

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

Área de concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Dissertação de Mestrado

HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS DE BIOMASSA
MICROALGAL BIOFLOCULADA COM FUNGO

Viviane Simon

Passo Fundo

2023



CIP – Catalogação na Publicação

S594h Simon, Viviane
Hidrólise de polissacarídeos de biomassa microalgal
biofloculada com fungo [recurso eletrônico] / Viviane
Simon. – 2023.
2 MB ; PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.
Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade
de Passo Fundo, 2023.

1. Spirulina. 2. Biomassa. 3. Alga. 4. Hidrólise. I. Colla,
Luciane Maria, orientadora. II. Título.

CDU: 631.4

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Universidade de Passo Fundo
Faculdade de Engenharia e Arquitetura
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado “HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS DE BIOMASSA MICROALGAL BIOFLOCULADA COM FUNGO”, elaborada por Viviane Simon, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Helen Treichel – Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier – Universidade de Passo Fundo (PPGPPF/UPF)

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião – Universidade de Passo Fundo (PPGEng/UPF)

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla- Orientador

Passo Fundo

2023

Viviane Simon

**HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS DE BIOMASSA
MICROALGAL BIOFLOCULADA COM FUNGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, do Instituto de Tecnologia da Universidade de Passo Fundo, com requisito para obtenção do título de Mestre, sob a orientação da Prof^a. Dr^a Luciane Maria Colla.

Passo Fundo

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos, à minha orientadora e a todos aqueles que acreditam na ciência e no poder da educação no desenvolvimento da nossa sociedade.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Currie

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram na concretização deste trabalho.

À minha família, especialmente meus pais, obrigado pelo suporte e incentivo de sempre. Ao meu marido, João Felipe, que sempre esteve comigo no desenvolvimento deste trabalho e, sempre me apoiou em todos os momentos. À minha filha, que está a caminho e, é meu maior incentivo para continuar nessa jornada. Vocês são meu suporte e minha força de todos os dias!

À minha orientadora, Luciane Colla, obrigada pelos ensinamentos, oportunidades, incentivos, paciência e por acreditar em mim. Sou grata por tudo o que aprendi em todos esses anos de orientação (desde a graduação, no mestrado e agora, doutorado). Tens um impacto muito grande na minha formação, não só acadêmica, como pessoal.

À Universidade de Passo Fundo, ao PPGEng, à CAPES e políticas públicas de concessão de bolsas, recursos e infraestrutura, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica e desenvolvimento desta dissertação.

À minha segunda família do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LaBio/UPF) que tenho um imenso carinho, aos nossos queridos IC's que sempre nos auxiliam no desenvolvimento de todas as atividades, e professores pela troca de conhecimentos e auxílio na execução desta dissertação. Obrigada por tudo, vocês foram essenciais para o êxito deste trabalho.

RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* é um microrganismo com grande potencial de aplicação biotecnológico. Dentre os obstáculos associados ao processo de cultivo, destacam-se a colheita da biomassa. A biofloculação é uma alternativa viável, pois utiliza as biomassas microbianas, a exemplo do *Aspergillus niger*, como biofloculantes. A biomassa resultante do processo de biofloculação pode ser utilizada para a produção de bioprodutos de alto valor agregado. Para a total exploração dessa biomassa são utilizados métodos de ruptura celular. Sendo assim, é importante o conhecimento específico da composição e estrutura celular microbiana para garantir a eficiência de hidrólise e conversão em bioprodutos. Para a ruptura celular são muito utilizados tratamentos físico-químicos, ou biológicos (uso de microrganismos ou enzimas). Visto a especificidade das enzimas, a hidrólise enzimática é vantajosa se comparada às tecnologias comumente utilizadas, sendo importante o conhecimento de quais enzimas são necessárias para a hidrólise de cada tipo de biomassa. Além disso, sabe-se que as enzimas comerciais existentes são aplicáveis, porém não são desenvolvidas especialmente para a hidrólise de biomassas vegetais, sendo necessário o conhecimento de como atuam em biomassas microbianas em relação às faixas operacionais de uso. Nesse sentido, o objetivo do estudo é avaliar processos físicos e enzimáticos na hidrólise de biomassas microbianas para aplicação na produção energética. Inicialmente foram realizados testes de colheita microalgal com diferentes teores de biofloculante e ajuste de milivoltagem para a microalga *S. platensis*, alcançando eficiências de 99,7% (proporção 1:8 fungo:microalga). Com aumento de escala os resultados de eficiência foram mantidos. Para a biomassa biofloculada foram testados, posteriormente, pré-tratamentos (ultrassom, autoclave e congelamento/descongelamento), que foram avaliados a partir da liberação de açúcares redutores totais (AR) ao longo de 6 h, pH 4,5, 50 °C, 120 rpm em banho maria, com a adição de enzimas amilase (Amylase AG XXL), AMG (Sazyme GO2 e), celulase (Celuclast 1.5 L) e xilanase (Ultraflo Max). A partir dos melhores resultados de eficiência, foram definidos como pré-tratamento padrão, a autoclavagem. Em seguida, foi realizada a caracterização das enzimas em relação ao pH e temperaturas ideais, utilizando seus substratos padrão. Nesta etapa, foi adicionada mais uma enzima amilase (LpHera) aos testes. Todas as enzimas tiveram maior atividade em pH 4,5 e, temperaturas de 60° (Amilase e AMG), 70°C (celulase) e 50 °C (xilanase). Com as temperaturas e pHs ótimos definidos, foram testados percentuais de adição de enzimas (0,01; 0,03 e 0,05%) para hidrólise da biomassa biofloculada. Os ensaios foram conduzidos até estabilização nos rendimentos de AR. De forma geral, não houve diferença estatística entre as concentrações de enzima utilizadas, sendo definida a utilização de 0,01%. A seguir, foram testadas diferentes associações de enzimas na hidrólise da biomassa biofloculada, sendo que o uso do Blend contendo amilase, AMG e celulase obteve os melhores resultados, com aproximadamente 70% de eficiência, considerando pré-tratamento e ação enzimática. O uso associado de enzimas mostrou-se mais eficiente que o uso individual, sendo uma alternativa para a hidrólise de biomassas mais complexas, como a biofloculada que contém o *A. niger*. Ainda, destaca-se a importância de otimização nos processos de hidrólise enzimática, sendo que, a depender das biomassas utilizadas, as enzimas podem atuar de formas diferentes, necessitando estudos de concentração, tempo de atuação e, uso associado, principalmente.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*; *Aspergillus niger*; pré-tratamentos; hidrólise enzimática; associação de enzimas; bioenergia.

ABSTRACT

The microalgae *Spirulina platensis* is a microorganism with great potential for biotechnological application. Among the obstacles associated with the cultivation process, biomass harvesting stands out. Bioflocculation is a viable alternative, using microbial biomass, such as *Aspergillus niger*, as bioflocculants. The biomass resulting from the bioflocculation process can be used to produce bioproducts with high-added value. For the full exploitation of this biomass, cell rupture methods are used. Therefore, specific microbial cell composition and structure knowledge is essential to ensure efficient hydrolysis and conversion into bioproducts. Physical-chemical or biological treatments (microorganisms or enzymes) are widely used for cell rupture. Given the high specificity of the enzymes, enzymatic hydrolysis is advantageous compared to commonly used technologies. It is essential to know which enzymes are necessary for the hydrolysis each type of biomass. In addition, it is known that existing commercial enzymes are applicable. However, they are not specially developed for the hydrolysis of plant biomass, requiring knowledge of how they act on microbial biomass concerning the operational ranges of use. In this sense, the study aims to evaluate physical and enzymatic processes in the hydrolysis of microbial biomass for application in energy production. Initially, microalgae harvest tests were carried out with different levels of bioflocculant and millivoltage adjustment for the microalgae *S. platensis*, reaching efficiencies of 99.7% (ratio 1:8 fungus: microalgae). With scale-up, the efficiency results were maintained. For the bioflocculated biomass, pre-treatments were subsequently tested (ultrasound, autoclave, and freeze/thaw), which were evaluated from the release of total reducing sugars (RS) over 6 h, pH 4.5, 50 °C, 120 rpm in a water bath, with the addition of amylase (Amylase AG XXL), AMG (Sazyme GO2 e), cellulase (Celuclast 1.5 L) and xylanase (Ultraflo Max) enzymes. Based on the best efficiency results, autoclaving was defined as standard pre-treatment. Then, the characterization of the enzymes was carried out concerning the ideal pH and temperatures using their standard substrates. Another amylase enzyme (LpHera) was added to the tests in this step. All enzymes had more excellent activity at pH 4.5 and temperatures of 60° (Amylase and AMG), 70°C (cellulase), and 50 °C (xylanase). With the optimum temperatures and pH defined, percentages of enzyme addition (0.01, 0.03, and 0.05%) for hydrolysis of the bioflocculated biomass were tested. Assays were conducted until stabilization in AR release. There was no statistical difference between the enzyme concentrations, with 0.01% being defined. Next, different associations of enzymes were tested in the hydrolysis of bioflocculated biomass, and the use of amylase, AMG and cellulase obtained the best results, with about 70% of efficiency, considering pre-treatment and enzymatic action. The associated use of enzymes proved to be more efficient than the individual user as an alternative for hydrolysis of more complex biomasses, such as the bioflocculated one containing *A. niger*. Still, the importance of optimization in enzymatic hydrolysis processes is highlighted, and, depending on the biomass used, enzymes can act in different ways, requiring studies of concentration, time of action and, mainly, associated use.

Keywords: *Spirulina platensis*; *Aspergillus niger*; pre-treatment; enzymatic hydrolysis; enzyme association; bioenergy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
a) Objetivo Geral	14
b) Objetivos Específicos	14
Referências	15
2 CAPÍTULO I: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MICROALGAL BIOMASS*	18
1 Introduction	19
2 Microalgae production and applications	21
3. Composition characteristics of microalgae cell walls	24
3.1 Prokaryotic Microalgae	24
3.2 Cell Walls of Eukaryotic Microalgae	25
4 Enzymatic hydrolysis of microalgae	27
4.1 Amylases	29
4.2 Celulases	31
4.3 Pectinases, Xylanases and Proteases	33
5 Conclusions	47
References	48
3 CAPÍTULO II: COLHEITA DE BIOMASSA DE <i>Spirulina platensis</i> VIA BIOFLOCULAÇÃO FÚNGICA	60
1. Introdução	60
2 Material e Métodos	64
2.1 Condições de cultivo microalgal	64
2.2 Produção do biofloculante fúngico	65
2.3 Ensaio de biofloculação fúngica	65
2.4 Caracterização das Biomassas	67
2.5 Tratamento dos dados	67
3 Resultados e Discussões	67
3.1 Ensaios de biofloculação fúngica	69
3.2 Caracterização das biomassas	73
4 Conclusão	74
5 Referências	74
4 CAPÍTULO III: HIDRÓLISE DE BIOMASSA MICROALGAL BIOFLOCULADA	80
1 Introdução	80

2	Material e Métodos	82
2.1	Testes preliminares de ruptura celular e hidrólise enzimática	82
2.2	Estudos de caracterização das enzimas: verificação de pH e temperatura ótimos	84
2.3	Estudo da carga enzimática e tempos de hidrólise	85
2.4	Estudo do uso associado de enzimas	86
2.5	Determinações Analíticas	87
2.5.1	Determinação de açúcares redutores totais	87
2.5.2	Caracterização das biomassas	87
2.6	Tratamento dos dados	87
3	Resultados e Discussões	88
3.1	Testes preliminares de ruptura celular e hidrólise enzimática	88
3.2	Estudos de caracterização das enzimas: verificação de pH e temperatura ótimos	91
3.3	Estudo da carga enzimática e tempos de hidrólise	98
3.4	Estudo do uso associado de enzimas	102
3.4.1	Blend 1: LpHera e Saczyme GO 2	102
3.4.2	Blend 2: LpHera + Saczyme GO 2 + Celluclast 1.5 L	103
3.4.3	Blend 3: LpHera + Saczyme GO 2 + Ultraflo Max	104
4	Conclusão	109
	Referências	109
5	CONCLUSÃO GERAL	115

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figure 1. Applications of microalgae in industry.	23
Figure 2. Demonstration diagram of the cell wall of prokaryotic microalgae of the genus <i>Spirulina</i> .	25
Figure 3. Cellular composition of eukaryotic microalgae.	26
Figure 4. Mechanisms of starch degradation through enzymatic hydrolysis.	30
Figure 5. Mechanisms of cellulose degradation through enzymatic hydrolysis.	32
Figure 7. Mechanisms of pectin degradation through enzymatic hydrolysis.	34
Figure 8. Mechanisms of xylan degradation through enzymatic hydrolysis.	36

CAPÍTULO II

Figura 1 - Curva de crescimento da microalga <i>S. platensis</i> .	69
Figura 2 – Influência do percentual de biofloculante e do ajuste de milivoltagem sobre a eficiência de biofloculação (%) na colheita da microalga <i>Spirulina platensis</i> usando biomassa fúngica.	70
Figura 3 – Eficiência dos testes de biofloculação fúngica utilizando diferentes concentrações de biofloculante e ajuste de milivoltagem.	72
Figura 4 – Eficiência dos testes de biofloculação quando realizado sem adição de biofloculante e com ajuste de milivoltagem ou, somente a adição de biofloculante sem ajuste de milivoltagem.	72
Figura 5 – Separação da biomassa de <i>S. platensis</i> em ensaios padrão de jar test.	73

CAPÍTULO III

Figura 1 – Rendimentos de AR* quando utilizadas as enzimas, amilase + AMG e celulase + xilanase, com diferentes pré-tratamentos.	91
Figura 2 – Atividade enzimática específica para a enzima LpHera* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.	93
Figura 3 – Atividade enzimática específica para a enzima Saczyme GO 2* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.	94
Figura 4 – Atividade enzimática específica para a enzima Amylase AG XXL* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.	95
Figura 5 – Atividade enzimática específica para a enzima Celluclast 1.5 L* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.	96

Figura 6 – Atividade enzimática específica para a enzima Ultraflo Max* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.	97
Figura 7 – Superfície de resposta para diferentes pHs e temperaturas das enzimas utilizadas neste estudo.	98
Figura 8 – Açúcares redutores totais* para a enzima LpHera para as diferentes concentrações testadas.	101
Figura 9 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera e Saczyme GO 2.	104
Figura 10 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera, Saczyme GO 2 e Celluclast 1.5 L.	105
Figura 11 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera, Saczyme GO 2, e Ultraflo Max.	107
Figura 12 – Rendimentos de açúcares redutores totais para as diferentes associações de enzimas no tempo 3h.	108
Figura 13 – Eficiência da hidrólise enzimática nos diferentes tratamentos no tempo de 3h.	109
Figura 14 - Rendimento de açúcares redutores* totais para as diferentes biomassas de estudo.	110

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com a crescente demanda por energia, buscam-se alternativas sustentáveis que atendam às necessidades globais e reduzam os impactos ambientais dos combustíveis fósseis. O uso de biomassas, como as microalgas, é uma alternativa viável do ponto de vista ambiental, devido sua capacidade de ciclagem do carbono atmosférico através da fotossíntese, onde realizam a captura do dióxido de carbono e produção de oxigênio (BOCKEN et al., 2021; HALLENBECK et al., 2016). Além disso, se comparadas com as biomassas utilizadas em combustíveis de 2ª geração (que utiliza biomassa vegetal lignocelulósica, como palhas, bagaços e folhas), as microalgas contornam as barreiras tecnológicas relacionadas com a recalcitrância da lignina, o que dificulta a consolidação do seu uso, visto a complexidade de conversão das matéria-primas em biocombustível (BRENNAN; OWENDE, 2010).

As biomassas microalgais podem ser utilizadas dentro do conceito de biorrefinarias integradas devido sua capacidade de acumular compostos de reserva como carboidratos (entre 22% e 60%) e lipídios (entre 4% e 75%) (KANDASAMY et al., 2022; MATA et al., 2010; SILVA et al., 2016), além de outras biomoléculas industrialmente importantes (proteínas, pigmentos, vitaminas e outros compostos bioativos) (PARK et al., 2022; FIGUEROA-TORRES et al., 2021). Através da plena exploração da composição celular de microalgas, as biorrefinarias de microalgas oferecem uma abordagem lucrativa e competitiva para a coprodução de biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado (KANDASAMY et al., 2022; STILE'S et al., 2018).

Uma das limitações do processo de cultivo microalgal, é a colheita da biomassa que comumente está associada a elevados custos de operação e manutenção, além da necessidade de energia para os equipamentos, especialmente para operação em grande escala (UMMALYMA et al., 2017). De forma geral são utilizadas técnicas como a centrifugação, filtração e coagulação/floculação, consideradas onerosas e, no caso da coagulação/floculação, prejudiciais para os processos de conversão da biomassa em bioprodutos, visto o uso de produtos químicos (VONSHAK; RICHMOND, 1988; ZHUANG et al., 2016; VANDAMME et al., 2011). Visto isso, uma técnica promissora que vêm sendo estudada é a biofloculação.

A biofloculação consiste na floculação da biomassa microalgal através do uso de biomassas microbianas (ALAM et al., 2016). A técnica possui custos reduzidos, se comparada às técnicas comumente utilizadas e, não contamina a biomassa final através da utilização de produtos químicos (CHUA et al., 2020; NAZARI et al., 2020; LEE et al., 2013). Com o uso da biofloculação, há ainda, o incremento de biomassa através da adição de fungos, bactérias ou

algas, utilizados como biofloculante. Entretanto, as biomassas finais apresentarão composições químicas variadas, o que trará a necessidade do estudo dos processos de *downstream* vinculados às aplicações posteriores.

Em relação ao uso da técnica, a biofloculação necessita de estudos específicos, uma vez que uma mesma microalga, mesmo que cultivada nas mesmas condições ambientais e nutricionais padronizadas, pode apresentar composições intracelulares diferentes em bateladas diferentes, alterando as condições ótimas de biofloculação. Da mesma forma, a fase de crescimento da microalga em que a colheita é realizada pode afetar a distribuição de cargas no meio, interferindo na eficiência de biofloculação (NAZARI et al., 2021)

Os carboidratos são o principal produto da via fotossintética microalgal, e estão presentes também em outros microrganismos utilizados na biofloculação. Os polissacarídeos microalgais já são amplamente estudados para a produção de bioetanol, biohidrogênio, entre outros bioprodutos (VIRMOND et al., 2013; REMPEL et al., 2019; CHEIRSILP et al., 2022), porém, com a biofloculação, obtêm-se biomassas microbianas de diferentes microrganismos, o que traz um desafio quando avaliadas as rotas biotecnológicas de conversão, principalmente na hidrólise da biomassa para liberação dos carboidratos intracelulares (REMPEL et al., 2018).

Na biomassa biofloculada podem estar presentes microrganismos procarióticos e eucarióticos, que diferem principalmente, na composição da parede celular. Microrganismos procarióticos possuem parede celular basicamente composta por polissacarídeos de glicose, sendo mais fácil a quebra de ligações, porém microrganismos eucarióticos, possuem em sua estrutura, uma matriz composta por biopolímeros resistentes aos processos de ruptura celular (VOIGT et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 1999). Sendo assim, torna-se fundamental a utilização de tratamentos capazes de hidrolisar compostos presentes tanto na parede celular microalgal, quanto dos demais microrganismos utilizados na biofloculação, com intuito de aumentar a eficiência de conversão da biomassa.

Métodos físicos podem ser utilizados para o rompimento da parede celular e melhorar o rendimento na liberação de compostos intracelulares (HA et al., 2021; KERIS-SEN et al., 2017). Dentre eles, destacam-se o ultrassom, micro-ondas, pulso de campo elétrico, métodos mecânicos, autoclavagem e congelamento/descongelamento (VELAZQUEZ-LÚCIO et al., 2018). Ainda, podem ser utilizados métodos químicos (hidrólise ácida ou alcalina) ou enzimáticos, sendo associados comumente à métodos físicos como pré-tratamento para o aumentar as eficiências de hidrólise das biomassas com parede celular mais complexa. A hidrólise enzimática é vantajosa se comparada à hidrólise química, pois não utiliza produtos químicos e altas temperaturas, sendo conduzida em condições mais amenas e com menor gasto

de energia, além de apresentar maior especificidade em relação aos substratos e não gerar subprodutos tóxicos (ARUMUGAM et al., 2020; ZABED et al., 2019).

Na hidrólise de biomassas microalgais as enzimas mais utilizadas são as α -amilases e amiloglicosidases (degradadoras de amido) (SOSSELLA et al., 2020; REMPEL et al., 2018) e, também, as celulases (degradadoras de parede celular) (SRIYOD et al., 2021). Já, para a biomassa biofloculada, com a presença de diferentes microrganismos, diferentes enzimas podem somar-se ao processo de quebra de polissacarídeos (ALAVIJEH et al., 2020; ZHANG et al., 2022). A hidrólise de biomassas algais vem sendo amplamente estudada para produção de bioenergia, principalmente por seu potencial na produção de biocompostos como o bioetanol, e biohidrogênio, porém, tratando-se de biomassas microalgais biofloculadas, ainda são necessários estudos que envolvam a hidrólise completa da biomassa, para garantir a eficiência na produção energética. Além disso, outros compostos podem ser obtidos a partir das biomassas hidrolisadas, como bioestimulantes (DE SOUZA SCHNEIDER et al., 2022), compostos para alimentos (PEREIRA et al., 2021) e biopeptídeos (ASTOLFI, 2019).

Esta dissertação faz parte da linha de pesquisa em Desenvolvimento de processos aplicados ao tratamento de ar, água, efluentes e solos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental. Constitui-se uma continuidade dos trabalhos que estudaram diferentes técnicas de colheita e hidrólise da biomassa microalgal, com técnicas de coagulação (SOSSELLA et al., 2019) e biofloculação (NAZARI et al., 2021). Os avanços do presente estudo se relacionam com o aprofundamento de estudos relacionados com a biofloculação (utilizando o ajuste de milivoltagem como parâmetro, visando a neutralização de cargas positivas e negativas entre microalga e fungo, para maior eficiência de separação) e hidrólise enzimática da biomassa biofloculada (utilizando associações de enzimas para a quebra de ligações químicas presentes tanto na microalga quanto no fungo).

A dissertação está dividida em três capítulos. No Capítulo I é apresentada uma revisão como capítulo de livro aceito para publicação no livro: *Biomass Hydrolysing Enzymes: Basics, Advancements and Applications*, edited by Anil K. Patel (Taiwan), Héctor A. Ruiz (Mexico), Ashok Pandey (India) and Reeta R. Singhanian (Taiwan). No Capítulo II são apresentados os resultados obtidos quanto à colheita da biomassa microalgal por meio da técnica de biofloculação fúngica. Já no Capítulo III é apresentada a pesquisa de hidrólise da biomassa de microalga biofloculada, com diferentes condições e emprego de diferentes enzimas. Além desses capítulos, uma introdução e objetivos estão apresentados, bem como a conclusão geral da dissertação.

Dessa forma, o objetivo geral e os objetivos específicos são:

a) Objetivo Geral

Realizar a biofloculação e hidrólise das biomassas microalgais floculadas.

b) Objetivos Específicos

- a) Cultivar a microalga *S. platensis* e avaliar as condições ideais da biofloculação fúngica com *Aspergillus niger*;
- b) Caracterizar a biomassa biofloculada, microalgal e fúngica quanto aos componentes intracelulares;
- c) Analisar diferentes métodos de pré-tratamento das biomassas para a ruptura da parede celular microbiana;
- d) Realizar a caracterização de enzimas para hidrólise da biomassa biofloculada, quanto ao pH, temperatura, concentração e tempos de atividade;
- d) Analisar as eficiências de hidrólise enzimática das biomassas biofloculada, microalgal e fúngica através de diferentes associações de enzimas.

Referências

ALAM, M. A.; VANDAMME, D.; CHUN, W.; ZHAO, X.; FOUBERT, I.; WANG, Z.; YUAN, Z. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 4, p. 573-583, 2016.

ALAVIJEH, R. S.; KARIMI, K.; WIJFFELS, R. H.; VAN DEN BERG, C.; EPPINK, M. Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123321, 2020.

ARUMUGAM, A.; MALOLAN, V. Vishal; PONNUSAMI, V. Contemporary pretreatment strategies for bioethanol production from corncobs: A comprehensive review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 2, p. 577-612, 2021.

BOCKEN, N. M.; SHORT, S. W. Unsustainable business models—Recognising and resolving institutionalised social and environmental harm. **Journal of Cleaner Production**, v. 312, p. 127828, 2021.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

CHEIRSILP, B.; MANEECHOTE, W. (2022). Insight on zero waste approach for sustainable microalgae biorefinery: Sequential fractionation, conversion and applications for high-to-low value-added products. **Bioresource Technology Reports**, v. 18, p. 101003, 2022.

CHUA, E. T.; SHEKH, A. Y.; ELTANAHY, E.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. Effective harvesting of *Nannochloropsis* microalgae using mushroom chitosan: a pilot-scale study. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 771, 2020.

DE SOUZA SCHNEIDER, R. D. C.; RUBERT, A.; FETTER, P. R.; BENITEZ, L. B.; NEVES, F. F.; RIZZETTI, T. M. Uso de hidrolisados de *Arthrospira platensis* (spirulina) para avaliação como bioestimulante na germinação de sementes de tomate. **Acta Scientiae et Technicae**, p. 10, 2022.

FIGUEROA-TORRES, G. M.; PITTMAN, J. K.; THEODOROPOULOS, C. Optimisation of microalgal cultivation via nutrient-enhanced strategies: the biorefinery paradigm. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021.

HA, G. S.; SAHA, S.; BASAK, B.; KURADE, M. B.; KIM, G. U.; JI, M. K.; JEON, B. H. High-throughput integrated pretreatment strategies to convert high-solid loading microalgae into high-concentration biofuels. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125651, 2021.

HALLENBECK, P. C; GROGGER, M; MRAZ, M; VEVERKA, D. Solar biofuels production with microalgae. **Applied Energy**, v. 179, p. 136-145, 2016.

