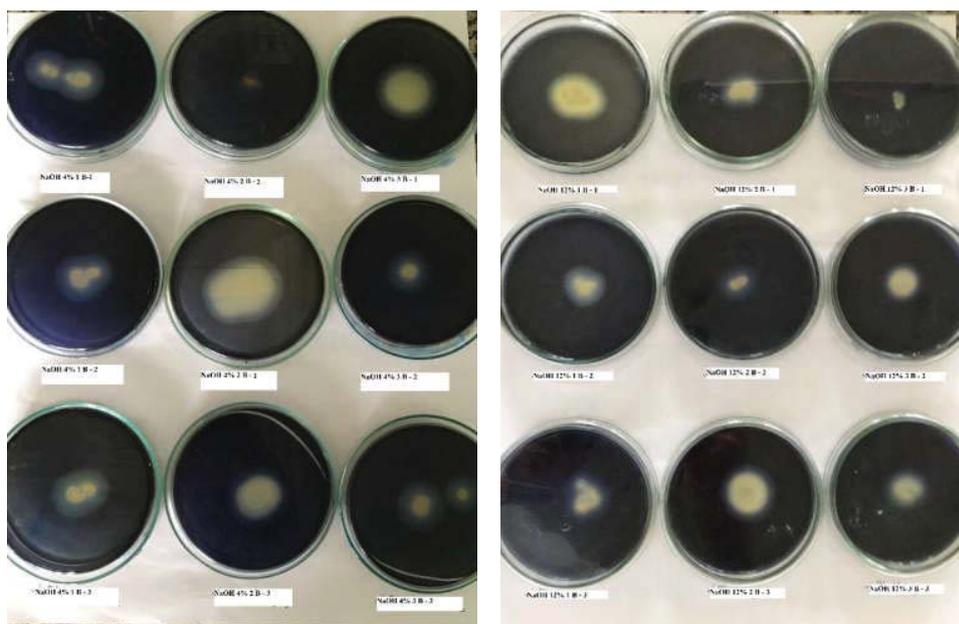
SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; CROUCH, S.R. **Principles of instrumental analysis**. 6 edition, Ed. Thomson Brooks. Belmont, CA – USA, 2007.

TAFARRELLO, L.A.B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações de alfa-amilase termoestável produzida por bactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade de Campinas, Campinas/SP, 2004.

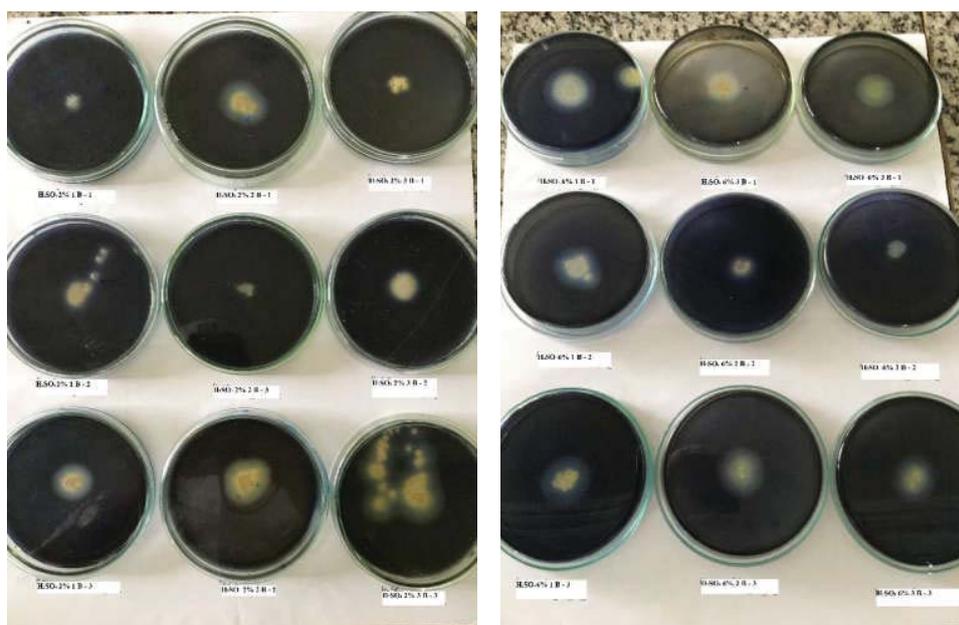
TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed rev e ampl. - Porto Alegre: Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