KANDASAMY, S.; ZHANG, B., HE, Z.; BHUVANENDRAN, N.; EL-SEESY, A. I.; WANG, Q.; DAR, M. A. (2022). Microalgae as a multipotential role in commercial applications: Current scenario and future perspectives. **Fuel**, v. 308, p. 122053, 2022.

KERIS-SEN, U. D.; GUROL, M. D. Using ozone for microalgal cell disruption to improve enzymatic saccharification of cellular carbohydrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 59-65, 2017.

LEE, J.; CHO, D. H.; RAMANAN, R.; KIM, B. H.; OH, H. M.; KIM, H. S. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 195-201, 2013.

MATA, T. M., MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

NAZARI, M. T.; RIGUETO, C. V. T.; REMPEL, A.; COLLA, L. M. Harvesting of *Spirulina platensis* using an eco-friendly fungal bioflocculant produced from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 322, p. 124525, 2021.

PARK, Y. H.; HAN, S. I.; OH, B.; KIM, H. S.; JEON, M. S.; KIM, S.; CHOI, Y. E. Microalgal secondary metabolite productions as a component of biorefinery: A review. **Bioresource Technology**, v. 126206, 2021.

PEREIRA, A. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, T. D. Encapsulamento de hidrolisados proteicos de *Spirulina* para aplicação em alimentos. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande, 2020.

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

REMPEL, A.; SOSSELLA, F. S.; MARGARITES, A. C.; ASTOLFI, A. L.; STEINMETZ, R. L. R., KUNZ, A.; COLLA, L. M. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy efficient approach. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121588, 2019.

RODRIGUES, K.; LIMA, M.; GONZALES, M.; KRETZMANN, N. Produção de bioplástico a partir da casca da batata (*Solanum tuberosum*). **XI Semana de Extensão, Pesquisa e Pós-Graduação SEPesq**, Centro Universitário Ritter dos Reis, 2015.

RODRÍGUEZ, R.; JIMÉNEZ, A.; GUILLÉN, R.; HEREDIA, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Postharvest changes in white asparagus cell wall during refrigerated storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3551-3557, 1999.

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

SOSSELLA, F. S.; REMPEL, A.; NUNES, J. M. A.; BIOLCHI, G.; MIGLIAVACA, R.; ANTUNES, A. C. F.; COSTA, J. A.V.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Effects of harvesting *Spirulina platensis* biomass using coagulants and electrocoagulation–flotation on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123526, 2020.

SRIYOD, K.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Single and Combined Enzymatic Saccharification and Biohydrogen Production from *Chlorella* sp. Biomass. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 3, p. 940-953, 2021.

STILE'S, W. A.; STYLES, D.; CHAPMAN, S. P.; ESTEVES, S.; BYWATER, A.; MELVILLE, L.; SILKINA, A.; LUPATSCH, I.; GRUNEWALD, C. F.; LOVITT, R.; CHALONER, T.; BULL, A.; MORRIS, C.; LLEWELLYN, C. A. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 732-742, 2018.

UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SAHOO, D. Bioflocculation: an alternative strategy for harvesting of microalgae—an overview. **Bioresource technology**, v. 242, p. 227-235, 2017.

VANDAMME, D.; PONTES, S. C. V.; GOIRIS, K.; FOUBERT, I.; PINOY, L. J. J.; MUYLAERT, K. Evaluation of electro-coagulation–flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2320-2329, 2011.

VELAZQUEZ-LUCIO, J.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; COLLA, L. M.; SÁENZ-GALINDO, A.; CERVANTES-CISNEROS, D. E.; AGUILAR, C. N.; RUIZ, H. A. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review, **Biofuel Reserch Journal**, v. 5, p. 780–791, 2018.

VIRMOND, E.; ROCHA, J. D.; MOREIRA, R. F. P. M.; JOSÉ, H. J. Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 197-230, 2013.

VOIGT, J.; STOLARCZYK, A.; ZYCH, M.; MALEC, P.; BURCZYK, J. The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science**, v. 215, p. 39-47, 2014.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p. 233-247, 1988.

ZABED, H. M.; AKTER, S.; YUN, J. H.; ZHANG, G. Y.; AWAD, F. N.; QI, X. H.; SAHU, J. N. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 105-128, 2019.

ZHANG, Y., KANG, X., ZHEN, F., WANG, Z., KONG, X., & SUN, Y. Assessment of enzyme addition strategies on the enhancement of lipid yield from microalgae. **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, 108198, 2022.

ZHUANG, L.; AZIMI, Y.; YU, D.; WANG, W.; WU, Y.; DAO, G.; HU, H. Enhanced attached growth of microalgae *Scenedesmus*. LX1 through ambient bacterial pre-coating of cotton fiber carriers. **Bioresource Technology**,

2 CAPÍTULO I: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MICROALGAL BIOMASS*

*Este capítulo está aceito para publicação no livro: Biomass Hydrolysing Enzymes: Basics, Advancements and Applications, edited by Anil K. Patel (Taiwan), Héctor A. Ruiz (Mexico), Ashok Pandey (India) and Reeta R. Singhanian (Taiwan).

Luciane Maria Colla^{1*}, Viviane Simon¹; João Felipe Freitag¹, Victória Dutra Fagundes¹; Alan Rempel¹, Julia Catiane Arenhart Braun¹

¹Graduate Program in Civil and Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, University of Passo Fundo, BR 285, Passo Fundo, RS, Brazil.

*Corresponding author: lmcolla@upf.br / University of Passo Fundo, Campus I, L1 Building. BR 285, Bairro São José - Passo Fundo, RS, Brazil, CEP: 99052-900 - Zip Code 611 - Phone: +55 (54) 3316-8193.

Abstract:

The hydrolysis of microalgal biomass is a challenge, since enzyme complexes capable of acting on the chemical composition of different biomasses are required. Enzymes, in turn, have optimal conditions of use that vary depending on the source, making the hydrolysis of complex materials a challenge. Regarding the chemical composition of microalgae, it varies depending on the origin and may present simple or complex carbohydrates. We aimed to show an overview related to the different chemical compositions of microalgae, enzymes necessary for their hydrolysis and pre-treatments, and also to present studies carried out around the world on the optimization of these processes.

Keywords: Enzymes, optimization of hydrolysis conditions, microalgae, bioethanol.

1 Introduction

Fossil fuels are still considered one of the main sources of energy in the world. However, this is characterized as an exhaustible reserve (Neves et al., 2021). Furthermore, the forms of extraction and processing bring harm to the environment, which reinforces the need for further development of new sustainable energy sources (Bocken et al., 2021). Another current factor that puts pressure on this energy matrix is the global geopolitical crisis, triggering price increases and reducing fossil raw material supplies. In this way, new technologies are being studied, aiming at the search for new energy matrices, from renewable raw materials, with processing processes that result in less environmental impact (Mota et al., 2022). In recent years, production of biofuels from different industrial and agro-industrial residues, as well as plant and microbiological biomass, has not been reported as promising in the production of bioethanol, biogas, biodiesel, in addition to other products with higher added value (Virmond. et al., 2013; De Corato et al., 2018; Junior et al., 2022).

Within these new technologies, the use of microalgal biomass has been studied to obtain different products and applications, such as the production of biodiesel, biomethane, biohydrogen, biofertilizers, bioethanol, pharmaceuticals, and cosmetics (Virmond. et al., 2013; Rempel et al., 2019; Cheirsilp et al., 2022). In addition to the range of products produced via the conversion of these microalgal biomasses, they do not require arable land, have advantages linked to the form of cultivation, and agro-industrial waste can be used resulting in its treatment and nutrient recovery, thus adding greater sustainability and circular bioeconomy to the processes (Khan et al., 2018). In addition, microalgae perform carbon sequestration, have high photosynthetic efficiency, and accumulate lipids, proteins, and carbohydrates. These intracellular compounds vary according to culture strategies and microalgal species. These compounds, after going through several stages of cell disruption, hydrolysis, and fermentation, give rise to the products mentioned above (Mobin et al., 2019; Mota et al., 2022).

The cell disruption step is the first process, through several strategies, the cell wall of the biomasses is broken and the compounds are exposed for the next steps (Sierra et al., 2017). The cell walls of microalgae vary by species, formed by multilayered polymers of glucans rich in amino acids (Chen et al., 2020). Still, there are species whose cellular structure is formed of more resistant materials, formed of insoluble cellulose biopolymers, which results in greater rigidity, hindering their rupture and, consequently, the access to intracellular compounds (Voigt et al., 2014).

Therefore, pre-treatment technologies must be employed to break down these cell walls, thus releasing these intracellular compounds (Maity & Mallick. 2022). These will later be hydrolyzed and transformed into less complex structures, thus being able to carry out their transformation into the desired products, via fermentation processes. There are several methods reported in the literature to rupture the cell walls of microalgal biomass, including chemical hydrolysis (acid or alkaline), enzymatic hydrolysis or mechanical processes (Maity & Mallick. 2022; Ebhodaghe et al., 2022).

As it is a first process for the release of these compounds, it is extremely important to evaluate methods that have high rupture efficiencies and do not generate reaction by-products. The use of enzymes tends to have advantages, since it is performed under milder conditions of pH and temperature compared to chemical hydrolysis. Another factor is that it is possible to use different enzymes so that all the cell wall compounds are accessed (Bahlawan et al., 2022; Dixon & Wilken, 2018).

After the rupture of the cell walls, the use of enzymes can also be used to carry out the hydrolysis of the released compounds (carbohydrates, proteins, lipids) presenting advantages, in addition to the milder pH and temperature conditions, such as the non-generation of by-products, that can be obtained when chemical hydrolysis is employed (Mussatto et al., 2010). According to the compound to be hydrolyzed, enzymes such as amylases, cellulases, xylanases, pectinases and proteases can be used. Such enzymes can be commercial or produced via fermentation processes using different residues, as a nutritional source for specific producing microorganisms, which adds more sustainability to the process (Ramos-Sánchez et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

The use of enzymes in cell disruption and hydrolysis of intracellular compounds has emerged as a promising strategy in the generation of products via microalgal biomass. However, it is extremely important to carry out studies on the composition of the cell walls of the microalgae species used, in addition to evaluating optimal pH and temperature ranges for enzyme action, as well as the dosages to be added to the processes.

With that, the objective of this chapter is to present the use of different enzymes that can be used in the rupture of cell walls and hydrolysis of intracellular compounds of different species of microalgae, demonstrating differences between the structures of the cell walls, as well as which enzymes can be used to make the break. It also presents the use of different enzymes capable of hydrolyzing the released compounds, showing studies with optimal pH and temperature ranges, which enzymes are most used and possible products generated.

2 Microalgae production and applications

Microalgal biomass is considered a sustainable raw material, with numerous advantages over other sources of biomass, such as the lack of arable land for its growth and the possibility of using alternative sources of water (waste, brackish and marine waters) for its cultivation, thus reducing dependence on freshwater sources (Harun & Danqua, 2011). In addition, it has higher photosynthetic efficiency (3-8%), biomass yield (more than 50%), and CO₂ capture (10-50 times) when compared to terrestrial plants (Sankaran et al., 2020).

Microalgae are microscopic and unicellular photosynthetic organisms, prokaryotic (cyanobacteria) or eukaryotic (green algae, diatoms) and have diverse forms, such as filamentous to coccoid. Microalgae can be grown in different growing media, including wastewater, with high growth rates (Rearte et al., 2021; Udaiyappan et al., 2017; Magro et al., 2021). The algal biomasses, as well as the bioproducts obtained from them, can be used in the pharmaceutical, food, agricultural, environmental, and bioenergy areas, among others (Siddiki et al., 2022).

Microalgae cultures can be carried out in open systems (open ponds) or closed (photobioreactors). Cultures in photobioreactors have the advantage of having the most controllable cultivation conditions, such as temperature and contamination. On the other hand, open systems allow a greater scale of application resulting in greater final biomass. Open ponds can be natural or artificial, and because they are open they can have greater external interference, such as different weather conditions, which result in different yields throughout the year. This system is characterized by being less expensive but requires a larger area for cultivation (Chew et al., 2018).

Photobioreactors differ from each other, being tubular (horizontal or vertical), flat panel or stirred tank. In addition, these systems allow greater control of luminosity, temperature and agitation (mechanical or by air bubbles). Due to the greater control of conditions, different species of microalgae can be cultivated in this type of cultivation. However, this system can become more costly to operate (Chew et al., 2018). Other fundamental factors for the cultivation of microalgae are the pH and the presence of the nutrients necessary for the development of the strains (Peter et al., 2022).

The carbon source used in the crops can be from different sources depending on the nature of the microalgae, which can be autotrophic, heterotrophic or mixotrophic. The autotrophic system consists of obtaining carbon sources from inorganic compounds, such as by absorbing light energy and CO₂ through photosynthesis processes. In the heterotrophic system,

microalgae obtain their carbon sources for growth through organic compounds (Castillo et al., 2021; Dragone, 2022).

Mixotrophic cultivation consists of obtaining carbon from different sources, organic and inorganic. This culture medium is used for the valuation of effluents and to increase biomass concentrations, increasing up to 2 to 3 times the amount of biomass when compared to autotrophic system (Roostaei et al., 2018), facilitating the adaptation of microalgae in different culture media (Patel et al., 2019). The different cultivation conditions in the mixotrophic system can result in biochemical composition of interest for the production of bioproducts. With the combination of different light intensities and organic and inorganic carbon sources, microalgae can accumulate lipids, proteins, carbohydrates, and other value-added bioproducts in their cells (Gao et al., 2022; Cheng et al., 2022). In addition, the possibility of using algal biomass to obtain several bioproducts simultaneously makes the system more viable and inserts microalgal biomass within the concepts of integrated biorefineries (Khan et al., 2019).

Microalgal biomass can be used in the development of biofuels, such as bioethanol (Rempel et al., 2019), biodiesel (Ahn et al., 2022), biomethane (Gruber-Brunhumer et al., 2016), and biohydrogen (Liu et al., 2022). It is also a raw material for the development of biofertilizers (Silambarasan et al., 2021), food products (Wang et al., 2022), pharmaceuticals, and cosmetics (Zhuang et al., 2022). Figure 1 presents the potential uses of microalgal biomass in industry (Ferreira et al., 2019).

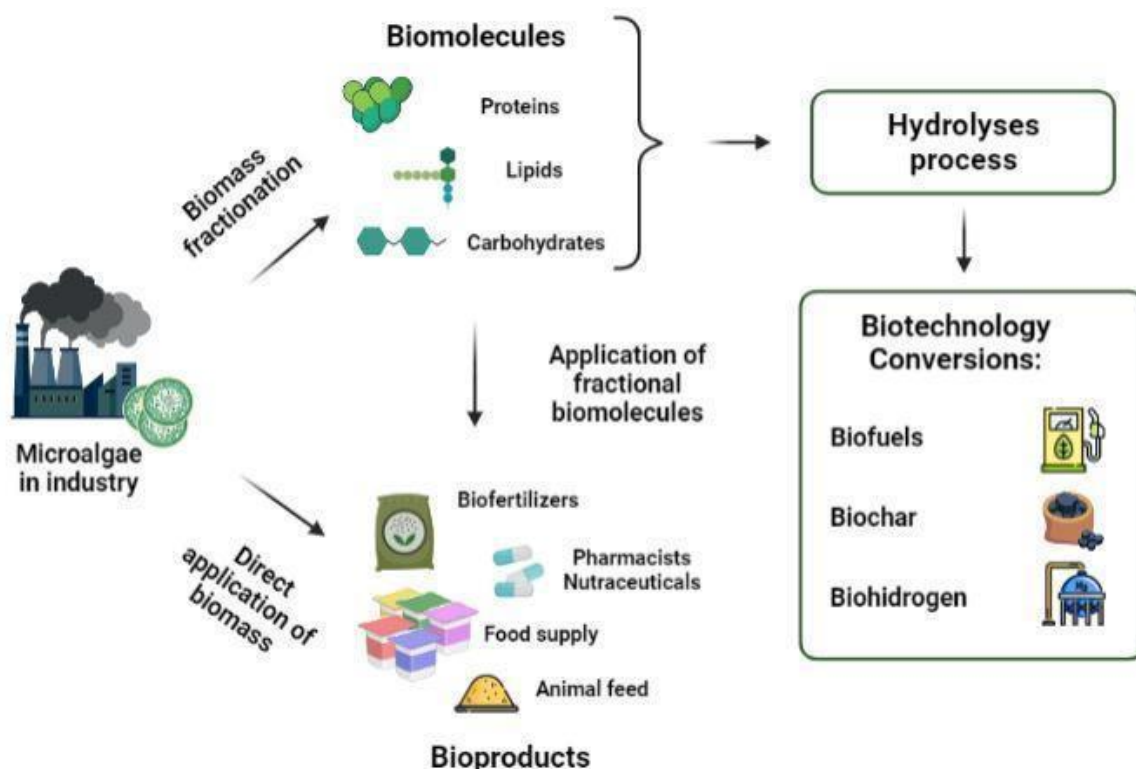


Figure 1. Applications of microalgae in industry.

The application of microalgal biomass depends on the intracellular composition and on the need for hydrolysis of the biomass to release these compounds. Thus, the application may vary depending on the characteristics of the cell walls of the various existing species (Constantino et al., 2021). And also, from the contents of the interior of the cell, for example, high levels of carbohydrates in microalgal biomass are of interest for the production of bioethanol, and high levels of lipids are important for the production of biodiesel (Moreira et al., 2021).

The microalgae *Chlorella homosphaera*, for example, has great biotechnological potential, mainly in the production of biodiesel due to its high levels of lipids (Sandani et al., 2020), and can be used as a heavy metal adsorbent (Kumar et al., 2015). In general, the microalgae cell wall is composed of polysaccharides formed by glucose monomers linked by α -1,4 glycosidic bonds. However, it is important to verify the differences between eukaryotic and prokaryotic cells to define potential biotechnological applications, such as differences in the cell wall and the presence of intracellular organelles (Russel et al., 2022). Next, characteristics of prokaryotic and eukaryotic cells, related to the enzymatic hydrolysis process, will be discussed.

3. Composition characteristics of microalgae cell walls

3.1 Prokaryotic Microalgae

Prokaryotic microalgae, also called cyanobacteria, have morphological properties similar to bacteria (Udaiyappan et al., 2017). They belong to the phylum *Cyanobacteria*. Several microalgae are known and studied, such as *Phormidium*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Microcystis*, *Cyanobacterium*, *Lyngbya*, *Synechococcus*, and *Spirulina* (*Arthrospira*). However, although belonging to the same phylum, microalgae have morphological differences between them.

The genus *Phormidium* is reported with approximately 170 identified microorganisms. Although there are differences between the genus itself, these microalgae are characterized by having curved trichomes measuring 2.5 - 11 μm in width, approximately isodiametric with a pointed or rounded apical cell (Mccallister et al., 2016). The cell wall of this microalgae is composed of about 52% dry weight of amino acids such as glucosamine, muramic acid, alanine, glutamic acid, and diaminopimelic acid. This composition comprises a layer of mucopolymers that form a rigid backbone that provides most of the cell's mechanical strength (Frank et al., 1962).

The cell wall of the *Anabaena* is formed by an outer membrane and a meshwork of peptidoglycans. It is also composed of proteins at the septal junction that unites the cells, these are important for the integrity of the filament (Camargo et al., 2021). About 550 morphospecies of microalgae of the genus *Anabaena* are reported, being them benthic and planktonic. This is a filamentous microalga that has the ability to float on water due to the presence of a gas vesicle in its cells (Li et al., 2016).

The *Spirulina* is highlighted since it is widely used around the world and with a great biotechnological application, with approximately 35 different species being used in the industry (Hasunuma et al., 2013; Colla et al., 2004). This genus is helical or cylindrical, with an average diameter of 2 to 12 μm and can reach 16 μm in length (Tomaselli, 2002). *Spirulina* can present high levels of proteins in its biomass when grown in media full of nutrients (especially N), which characterizes its main application in the food and nutraceutical industry (Nguyen et al., 2020; Zhao et al., 2022). In addition, *Spirulina* has fast-growing characteristics, ideal for industrial-scale applications. Its constitution is proteins (55 to 70%), carbohydrates (10 to 14%), and lipids (4 to 9%) (Margarites et al., 2016).

The microalga *Spirulina platensis* has a cell wall composed of multilayers of glucan and peptidoglycan polymers that form a layer consisting of sugars and amino acids linked by covalent bonds (Chen et al., 2020) Figure 2 shows a schematic of the formation of its cell wall, composed of four layers, two fibrillar (one of them of β -1,2-glucan), one of the peptidoglycans, and one of the acidic polysaccharides.

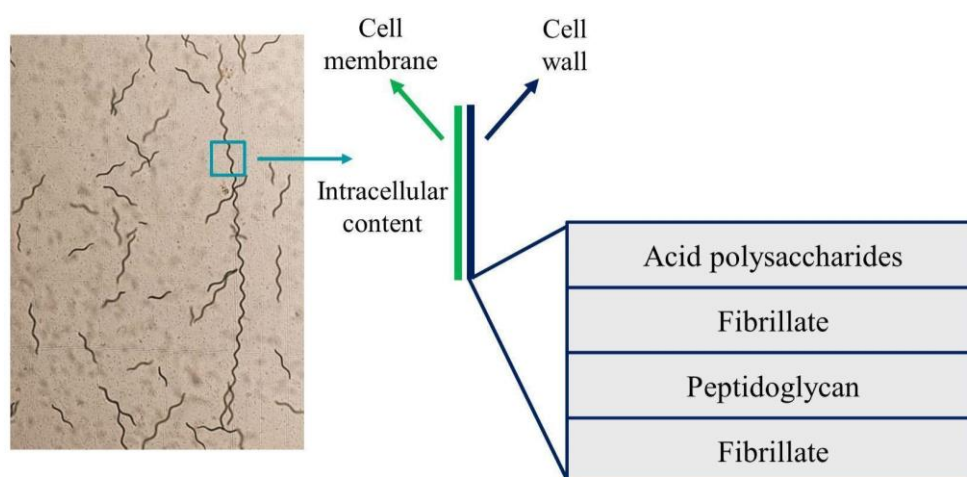


Figure 2. Demonstration diagram of the cell wall of prokaryotic microalgae of the genus *Spirulina*.
Fonte: Van Leeuwenhoek, 1977.

Glucan and peptidoglycan polymers are formed by chains of molecules (sugars and/or amino acids) linked by stable covalent bonds, and these chains of molecules are linked by hydrogen bonds and Van der Waals forces (Van Leeuwenhoek, 1977; Chen et al., 2020).

Among the intracellular compounds of interest, carbohydrates are highlighted, used in the development of biofuels. These polysaccharides can be similar to starch and laminarin. In laminarin-type carbohydrates, β -1,3 and β -1,6-type glycosidic bonds are found between glucose monomers, and in starch-type carbohydrates, which consist of amylopectin (branched structure with α -1,4 and α -1,6) and amylose (α -1,4 glycosidic bonds). In cyanobacteria, glycogen is found mainly, as a polysaccharide similar to starch, but smaller, facilitating fermentation (Maity & Mallick, 2022). Thus, when enzymatic hydrolysis is performed, it is important to know and evaluate the type of bonds that each enzyme can break, to bring greater efficiency to the process (Templeton et al., 2012.)

3.2 Cell Walls of Eukaryotic Microalgae

Eukaryotic microalgae belong to several taxonomic groups, and among these, the main phyla of microalgae are *Rhodophyta* (red algae), *Chlorophyta* (green algae), *Bacillariophyta*

(diatoms), and *Chrysophyta* (golden algae). Also, among these phyla, different classes and orders are reported as biomasses with industrial use. Some eukaryotic microalgae reported are *Desmodesmus*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Botryococcus*, *Haematococcus*, *Parachlorella*, *Chlamydomonas*, *Tetradesmus*, and *Chlorella* (Russel et al., 2022; Udaiyappan et al., 2017).

The intracellular compositions of proteins, carbohydrates and lipids vary among themselves. Protein concentrations can range from 28 to 68% for *Scenedesmus subspicatus* and *Haematococcus pluvialis*, respectively. The lipid levels can have values that reach 33% for *Botryococcus braunii*, but it can have lower levels that vary within the genus itself, as in the case of *Chlorella* (2 to 22%) (Russel et al., 2022).

The eukaryotic microalgae of the *Chlorococcales* polyphyletic group, belonging to the *Chlorophyceae* class, such as *Scenedesmus*, feature a resistant cell wall, formed by a trilaminar structure that may contain insoluble biopolymers such as cellulose on the inside, and algaenan on the outside that also contribute to the rigidity of the structure. These microalgae may also have cross-linked glycoproteins in their cell wall that contain glucosamine and hydroxyproline (Voigt et al., 2014). However, within the *Chlorophyceae*, there may be genera, such as *Chlamydomonas*, which do not have cellulose in their cell wall, but rather a layer of hydroxyproline-rich crystalline glycoproteins (Domozych et al., 2012).

Chlorella microalgae also have a rigid, stable cell wall with a complex structure. It is formed by two cell layers, and in its external part, it has a polysaccharide matrix, containing pectin, agar, alginate, and biopolymers. In its inner layer, it has hemicellulose and glycoproteins in a matrix of cellulose microfibrils, as illustrated in Figure 3 (Kusmiyati et al., 2020; Scholz et al., 2014).

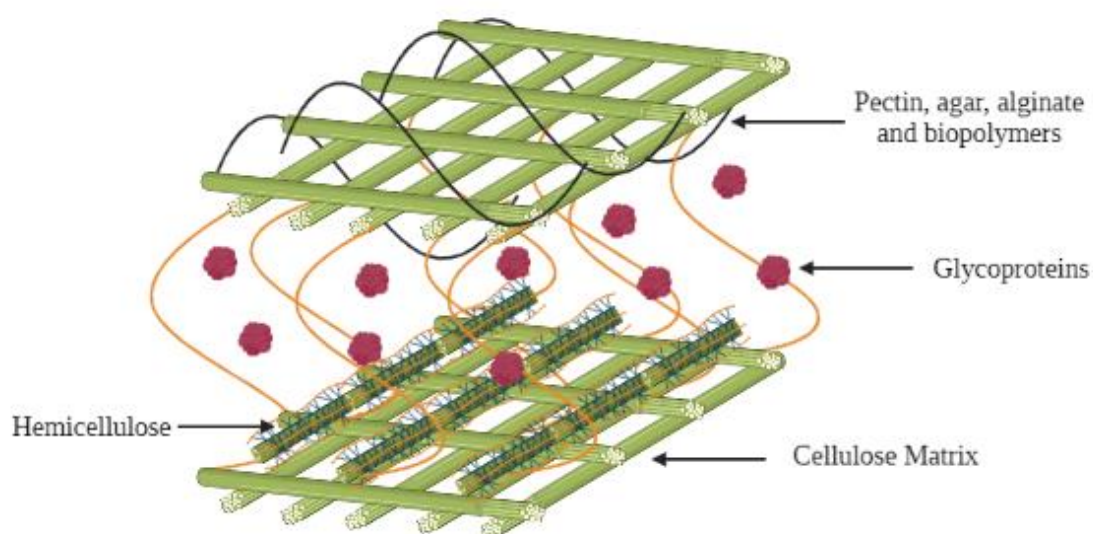


Figure 3. Cellular composition of eukaryotic microalgae.
Fonte: Adapted from Velázquez-Lucio et al. (2018).

The cell wall of the eukaryotic microalgae *Chlorella homosphaera* has a rigid fibrillar matrix inside, with high levels of cellulose and hemicellulose, which can be degraded by cellulolytic enzymes (Burczyk et al., 1999). This microalga has chitin-like polysaccharides in its inner and outer cell walls. After being hydrolyzed, it forms monosaccharides of rhamnose, mannose, glucose, and galactose (Monjed et al., 2021; Ogawa et al., 1998). In its outer layer, as well as *Scenedesmus*, the algaenan biopolymer is present. This compound is a long-chain non-hydrolyzable aliphatic biopolymer. These monomers have ester bonds that form a linear chain and make this microalga resistant to enzymatic hydrolysis (Rodriguez et al., 1999).

In contrast, the eukaryotic microalgae *Dunaliella* does not have a very rigid cell wall. Its cells are surrounded only by a plasma membrane that can undergo osmotic shocks that bring changes in volume and shape. After osmotic equilibrium by the release of glycerol, it can return to normal size, which makes it a halotolerant microalga (Sadka et al., 1991). Osmoregulation and ATPase activation in the plasma membrane allows this microalga to be tolerant in saline environments and with the presence of metals, making it possible to eliminate these compounds and making it sometimes less susceptible than microalgae with complex cell walls (Sendra et al., 2018).

4 Enzymatic hydrolysis of microalgae

Hydrolysis processes are generally used to convert biomass into high value-added bioproducts. The main applications of hydrolytic methods involve the extraction or conversion of biomolecules such as carbohydrates, lipids, proteins and bioactive compounds (Giang et al., 2019; Juárez et al., 2016; Khan et al., 2017; Nguyen et al., 2020; Zhao et al., 2022). These processes can be used as pre-treatment of subsequent steps, or individually, for the rupture of the microalgal cell wall and release of intracellular biocompounds. It is common the associated use of physical-chemical or biological processes as pre-treatment, in order to increase the biomass conversion efficiency results (Velazquez-Lúcio et al., 2018). Among the most used pre-treatments, the use of ultrasound, microwaves, freezing and thawing, heat treatments, acid or alkaline hydrolysis (Halim et al., 2012; Zhou et al. 2014) stand out.

The use of pre-treatments does not necessarily mean greater conversion efficiency. In their study, Lee et al. (2013) performed the chemical pre-treatment of microalgal biomass, using hydrochloric acid (acid hydrolysis) to release reducing sugars. In enzymatic hydrolysis, amylolytic (AMG 300L) and cellulolytic (Celluclast 1.5 L, Novoprime B957) enzymes were

used, in addition to a multi-enzyme complex (Viscozyme L) composed of arabinase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase and xylanase. The best hydrolysis efficiencies were obtained when using AMG 300 L enzymes (80.9%), followed by the multienzymatic complex, and when combined, the hydrolysis efficiency did not increase significantly (81.9%). Furthermore, the study emphasizes that the use of acid hydrolysis proved to be unnecessary when combined with enzymatic hydrolysis.

The use of enzymes appears to be promising, as it presents efficiency in the rupture of the microalgal cell wall, due to the high specificity in relation to substrates. Furthermore, the methodology has advantages compared to the use of chemical methods, as it works in milder conditions of temperature and pH, bringing greater safety to the process (Bahlawan et al., 2022; Dixon & Wilken, 2018; Mussatto et al., 2010, Nguyen et al., 2020; Sathya et al., 2021). In addition to the use of commercial enzymes, *homemade* microbial enzymes are commonly produced. The process may involve the valuation of by-products, such as agro-industrial residues, for example, and through the use of microorganisms and specific culture media, enzymes or enzyme complexes with hydrolysis capacity can be obtained, resulting in a more sustainable and cost-effective process. reduced if the purification conditions are optimized (Ramos-Sánchez et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

According to Monjed et al. (2021), enzymes of fungal origin have great potential for the hydrolysis of eukaryotic microalgae, such as *Chlorella vulgaris*, especially cellulases, hemicellulases, glucanases, pectinases and chitinases. In the study, the enzymes were evaluated by the release of reducing sugars, mainly glucose, without detecting sugars such as N-acetylglucosamine and other oligosaccharides from the degraded biomass.

Among the factors that most interfere in the enzymatic hydrolysis process, the temperature and pH of the medium stand out (Liu et al., 2020; Malakar et al., 2020) to obtain greater efficiencies in the conversion processes (Harun et al., 2014). Rempel et al. (2018) performed the characterization of optimal temperatures and pHs of α -amylase and amyloglucosidase enzymes (*Novozymes*®), using as substrates starch and biomass of the microalgae *Spirulina platensis*. The enzymes were evaluated for the production of reducing sugars, with higher production at 50 °C and pH of 5.5 and 6.0, for α -amylase and amyloglucosidase, respectively.

Another important factor in enzymatic hydrolysis processes is the correct choice of enzymes, as the composition of the microalgal cell wall may vary according to species (Schenk et al., 2008). In this sense, according to the composition of the microalgal cell wall, associations of enzymes can be used in order to obtain a greater hydrolysis yield (Gusakov et al., 2007;

García et al., 2012). The enzymes most used in the hydrolysis of microalgal biomass are amylases (Peng et al., 2018; Souza et al.; 2020), however, in the case of eukaryotic microalgae, the cellulose composition can reach up to 33% of intracellular polysaccharides (Northcote et al., 1958), requiring the application of specific enzymes. Cellulases (endoglucanases, exoglucanases and cellobiases) are already widely used industrially (Fu et al., 2010).

In the study by Sriyod et al. (2021), the optimization of the enzymatic hydrolysis of the microalgae *Chlorella* sp. using together the enzymes Termamyl SC (alpha-amylase), Dextrozyme GA (amyloglucosidase) and Cellic CTec2 (cellulase), to convert fermentable sugars into biohydrogen. With a substrate concentration of 100 g volatile solids VS L⁻¹, the optimal enzyme concentrations were 160 U g⁻¹ VS, 320 U g⁻¹ VS and 40 U of filter paper g⁻¹ VS. With the association of enzymes, hydrolysis efficiencies of approximately 50% were obtained.

Hosseini et al. (2020) performed the enzymatic hydrolysis of *Haematococcus pluvialis* for the production of bioethanol. The hydrolysis of α - β -glucan was performed using different commercial enzymes, starting with the use of a mixture of Cellic, (Ctec2 and Cellic Htec2) at 45 °C for 48 h (with activity of 50 FPU - filter paper per units). Then, 10 μ L of α -amylase enzyme were added to the reaction solution, which was incubated at 90°C in a water bath with shaking for 2 h. Finally, the temperature of the mixture was reduced to 60°C and 10 μ L of glucoamylase enzyme solution was added to the reaction mixture which was incubated in a water bath at 60°C for 22 h.

Next, the most commonly used enzymes in the hydrolysis of microalgal biomass will be discussed individually, with emphasis on amylases, cellulases, xylanases, pectinases, proteases and lipases (Alavijeh et al., 2020; Kim et al., 2014; Liu et al. , 2021; Sossella et al., 2020; Rempel et al., 2018; Gupta et al., 2008).

4.1 Amylases

Starch is one of the most abundant carbohydrates in microalgae. It is a polysaccharide composed of several glucose molecules, linked by glycosidic bonds. Starch is composed of a linear fraction, amylose, which is a linear polymer with α -1,4 linkage chains, and a branched fraction, amylopectin, which in addition to α -1,4 bonds, has α -linkages. 1.6 (Jiang et al., 2017; Tiwari et al., 2015).

Amylases are enzymes that act in the hydrolysis of starch, and can be produced by various microorganisms, plants and humans. According to the mechanism that breaks down starch, they are classified into four types:

- the α -amylase that randomly break the bonds of starch in α -1,4 from the inside of the starch chain, producing glucose compounds with different chain sizes;
- β -amylases, which produce maltose, act by breaking glucose-glucose bonds (α -1,4-D-glucan, maltohydrolase) from outside the starch chain;
- the amyloglucosidase, which successively break bonds at the non-reducing ends (Figure 4) (α -1.4 and α -1.6), producing free glucose;
- pulalanases, which are debranching enzymes that hydrolyze the α -1,6 bonds of α -glycans (Pandey et al., 2000; Rodrigues et al., 2021; Sindhu et al., 2017).

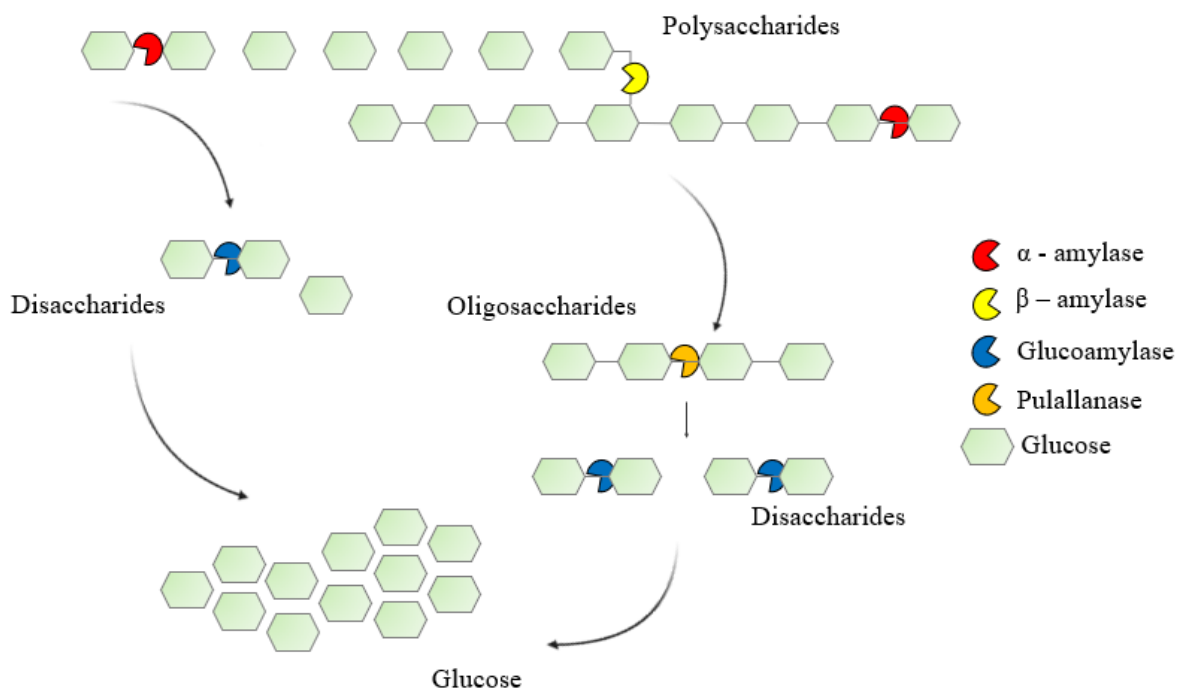


Figure 4. Mechanisms of starch degradation through enzymatic hydrolysis.
Source: Adapted from Al Abdallah et al. (2016).

Thus, in the hydrolysis process, starches present in microalgal biomass are converted into simpler sugars, since starches are extensive complex structures (Rempel et al., 2018).

In a study carried out by Souza et al. (2020), enzymatic hydrolysis of the biomass of the microalgae *Chlorella sorokiniana* was performed using amylolytic enzymes with activity of 4.8 U (*A. awamori*) and 540 U (*T. reesei*). The experiments were carried out in 1.5 mL tubes containing 1.25 g of a 1% (m m^{-1}) mixture of *Chlorella sorokiniana*, enzymes and 0.05 M citrate

buffer solution pH 4.8. The tubes were incubated for 24 h at 50 °C and 200 rpm. Starch from microalgal cells was hydrolyzed by *homemade* fungal amylases, with a yield and final glucose concentration of 99% and 16 g L⁻¹, respectively, in a period of 5 h.

For the production of bioethanol from the microalgae *Chlorella* sp., Ngamsirisomsakul et al. (2019) used α -amylase (SPEZYME® ALPHA, DuPont) and glucoamylase (GC 147, DuPont) enzymes in acid-pretreated biomass (98% H₂SO₄). The α -amylase enzyme was used at a temperature of 85°C and pH 5.7, while the glucoamylase was used at 65°C and pH 4.5. The best results were observed using only glucoamylase in the pre-treated biomass, with 25 U glucoamylase/g of microalgae. The yield of bioethanol produced from the hydrolyzate was 10.58 \pm 0.34 g L⁻¹ or 52.88 \pm 1.69 mg g⁻¹ of microalgae. The results were 7.1 times higher in the production of bioethanol compared to the use of biomass without pre-treatment.

In the study by Constantino et al. (2021) chemo-enzymatic hydrolysis of biomass from different microalgae was performed. The microalgae *Tetraselmis striata* (C4), *Tetraselmis* sp. (C6), *Cylindrotheca fusiformis* (S3), *Nanofrustulum* sp. (S4), *Picochlorum maculatum* (C2), *Phaeodactylum trichomutum* (S6), *Chlorella sorokiniana* 211-32 (C1) and, *Chlamydomonas reinhardtii* (C3). Acid hydrolysis was used as a pre-treatment and was carried out with a 4% sulfuric acid solution, biomass concentration of 50 g L⁻¹, and the mixture was placed in an autoclave at 121°C for 30 min. Enzymatic hydrolysis was carried out in sequence using α -amylase (8000 U g⁻¹ of biomass, pH 5.5 and 95°C) and amyloglucosidase (600 U g⁻¹ of biomass, pH 4.5 and 55 °C). The enzymes were added in the reverse order to the conventional one, that is, first the amyloglucosidase was added and then (after 3 h) the α -amylase was added. The assays were conducted for 6 h, with samples taken every hour for analysis of reducing sugars. Using the proposed strategy, a one-third increase in reducing sugar yields was observed when compared to the conventional strategy. 34.0 \pm 1.0 g of total reducing sugar (100 g)⁻¹ of dry biomass were obtained.

4.2 Celulases

Cellulose is highly stable, composed of glucose molecules in linear chains of up to 12,000 monomers that are joined by β -1,4 glycosidic bonds. Microalgal biomass can contain up to 75% carbohydrates, depending on the species, which are held together by hydrogen bonds in the native state, but they have a strong tendency to form hydrogen bonds which increases the

rigidity of the cellulose and makes it highly insoluble and resistant. for most organic solvents (Gaete et al., 2020; Hamed et al, 2016).

The complete hydrolysis of cellulose is mediated by a combination of three main types of cellulases. The classification of cellulases, according to Lynd et al. (2002) is according to its site of action on the cellulosic substrate: Endoglucanases (EnG), which cleave bonds of the cellulosic fiber, Exoglucanases (ExG), which act on the external region of cellulose and β -glucosidases (BG) which hydrolyze glucose-soluble oligosaccharides (Figure 5).

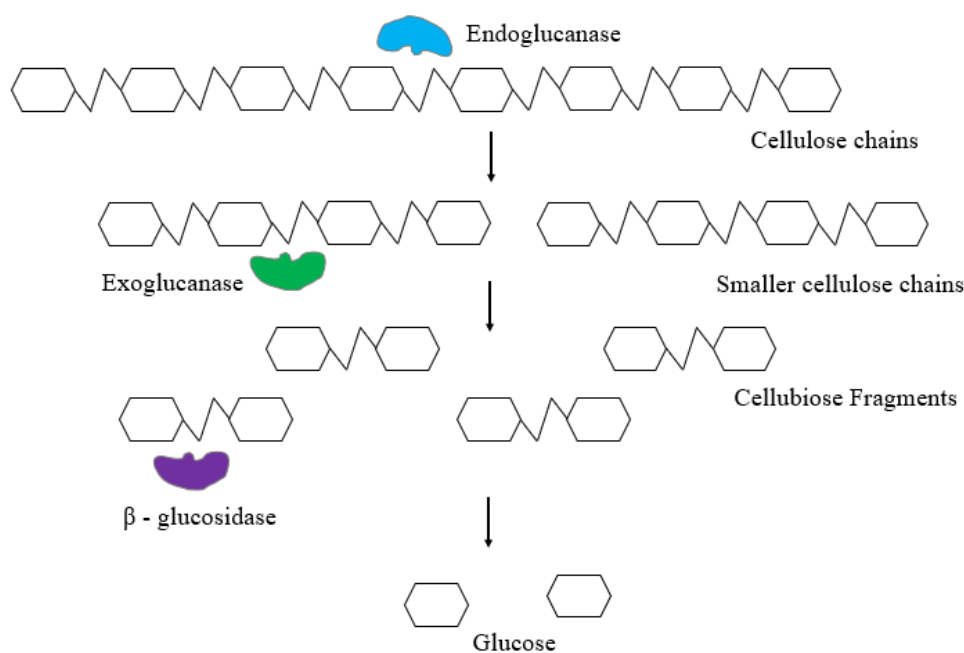


Figure 5. Mechanisms of cellulose degradation through enzymatic hydrolysis.
Font: Adapted from Wright et al. (1988).

In the study carried out by Maffei et al. (2018) the effects of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the properties of the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. Cellulyve 50LC® - (CEL) and Feedlyve GMA® (GMA) enzymes were used at concentrations of 13.8 mg L⁻¹ and 1.5 mg L⁻¹, respectively. The tests were carried out under optimized conditions with 0.2 g of biomass for 10 mL of enzyme solution at the concentrations described, pH 4.4 and 50 °C, for 24 h. At the end of the tests, the biomass was centrifuged for Fourier-transform infrared (FTIR), Powder X-ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscope (SEM images) analysis. The combined use of these enzymes synergistically promoted lipid recovery from microalgae, increasing the extraction yield from 40.8% to over 73%. The use of enzymes increased the ratio of crystalline to amorphous cellulose. Dramatic changes in cell morphology, extensive cell damage and release of intracellular material were

also observed. The results obtained indicate that the enzymes used are capable of breaking the cell wall of microalgae.

Bioethanol production from the biomass of the microalgae *Dunaliella tertiolecta* was investigated by Lee et al. (2013) using chemo-enzymatic saccharification. HCl-catalyzed saccharification of residual biomass at 121°C for 15 min produced reducing sugars in a yield of 29.5% (w w⁻¹) based on dry weight of residual biomass. Initially, the biomass was pre-treated (5% m v⁻¹) with HCl or H₂SO₄ of different molarities and the mixture was taken to an autoclave at 121 °C for 15 min. Then, the saccharification of the biomass (5% w v⁻¹) was carried out at temperatures and pHs ranging from 35-55 °C and 3.5-6.5, respectively, using the enzymes Celluclast 1.5 L, AMG 300L and/or Viscozyme L (contains arabinase, cellulase, β-glucanase, hemicellulase and xylanase) (*Novozymes*®) with concentrations ranging from 0.1-1.0 mg g⁻¹ of dry microalgae biomass. AMG 300L and Viscozyme L showed better hydrolysis efficiency when compared to the other enzymes. At pH 5.5 and temperature 55°C, enzymatic saccharification yields were 21.9%, 19.2%, (w/w based on residual biomass) for AMG 300L, Viscozyme L, respectively.

4.3 Pectinases, Xylanases and Proteases

Pectinases, xylanases and proteases, in general, are used in combination with amylolytic and cellulolytic enzymes, among others, and not in isolation, in order to increase hydrolysis yields. Thus, they will be addressed in this topic jointly.

Pectinases are widely used in the food and industrial production chain, based on the depolymerization of pectin as a result of deesterification and hydrolysis reactions (Rivera et al., 2021). More recently, they have been applied to the hydrolysis of microalgal biomass to increase the yields of polysaccharides associated with other enzymes (Zhang et al., 2018). Pectins are known to be classified based on their mechanism of action into three main categories: protopectinases (degrade insoluble protopectins), deesterifiers (hydrolyze specific substrate groups), and pectinase (hydrolytic removal of pectates) (John et al., 2020)

Also, based on their site of action, pectinases can be classified as endopectinases and exopectinases. Endopectinases are characterized by the random cleavage of internal pectin bonds. Exopectinases cleave the outer units of long-chain polysaccharides. Figure 7 shows the mechanisms of pectin degradation with the use of pectinolytic enzymes.

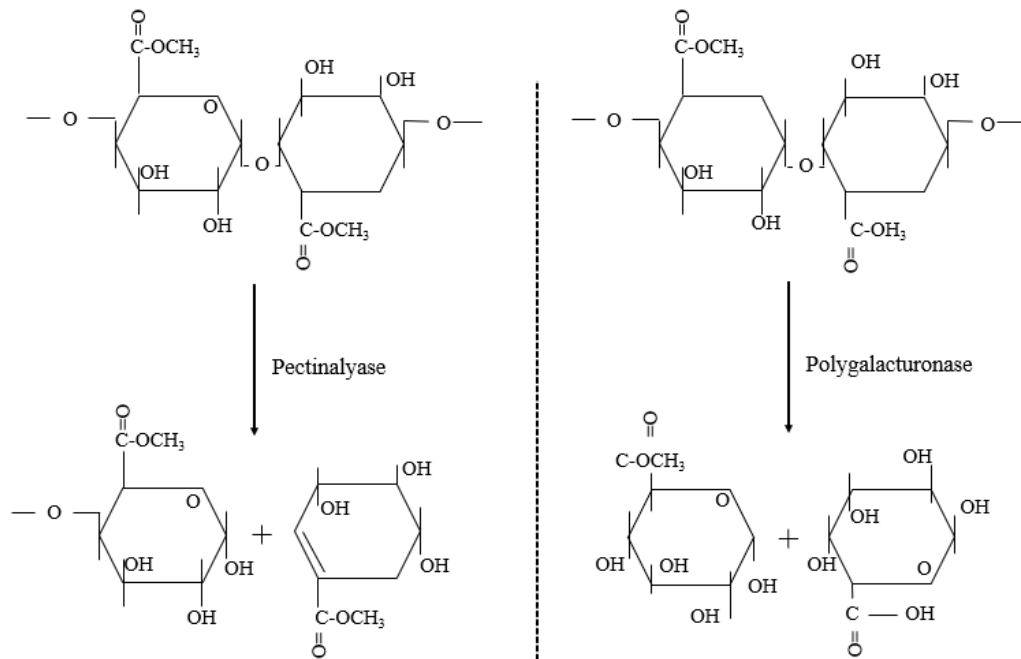


Figure 7. Mechanisms of pectin degradation through enzymatic hydrolysis.

Xylan is the most abundant constituent of hemicellulose and is located at the interface between lignin and cellulose (Barbosa et al., 2021). The main chain of xylan consists mainly of β -(1,4) glycosidic bonds of D-xylopyranose units, with the potential to present a varied degree of polymerization and branching, depending on the plant species (Figure 8) (Beliën et al., 2006). For the degradation of xylan, in turn, due to the complexity and heterogeneity of the chemical nature of xylan, its complete depolymerization is only possible through the synergy of a set of hydrolytic enzymes with different specificities, called the xylanolytic enzyme system (Burlacu et al. al., 2016).

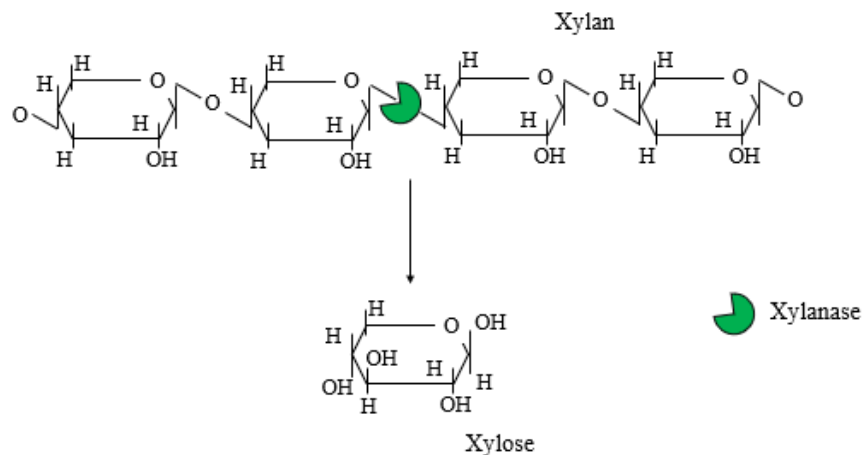


Figure 8. Mechanisms of xylan degradation through enzymatic hydrolysis.