APÊNDICE B – Resultado do teste de lugol nos diferentes pré-tratamentos

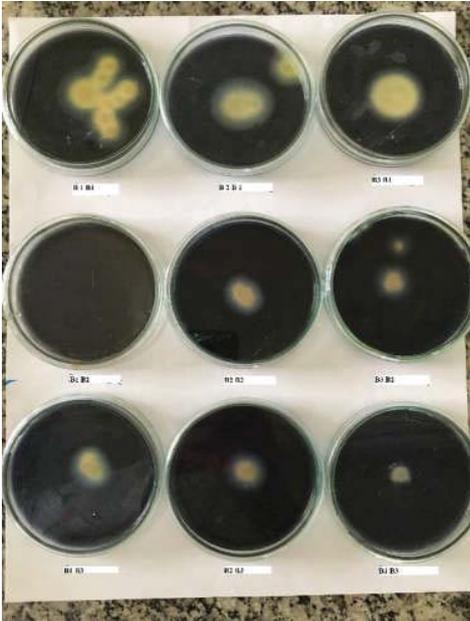
Ensaio com NaOH 4% a 120°C e 12% a 80°C



Ensaio com H₂SO₄ a 2% a 80°C e 6% a 120°C.

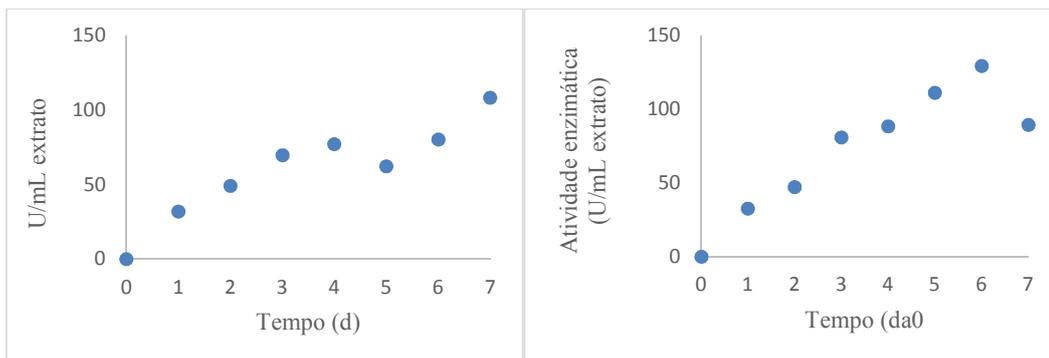


Ensaio coluna Winogradsky sem pré-tratamento



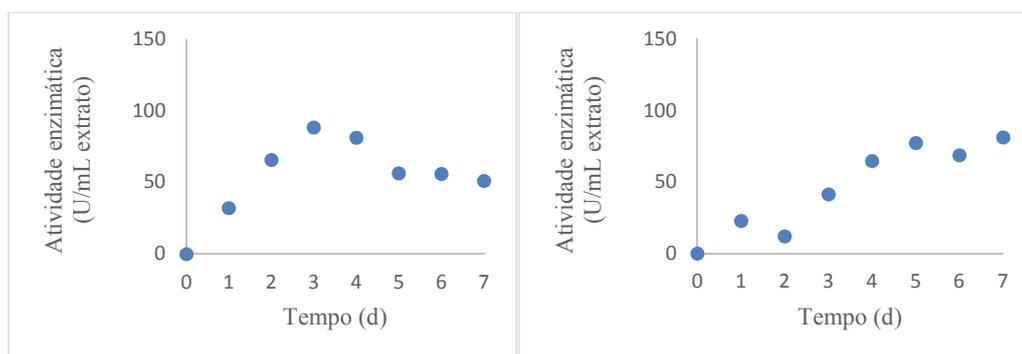
APÊNDICE C – Atividade enzimática dos microrganismos não selecionados

(a) microrganismo 1; (b) microrganismo 2; (c) microrganismo 4; (d) microrganismo 6;
(e) microrganismo 8; (f) microrganismo 10.



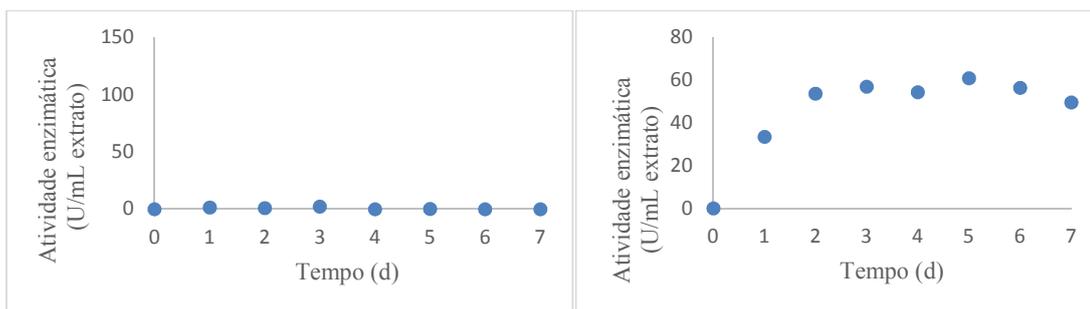
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)