Endo1,4- β -D-xylanases are responsible for the endohydrolysis of β -1,4-glycosidic bonds in the xylan main chain. They produce fractions of xylo-oligosaccharides with a higher degree of polymerization, such as xylose, xylobiose and xylotriose, and are produced by microorganisms, such as the bacteria *Streptomyces* sp. and *Bacillus* sp. and the fungi *Trichoderma* sp. and *Aspergillus* sp. (Burlacu et al., 2016).

The current classification of xylanases was proposed based on the comparison of amino acid sequences (Kocabas et al., 2015; Pollet et al., 2010), divided between the glycosyl hydrolases (GH) system (Henrissat & Coutinho, 2001), being a group of enzymes that hydrolyze the glycosidic bond between two or more carbohydrates or between portions of these and non-carbohydrate portions.

Proteins are made up of biomolecules called amino acids, linked by peptide bonds. Protein hydrolysis can be carried out by proteolytic enzymes and is called proteolysis. Proteases are commonly produced by microorganisms such as fungi, yeasts, bacteria and actinomycetes and act by breaking the nitrogen and carbon terminal amino acid bonds (exopeptidases), or by breaking the internal bonds of polypeptide chains (endopeptidases). They can also be classified according to catalytic mechanism and specificity (serine, aspartic, threonine, cysteine, glutamic and metalloproteinase proteases) and structural relationship characteristics (Barrett, 2000; Gurumallesh et al., 2019; Srivastava et al., 2020)

In proteolysis, specific intracellular proteins are denatured and then the denatured polypeptides are moved into the chamber of a peptidase for protein degradation, producing amino acid molecules. Amino acids, in turn, have a central carbon atom connected with an amine group at one end and a carboxylic acid at the other, with the remaining bonds filled with hydrogen and an R (alkyl) group. During the degradation process, the amine can increase the efficiency of microorganisms involved in the conversion of sugars into alcohol and other biofuel products, such as the extraction of lipids, through the availability of nitrogen. In addition, the carboxylic acid present in the protein can also be used in the production of biofuels through the formation of alcohol (Amor et al., 2019, 2015; Özdemir & Gece, 2019; Paritosh et al., 2017; Srivastava et al., 2020).

The study by Bader et al. (2020) sought to identify alternative sources of enzymes for saccharification of microalgae biomass of the *Chlamydomonas* species. The production of hydrolytic enzymes was carried out from the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. For hydrolysis, temperatures and pHs were used that varied between 40°C, 50°C or 60°C and pH 5, 7, or 9, respectively. The experiments were carried out with 1% (w v⁻¹) of dry microalgae biomass or 5% (w v⁻¹) of fresh biomass (intact cells) added to 100 μ L of fungal medium and

incubated at 55°C. The fungus was able to produce pectinolytic, amylolytic, cellulolytic and proteolytic enzymes and efficiently hydrolyzed the biomasses. The overall efficiency for releasing reducing sugars using fresh biomass was 66% or 74% of its total carbohydrates. When using the same concentration of dry biomass, the efficiency of releasing reducing sugars was approximately 70%. Saccharification of algal biomass yielded up to 22.4 g of L⁻¹ reducing sugars.

For the production of bioethanol from the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated under nutritional stress conditions, Kim et al. (2014) investigated the enzymatic hydrolysis of biomass using different enzymes: Celluclast 1.5 L and Pectinex SP-L (*Novozymes*®). Xylanase (X2629), β-glucosidase (C6105), amylase (A8220), chitinase (C6137), lysozyme (L6876) and sulfatase (S9626) - Sigma-Aldrich. The cellulase and pectinase enzymatic activities were 0.122 filter paper units (FPU) mg⁻¹ protein and 240 international units (IU) mg⁻¹ protein, respectively. The activities of other enzymes were 16 FAU mL⁻¹ (amylase), 10 U mL⁻¹ (β-glucosidase), 100 U mL⁻¹ (xylanase), 0.2 U mL⁻¹ (chitinase), 4000 U mL⁻¹ (lysozyme) and 50 U mL⁻¹ (sulfatase). Pectinase was added to the microalgae at concentrations of 0.24–9.4 mg g⁻¹ of protein and the other enzymes were used at concentrations indicated by the manufacturer. Enzymatic hydrolysis was performed with 1% (w v⁻¹) microalgal biomass (w v⁻¹) in buffer (pH 4.8) at 200 rpm and 50°C for 72 h. Pectinase showed the best results with a saccharification yield of 79% after 72 h.

In a study carried out by Zhang et al. (2018) The optimization of the enzymatic extraction of lipids from the microalga *Scenedesmus* sp. using the enzymes: cellulase, xylanase and pectinase, at different concentrations (0, 10, 20, 30, 40 mg g⁻¹ for cellulase (D1) and 0, 10, 15, 20 mg g⁻¹ for xylanase (D2) and pectinase (D3)), temperature (30, 40, 50, 60, 70°C), pH (2, 3.5, 5, 6.5, 8) and incubation time (60, 120, 180, 240, 300 min). The optimal conditions were established at: T = 45°C, pH = 4.4, P = 190 min, D1 = 20 mg g⁻¹, D2 = 14 mg g⁻¹, D3 = 10 mg g⁻¹. The lipid extraction yields were 13.8 ± 0.4 g 100 g⁻¹ with an optimal percentage of 86.4%.

Despite the advantages of using enzymes in hydrolysis and conversion processes of microalgal biomass to obtain biomolecules, their studies are mainly focused on the laboratory scale. Table 1 presents different studies that evaluate the use of different enzymes in enzymatic hydrolysis of microalgal biomass, aiming to obtain biomolecules of interest.

Table 1. Use of enzymes in enzymatic hydrolysis processes to obtain biomolecules and/or bioproducts from microalgal biomass.

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
Cellulase, xylanase, pectinase, snailase, trypsin, and lysozyme from commercial production	<i>Scenedesmus</i> sp	<ul style="list-style-type: none"> Enzyme concentrations: 5, 20, 40, and 80 mg g⁻¹ of dry biomass; Temperatures and pH ranged between 30 and 60°C and 3.5 to 9.0, according to the manufacturer's information; Conditions of 55 °C, pH 4.5, and 24 h with cellulase, xylanase, and pectinase enzymes. 	Lipid extraction	100% lipid recovery yield (total lipid content) can be achieved with the step-by-step enzymatic hydrolysis sequence: pectinase (10 mg g ⁻¹ microalgae dry weight), cellulase (20 mg g ⁻¹), and xylanase (14 mg g ⁻¹).	Zhang et al. (2022)
Cellulase and protease	<i>Chlorella vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> Hydrolysis is divided into three groups, group A (cellulase hydrolysis), group B (protease hydrolysis), and group C (mixed enzymatic hydrolysis); 15% enzyme load; pH ranging from 5 to 9. 	Biohydrogen production	25.99 mL g ⁻¹ of biohydrogen for cellulase, 16.47 mL g ⁻¹ using protease, and 27.43 mL g ⁻¹ using the enzymes together	Liu et al. (2021)
Commercial enzymes (α -amylase (Liquozyme® Supra 2.2X) and amyloglucosidase (AMG® 300L)	<i>Arthrospira platensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Enzymatic hydrolysis (pH 5.5; 50 °C); Enzymes were added simultaneously.; With concentrations of 0.5, 1.0, 1.5% (v v⁻¹); 	Protein extraction for bioethanol production	8.06 g L ⁻¹ of bioethanol, with a theoretical yield of 100%	Peron-Schlosser et al. (2021)

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
		<ul style="list-style-type: none"> With a pH 5.5 and a temperature of 50 °C. 			
Commercial enzymes (Endo-peptidase (Alcalase 2.4L, Protamex) and cellulase (Celluclast 1.5L))	<i>Scenedesmus almeriensis</i> , <i>S. acuminatus</i> , <i>S. ecornis</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>Mychonastes homophaera</i>	<ul style="list-style-type: none"> Experiment A1: Consortium of microalgae (96% of <i>S. almeriensis</i> and 4% of <i>S. acuminatus</i>) and bacteria in wastewater with pH 6.5; Exp. A2: 80% <i>S. almeriensis</i>, 10% <i>S. ecornis</i>, 9% <i>S. quadricauda</i> and 1% <i>Mychonastes homophaera</i> with a pH of 8; Tests performed with a concentration of microalgae biomass of 5% (w w⁻¹); Enzymes applied under ideal conditions provided by the manufacturer. 	Production of carbohydrates	38.5% carbohydrate yield of the cellulase enzyme in experiment A1	Rojo et al. (2021)
Commercial enzymes α -amylase (Liquozyme® Supra 2.2X) and amyloglucosidase (AMG® 300 L)	<i>Spirulina platensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Enzymes were added simultaneously at a concentration of 1% (v v⁻¹), according to Rempel et al. (2018). 	Bioethanol production	Bioethanol production from hydrolyzed biomass showed 4,664 kJ kg ⁻¹	Rempel et al. (2021)

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
Lipases, phospholipases, protease, and cellulase	<i>Chlorella vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> The dosage of each enzyme was 2% (v w⁻¹); Enzymatic hydrolysis by cellulase and protease was carried out at 45°C while the experiments with lipase and phospholipase A1 were performed at 37°C. 	Obtaining lipids, proteins, and carbohydrates	The maximum yield of 88% of lipids in the solid phase while 74% of carbohydrates and 68% of proteins were separated in the liquid phase.	Alavijeh et al. (2020)
Commercial enzymes α -amylase (Liquozyme) and glucoamylase (Dextrozyme), Cellic CTec2, and Cellic HTec2	<i>Haematococcus pluvialis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Four different hydrolysis (α-amylase+glucoamylase, α-amylase+glucoamylase, CTec2+HTec2 and CTec2+HTec2+α-amylase+glucoamylase); Hydrolysis time ranging from 2 h to 49 h; pH ranging between 4.5 and 6 and temperature from 45 to 90 °C. 	Production of glucose and bioethanol	7.2% glucose yield and 88.1% ethanol yield in the combined use of commercial enzymes	Hosseini et al. (2020)
Commercially produced cellulase, α -amylase, β -glucosidase, and amyloglucosidase	<i>Hindakia tetrachotoma</i>	<ul style="list-style-type: none"> Lyophilized microalgae (10 g L⁻¹) and enzymes with maximum activity; pH de 5.5; β-glycosidase and cellulase 	Bioethanol production	Enzymatic hydrolysis with β -glucosidase/cellulase + α -amylase showed the highest saccharification values with 92.3 \pm 0.9%.	Onay (2019)

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
		at 65 °C and α -amylase at 95 °C for 2 h.			
Commercially produced cellulase	Mixed microalgae	<ul style="list-style-type: none"> • Concentration of: 25, 50, 75 and 100 g L⁻¹ of microalgal biomass; • Concentration of 0.416 mg protein mL⁻¹ of cellulase; • Temperature ranges from 30-50°C and pH ranges from 4–6. 	Glucose yield for bioethanol production	The highest glucose yield (57%) (microalgae biomass of 50 g L ⁻¹ , pH 5, and temperature of 50°C)	Shokrkar; Ebrahimi; Zamani (2018)
Commercial enzymes Cellulase (Celluclast 1.5 L) and pectinase (Pectinex SP-L)	<i>Porphyridium cruentum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • AEnzymatic hydrolysis was performed with samples of SPC (seawater <i>P. cruentum</i>) and FPC (freshwater <i>P. cruentum</i>); • 1% (w/v) dry matter, pectinase (4.8 mg/g BW), cellulase (7.2 mg g⁻¹ BW), 0.1% (w v⁻¹) yeast extract, peptone at 0. 2% (w v⁻¹) and 50 mM citrate buffer (pH 4.8) at 37°C for 7 h. 	Conversion of glucose to bioethanol production	Glucose yield of 89.8% and 85.3% of glucose for SPC and FPC, respectively.	Kim; Oh; Bae (2017)
Commercial enzymes cellulase (Celluclast 1.5 L) and β -	<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>S. quadricauda</i> ,	<ul style="list-style-type: none"> • The hydrolysis tests of untreated and pre-treated microalgae were carried out at concentrations of 6% w/w of dry solid and a mixture of 	Production of sugars (glucose, xylose, cellobiose, and arabinose)	55-90% sugar extraction for experiments A1 and A2	Juárez et al. (2016)

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
glucosidase (20 CBU g ⁻¹))	<i>Nitzschia</i> sp. <i>e</i> <i>Aphanothece</i> sp.	cellulose (dry basis); <ul style="list-style-type: none"> pH was adjusted to 4.9 ± 0.1. 			
Commercially produced cellulase, pectinase, and hemicellulase	<i>Scenedesmus</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> Biomass concentration between 2.5 and 10g L⁻¹; Temperature from 30 to 60 °C; The pH of 3.5 to 5.0; Protein cellulase:pectinase:hemicellulase weight ratio in 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:1 and 1:1:2 (w/w/w). 	Enzymatic oil extraction	Maximum yield of extracted oil reached 86.1% (algae concentration at 2.5 g L ⁻¹ , temperature 30/50°C, pH 3.5/4.5) and a cellulase:pectinase:hemicellulase ratio of 1:1 :1 or 1:2:1 (w/w/w)	Huo et al. (2015)
Commercial enzymes Cellulases (Celluclast 1.5 L) and β-glucosidases (Novozyme 188)	<i>Chlorella vulgaris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. vulgaris</i> cells in buffer solution were mixed with 2% (v v⁻¹) Celluclast 1.5 L and 1% (v v⁻¹) Novozyme 188; The pH varied to 3.8, 4.8, and 5.8 at 50°C; The temperature varied between 40, 50, and 60°C at pH 4.8; The concentration of <i>C. vulgaris</i> was varied to 1, 2, 3, 4, and 5% by weight at pH 4.8 and 50°C. 	Lipid extraction	The maximum hydrolysis yield was 85.3% lipid extraction	Cho et al. (2013)

Enzymes	Microalgae	Experimental conditions	Bioproducts/bioprocess	Hydrolysis efficiency	Reference
Commercial enzymes (Celluclast 1.5 L, Novoprime B957, AMG 300 L, and Viscozyme L)	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 5% (w v⁻¹) of residual biomass; • Temperatures (35-55 °C) and pH (3.5-6.5); • The reaction mixture was incubated with Celluclast 1.5 L, Novoprime B957, AMG 300L, and/or Viscozyme L; • The enzyme in the range of 0.1-1.0 mL g⁻¹ was used based on the dry mass of residual biomass. 	Lipid extraction for bioethanol production	Saccharification with AMG 300 L produced 21.0 mg mL ⁻¹ of reducing sugar with a yield of 42.0% (w w ⁻¹) based on residual biomass at pH 5.5 and 55 °C.	Lee et al. (2012)
Enzimas com erciais (Alcalase 2,5 L e Flavourzime 1000 mL)	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • In the first step, the biomass was transferred to the hydrolysis reactor by 2.5 L alkalase with a temperature of 50°C and pH 8.0; • In the second stage, the pH was reduced to 7.0 and then the second Flavourzyme 1000L enzyme was added; • Optimal enzyme conditions were recommended by enzyme suppliers. 	L-amino acid production	59% yield in amino acid production	García; Fernández; Sevilla (2012)

The studies presented used a wide range of enzymes in the process of enzymatic hydrolysis of microalgal biomass, highlighting: cellulases, amylases, proteases, pectinases, lipases, and others. Among the biomolecules and bioproducts of interest are lipids, proteins and carbohydrates, and bioethanol and biohydrogen, respectively.

Zhang et al. (2022) used six different commercial enzymes in the enzymatic hydrolysis process to evaluate the production of lipids from the biomass of the eukaryotic microalgae *Scenedesmus* sp. being the enzymes applied individually (with pH ranging from 3.0 to 8.0 and temperature from 35 to 65°C, as indicated by the manufacturer) and in a mix of enzymes (with pH of 4.5 and temperature of 55°C) with enzyme concentrations of 5, 20, 40 and 80 mg g⁻¹. As a result, they obtained 100% lipid recovery in the assay using an enzyme mix (pectinase, cellulase, and xylanase at concentrations of 10, 20, and 14 mg g⁻¹, respectively). Since cellulase can effectively degrade the cellulose structure in the cell walls of algae, which could promote lipid release from intracellular microalgae, moreover, xylanase and pectinase mainly composed of xylanhydrolase and polygalacturonase, respectively, could specifically damage the structure of hemicellulose and pectin in the cell wall of microalgae (Miedes & Lorences, 2006, Maffei et al., 2018, Liu et al., 2018).

To produce biohydrogen, Liu et al. (2021) evaluated the efficiency of enzymatic hydrolysis of *Chlorella vulgaris* (eukaryotic) biomass using proteolytic and cellulolytic enzymes. The results showed that, when using cellulase alone, with pH 7.0, 25.99 mL g⁻¹ of biohydrogen (in dry cell weight) were obtained. Using the protease alone with pH 8.0, 16.47 mL g⁻¹ of biohydrogen were obtained. The best results were obtained using the enzymes together (cellulase and protease) with pH 7.0, with a production of 27.43 mL g⁻¹ of biohydrogen, following the strategy of performing hydrolysis by protease first, followed by hydrolysis with cellulase. For the authors, the advantage of this enzymatic hydrolysis strategy was the solubilization of proteins in the first part of the hydrolysis and the separation of carbohydrates afterward.

Alavijeh et al. (2021) also used the biomass of *Chlorella vulgaris*, however, for the extraction of lipids, proteins, and carbohydrates, the process was carried out by milling the biomass followed by enzymatic hydrolysis carried out with different enzymes (cellulase, lipase, phospholipase, and protease) and the dosage of each enzyme was adjusted to 2% (v w⁻¹) under hydrolysis conditions. The maximum recovery yield for all components was obtained after enzymatic hydrolysis of the biomass by lipases, without the addition of other enzymes, at 37°C and pH 7.4 for 24 h, producing 88% of lipids in the solid phase while 74% of carbohydrates and 68% of proteins were separated in the liquid phase. Some studies indicate that lipases can

act in the release of proteins and carbohydrates in the liquid phase and later purified lipids in the solid phase, mainly due to the potential of lipases to digest the monolayer of polar lipids or membrane proteins that cover the lipid droplets (Alavijeh et al., 2021; Dixon & Wilken, 2018).

Peron-Schlosser et al. (2021) used commercial enzymes in the enzymatic hydrolysis process, in which the enzymes α -amylase (Liquozyme® Supra 2.2X) and amyloglucosidase (AMG® 300 L) were used simultaneously in the hydrolysis of residues from the process of extracting proteins from biomass of the prokaryotic microalgae *Arthrospira platensis*, for the production of ethanol in the biorefinery concept, the concentration of each enzyme was varied in 0.5, 1.0 and 1.5%, ($v v^{-1}$), pH from 5.5 to 50°C. Over 12 h, 8.06 g L⁻¹ of bioethanol were obtained, with a theoretical yield of 100%. Still, it is important to point out that the medium was not supplemented, which means that the nutrients present in the hydrolyzate were sufficient for the full development of the alcoholic fermentation.

Aikawa et al. (2018) carried out the production of bioethanol from the microalgae *Arthrospira platensis* using amyolytic enzymes and CaCl₂ supplementation. The authors evaluated the enzymatic hydrolysis process simultaneously with the alcoholic fermentation, using genetic biotechnology, in the studies a recombinant yeast strain *S. cerevisiae* was used, which was able to maintain the α -amylase of the bacterium *Streptococcus bovis* and also to exhibit glucoamylase from *Rhizopus oryzae*. They tested it on the surface of *A. platensis* to eliminate the need for biomass pretreatment and amylase hydrolysis, with or without CaCl₂. However, the ethanol productivity was only increased with the addition of 100 mM of CaCl₂, which helped to break the surface layer of polysaccharides of *Arthrospira platensis*. In this way, they directly converted *A. platensis* biomass into ethanol with a yield of 32% (gEtOH g⁻¹ Biomass).

Simultaneously using commercial enzymes alpha-amylase (Liquozyme® Supra 2.2X) and amyloglycosity (AMG® 300L), both from Novozymes, Rempel et al. (2018) evaluated the saccharification efficiency of the prokaryotic microalgae *S. platensis* biomass for bioethanol production. Enzymes were used freely (1% $v v^{-1}$) and immobilized (1% $v v^{-1}$) with a pH of 5.5 and temperature of 50°C, reaching hydrolysis efficiency of 99% and 83%, respectively. Both free and immobilized, the enzymes proved to be efficient in converting polysaccharides into simple sugars, being a promising alternative in the production of biofuels from microalgae.

Rojo et al. (2021) evaluated the release of carbohydrates from microalgae-bacteria biomasses of eukaryotic characteristics, using different enzymes (Alcalase 2.4L, Protamex, and Celluclast 1.5L – Novozymes®). The highest carbohydrate release was 38.5%, with the use of a cellulolytic enzyme (Celluclast 1.5 L) at pH 6.5 at 50°C and hydrolysis time of 5 hours. He et

al. (2020) used several enzymes to convert the biomass of the eukaryotic microalgae *Nannochloropsis* into biodiesel, including Celluclast 1.5 L (Novozymes®). The enzyme was able to hydrolyze the microalgal cell and approximately 170 mg g⁻¹ of lipids and recovery of 35% methyl esters of fatty acids were obtained.

In a study carried out by El-Mashad (2015), the potential for the production of bioethanol and biomethane from the enzymatic hydrolysis of the prokaryotic microalgae *S. platensis* and lignocellulosic biomass were evaluated. The biomasses were evaluated jointly and individually. For the hydrolysis process, two commercial cellulase enzymes (Novozymes® 188 and Celluclast 1.5 L) were used simultaneously. After 96 h of saccharification, results of 141.21 mg g⁻¹ of glucose and 66.5 mg g⁻¹ of xylose were obtained, with an ethanol production potential of 166 l.ton⁻¹. Regarding biomethane production, gross energy values of 6774 MJ ton⁻¹ were estimated. The results were obtained for the biomasses without pre-treatment, using the associated biomasses, showing the efficiency of cellulase enzymes in the hydrolysis of both microalgae and lignocellulosic matrices.

Bader et al. (2020), in turn, studied the saccharification of the biomass of the eukaryotic microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* through enzymes released in the growth of the fungus *Trichoderma harzianum*, with pectinolytic, amylolytic and cellulolytic activities being detected. To optimize the hydrolysis of the biomass, different combinations of temperature (40°C, 50°C, or 60°C) and pH (5, 7, or 9) were analyzed. At the end of the saccharification, 22.4 g L⁻¹ reducing sugars were reached, which is promising for the conversion of microalgal strains for the production of bioethanol. Velazquez-Lucio et al. (2018) discusses that in addition to many high-value molecules, microalgae cells can accumulate neutral lipids (20 to 60% of dry weight) and storage polysaccharides (20 to 50% starch), which can be used for the production of bioethanol.

For the hydrolysis of *Chlorella vulgaris* biomass, Ho et al. (2013) carried out a comparative study between acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis (α -amylase and amyloglycosity) for the production of bioethanol. Hydrolysis yields of 87.6% were obtained for acid hydrolysis and 89.3% for enzymatic hydrolysis. Choi et al. (2010) using the same enzymes for the conversion of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass into bioethanol, obtained yields of 90%.

A study by Ortega and Galán (2021) proves that, in addition to cellulose and hemicellulose, the microalgae in the study are made up of complex structures, such as pectins, and that, for example, due to the action of pectinase, arabinose released increased, as a consequence of the degradation of arabinans present in the main structure of pectins.

Furthermore, in the Pectinex-Celluclast-Viscozyme enzyme mixture, the authors reported the breakdown of pectins and polygalacturonic acids, to improve the interaction between cellulolytic, hemicellulolytic, cellulose, and hemicellulose enzymes present in the residual biomass of the microalgae biomass, increasing the amounts of glucose and final xylose.

In a study carried out by Lee et al. (2013), the enzymes Celluclast 1.5 L, Novoprime B957, AMG 300 L, and/or Viscozyme L (Novozymes®) were used for saccharification of the biomass of the eukaryotic alga *Dunaliella tertiolecta* and production of bioethanol. Biomass was used after lipid extraction to produce biodiesel. The results showed a hydrolysis efficiency of 42% for the residual biomass (pH 5.5 and temperature of 55°C), with the release of 21 mg mL⁻¹ of reducing sugars. The bioethanol yield was 0.14 g ethanol g⁻¹ of biomass and 0.44 (g of ethanol) (g⁻¹ glucose).

Hosseini et al. (2020) implemented a biorefinery approach to produce the antioxidant astaxanthin and the biofuels bioethanol and biogas from the biomass of the eukaryotic microalgae *Haematococcus pluvialis*. First, the authors performed the extraction of astaxanthin, for subsequent enzymatic hydrolysis of the biomass to produce bioethanol. Four different hydrolysis processes were used with pH and temperatures varying between 4.5 and 6.5 and 45 and 90°C. An efficiency of 97.2% was obtained on the total residual glucan, which was then fermented to produce 0.21 g ethanol g⁻¹ of residual biomass. The hydrolysis that obtained the best results was performed using α -amylase (Liquezyme) and glucoamylase (Dextrozyme GA), both with an enzyme load of 10 μ L g⁻¹ of residual biomass, for the hydrolysis of α -glucans, and a mixture of cellulases to hydrolysis of β -glucans (Cellic CTec2 and Cellic HTec2), using 10 FPU g⁻¹ of residual biomass.

Garcia et al. (2012) performed enzymatic hydrolysis of *Scenedesmus almeriensis* biomass for amino acid production using commercial enzymes Alcalase 2.5 L and Flavourzyme 1000mL at concentrations of 2.5 AU-A g⁻¹ and 1000 AU-A g⁻¹, respectively, following the recommendations of the manufacturer (Novozymes®). The temperature was set at 50°C and the pH was adjusted to 8.0 during the period of action of Alcalase 2.5 L, and then to 7.0 for the addition of Flavourzyme 1000 mL, the study was separated into two hydrolysis steps. The data show that carrying out a second hydrolysis step increases the degree of hydrolysis from 51% to 59%. The authors also address that the concentration of biomass and enzymes during the enzymatic hydrolysis process are important operational parameters and, therefore, need to be optimized, mainly because enzymes are expensive and therefore are used in concentrations as low as possible, which are normally between 1% and 5% in this type of application.

Although much of the genetic resources of microalgae remain unexplored, an increasing number of enzymes with potential applications in the food, pharmaceutical, and chemical industry have been reported, some of the most important challenges will be to increase the concentration of enzymes and reduce the cost of downstream operations (Brasil et al., 2017). In addition, with advancing technologies, more stable and efficient enzymes can be obtained through genetic engineering and the study of enzyme immobilization techniques can considerably affect enzyme pretreatment (Barati et al., 2021). Furthermore, synthetic biology can be applied to obtain enzymes with greater efficiency, for example, thermostable enzymes can be exploited to increase biomass hydrolysis (Tiwari et al., 2017; Shukla, 2019).

The advances, coupled with the use of all algal biomass to produce various bioproducts in a biorefinery strategy, offer promising possibilities to overcome these limitations and achieve cost-effective production of industrial enzymes in microalgae cells in the future (Chisti, 2007). Microalgae biorefinery involves the combination of technologies of harvesting, fractionation, hydrolysis of algal biomass, and conversion into products with the concomitant recovery of intermediate products, thus, a biorefinery approach in microalgae technology is essential from an economic perspective, as the cultivation of Microalgae exclusively for the purpose of biofuel production is quite expensive and the cost of the product is not competitive with conventional chemicals available on the market, in addition, microalgae biomass has great potential for a diverse number of products such as food biochemicals, nutraceuticals, cosmetics, and fuel production (Hughes et al., 2013; Brasil et al., 2017).

5 Conclusions

Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass to obtain biomolecules of industrial interest, such as carbohydrates, proteins, lipids, and even bioactive compounds, has been the subject of studies for some time. However, some factors need to be considered to optimize the enzymatic hydrolysis process, mainly due to the characteristics of microalgal biomass and enzymes. This is because the way of adding the enzymes varies according to the species of microalgae applied, with amylases and cellulases being the most used enzymes in the enzymatic hydrolysis of microalgae. Still, there is a need to characterize mainly the pH, temperature, and hydrolysis time of the enzymes used, mainly due to the variation of enzymatic activity of each enzyme.

It is also important to highlight the importance of pre-treatments carried out to break the cell walls of the microalgal biomass, making the subsequent process of enzymatic hydrolysis more efficient. enzymatic analysis of microalgal biomass.

References

- Ahn, Y., Park, S., Ji, M. K., Ha, G. S., Jeon, B. H., & Choi, J. (2022). Biodiesel production potential of microalgae, cultivated in acid mine drainage and livestock wastewater. *Journal of Environmental Management*, 314, 115031.
- Aikawa, S., Inokuma, K., Wakai, S., Sasaki, K., Ogino, C., Chang, J. S., ... & Kondo, A. (2018). Direct and highly productive conversion of cyanobacteria *Arthrospira platensis* to ethanol with CaCl₂ addition. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1-9.
- Al Abdallah, Q., Nixon, B. T., & Fortwendel, J. R. (2016). The enzymatic conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in energy research*, 4, 36.
- Alavijeh, R. S., Karimi, K., Wijffels, R. H., van den Berg, C., & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource technology*, 309, 123321.
- Amor, A. J., Schmitz, K. R., Baker, T. A., & Sauer, R. T. (2019). Roles of the ClpX IGF loops in ClpP association, dissociation, and protein degradation. *Protein Science*, 28(4), 756-765.
- Bader, A. N., Rizza, L. S., Consolo, V. F., & Curatti, L. (2020). Efficient saccharification of microalgal biomass by *Trichoderma harzianum* enzymes for the production of ethanol. *Algal Research*, 48, 101926.
- Bahlawan, S., Ash, Z., Damayanti, A., Putri, A., Dewi, R., Triwibowo, B., & Prasetiawan, H. (2022). Comparative Study on the Various Hydrolysis and Fermentation Methods of *Chlorella vulgaris* Biomass for the Production of Bioethanol. *International Journal of Renewable Energy Development*, 11(2).
- Barati, B., Zafar, F. F., Rupani, P. F., & Wang, S. (2021). Bacterial pretreatment of microalgae and the potential of novel nature hydrolytic sources. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101362.
- Barbosa, M., Moura, S., Araujo, A., Quirino, B., Souto, B. D. M., & Salles, R. (2021). Xilanases microbianas e suas aplicações industriais. *Embrapa Agroenergia-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Barrett, A. J. (2000). Proteases. *Current Protocols in Protein Science*, 21(1), 21-1.
- Beliën, T., Van Campenhout, S., Robben, J., & Volckaert, G. (2006). Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1072-1081.

- Bocken, N. M., & Short, S. W. (2021). Unsustainable business models—Recognising and resolving institutionalised social and environmental harm. *Journal of Cleaner Production*, *312*, 127828.
- Brasil, B. D. S. A. F., de Siqueira, F. G., Salum, T. F. C., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2017). Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal research*, *25*, 76-89.
- Burczyk, J., Śmietana, B., Termińska-Pabis, K., Zych, M., & Kowalowski, P. (1999). Comparison of nitrogen content amino acid composition and glucosamine content of cell walls of various chlorococcalean algae. *Phytochemistry*, *51*(4), 491-497.
- Burlacu, A., Cornea, C. P., & Israel-Roming, F. (2016). Microbial xylanase: a review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, *20*, 335-342.
- Camargo, S., Leshkowitz, D., Dassa, B., Mariscal, V., Flores, E., Stavans, J., & Arbel-Goren, R. (2021). Impaired cell-cell communication in the multicellular cyanobacterium *Anabaena* affects carbon uptake, photosynthesis, and the cell wall. *Iscience*, *24*(1), 101977.
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, *176*, 108183.
- Cheirsilp, B., & Maneechote, W. (2022). Insight on zero waste approach for sustainable microalgae biorefinery: Sequential fractionation, conversion and applications for high-to-low value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 101003.
- Chen, W., Xu, J., Yu, Q., Yuan, Z., Kong, X., Sun, Y., ... & Guo, Y. (2020). Structural insights reveal the effective *Spirulina platensis* cell wall dissociation methods for multi-output recovery. *Bioresource Technology*, *300*, 122628.
- Cheng, P., Huang, J., Song, X., Yao, T., Jiang, J., Zhou, C., ... & Ruan, R. (2022). Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae to simultaneously achieve furfural wastewater treatment and lipid production. *Bioresource Technology*, *349*, 126888.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *91*, 332-344.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, *25*(3), 294-306.
- Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W., & Park, J. Y. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, *54*, 156-160.
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, *33*(7), 1443-1454.
- Choi, S. P., Nguyen, M. T., & Sim, S. J. (2010). Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource technology*, *101*(14), 5330-5336.

- Clark, J. M., Nimlos, M. R., & Robichaud, D. J. (2015). Bimolecular decomposition pathways for carboxylic acids of relevance to biofuels. *The Journal of Physical Chemistry A*, *119*(3), 501-516.
- Colla, L. M., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. V. (2004). Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *59*(1-2), 55-59.
- Constantino, A., Rodrigues, B., Leon, R., Barros, R., & Raposo, S. (2021). Alternative chemo-enzymatic hydrolysis strategy applied to different microalgae species for bioethanol production. *Algal Research*, *56*, 102329.
- De Corato, U., De Bari, I., Viola, E., & Pugliese, M. (2018). Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *88*, 326-346.
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, *5*(1), 1-24.
- Domozych, D. S., Ciancia, M., Fangel, J. U., Mikkelsen, M. D., Ulvskov, P., & Willats, W. G. (2012). The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in plant science*, *3*, 82.
- Dragone, G. (2022). Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *160*, 112284.
- Ebhodaghe, S. O., Imanah, O. E., & Ndibe, H. (2022). Biofuels from microalgae biomass: A review of conversion processes and procedures. *Arabian Journal of Chemistry*, *15*(2), 103591.
- El-Mashad, H. M. (2015). Biomethane and ethanol production potential of *Spirulina platensis* algae and enzymatically saccharified switchgrass. *Biochemical Engineering Journal*, *93*, 119-127.
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Ferreira, A. F., Tavares, M. L., Vladic, J., Vidović, S., ... & Gouveia, L. (2019). *Scenedesmus obliquus* microalga-based biorefinery—from brewery effluent to bioactive compounds, biofuels and biofertilizers—aiming at a circular bioeconomy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *13*(5), 1169-1186.
- Frank, H., Lefort, M., & Martin, H. (1962). Chemical analysis of a mucopolymer component in cell walls of the blue-green alga *Phormidium uncinatum*. *Biochemical and biophysical research communications*, *7*(4), 322-325.
- Fu, C. C., Hung, T. C., Chen, J. Y., Su, C. H., & Wu, W. T. (2010). Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, *101*(22), 8750-8754.

Gaete, A. V., de Souza Teodoro, C. E., & Martinazzo, A. P. (2020). Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulose: uma revisão. *Research, Society and Development*, 9(8), e567985785-e567985785.

Gao, P., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & She, Z. (2022). Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of environmental management*, 302, 114095..

García, J. R., Fernández, F. A., & Sevilla, J. F. (2012). Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 112, 164-170.

Giang, T. T., Lunprom, S., Liao, Q., Reungsang, A., & Salakkam, A. (2019). Enhancing hydrogen production from *Chlorella* sp. biomass by pre-hydrolysis with Simultaneous Saccharification and Fermentation (PSSF). *Energies*, 12(5), 908.

Gruber-Brunhumer, M. R., Jerney, J., Zohar, E., Nussbaumer, M., Hieger, C., Bromberger, P., ... & Drosch, B. (2016). Associated effects of storage and mechanical pre-treatments of microalgae biomass on biomethane yields in anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 93, 259-268.

Gupta, S., Kapoor, M., Sharma, K. K., Nair, L. M., & Kuhad, R. C. (2008). Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Bioresource technology*, 99(5), 937-945.

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254-267.

Gusakov, A. V., Salanovich, T. N., Antonov, A. I., Ustinov, B. B., Okunev, O. N., Burlingame, R., ... & Sinitzyn, A. P. (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 97(5), 1028-1038.

Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied energy*, 91(1), 116-121.

Hamed, S. B., Hamed, M. B. B., Kassouar, S., & Abi Ayad, S. M. E. A. (2016). Physicochemical analysis of cellulose from microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *African Journal of Biotechnology*, 15(24), 1201-1206.

Harun, R., & Danquah, M. K. (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 46(1), 304-309.

Harun, R., Yip, J. W., Thiruvankadam, S., Ghani, W. A., Cherrington, T., & Danquah, M. K. (2014). Algal biomass conversion to bioethanol—a step-by-step assessment. *Biotechnology journal*, 9(1), 73-86.

Hasunuma, T., Kikuyama, F., Matsuda, M., Aikawa, S., Izumi, Y., & Kondo, A. (2013). Dynamic metabolic profiling of cyanobacterial glycogen biosynthesis under conditions of nitrate depletion. *Journal of experimental botany*, 64(10), 2943-2954.

- He, Y., Zhang, B., Guo, S., Guo, Z., Chen, B., & Wang, M. (2020). Sustainable biodiesel production from the green microalgae *Nannochloropsis*: Novel integrated processes from cultivation to enzyme-assisted extraction and ethanolysis of lipids. *Energy Conversion and Management*, *209*, 112618.
- Henrissat, B., & Coutinho, P. M. (2001). Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles. In *Methods in enzymology* (Vol. 330, pp. 183-201). Academic Press.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresource technology*, *135*, 157-165.
- Hosseini, A., Jazini, M., Mahdieh, M., & Karimi, K. (2020). Efficient superantioxidant and biofuel production from microalga *Haematococcus pluvialis* via a biorefinery approach. *Bioresource Technology*, *306*, 123100.
- Hughes, S. R., Gibbons, W. R., Moser, B. R., & Rich, J. O. (2013). Sustainable multipurpose biorefineries for third-generation biofuels and value-added co-products. *Biofuels-economy, environment and sustainability*, *2013*, 245-262.
- Huo, S., Wang, Z., Cui, F., Zou, B., Zhao, P., & Yuan, Z. (2015). Enzyme-assisted extraction of oil from wet microalgae *Scenedesmus* sp. G4. *Energies*, *8*(8), 8165-8174.
- Jiang, J., Yao, C., Cao, X., Liu, Y., & Xue, S. (2017). Characterization of starch phosphorylase from the marine green microalga (*Chlorophyta*) *Tetraselmis subcordiformis* reveals its potential role in starch biosynthesis. *Journal of plant physiology*, *218*, 84-93.
- John, J., Kaimal, K. S., Smith, M. L., Rahman, P. K., & Chellam, P. V. (2020). Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *162*, 1086-1099.
- Juárez, J. M., Hernando, A. L., Torre, R. M., Lanza, S. B., & Rodríguez, S. B. (2016). Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, *218*, 265-271.
- Junior, A. D. N. F., Etchebehere, C., Perecin, D., Teixeira, S., & Woods, J. (2022). Advancing anaerobic digestion of sugarcane vinasse: Current development, struggles and future trends on production and end-uses of biogas in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *157*, 112045.
- Khan, M. I., Lee, M. G., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2017). Pretreatment optimization of the biomass of *Microcystis aeruginosa* for efficient bioethanol production. *Amb Express*, *7*(1), 1-9.
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial cell factories*, *17*(1), 1-21.

- Khan, S. A., Sharma, G. K., Malla, F. A., Kumar, A., & Gupta, N. (2019). Microalgae based biofertilizers: a biorefinery approach to phycoremediate wastewater and harvest biodiesel and manure. *Journal of Cleaner production*, *211*, 1412-1419.
- Kim, H. M., Oh, C. H., & Bae, H. J. (2017). Comparison of red microalgae (*Porphyridium cruentum*) culture conditions for bioethanol production. *Bioresource technology*, *233*, 44-50.
- Kim, K. H., Choi, I. S., Kim, H. M., Wi, S. G., & Bae, H. J. (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, *153*, 47-54.
- Kocabaş, D. S., Güder, S., & Özben, N. (2015). Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *115*, 66-75.
- Kumar, K. S., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae—a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, *113*, 329-352.
- Kusmiyati, K., Heratri, A., Kubikazari, S., Hidayat, A., & Hadiyanto, H. (2020). Hydrolysis of Microalgae *Spirulina platensis*, *Chlorella sp.*, and Macroalgae *Ulva lactuca* for Bioethanol Production. *International Energy Journal*, *20*(4).
- Lee, O. K., Kim, A. L., Seong, D. H., Lee, C. G., Jung, Y. T., Lee, J. W., & Lee, E. Y. (2013). Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource technology*, *132*, 197-201.
- Li, X., Dreher, T. W., & Li, R. (2016). An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (Anabaena) species. *Harmful algae*, *54*, 54-68.
- Liu, H., Ru, G., Zhang, Z., Li, Y., Xia, C., Lu, C., & Zhang, Q. (2021). Experimental study on optimization of initial pH for photo-fermentation bio-hydrogen under different enzymatic hydrolysis of *chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, *338*, 125571.
- Liu, H., Zhang, Z., Lu, C., Wang, J., Wang, K., Guo, S., & Zhang, Q. (2022). Effects of enzymatic hydrolysis and alkalization pretreatment on biohydrogen production by chlorella photosynthesis. *Bioresource Technology*, *349*, 126859.
- Liu, H., Zhang, Z., Zhang, H., Lee, D. J., Zhang, Q., Lu, C., & He, C. (2020). Evaluation of hydrogen yield potential from *Chlorella* by photo-fermentation under diverse substrate concentration and enzyme loading. *Bioresource Technology*, *303*, 122956.
- Liu, W., Chen, W., Hou, Q., Wang, S., & Liu, F. (2018). Effects of combined pretreatment of dilute acid pre-extraction and chemical-assisted mechanical refining on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *RSC advances*, *8*(19), 10207-10214.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, *66*(3), 506-577.

- Magro, F. G., Freitag, J. F., Bergoli, A., Cavanhi, V. A. F., & Colla, L. M. (2021). Microalgae consortia cultivation using effluents for bioproduct manufacture. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(3), 865-886.
- Maity, S., & Mallick, N. (2022). Trends and advances in sustainable bioethanol production by marine microalgae: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 131153.
- Malakar, B., Das, D., & Mohanty, K. (2020). Optimization of glucose yield from potato and sweet lime peel waste through different pre-treatment techniques along with enzyme assisted hydrolysis towards liquid biofuel. *Renewable Energy*, 145, 2723-2732.
- Margarites, A. C., Volpato, N., Araújo, E., Cardoso, L. G., Bertolin, T. E., Colla, L. M., & Costa, J. A. V. (2017). *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. *Environmental technology*, 38(17), 2209-2216.
- McAllister, T. G., Wood, S. A., & Hawes, I. (2016). The rise of toxic benthic *Phormidium* proliferations: a review of their taxonomy, distribution, toxin content and factors regulating prevalence and increased severity. *Harmful Algae*, 55, 282-294.
- Miedes, E., & Lorences, E. P. (2006). Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1359-1364.
- Mobin, S. M., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications—A review. *Energy Procedia*, 160, 752-760.
- Monjed, M. K., Achour, B., Robson, G. D., & Pittman, J. K. (2021). Improved saccharification of *Chlorella vulgaris* biomass by fungal secreted enzymes for bioethanol production. *Algal Research*, 58, 102402.
- Moreira, J. B., Santos, T. D., Duarte, J. H., Bezerra, P. Q. M., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2021). Role of microalgae in circular bioeconomy: from waste treatment to biofuel production. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 1-11.
- Mota, G. F., de Sousa, I. G., de Oliveira, A. L. B., Cavalcante, A. L. G., da Silva Moreira, K., Cavalcante, F. T. T., ... & dos Santos, J. C. (2022). Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. *Algal Research*, 62, 102616.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., ... & Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology advances*, 28(6), 817-830.
- Neves, S. A., & Marques, A. C. (2021). The substitution of fossil fuels in the US transportation energy mix: Are emissions decoupling from economic growth?. *Research in Transportation Economics*, 90, 101036.
- Ngamsirisomsakul, M., Reungsang, A., Liao, Q., & Kongkeitkajorn, M. B. (2019). Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Renewable Energy*, 141, 482-492.

- Nguyen, T. T., Heimann, K., & Zhang, W. (2020). Protein recovery from underutilised marine bioresources for product development with nutraceutical and pharmaceutical bioactivities. *Marine Drugs*, *18*(8), 391.
- Northcote, D. H., Goulding, K. J., & Horne, R. W. (1958). The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Journal*, *70*(3), 391.
- Ogawa, K., Yamaura, M., Ikeda, Y., & KONDO, S. (1998). New aldobiuronic acid, 3-O- α -d-glucopyranuronosyl-1-rhamnopyranose, from an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *62*(10), 2030-2031.
- Onay, M. (2019). Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetrachotoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. *Fuel*, *239*, 1315-1323.
- Ortega, J. L. S., & Galán, J. E. L. (2021). Hidrólise Enzimática de Carboidratos Restos na Biomassa de Microalga *Chlorella vulgaris*.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, *31*(2), 135-152.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, *31*(2), 135-152.
- Paritosh, K., Kushwaha, S. K., Yadav, M., Pareek, N., Chawade, A., & Vivekanand, V. (2017). Food waste to energy: an overview of sustainable approaches for food waste management and nutrient recycling. *BioMed research international*, 2017.
- Patel, A. K., Joun, J. M., Hong, M. E., & Sim, S. J. (2019). Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. *Bioresource technology*, *282*, 245-253.
- Peng, H., Zhai, L., Xu, S., Xu, P., He, C., Xiao, Y., & Gao, Y. (2018). Efficient Hydrolysis of Raw Microalgae Starch by an α -Amylase (AmyP) of Glycoside Hydrolase Subfamily GH13_37. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(48), 12748-12755.
- Peron-Schlosser, B., Stobienia, M., Bispo, L. D. O., Colla, L. M., Baraldi, I. J., & Colla, E. (2021). Residual fractions from *arthrospira platensis* protein extraction as feedstock for ethanol production. *Biocatalysis and Biotransformation*, *39*(5), 378-388.
- Peter, A. P., Koyande, A. K., Chew, K. W., Ho, S. H., Chen, W. H., Chang, J. S., ... & Show, P. L. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *154*, 111852.
- Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2010). Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical reviews in biotechnology*, *30*(3), 176-191.

Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., & Fickers, P. (2015). Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(2), 1.

Rearte, T. A., Rodriguez, N., Sabatté, F., & de Iorio, A. F. (2021). Unicellular microalgae vs. filamentous algae for wastewater treatment and nutrient recovery. *Algal Research*, 59, 102442.

Rempel, A., Machado, T., Treichel, H., Colla, E., Margarites, A. C., & Colla, L. M. (2018). Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. *Bioresource technology*, 263, 163-171.

Rempel, A., Nadal Biolchi, G., Farezin Antunes, A. C., Gutkoski, J. P., Treichel, H., & Colla, L. M. (2021). Cultivation of microalgae in media added of emergent pollutants and effect on growth, chemical composition, and use of biomass to enzymatic hydrolysis. *BioEnergy Research*, 14(1), 265-277.

Rempel, A., de Souza Sossella, F., Margarites, A. C., Astolfi, A. L., Steinmetz, R. L. R., Kunz, A., ... & Colla, L. M. (2019). Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. *Bioresource technology*, 288, 121588.

Rivera, O. M. P., Leos, M. D. S., Solis, V. E., & Domínguez, J. M. (2021). Recent trends on the valorization of winemaking industry wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27, 100415.

Rodrigues, É. F., Ficanha, A. M. M., Dallago, R. M., Treichel, H., Reinehr, C. O., Machado, T. P., ... & Colla, L. M. (2017). Production and purification of amylolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. *Bioresource Technology*, 225, 134-141.

Rodrigues, E. M. G. (2021). Utilização de subproduto da indústria cervejeira como substrato para a produção de amilase por fermentação em estado sólido. *Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)*, 11(1), 46-57.

Rodríguez, M. C., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (1999). The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of *Coelastrum sphaericum* (Chlorophyceae). *Journal of phycology*, 35(5), 1025-1031.

Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335, 125256.

Roostaei, J., Zhang, Y., Gopalakrishnan, K., & Ochocki, A. J. (2018). Mixotrophic microalgae biofilm: a novel algae cultivation strategy for improved productivity and cost-efficiency of biofuel feedstock production. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.

Russell, C., Rodriguez, C., & Yaseen, M. (2021). High-value biochemical products & applications of freshwater eukaryotic microalgae. *Science of The Total Environment*, 151111.

Sadka, A., Himmelhoch, S., & Zamir, A. (1991). A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, *95*(3), 822-831.

Sandani, W. P., Nishshanka, G. K. S. H., Premaratne, R. G. M. M., Wijayasekera, S. C. N., Ariyadasa, T. U., & Premachandra, J. K. (2020). Comparative assessment of pretreatment strategies for production of microalgae-based biodiesel from locally isolated *Chlorella homosphaera*. *Journal of bioscience and bioengineering*, *130*(3), 295-305.

Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W. H., & Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource technology*, *298*, 122476.

Sathya, R., MubarakAli, D., MohamedSaalis, J., & Kim, J. W. (2021). A systemic review on microalgal peptides: Bioprocess and sustainable applications. *Sustainability*, *13*(6), 3262.

Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., ... & Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy research*, *1*(1), 20-43.

Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., ... & Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic cell*, *13*(11), 1450-1464.

Sendra, M., Blasco, J., & Araújo, C. V. (2018). Is the cell wall of marine phytoplankton a protective barrier or a nanoparticle interaction site? Toxicological responses of *Chlorella autotrophica* and *Dunaliella salina* to Ag and CeO₂ nanoparticles. *Ecological Indicators*, *95*, 1053-1067.

Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2018). Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis. *Fuel*, *228*, 30-38.

Shukla, P. (2019). Synthetic biology perspectives of microbial enzymes and their innovative applications. *Indian journal of microbiology*, *59*(4), 401-409.

Siddiki, S. Y. A., Mofijur, M., Kumar, P. S., Ahmed, S. F., Inayat, A., Kusumo, F., ... & Mahlia, T. M. I. (2022). Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel*, *307*, 121782.

Sierra, L. S., Dixon, C. K., & Wilken, L. R. (2017). Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal research*, *25*, 149-159.

Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A., Cornejo, P., Kamaraj, B., & Chi, N. T. L. (2021). Removal of nutrients from domestic wastewater by microalgae coupled to lipid augmentation for biodiesel production and influence of deoiled algal biomass as biofertilizer for *Solanum lycopersicum* cultivation. *Chemosphere*, *268*, 129323.

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). α -Amylases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, 3–24.

Sossella, F. S., Rempel, A., Nunes, J. M. A., Biolchi, G., Migliavaca, R., Antunes, A. C. F., ... & Colla, L. M. (2020). Effects of harvesting *Spirulina platensis* biomass using coagulants and electrocoagulation–flotation on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 311, 123526.

Souza, M. F., Rodrigues, M. A., Freitas, S. P., & da Silva Bon, E. P. (2020). Effect of milling and enzymatic hydrolysis in the production of glucose from starch-rich *Chlorella sorokiniana* biomass. *Algal Research*, 50, 101961.

Srivastava, N., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2020). Industrial enzymes for biofuels production.

Sriyod, K., Reungsang, A., & Plangklang, P. (2021). Single and Combined Enzymatic Saccharification and Biohydrogen Production from *Chlorella* sp. Biomass. *BioEnergy Research*, 14(3), 940-953.

Templeton, D. W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D., & Laurens, L. M. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1270, 225-234.

Tiwari, R., Singh, P. K., Singh, S., Nain, P. K., Nain, L., & Shukla, P. (2017). Bioprospecting of novel thermostable β -glucosidase from *Bacillus subtilis* RA10 and its application in biomass hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-18.

Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., ... & Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci*, 4(1), 1886-1901.

Tomaselli, L. (1997). Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*), *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology, 1-16.

Udaiyappan, A. F. M., Hasan, H. A., Takriff, M. S., & Abdullah, S. R. S. (2017). A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 20, 8-21.

Van Eykelenburg, C. (1977). On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. *Antonie van leeuwenhoek*, 43(2), 89-99.

Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R. M., Colla, L. M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D. E., Aguilar, C. N., ... & Ruiz, H. A. (2018). Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review.

Virmond, E., Rocha, J. D., Moreira, R. F. P. M., & José, H. J. (2013). Valorization of agroindustrial solid residues and residues from biofuel production chains by thermochemical conversion: a review, citing Brazil as a case study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30, 197-230.

Voigt, J., Stolarczyk, A., Zych, M., Malec, P., & Burczyk, J. (2014). The cell-wall glycoproteins of the green alga *Scenedesmus obliquus*. The predominant cell-wall polypeptide of *Scenedesmus obliquus* is related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, *215*, 39-47.

Wang, M., Yin, Z., & Zeng, M. (2022). Microalgae as a promising structure ingredient in food: Obtained by simple thermal and high-speed shearing homogenization. *Food Hydrocolloids*, *131*, 107743.

Wright, J. D., Wyman, C. E., & Grohmann, K. (1988). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *18*(1), 75-90.

Zhang, Y., Kang, X., Zhen, F., Wang, Z., Kong, X., & Sun, Y. (2022). Assessment of enzyme addition strategies on the enhancement of lipid yield from microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, *177*, 108198.

Zhang, Y., Kong, X., Wang, Z., Sun, Y., Zhu, S., Li, L., & Lv, P. (2018). Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. *Renewable Energy*, *125*, 1049-1057.

Zhao, K., Zhang, M., Tian, H., Lei, F., He, D., Zheng, J., & Zhang, L. (2022). Effects of Structural and Compositional Changes of *Nanochloropsis oceanica* after Enzyme Treatment on EPA-Rich Lipids Extraction. *Marine Drugs*, *20*(3), 160.

Zhou, J., Zhang, F., Meng, H., Bao, G., Zhang, Y., & Li, Y. (2014). Development of a silicon carbide disruption method enables efficient extraction of proteins from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Process Biochemistry*, *49*(12), 2199-2202.

Zhuang, D., He, N., Khoo, K. S., Ng, E. P., Chew, K. W., & Ling, T. C. (2021). Application progress of bioactive compounds in microalgae on pharmaceutical and cosmetics. *Chemosphere*, 132932.

3 CAPÍTULO II: COLHEITA DE BIOMASSA DE *Spirulina platensis* VIA BIOFLOCULAÇÃO FÚNGICA

Resumo: O objetivo do estudo foi produzir biomassa fúngica a partir de resíduos agroindustriais para posterior utilização como biofloculante na colheita da microalga *Spirulina platensis*. A microalga foi cultivada em *raceway pond* com volume de 180 L, em planta piloto com controle de temperatura e luz natural, por 25 dias, até fase estacionária de crescimento. Para a produção do biofloculante foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*, que foi cultivado em fermentação submersa, utilizando farelo de trigo em suspensão 10%, com agitação orbital e temperatura controlada por 72 h. A biomassa fúngica foi utilizada como biofloculante em cultivos de *Spirulina platensis*. Foram testadas diferentes concentrações de biofloculante e ajuste de milivoltagem, com agitação rápida e lenta em tanques do tipo *jar test*, com repouso de 30 min após agitação. Os testes obtiveram eficiências de até 99,7% após 30 minutos de sedimentação em algumas condições experimentais. O método desenvolvido é uma alternativa promissora às técnicas tradicionais de colheita utilizadas para a microalga *Spirulina platensis*. Além de eficiente na separação da microalga, o uso de biofloculação, permite o acúmulo de biomassa fúngica, que pode ser convertida em bioprodutos de alto valor agregado, da mesma forma que as microalgas.

Palavras-chave: Biofloculação, *Aspergillus niger*, *Spirulina platensis*, fermentação submersa, sustentabilidade.

1. Introdução

O aquecimento global é provocado por fenômenos naturais e ações antrópicas, que contribuem em conjunto com emissões dos gases do efeito estufa. Dentre as ações antrópicas que mais contribuem para o aquecimento global está o uso de combustíveis fósseis, como carvão e petróleo (PERERA; NADEAU, 2022). Ao longo dos anos pesquisas buscam alternativas mais sustentáveis para os combustíveis tradicionais, como biocombustíveis oriundos de diferentes matérias-primas, como cana-de-açúcar (YADAV et al., 2022), soja (GANGOLU et al., 2022), resíduos alimentares (ZENG et al., 2022), hidrogênio (UBANDO et al., 2022) e microalgas (SUBHASH et al., 2022). As rotas de biocombustíveis de microalgas são promissoras, uma vez que não competem com áreas agricultáveis e possuem rápido crescimento, além de ser possível integrar com demais bioprocessos para a geração de novos bioprodutos por meio das biorrefinarias de microalgas (VASISTHA et al., 2023).

Para o processamento da biomassa de microalgas até biocombustíveis, torna-se necessário realizar a colheita da biomassa, sendo um dos processos que representam um dos gargalos da exploração biotecnológica de microalgas (KUMAR et al., 2022). Os métodos de colheita microalgal são baseados em processos físicos, químicos e biológicos. Em geral, todos os processos apresentam limitações, principalmente associadas ao pequeno tamanho da célula

(2-20 μm), além da superfície com cargas negativas e o custo elevado da separação da biomassa (ZHANG et al., 2019). É importante que a técnica de colheita microalgal seja eficiente, com obtenção de altas concentrações e, não modifique a biomassa ao final a ponto de necessitar processos de purificação para aplicação posterior. Ainda, deve ser levado em consideração o custo do processo, principalmente quando se trata de uso energético e manutenção de equipamentos, além do tempo necessário para a colheita (OGBONNA et al., 2021).

A biofloculação como método de colheita biológica pode ser utilizada como alternativa sustentável, na qual as células microalgais são induzidas, através da diferença de cargas elétricas, a agregar-se, com a adição de flocculantes microbianos no meio (MATTER et al., 2019; ALAM et al., 2016; GULTOM; HU, 2013; UMMALYMA et al., 2017). Como limitações, é importante ressaltar, que a eficiência de colheita pode variar entre espécies diferentes de microalgas e, também, conforme condições de cultivo, ambientais e nutricionais (MATTER et al., 2019, ROSELET et al., 2019; SINGH; PATIDAR, 2018; BARROS et al., 2015). Sabe-se que as melhores eficiências de separação são alcançadas no início da fase estacionária de crescimento microalgal (aproximadamente 95%) (NAZARI et al., 2021). Sendo assim, em diferentes fases do cultivo podem ocorrer alterações na composição intracelular, alterando a eficiência de colheita.

Para a colheita da biomassa microalgal, são relatados estudos simbióticos de interação entre microalga-bactéria (WANG et al., 2022; LAKSHMIKANDAN et al., 2021), microalga-fungo (CHU et al., 2021; LAL et al., 2021) e, também, microalga-alga (UMMALYMA et al., 2017). A interação entre fungo-microalga é considerada vantajosa no processo de colheita microalgal, devido às elevadas eficiências de processo, que ocorre pela capacidade de autopeletização dos fungos (CHEN et al. 2018; GULTOM; HU, 2013; XIE et al. 2013). A integração e subsequente agregação de microalgas e fungos ocorre através da diferença de cargas apresentada pelos microrganismos (fungos possuem carga positiva e microalgas possuem cargas negativas), sendo assim, a atração mútua entre eles ocasiona sua coagulação e sedimentação, devido aumento de densidade das partículas (ZHANG; HU 2012; ZHOU et al. 2012).

O fenômeno da biofloculação fúngica pode ser explicado ainda, através dos estudos de Gulton e Hu (2013) e Grima et al. (2003), ao qual propuseram que as algas têm superfície com carga negativa (23,7 mV) devido à presença de prótons ativos nos grupos funcionais carboxílico, fosfórico, fosfodiéster, hidroxil e amina. Já as células fúngicas possuem micélios ricos em polissacarídeos que mostraram ser carregados positivamente (+46,1 mV) e podem neutralizar as cargas negativas presentes na superfície das algas, permitindo a fixação à parede

celular do fungo. Estudos recentes reportam excelentes eficiências de colheita de microalgas a partir da biofloculação fúngica utilizando espécies de *Aspergillus fumigatus* (BHATTACHARYA et al., 2019), *Penicillium* sp. (CHEN et al., 2018), *Aspergillus niger* (ALRUBAIE; ALSHAMMARI, 2018; NAZARI et al., 2021; PEI et al., 2021; ALSHAMMARI et al., 2018) e *Mucor circinelloides* (GU et al., 2017).

Segundo Prajapati et al. (2016), isso pode ser comprovado pois a maioria de seus experimentos utilizando 5% de biomassa de *A. niger* sem ajustes de pH, alcançaram eficiências de separação maiores que 80%. Para avaliar a eficiência de biofloculação da microalga *Chlorella vulgaris*, Alrubaie e Al-Shammari (2018) utilizaram o fungo *A. niger*. Os valores ótimos de eficiência de biofloculação foram alcançados utilizando pH na faixa de 5 a 7, sendo obtidos praticamente 100% de eficiência. A Tabela 1 apresenta estudos de biofloculação fúngica para diferentes microalgas.

Tabela 1 – Estudos de biofloculação fúngica para diferentes espécies de microalgas.

Microalga	Fungo/ Biofloculante	Condições Experimentais	Eficiência	Referência
<i>Botryococcus braunii</i>	<i>A. fumigatus</i>	Proporção 1:40 ao longo de 12h resultando em 0,75 kg de biomassa seca de 250 L de cultivo	98 % sem suplementação ou ajuste de pH	Al-Hothaly et al. (2015)
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>A. fumigatus</i>	Os fungos produziram pastilhas esféricas densas (5-6 mm) quando cultivados em caldo líquido de crescimento fúngico (FGB) contendo 20 g.L ⁻¹ de glicose sob rotação de 150 rpm	80 – 86%	Miranda et al. (2015)
<i>S. platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	2 g/L de glicose com uma proporção de 1:300 de fungos:microalgas	≈ 90%	Gultom et al. (2014)
<i>Spirulina platensis</i>	<i>A. niger</i>	0,5% m/v de biofloculante cultivado em fermentação submersa, agitação de 200 rpm por 1,5 min e 20 rpm por 10 min.	99%	Nazari et al. (2021)
<i>Chlorella</i> sp.	<i>A. fumigatus</i>	30 mg.L ⁻¹ de biofloculante	97%	Nasir et al. (2015)
<i>Chlorella vulgaris</i> UMN235	<i>Aspergillus</i> sp. UMN F01 e <i>Aspergillus</i> . sp. UMN F02	Suplementação com glicose (20 g.L ⁻¹) e inoculação com e 1.2x10 ⁸ .L ⁻¹ de esporos em meio BG-11	≈ 100%	Zhou et al. (2012)
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>A. niger</i>	Pellets fúngicos foram inoculados no cultivo	99,4 %	Pei et al. (2021)

		microalgal com pH inicial de 8,0, temperatura de 30 °C e velocidade de rotação de 160 rpm por 48 h em meio BG-11		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Mucor circinelloides</i>	pH 7,0, suplementação com 1,47 g/L de glicose,	97.45%	Jiang et al. (2020)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>A. niger</i>	1×10^4 esporos.mL ⁻¹ , 15 g.L ⁻¹ de sacarose (C) e pH entre 5,0-7,0	≈ 100%	Alrubaie; Al-Shammari (2018)

De forma geral, os estudos são focados na produção energética (bioetanol, biohidrogênio e biodiesel) e tratamento de águas residuárias a partir de biomassas microalgais (NASIR et al., 2015; PRAJAPATI et al., 2016). A biofloculação é utilizada como uma tecnologia sustentável de colheita, tendo em vista que não utiliza produtos químicos no processo. As eficiências de colheita estão associadas principalmente à razão fungo:microalga utilizada, que se dá por inoculação de esporos ou pellets fúngicos (ALAM et al., 2016; UMMALYMA et al., 2017). Na maioria dos casos os pellets foram mais eficientes, porém, o processo de otimização para sua produção pode ser lento e, agitação elevada do meio pode ocasionar o rompimento das hifas fúngicas. Ainda, quando avaliados os valores entre fungo e microalga, a razão do fungo é sempre maior (em base seca) (LUO et al. 2019).

Outro fator importante analisado foram as condições de cultivo microalgal, sendo que, em diferentes fases a microalga pode apresentar alteração de cargas elétricas, reduzindo a eficiência de colheita. Assim, são relatados estudos com variação de pH e também, a adição de solução de glicose para suplementação, a fim de reduzir o pH da microalga, que quando em concentrações mais altas pode chegar a valores próximos de 10. As melhores eficiências de colheita são relatadas com pHs entre 5-8, com ou sem suplementação de glicose (variação entre 0 e 30 g.L⁻¹), para os estudos avaliados (MIRANDA et al., 2017; WREDE et al., 2014).

Dentre os fungos mais utilizados, os do gênero *Aspergillus* se destacam, apresentando eficiências de colheita de até 100% para diferentes espécies de microalgas (procarióticas e eucarióticas) (NAZARI et al., 2021). Segundo Ummalyma et al. (2017), apesar das limitações associadas a biofloculação fúngica, como a produção de biomassa fúngica, a faixa de pH e diferenças celulares e estruturais de determinadas espécies de microalgas, a técnica é promissora e pode ser integrada no conceito de biorrefinaria, pois possibilita a produção integrada através da utilização dos subprodutos. Portanto, foram estudadas diferentes condições de biofloculação fúngica, objetivando eficiência de processo sem alterações da biomassa que interfiram em futuros processos biotecnológicos.

2 Material e Métodos

2.1 Condições de cultivo microalgal

A microalga *Spirulina platensis* foi cultivada em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), na concentração de 20% (p/v), composto por vitaminas A5 (H_3BO_3 ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e B6 (NH_4VO_3 ; $\text{KCr}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CO}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Ainda, o cultivo foi realizado em *raceway pond* com volume útil de 180 L, com concentração inicial de inóculo de $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. O cultivo foi realizado em estufa de hidroponia, com agitação proporcionada por lâminas rotativas ($0,35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), com controle de temperatura entre $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e luminosidade fornecida por luz natural em estufa de hidroponia. As microalgas foram cultivadas até o final da fase estacionária de crescimento, quando apresentaram densidade celular estável, relatada como aquela que resulta no maior acúmulo de carboidratos (MAGRO et al., 2018).

Foi realizado o cultivo semicontínuo, com retirada de 90 L de meio de cultivo ao final da fase estacionária de crescimento, para biofloculação, e adição de 90 L de meio Zarrouk 20% (m/v) para dar continuidade ao cultivo sem a necessidade de preparo de novo inóculo. O monitoramento do crescimento microalgal foi realizado através de coleta de amostras três vezes por semana para determinação do pH por potenciometria e, concentração de biomassa microalgal por meio de espectrofotometria, que utiliza uma relação pré-estabelecida entre absorvância em 670 nm e peso seco da biomassa microalgal, ambos em triplicata (NAZARI et al., 2021; REMPEL et al., 2018).

2.2 Produção do biofloculante fúngico

A produção do biofloculante fúngico foi realizada utilizando metodologia adaptada de Nazari et al. (2021). Para o estudo, foi utilizada cepa do fungo *Aspergillus niger* DAOM (COLLA et al., 2015). De tubos de ensaio contendo *A. niger* mantidos em meio de cultivo ágar batata dextrose (PDA) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, o fungo foi transferido para placas de Petri contendo 15 mL de meio PDA. Para isso, 5 mL de solução estéril de Tween 0,1% foram adicionados aos tubos contendo o fungo. Desta suspensão de esporos fúngicos, 0,5 mL ($2 \cdot 10^6$ esporos $\cdot \text{mL}^{-1}$) foram transferidos para placas de Petri contendo meio PDA, as quais foram incubadas em estufa termostatizada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 dias. Os inóculos obtidos foram utilizados para inocular os meios de cultura da fermentação submersa (FS) para incremento de biomassa.

O meio de cultivo da fermentação submersa foi produzido com uma suspensão de 10% (m/v) de farelo de trigo, em água destilada. A suspensão foi submetida a cozimento por 30 min a 100 °C, seguida de filtração para remoção de sólidos suspensos insolúveis. A fermentação submersa foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL com adição de 100 mL de meio de cultivo, 1% de nitrato de sódio como fonte suplementar de nitrogênio e ajuste de pH para 7. Os meios foram inoculados com a adição de 2 discos miceliais de *A. niger* de 1 cm de diâmetro, provenientes do inóculo preparado em placas de Petri, em cada Erlenmeyer. A FS foi realizada ao longo de 72 h em agitador orbital (modelo TE-421, Tecnal, Brasil) a 30 °C, a 0,97g (120 rpm). A biomassa úmida resultante foi utilizada, inicialmente, como biofloculante da microalga *S. platensis*.

2.3 Ensaio de biofloculação fúngica

Foram realizados testes das condições de biofloculação, variando-se a concentração de biofloculante úmido (relação microalga: fungo) com ajuste de milivoltagem (aproximadamente zero) utilizando ácido acético glacial (20%); os testes controle foram realizados com adição do biofloculante e sem ajuste de milivoltagem e; com ajuste de milivoltagem sem a adição do biofloculante. O biofloculante foi adicionado com umidade de aproximadamente 90%. A relação microalga:fungo (base seca) foi determinada considerando a umidade da biomassa fúngica (NAZARI et al., 2021). A Tabela 1 apresenta as condições experimentais dos ensaios de biofloculação.

Tabela 1 - Condições experimentais dos ensaios de biofloculação.

Experimentos*	Relação (microalga:fungo)**	Ajuste de milivoltagem (mV)
1	8:1	com ajuste
2	5:1	com ajuste
3	sem adição de fungo	com ajuste
4	8:1	sem ajuste
5	5:1	sem ajuste

*Os experimentos foram realizados em duplicata.

**Concentração em base seca.

Os testes foram realizados inicialmente em béquers de 250 mL com 200 mL de volume útil de meio de cultivo microalgal, com agitação realizada com agitador mecânico (200 rpm por 1,5 min e 20 rpm por 10 min). Em seguida, nas melhores condições de eficiência de floculação,

foram definidos os ensaios posteriores em em maior escala de volume. Esta etapa foi realizada adicionando o biofloculante úmido em recipientes de *jar test* com volume útil de 2 L (nas condições estabelecidas de concentração de biofloculante e milivoltagem), contendo culturas de *S. platensis*. O agitador mecânico *jar test* (modelo 713, Fisaton, Brasil) foi utilizado para realizar a mistura rápida (1,5 min), seguida de mistura lenta (10 min) (CHEN et al., 2018; MIRANDA et al., 2015). Após a mistura lenta, o meio foi mantido em repouso por 30 min, para separação da biomassa microalgal e, em seguida, foi realizada a filtração, a partir da qual foi retirada uma alíquota para determinação da eficiência de biofloculação, realizada por espectrofotometria. A eficiência de colheita foi determinada pela Equação 1.

$$\text{Eficiência da Colheita (EC, \%)} = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

Sendo: EC = Eficiência de colheita (%); C_0 = Concentração inicial de *S. platensis* (g.L^{-1}); C_f = Concentração final de *S. platensis* (g.L^{-1}).

2.4 Caracterização das Biomassas

Foi realizada a caracterização das biomassas de forma individual (*S. platensis* e *A. niger*) e, associadas (*S. platensis* + *A. niger*). As metodologias utilizadas são padronizadas para caracterização de biomassas microalgais, sendo adaptadas para a caracterização da biomassa fúngica.

A quantificação do teor de carboidratos e proteínas foi realizada após preparo da amostra por método da sonicação (Sonda Ultrassônica Unique- Modelo: DES500, ponteira “micro”). As suspensões de microalgas foram submetidas a 5 ciclos (1 ciclo: 1 min de sonicação e 1 min de repouso) de rompimento celular. Após a sonicação, foi determinado o teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O teor de proteínas foi determinado conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

As demais determinações foram realizadas com as biomassas secas, sem tratamento prévio. Para a determinação da concentração de lipídios foi utilizado o método desenvolvido por Folch et al. (1957). A análise de cinzas da biomassa foi realizada através do método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). O teor de umidade foi realizado através de análise gravimétrica. As determinações de proteínas e carboidratos foram realizadas em triplicata de extratos e análises e, as demais, em duplicata, sendo que todas terão os resultados expressos em base seca.

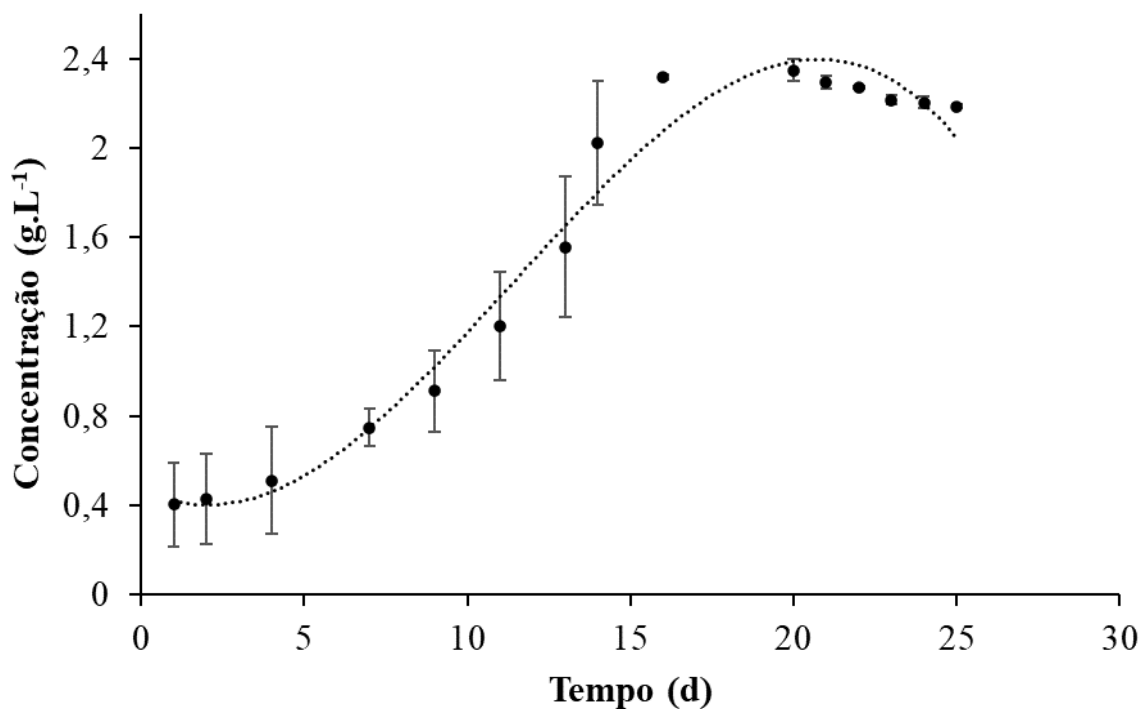
2.5 Tratamento dos dados

O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software *Statistica* 10 através do Teste de Tukey para comparação de médias, com nível de confiança de 95%.

3 Resultados e Discussões

A Figura 1 apresenta a curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* durante um ciclo de crescimento contínuo que ocorreu ao longo de 25 dias até alcançar o período final da fase estacionária de crescimento. Foram realizados mais dois cultivos para obtenção de biomassa que tiveram o mesmo comportamento.

Figura 1 - Curva de crescimento da microalga *S. platensis*.



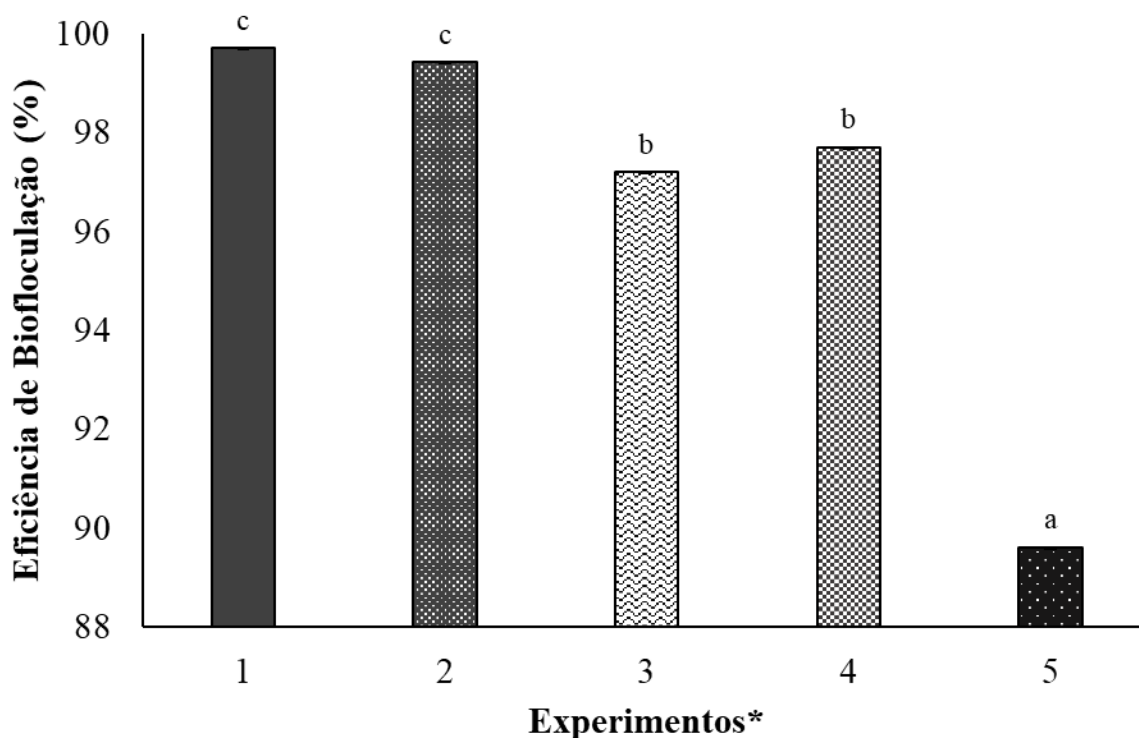
Através da análise da curva de crescimento da microalga *S. platensis*, observa-se que a fase de adaptação ocorreu a longo dos primeiros 7 dias (fase *lag*), seguido da fase exponencial de crescimento (fase *log*) com amplo crescimento da concentração celular das microalgas, até o 15º dia de cultivo. Na sequência, já entrando no período da fase estacionária, permaneceu por 10 dias até começar a apresentar indícios de queda e morte celular. Dessa forma, no 25º dia os cultivos foram encerrados com $2,18 \pm 0,008 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 1).

Rempel et al. (2018) realizaram o cultivo da microalga *Spirulina platensis* para a produção de bioetanol. Os cultivos foram realizados em mini tanques de 10 L utilizando o meio de cultivo Zarrouk 20%, semelhante a este estudo, porém, sem a adição das vitaminas A5 e B6. O crescimento da microalga teve comportamento semelhante a este estudo, com as fases de crescimento bem definidas, porém, mais curtas, chegando ao final da fase estacionária de crescimento em 12 dias de cultivo. Segundo Quigg (2016), micronutrientes como ferro, manganês, zinco, cobre, molibdênio, cobalto, vanádio e níquel são fundamentais para o funcionamento das organelas celulares das microalgas, sendo que cada espécie possui características fisiológicas específicas no sentido de absorver e eliminar os micronutrientes.

3.1 Ensaios de biofloculação fúngica

A Figura 2 apresenta os resultados de eficiência de biofloculação para os diferentes tratamentos aplicados.

Figura 2 – Influência do percentual de biofloculante e do ajuste de milivoltagem sobre a eficiência de biofloculação (%) na colheita da microalga *Spirulina platensis* usando biomassa fúngica.



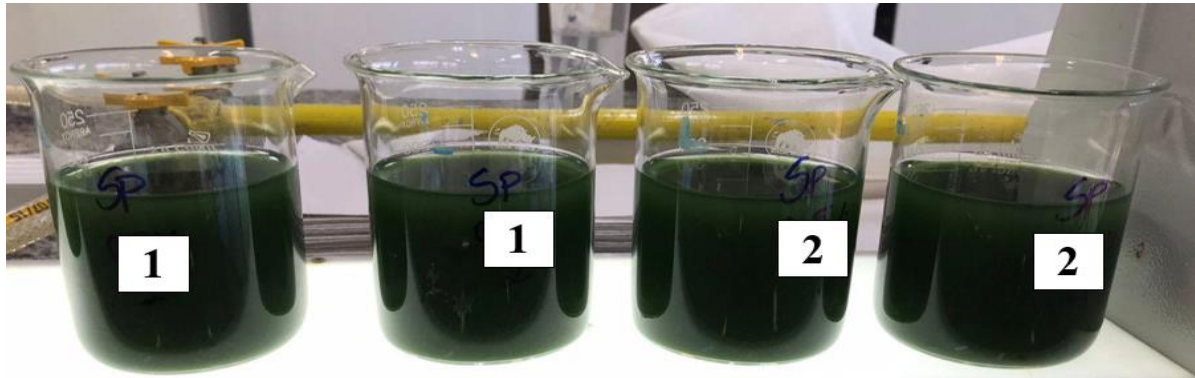
*Experimentos: 1 – Relação 8:1 de biofloculante COM ajuste de milivoltagem (mV); 2 – Relação 5:1 de biofloculante COM ajuste de mV; 3 – SEM adição de biofloculante e COM ajuste de mV; 4 – 8:1 de biofloculante e SEM ajuste de mV; 5 – 5:1 de biofloculante e SEM ajuste de mV.

**Médias \pm desvio padrão. Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

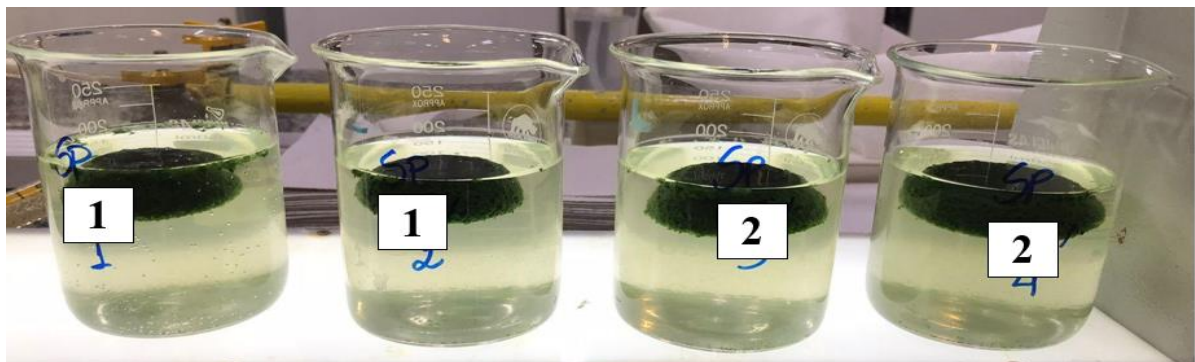
As maiores eficiências de biofloculação foram observadas para os ensaios 1 e 2 (99,70 % e 99,41 %, respectivamente; $p > 0,05$). Os experimentos 3 e 4 apresentaram resultados inferiores, mas iguais estatisticamente entre si (97,19 % e 97,70 %, respectivamente). A menor eficiência foi obtida para o ensaio 5 (89,60 %) realizado sem o uso de biofloculantes. Algumas microalgas, como a *Spirulina*, possuem potencial de auto-floculação que pode ocorrer naturalmente. O fenômeno se refere à agregação celular e/ou adesão de células umas às outras em meio líquido (CHENG et al., 2020; UBA et al., 2022). Os testes apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por Nazari (2020), que teve resultados variando entre 95,9% a 98,8%. Em seu estudo, foram utilizados diferentes pH (4, 6, 8 e sem ajuste de pH), no entanto, a milivoltagem não foi avaliada. Os melhores resultados foram obtidos para os ensaios controle, sem ajuste de pH (valores entre 10 e 11). Comumente são realizados ensaios de coagulação/floculação considerando somente o pH do meio, sem controle da milivoltagem. Ives (1959) descreveu a importância entre a carga superficial das algas e o seu processo de coagulação. O estudo sugeriu que o mecanismo de coagulação ocorria através de uma atração mútua e neutralização da carga das algas e do biofloculante utilizado. No caso deste estudo, o controle da milivoltagem foi realizado para avaliar em qual ponto/pH seria alcançada a neutralização das cargas do meio. O potencial isoelétrico foi obtido com pH de aproximadamente 6,82, semelhante aos resultados obtidos por Veneu et al. (2015), entre 6,5 e 6,9.

De forma geral, os testes apresentaram valores de eficiência elevados, porém, quando avaliada a formação de flocos, os experimentos 1 e 2 apresentam maior estabilidade, se comparados aos demais, podendo ser filtrados em peneira comum. Já para os demais tratamentos, ao movimentar o líquido, a biomassa separada se mistura com o meio novamente, sendo necessário outro método de separação, como a centrifugação, por exemplo. Na Figura 3 pode ser observado o antes (a) e depois (b) do processo de biofloculação para os ensaios 1 e 2 e, na Figura 4 estão apresentados os testes 3 (a) e, 4 e 5 (b).

Figura 3 – Eficiência dos testes de biofloculação fúngica utilizando diferentes concentrações de biofloculante e ajuste de milivoltagem.

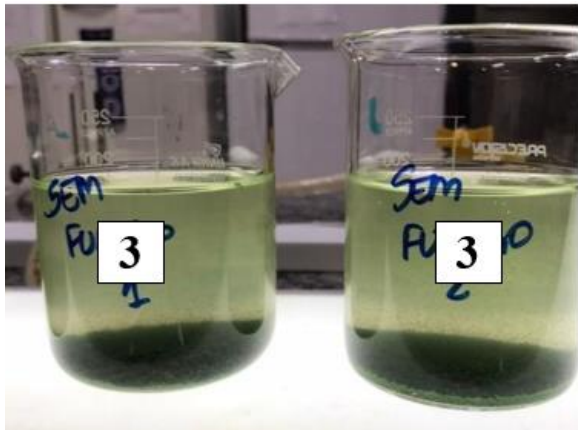


(a)

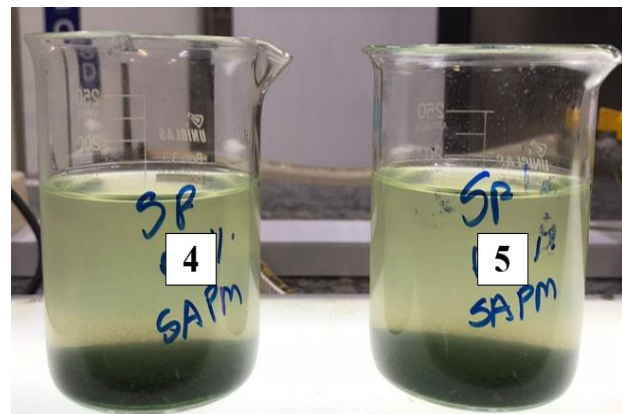


(b)

Figura 4 – Eficiência dos testes de biofloculação quando realizado sem adição de biofloculante e com ajuste de milivoltagem ou, somente a adição de biofloculante sem ajuste de milivoltagem.



(a)



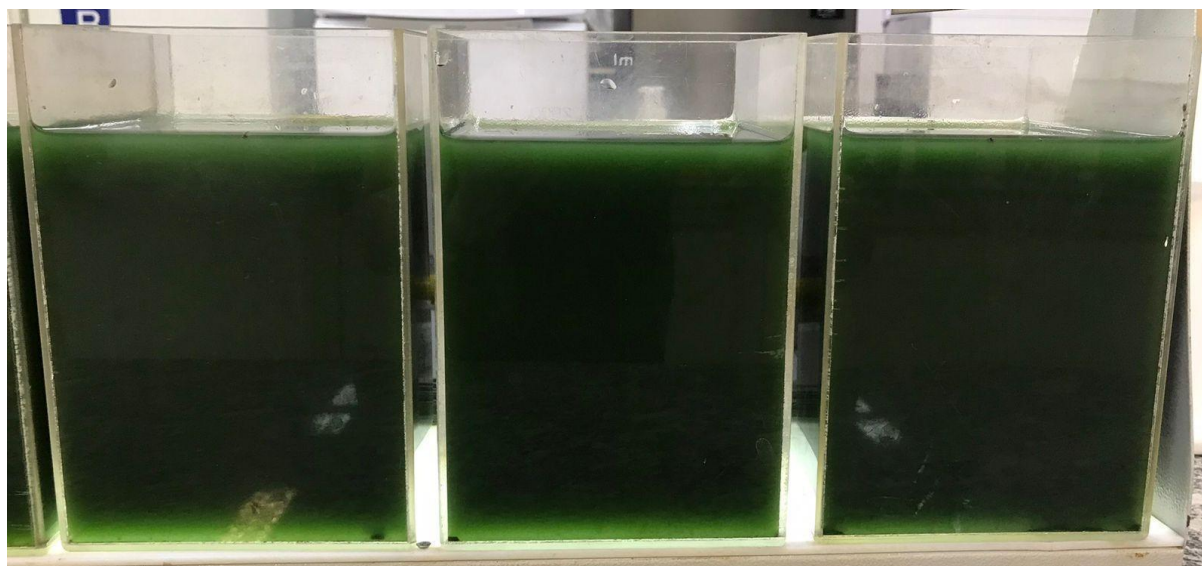
(b)

Assim, como não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a utilização de 8:1 e 5:1 de biofloculante fúngico, optou-se por seguir os experimentos de aumento de escala com 8:1 (fração 8:1 de microalga:fungo em base seca) de biofloculante e com ajuste de milivoltagem, conforme experimento 1. Foram utilizadas maiores quantidades de microalga em relação ao fungo, pensando principalmente em processos biotecnológicos futuros, visto a complexidade da parede celular fúngica, se comparada a microalgal. A parede celular dos fungos possui vários

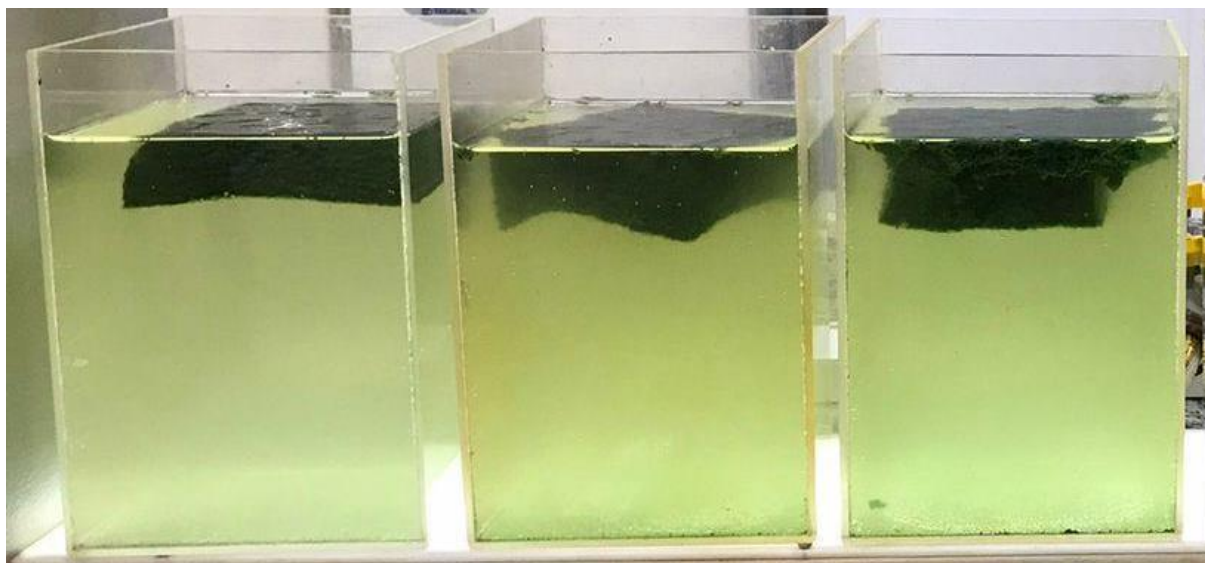
tipos de alfa-glucanas. Os mais comuns desses polissacarídeos são: glicogênio, que é feito de unidades de glicosil unidas por ligações α -1,4 e α -1,6, e glucanos nos quais as unidades de glicosil são ligadas apenas por meio de ligações α -1,3, ou ligações α -1,3 e α -1,4 (BACON et al., 1968; GOLD et al., 1973; HOCHSTENBACH et al., 1998; GRÜN et al., 2005). Como mencionado acima, o glicogênio é um material de reserva de energia que se acumula na forma de grãos no citoplasma (RUIZ-HERRERA, ORTIZ-CASTELLANOS, 2019). Os polissacarídeos das outras classes são componentes da parede da célula, onde são elementos estruturais (HOCHSTENBACH et al., 1998; GRÜN et al., 2005), conferindo resistência.

Ao utilizar as mesmas condições em tanques *jar test* de 2 L, as eficiências foram mantidas, alcançando valores entre 99,5% e 99,7%. Ainda, quando realizado o aumento de escala, nas condições propostas, não foi necessária a agitação rápida e lenta, sendo que, ao longo de 30 min houve separação da biomassa. Na Figura 5 pode ser observada a separação da biomassa de *S. platensis* (a – antes e, b – depois), conforme observado também, nos testes iniciais.

Figura 5 – Separação da biomassa de *S. platensis* em ensaios padrão de *jar test*.



(a)



(b)

No processo de biofloculação, as hifas fúngicas e os micélios contém polissacarídeos com sítios ativos que podem permitir a bioadsorção e criação de aglomerados (ZHANG; HU, 2012), o principal fenômeno que possibilita a agregação dos flocos está relacionado com as cargas negativas da microalga e positivas das hifas fúngicas (ZHOU et al., 2013), que podem ser ajustadas, também, através do ajuste de milivoltagem.

Segundo Alam (2016), quando a *S. platensis* começa a apresentar morte celular, pode ocorrer a desestabilização de cargas na superfície da célula, sendo um dos requisitos para a efetivação da agregação das biomassas no processo de biofloculação. Nesse sentido, mesmo ao final da fase estacionária de crescimento, com a utilização do biofloculante fúngico e ajuste de milivoltagem, foi possível alcançar eficiências próximas de 100%. Isso sugere que, indiferente da fase de crescimento da microalga *S. platensis*, com as condições de biofloculação estabelecidas neste estudo, é possível alcançar elevadas eficiências de biofloculação.

3.2 Caracterização das biomassas

A Tabela 1 Apresenta os resultados de caracterização das biomassas de estudo (*S. platensis*, *A. niger* e biofloculado).

Tabela 1 – Caracterização química das biomassas de *S. platensis*, do fungo *A. niger* e da biomassa biofloculada*.

Biomassa	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Umidade (%)	Cinzas (%)
<i>S. platensis</i>	22,96 ± 0,085	35,79 ± 0,032	6,23 ± 0,125	0,56 ± 0,017	12,19 ± 0,05
<i>A. niger</i>	29,24 ± 0,148	54,051 ± 0,028	2,45 ± 0,114	0,63 ± 0,058	10,47 ± 0,008
Biofloculado (<i>Sp</i> + <i>A. niger</i>)	14,94 ± 0,048	28,46 ± 0,014	3,14 ± 0,098	0,59 ± 0,044	10,41 ± 0,126

*Média±Desvio Padrão

Segundo a literatura *S. platensis* possui entre 55-70% de proteínas, 10-27% de carboidratos e 4-9% de lipídios (MAGRO et al., 2016; MARGARITES et al., 2016; NAZARI, 2020), o que está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1. Porém, avaliando a caracterização realizada, ao final, deveríamos ter um percentual de 100% de composição para cada uma das biomassas, o que pode ser justificado em função da determinação de carboidratos e proteínas, que utiliza uma etapa de pré-tratamento com sonda ultrassônica, e pode não ter apresentado a eficiência desejada. As demais biomassas continham ou o fungo de forma individual ou associada a biomassa, sendo assim, como a metodologia utilizada para microalgas foi adaptada, é possível que não tenha sido eficiente para a caracterização do fungo. Ainda, analisando os elevados índices de carboidratos intracelulares para a cepa de *A. niger*, o fungo caracteriza-se por possuir presença de açúcares complexos em sua parede celular. A biomassa biofloculada apresentou baixos índices de carboidratos e proteínas, se comparada com as biomassas de forma individual, porém se devem a fração fungo:alga (1:8 em base seca) utilizada nos ensaios. Para ensaios futuros, sugere-se a utilização da metodologia de Kjeldahl (AOAC, 2000) para determinação de proteínas e, a partir dela, a determinação da composição de carboidratos por diferença de percentual, utilizando os demais parâmetros já calculados para lipídios, cinzas e umidade.

Por outro lado, mesmo apresentando baixas concentrações de biocompostos intracelulares como carboidratos e proteínas, a biomassa da microalga ainda é uma matéria-prima de alto valor agregado. No sentido da aplicação da biomassa no contexto das biorrefinarias, a biomassa microalgal pode ser destinada para rotas de extração de lipídios visando biodiesel (SUBHASH et al., 2022), biometano (SHENG et al., 2022) ou biofertilizantes (BRAUN; COLLA, 2022).

4 Conclusão

A partir dos experimentos realizados, observou-se que as melhores eficiências de biofloculação da microalga *Spirulina platensis* foram obtidas com o uso do biofloculante associado ao ajuste da milivoltagem do meio, não havendo diferenças significativas para as diferentes concentrações de biofloculante fúngico utilizado. O uso do biofloculante fúngico sem ajuste de milivoltagem, ou somente com o ajuste da milivoltagem sem adição do biofloculante permite alcançar elevada eficiência de separação, porém, os flocos formados não são estáveis, dificultando a separação da biomassa biofloculada do sobrenadante. A biofloculação é uma técnica de separação promissora e sustentável, por utilizar valorização de resíduos no processo e, também, pelo fato de não haver contaminação da biomassa ao final do processo, permitindo diversas aplicações biotecnológicas.

5 Referências

- ALAM, M. A.; VANDAMME, D.; CHUN, W.; ZHAO, X.; FOUBERT, I.; WANG, Z.; YUAN, Z. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 4, p. 573-583, 2016.
- ALRUBAIE, G., AL-SHAMMARI, R.H. Microalgae *Chlorella Vulgaris* Harvesting Via Co-Pelletization with Filamentous Fungus. **Baghdad Science Journal**, 15(1), 31-36, 2018.
- AL-HOTHALY, K.A.; ADETUTU, E.M.; TAHA, M.; FABBRI, D.; LORENZETTI, C.; CONTI, R.; BALL, A.S. Bio-harvesting and pyrolysis of the microalgae *Botryococcus braunii*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 117–123, 2015.
- AL-SHAMMARI, R. H. Microalgae *Chlorella vulgaris* harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Baghdad Science Journal**, v. 15, n. 1, p. 31-36, 2018.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. Washington, DC: AOAC, 2000.
- BARROS, A.I.; GONÇALVES, A.L.; SIMÕES, M., PIRES, J.C. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1489–1500, 2015.
- BHATTACHARYA, A.; MATHUR, M.; KUMAR, P.; MALIK, A. Potential role of N-acetyl glucosamine in *Aspergillus fumigatus*-assisted *Chlorella pyrenoidosa* harvesting. **Biotechnology for biofuels**, v. 12, p. 1-17, 2019.
- BRAUN, J. C.; COLLA, L. M. Use of Microalgae for the Development of Biofertilizers and Biostimulants. **BioEnergy Research**, p. 1-22, 2022.

CHEN, J.; LENG, L.; YE, C.; LU, Q.; ADDY, M.; WANG, J.; ZHOU, W. A comparative study between fungal pellet-and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 181–190, 2018.

CHENG, P.; CHEN, D.; LIU, W.; COBB, K.; ZHOU, N.; LIU, Y.; LIU, H.; WANG, Q.; CHEN, P.; ZHOU, C.; RUAN, R. Auto-flocculation microalgae species *Tribonema* sp. and *Synechocystis* sp. with T-IPL pretreatment to improve swine wastewater nutrient removal. **Science of The Total Environment**, v. 725, p. 138263, 2020.

CHU, R.; LI, S.; YIN, Z.; HU, D.; ZHANG, L.; XIANG, M.; ZHU, L. A fungal immobilization technique for efficient harvesting of oleaginous microalgae: key parameter optimization, mechanism exploration and spent medium recycling. **Science of The Total Environment**, p. 148174, 2021.

COLLA, L. M.; FICANHA, A. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 725959, 2015.

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

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

GANGOLU, N. R.; CHUNCHU, B. R. K.; YALLAMATI, A.; GOPIDESI, R. K. Assessment of diesel engine characteristics by using soybean oil as a biofuel. **Environment, Development and Sustainability**, v. 24, n. 6, p. 7579-7592, 2022.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ, F. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

GU, Q.; JIN, W. B.; CHEN, Y. Q.; GUO, S. D.; WAN, C. F. Highly efficient bioflocculation of microalgae using *Mucor circinelloides*. **Huan Jing ke Xue. Huanjing Kexue**, v. 38, n. 2, p. 688-696, 2017.

GULTOM, S., HU, B. Review of microalgae harvesting via copelletization with filamentous fungus. **Energies**, v. 6, p. 5921–5939, 2013.

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

IVES, K. J. The significance of surface electric charge on algae in water purification. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**; v. 1, p. 37-47, 1959.

JIANG, J.; YAO, C.; CAO, X.; LIU, Y.; XUE, S. Characterization of starch phosphorylase from the marine green microalga (*Chlorophyta*) *Tetraselmis subcordiformis* reveals its potential role in starch biosynthesis. **Journal of plant physiology**, v. 218, p. 84-93, 2017.

KUMAR, N.; BANERJEE, C.; NEGI, S.; SHUKLA, P. Microalgae harvesting techniques: updates and recent technological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-27, 2022.

LAKSHMIKANDAN, M.; WANG, S.; MURUGESAN, A. G.; SARAVANAKUMAR, M.; SELVAKUMAR, G. Co-cultivation of *Streptomyces* and microalgal cells as an efficient system for biodiesel production and bioflocculation formation. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125118, 2021.

LAL, A.; BANERJEE, S.; DAS, D. *Aspergillus* sp. assisted bioflocculation of *Chlorella* MJ 11/11 for the production of biofuel from the algal-fungal co-pellet. **Separation and Purification Technology**, v. 272, p. 118320, 2021.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.

MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA; L. M. Bioethanol production using microalgae: a review. **Exact Technology Science**, v. 37, p. 159, 2016.

LUO, S.; WU, X.; JIANG, H.; YU, M.; LIU, Y.; MIN, A.; RUAN, R. Edible Fungi-Assisted Harvesting System for Efficient Microalgae Bio-flocculation. **Bioresource Technology** v. 282, p. 325-330, 2019.

MAGRO, F. G.; MARGARITES, A. C.; REINEHR, C. O.; GONÇALVES, G. C.; RODIGHERI, G.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. *Spirulina platensis* biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds. **Environment Technology**, v. 39, n. 14, p. 1868-1877, 2018.

MARGARITES, A. C. F.; VOLPATO, N.; ARAÚJO, E.; CARDOSO, L. G.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. **Environmental technology**, v. 38, n. 17, p. 2209-2216, 2016.

MATTER, I.A.; BUI, V.K.H.; JUNG, M.; SEO, J.Y.; KIM, Y.E.; LEE, Y.C.; OH, Y.K. Flocculation harvesting techniques for microalgae: a review. **Applied Sciences**, v. 9, p. 3069, 2019.

MIRANDA, R.; LATOUR, I.; HÖRSKEN, A.; JARABO, R.; BLANCO, A. Enhanced Silica Removal by Polyamine-and Polyacrylamide-Polyaluminum Hybrid Coagulants. **Chemical Engineering & Technology**, v. 38, n. 11, p. 2045-2053, 2015.

NASIR, N.M.; BAKAR, N.S.A.; LANANAN, F.; HAMID, S.H.A.; LAM, S.S.; JUSOH, A. Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 492–498, 2015.

NAZARI, M. **Colheita de *Spirulina platensis* via bioflocculação fúngica e uso da biomassa em bioprocessos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2020.

NAZARI, M. T.; RIGUETO, C. V. T.; REMPEL, A.; COLLA, L. M. Harvesting of *Spirulina platensis* using an eco-friendly fungal bioflocculant produced from agro-industrial by-products. **Bioresource technology**, v. 322, p. 124525, 2021.

OGBONNA, C. N.; NWOBA, E. G. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110690, 2021.

PEI, X. Y.; REN, H. Y.; LIU, B. F. Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on harvesting of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124463, 2021.

PERERA, F.; NADEAU, K. Climate change, fossil-fuel pollution, and children's health. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 24, p. 2303-2314, 2022.

PRAJAPATI, S.K.; BHATTACHARYA, A.; KUMAR, P.; MALIK, A.; VIJAY, V.K. A method for simultaneous bioflocculation and pretreatment of algal biomass targeting improved methane production. **Green Chemistry**, v. 18, n. 19, p. 5230–5238, 2016.

QUIGG, A. Micronutrients. **The physiology of microalgae**, p. 211-231, 2016.

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

RODRIGUES, K.; LIMA, M.; GONZALES, M.; KRETZMANN, N. Produção de bioplástico a partir da casca da batata (*Solanum tuberosum*). **XI Semana de Extensão, Pesquisa e Pós-Graduação SEPesq**, Centro Universitário Ritter dos Reis, 2015.

ROSELET, F.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K.; ABREU, P.C. Harvesting of microalgae for biomass production. **In: Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment**. Springer, Singapore, p. 211–243, 2019.

RÓZ, A. L. Preparação e caracterização de amidos termoplásticos. **Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo - USP**, 2004.

SHENG, Y.; SHANMUGAM, S.; CHINNATHAMBI, A.; SALMEN, S. H.; GE, S.; XIA, C.; BRINDHADEVI, K. Feasibility of microalgal and macroalgal biomass co-digestion on biomethane production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 47, n. 88, p. 37394-37400, 2022.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 499-508, 2018.

SUBHASH, G. V.; RAJVANSHI, M.; KUMAR, G. R. K.; SAGARAM, U. S.; PRASAD, V.; GOVINDACHARY, S.; DASGUPTA, S. Challenges in microalgal biofuel production: A perspective on techno economic feasibility under biorefinery stratagem. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126155, 2022.

UBA, K. I.; GAID, G. D.; PERALES, J. M. L.; BONGGA, F. C.; GAID, R. D. Use of aluminium sulphate as flocculant for spirulina (*Arthrospira platensis*) with notes on the use of

antioxidants for preservation under refrigerated conditions. **Journal of Fisheries**, v. 10, n. 3, p. 103203-103203, 2022.

UBANDO, A. T.; CHEN, W. H.; HURT, D. A.; RAJENDRAN, S.; LIN, S. L. Biohydrogen in a circular bioeconomy: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 128168, 2022.

UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SAHOO, D. Bioflocculation: an alternative strategy for harvesting of microalgae—an overview. **Bioresource technology**, v. 242, p. 227-235, 2017.

VASISTHA, S.; BALAKRISHNAN, D.; MANIVANNAN, A.; RAI, M. P. Microalgae on distillery wastewater treatment for improved biodiesel production and cellulose nanofiber synthesis: A sustainable biorefinery approach. **Chemosphere**, v. 315, p. 137666, 2023.

VENEU, D. M.; DA SILVA, M. P. M.; DI SALVIO, A. M.; DELPHINO, I. A. Z. Tratamento de água eutrofizada através dos processos de pré-oxidação, coagulação e floculação. **Engevista**, v. 17, n. 2, p. 175-186, 2015.

WANG, M.; YIN, Z.; ZENG, M. Microalgae as a promising structure ingredient in food: Obtained by simple thermal and high-speed shearing homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 131, p. 107743, 2022.

WREDE, D.; TAHA, M., MIRANDA, A.F., KADALI, K., STEVENSON, T., BALL, A.S., MOURADOV, A. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. **PLoS One**, v. 17, p. 75-90, 2014.

XIE, S.; SUN, S.; DAI, S.Y.; YUAN, J.S. Efficient coagulation of microalgae in cultures with filamentous fungi. **Algal Research**, v. 2, p. 28–33, 2013.

YADAV, P.; KUMAR TIWARI, S.; KUMAR, V.; SINGH, D.; KUMAR, S.; MALIK, V.; SINGH, B. Sugarcane bagasse: an important lignocellulosic substrate for production of enzymes and biofuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-32, 2022.

ZARROUK, C. **Contribution A L'etude D'une Cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima***. Thesis. University Of Paris, France, 1966.

ZENG, J.; ZENG, H.; WANG, Z. Review on technology of making biofuel from food waste. **International Journal of Energy Research**, v. 46, n. 8, p. 10301-10319, 2022.

ZHANG, J.; HU, B. A novel method to harvest microalgae via co-culture of filamentous fungi to form cell pellets. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 529–535, 2012.

ZHANG, H.; YANG, L.; ZANG, X.; CHENG, S.; ZHANG, X. Effect of shear rate on floc characteristics and concentration factors for the harvesting of *Chlorella vulgaris* using coagulation-flocculation-sedimentation. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 811-817, 2019.

ZHOU, W.; CHENG, Y.; LI, Y.; WAN, Y.; LIU, Y.; LIN, X.; RUAN, R. Novel fungal pelletization-assisted technology for algae harvesting and wastewater treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 214-228, 2012.

4 CAPÍTULO III: HIDRÓLISE DE BIOMASSA MICROALGAL BIOFLOCULADA

Resumo: Na rota da geração de biocombustíveis de terceira geração, o processo de hidrólise enzimática é uma etapa importante para a disponibilização de açúcares simples para a fermentação alcoólica até a geração de bioetanol. Após o cultivo microalgal, técnicas de colheita de microalgas como a biofloculação apresentam eficiência, entretanto, a biomassa é composta por diferentes microrganismos, com composição de parede celular distinta. Nesse sentido, objetivou-se avaliar diferentes métodos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a biomassa da microalga *Spirulina platensis* biofloculada com o fungo *Aspergillus niger*. Inicialmente foram realizados testes preliminares de ruptura celular através de diferentes métodos físicos (ultrassom, congelamento/descongelamento, autoclave) e enzimáticos (enzimas comerciais: amilase, amiloglicosidase (AMG), celulase, xilanase). Em seguida, foi realizado teste de atividade das enzimas de forma individual em substrato padrão, para avaliar temperaturas e pHs ótimos de ativação. A partir disso, a biomassa biofloculada foi submetida a testes de hidrólise com diferentes concentrações das enzimas (0,01%, 0,03% e 0,05%), de forma individual. Com a definição das concentrações e tempo de hidrólise, foram realizados ensaios com o uso de enzimas associadas (α -amilase + AMG; α -amilase + AMG + celulase; α -amilase + AMG + xilanase). Os melhores resultados (aproximadamente 70% de hidrólise) foram obtidos utilizando 0,01% das enzimas α -amilase + AMG + celulase, utilizando o α -amilase por 2 horas a 90°C, com posterior adição das demais enzimas na mesma concentração, porém, a 60 °C por mais duas horas, quando houve estabilização dos resultados de açúcares redutores totais. A utilização de enzimas para a hidrólise da biomassa microalgal biofloculada mostrou-se eficiente, visto a complexidade da parede celular de ambos os microrganismos presentes no meio.

Palavras-chave: Biofloculação, pré-tratamento, hidrólise enzimática, *Spirulina platensis*, *Aspergillus niger*

1 Introdução

A matriz energética global baseada no uso de recursos fósseis se destaca por possuir elevado potencial de gerar impactos ambientais, uma vez que utiliza fontes não renováveis para consumo como petróleo e carvão mineral. Desde a década de 1970 com o Protocolo de Kyoto até as recentes Cúpulas do Clima (COP) das Nações Unidas, esforços para mitigar a geração de gases de efeito estufa foram firmados seja no setor industrial ou de geração de energia (CHO et al., 2023). O uso de biomassas para a geração de energia é visto como promissor, uma vez que utiliza materiais que consomem o CO₂ atmosférico no processo de fotossíntese, tornando o sistema de conversão e produção com menor pegada ambiental (MAGHZIAN et al., 2022).

As biomassas são utilizadas principalmente para a conversão à biocombustíveis, com ampla versatilidade no sentido de possibilidades de matérias-primas. Dessa forma, os biocombustíveis podem ser de primeira, segunda, terça ou quarta geração (CABRERA et al., 2023). Em relação à terceira geração, as biomassas possuem vantagens no sentido de processos

biotecnológicos avançados, mas que ainda possuem gargalos de produção de larga escala e competitividade com combustíveis fósseis (MALIHA; ABU-HIJLEH, 2022). As microalgas, que se encaixam dentro do conceito de biocombustíveis de terceira geração, possuem várias estratégias de cultivos voltadas de acordo com as rotas do bioproduto de interesse.

A colheita da biomassa de microalgas se destaca como uma das etapas que mais consomem energia no processo, sendo reconhecido como um dos gargalos na exploração da biomassa (ROY; MOHANTY, 2019). A dificuldade da colheita da biomassa está relacionada com o pequeno tamanho das células e sua elevada concentração no meio, sendo possível empregar diferentes técnicas para a colheita. Recentemente, estudos voltados a autofloculação e biofloculação de biomassas de microalgas foram alvo de pesquisa, uma vez que são técnicas sustentáveis e não utilizam produtos químicos no processo (MOREIRA et al., 2022; KURNIAWAN et al., 2022). A biofloculação utiliza outros microrganismos para flocular a biomassa de alga, sendo esses microrganismos bactérias (NGUYEN et al., 2020) e fungos (NAZARI et al., 2021), enquanto que a autofloculação pode ser realizada a partir de células de microalgas (CHENG et al., 2020).

O processo de conversão de biomassas de microalgas em biocombustíveis como biodiesel, bioetanol e biometano é fundamental para a quebra da parede celular microbiana por meio de técnicas de pré-tratamento (SANKARAN et al., 2020). Dentre esses processos de ruptura celular se destaca os métodos físicos (YU et al., 2020; MANMAI et al., 2022), fisicoquímicos (HAMRAOUI et al., 2020; YUAN et al., 2020).

Os processos citados de pré-tratamento são utilizados de forma anterior à hidrólise enzimática, sendo métodos que facilitam o acesso das enzimas no sítio ativo da estrutura correspondente. Dessa forma, os processos de hidrólise enzimática são geralmente usados para converter biomassa em bioprodutos de alto valor agregado. As principais aplicações dos métodos hidrolíticos envolvem a extração ou conversão de biomoléculas como carboidratos, lipídios, proteínas e compostos bioativos (GIANG et al., 2019; JUÁREZ et al., 2016; KHAN et al., 2017; NGUYEN et al., 2020; ZHAO et al., 2022).

Como vantagem da hidrólise enzimática frente a outros métodos está a especificidade de cada enzima sobre o substrato, focando na bioconversão de substâncias complexas como amido em substâncias simples como glicose. Além do uso de enzimas comerciais, enzimas microbianas *homemade* são comumente produzidas. O processo pode envolver a valorização de subprodutos, como resíduos agroindustriais, por exemplo, e por meio do uso de microrganismos e meios de cultura específicos, enzimas ou complexos enzimáticos com

capacidade de hidrólise podem ser obtidos, resultando em um processo mais sustentável e de baixo custo (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015; RODRIGUES et al., 2017).

Todavia, estudos que exploram a hidrólise de biomassas biofloculadas por fungos são escassos, visto que a biomassa biofloculada possui a presença de células de espécies de fungos, além da célula microalga. Dessa forma, nos processos de hidrólise enzimática de biomassas biofloculadas, tanto a composição da parede celular das microalgas pode variar de acordo com a espécie (SCHENK et al., 2008) como também a espécie do microrganismo biofloculador. Nesse sentido, de acordo com a composição da parede celular da microalga e do fungo, associações de enzimas comerciais podem ser utilizadas para obter um maior rendimento de hidrólise (GUSAKOV et al., 2007; GARCÍA et al., 2012). Nesse sentido, objetivou-se estudar diferentes métodos físicos e enzimáticos na hidrólise da biomassa da microalga *Spirulina platensis* biofloculada com o fungo *Aspergillus niger*.

2 Material e Métodos

A microalga *Spirulina platensis* utilizada nos experimentos de hidrólise foi cultivada em *raceway ponds* de 180 L, com temperatura controlada (25 °C), luminosidade natural, com agitação constante, por 25 dias até final da fase estacionária de crescimento. Em seguida foi realizada a colheita da biomassa através do uso de biofloculante fúngico (*Aspergillus niger*), cultivado em fermentação submersa, utilizando farelo de trigo. O biofloculante foi utilizado em proporção de 1:8 (fungo:microalga) e foi realizado o ajuste da milivoltagem do meio para neutralização de cargas positivas e negativas, visando maior formação de flocos e separação da biomassa. As biomassas foram caracterizadas utilizando metodologia de composição centesimal (AOAC, 2000).

2.1 Testes preliminares de ruptura celular e hidrólise enzimática

Inicialmente foram realizados testes para avaliação do melhor pré-tratamento para ruptura celular da biomassa biofloculada. A biomassa biofloculada foi submetida a três tipos de pré-tratamentos físicos para ruptura celular e, em seguida, foi realizada a hidrólise enzimática, utilizando enzimas comerciais. Foi realizada a determinação de açúcares redutores totais (MILLER, 1959) ao final de cada etapa a fim de avaliar a eficiência dos pré-tratamentos sobre a hidrólise enzimática. Nesta etapa não foram avaliadas as biomassas de forma individual, somente a biomassa biofloculada. Na Tabela 1 está descrito o delineamento experimental com

os diferentes métodos físicos e enzimáticos de hidrólise. Para realização de cada tratamento, foi preparada uma suspensão de 10% (m/v) da biomassa biofloculada em tampão fosfato pH 4,5. O pH foi selecionado conforme valores ideais de ativação das enzimas a serem utilizadas posteriormente, descritos pelo fabricante (*Novozymes*® - Bagsvaerd, Denmark). Os reatores foram preparados com volume total de 250 mL em Erlenmeyer de 500 mL.

Tabela 1 - Delineamento dos ensaios de hidrólise da biomassa biofloculada.

Testes de Ruptura Celular			
Tratamento	Biofloculado	Método	Descrição
1		Sonda ultrassônica*	Sonicação por 10 ciclos de 60 s.
2	<i>Spirulina platensis</i>	Autoclave	Autoclavagem por 20 min a 121°C.
3	+ <i>A. niger</i>	Congelamento/ descongelamento*	Congelamento e descongelamento - 24 h cada ciclo.
Testes de hidrólise enzimática			
Tratamento	Biofloculado	Método	Descrição
1		Sonda Ultrassônica*	Amylase AG XXL + Saczyme GO 2 Celluclast 1.5L + Ultraflo Max
2		Autoclavagem	Amylase AG XXL + Saczyme GO 2 Celluclast 1.5L + Ultraflo Max
3	<i>Spirulina platensis</i> + <i>A. niger</i>	Congelamento/ descongelamento*	Amylase AG XXL + Saczyme GO 2 Celluclast 1.5L + Ultraflo Max
4		Gelatinização	Amylase AG XXL + Saczyme GO 2 Celluclast 1.5L + Ultraflo Max

*Gelatinização realizada em banho termostático a 100°C por 10 min.

A gelatinização acompanhada dos métodos de sonda ultrassônica e congelamento/descongelamento se faz necessária, uma vez que a ambas as técnicas não

trabalham com elevadas pressões e temperaturas, sendo necessária o tratamento térmico para gelatinização dos polissacarídeos (SINGH et al., 2016).

Após ruptura celular da biomassa biofloculada, foi realizada a hidrólise enzimática utilizando as enzimas amilase (Amylase AG XXL) + amiloglicosidase - AMG (Saczyme GO 2), celulase (Celluclast 1.5L) + xilanase (Ultraflo Max) da *Novozymes*®, cedidas pela empresa LNF Enzimas. A concentração das enzimas foi estabelecida conforme indicação de uso do fabricante (100 mL/m³). A escolha por essas enzimas está associada diretamente à estrutura celular dos microrganismos. Os ensaios de hidrólise foram realizados em estufa termostaticada a 50 °C (temperatura ideal de ativação das enzimas indicada pelo fabricante), com agitação de 120 rpm e, amostragens foram realizadas no tempo inicial (sem adição de enzimas) e a cada 1 h (com adição das enzimas) até estabilidade dos resultados de açúcares redutores totais.

2.2 Estudos de caracterização das enzimas: verificação de pH e temperatura ótimos

As enzimas que foram utilizadas na hidrólise das biomassas (amilase, amiloglicosidase - AMG, celulase e xilanase), foram submetidas a análises de atividade enzimática, utilizando seus respectivos substratos padrões, visto que as enzimas podem perder atividade ao longo do tempo e, mesmo lotes diferentes podem apresentar atividades enzimáticas diferentes. Ainda, nesta etapa foi testada outra enzima α -amilase (LpHera), adquirida posteriormente aos testes preliminares de hidrólise realizados. Além disso, foi realizada a caracterização das enzimas em relação ao pH e temperaturas ótimas, utilizando um planejamento experimental 3^k (k = 2) (Tabela 3), com variação de pH (4,5; 5,5 e 6,5) e temperatura (50 °C; 60 °C e 70 °C) para todas as enzimas, exceto para a LpHera (α -amilase), a qual foram testadas temperaturas de 50 °C, 70 °C e 90 °C. Os valores de variação foram estabelecidos conforme condições de otimização do fabricante em relação ao uso das enzimas (pH 4,5 e temperatura de até 90 °C para LpHera e, 50 °C para as demais enzimas).

Tabela 3 – Planejamento experimental 3^k (k=2) para a otimização do uso das enzimas selecionadas.

Experimento	X1	X2	X3
1	-1(4,5)	-1(50)	-1(50)
2	-1(4,5)	0(60)	0(70)
3	-1(4,5)	+1(70)	+1(90)
4	0(5,5)	-1(50)	-1(50)

5	0(5,5)	0(60)	0(70)
6	0(5,5)	+1(70)	+1(90)
7	+1(6,5)	-1(50)	-1(50)
8	+1(6,5)	0(60)	0(70)
9	+1(6,5)	+1(70)	+1(90)

X1: níveis de variação do pH para cada uma das enzimas; X2: níveis de variação de temperatura para as enzimas Saczyme GO2 (amiloglicosidase), Amylase AG XXL (amilase), Celluclast 1.5 L (celulase) e Ultraflo Max (xilanase); X3: níveis de variação de temperatura para a enzima LpHera (α -amilase).

A atividade das enzimas amilase (LpHera, Amylase AG XXL) e amiloglicosidase - AMG (Saczyme GO 2) foi realizada através de metodologia adaptada de Rempel et al. (2018), utilizando como substrato padrão o amido (solução 1% em tampão fosfato 0,2 M). Em tubos de ensaio, foram adicionados 4 mL de solução de amido e 1 mL de enzima. Os tubos foram incubados em mesa agitadora por 30 min com temperatura de 50 °C. Em seguida, foi realizada a inativação das enzimas com a adição de 1 mL de NaOH 1 M seguido de fervura em banho-maria a 100 °C por 1 min.

Da mesma forma, foi realizada a atividade da enzima celulase (Celluclast 1.5 L) e xilanase (Ultraflo Max), porém, utilizando como substratos a carboximetilcelulase (CMC) e papel filtro, respectivamente. Ambas serão realizadas em solução tampão fosfato 0,2 M na concentração de 1%. As atividades enzimáticas foram avaliadas através da determinação de açúcares redutores totais (AR), utilizando o método 3,5 DNS (MILLER, 1959), com precipitação prévia de proteínas com Carrez I e II. Para os três métodos de determinação, as atividades enzimáticas foram calculadas através da Equação 3 (ALVA et al., 2007).

$$AE = \frac{AR}{t} * \frac{1000}{180} * FD \quad (3)$$

Sendo: [AR] = Concentração de açúcares redutores (mg/mL); t = Tempo de reação (30 min); FD = fator de diluição.

2.3 Estudo da carga enzimática e tempos de hidrólise

Após a caracterização das enzimas quanto ao pH e temperaturas ótimas de uso em seus respectivos substratos, foi realizado um estudo da concentração de enzimas necessária para a hidrólise da biomassa biofloculada. Nas condições otimizadas para cada enzima, foram testadas concentrações de 0,01%, 0,03% e 0,05%, sendo que 0,01% correspondem aos valores

estabelecidos pelo fabricante das enzimas (100 mL/m³). Os experimentos foram realizados em duplicata, em Erlenmeyer de 250 mL com suspensão de 10 % (m/v) em tampão fosfato 0,2 M e volume útil de 50 mL. A biomassa foi submetida a processo de ruptura celular e gelatinização em autoclave por 20 min a 121 °C. Os reatores foram incubados em banho-maria a 120 rpm, com amostras retiradas a cada 1 hora para análise de açúcares redutores, sendo o tempo inicial (t₀) sem adição de enzimas, e os demais tempos, com adição de enzimas, por um período de 6 horas (Saczyme GO 2 e Amylase XXL) e 4 horas (LpHera, Celluclast 1.5 L e Ultraflo Max), quando houve a estabilização dos resultados. Tanto os pHs, como as temperaturas utilizadas foram definidos conforme ensaios de otimização anteriores.

2.4 Estudo do uso associado de enzimas

Estabelecidas as melhores condições de uso das enzimas (temperatura, pH, concentração e tempo de ação), foram testadas diferentes associações de enzimas na hidrólise da biomassa biofloculada. Para os ensaios foram preparados reatores de 50 mL em Erlenmeyers de 250 mL, com suspensão de biomassa de 10%. A suspensão passou por pré-tratamento para ruptura celular e posteriormente, realizou-se a adição das enzimas. Foram realizados 3 ensaios em duplicata: Blend 1: α -amilase + AMG; Blend 2: α -amilase + AMG + celulase; Blend 3: α -amilase + AMG + xilanase; (a partir das enzimas testadas nas etapas anteriores, foram selecionadas enzimas específicas, conforme ação na parede celular microbiana e faixa de operação, sendo a α -amilase (LpHera), AMG (Saczyme GO 2), celulase (Celluclast 1.5 L) e, xilanase (Ultraflo Max)); todos os ensaios utilizaram a α -amilase inicialmente em temperatura de 90 °C por 2 h e, em seguida houve a adição das demais enzimas, com a temperatura de 60 °C até estabilidade nos rendimentos de açúcares redutores totais. Para os blends de enzimas foram avaliados ainda, diferentes métodos de pré-tratamento (autoclave, ultrassom, ultrassom + autoclave, gelatinização), levando em consideração os melhores resultados da etapa inicial deste estudo. A gelatinização foi utilizada como controle, pois todos os métodos passam por processo posterior de gelatinização, exceto a autoclavagem que já utiliza altas temperaturas. A eficiência de hidrólise foi calculada utilizando relação entre a composição de polissacarídeos presentes na biomassa inicialmente em g/100g e após a hidrólise, também em g/100g. A relação foi apresentada em percentual (%). A Equação 1 foi utilizada para calcular a eficiência de hidrólise das biomassas.

$$EH(\%) = (CHO_i/CHO_f) * 100 \quad (1)$$

Sendo: EH(%) = eficiência de hidrólise; CHO_i = percentual de carboidratos iniciais; CHO_f = percentual de carboidratos após a hidrólise;

Para comparação, a partir das melhores condições obtidas nestes ensaios, foi realizada a hidrólise das biomassas da microalga *Spirulina platensis* e do fungo *Aspergillus niger*, de forma individual.

2.5 Determinações Analíticas

2.5.1 Determinação de açúcares redutores totais

Para determinação dos açúcares redutores gerados, foram realizadas amostragens de 1 mL de cada tratamento com posterior precipitação das proteínas, utilizando 0,4 mL de soluções de Carrez I (solução 15% de ferrocianato de potássio) e II (solução 30% de sulfato de zinco), conforme metodologia de Miller (1959), que é baseado em uma curva padrão de glicose para o reagente DNS. A curva padrão ($R^2 = 0,9996$) utilizada nos experimentos pode ser observada na Equação 2.

$$y = (0,215x - 0,0059) * FD \quad (2)$$

Sendo: y = Concentração de açúcares redutores (g/L); x = Absorbância a 546 nm; FD = fator de diluição;

A partir dos resultados do delineamento apresentado na Tabela 2, foi selecionado o melhor pré-tratamento para ser utilizado nas etapas seguintes. Além disso, nas etapas seguintes, passou a ser utilizada a enzima α -amilase (LpHepa), da mesma fabricante, com intuito de aumentar as eficiências de hidrólise.

2.5.2 Caracterização das biomassas

As biomassas foram caracterizadas utilizando metodologia de composição centesimal (AOAC, 2000). Os substratos foram caracterizados quanto aos teores de proteínas totais, lipídios, cinzas, umidade e carboidratos totais.

2.6 Tratamento dos dados

O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software *Statistica 10* através de análise de variância (ANOVA), seguido de Teste de Tukey para comparação de médias, com nível de confiança de 95%.

3 Resultados e Discussões

Inicialmente as biomassas de estudo foram caracterizadas quanto a sua composição centesimal, visto que os rendimentos de açúcares e eficiência de hidrólise são baseados na composição de carboidratos presentes nas biomassas. A composição centesimal das biomassas utilizadas neste estudo está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição centesimal* das biomassas utilizadas neste estudo.

Biomassa	Carboidratos	Proteínas	Lipídios	Cinzas	Umidade
<i>S. platensis</i> + <i>A. niger</i>	29,14	31,02	32,08	0,35	7,41
<i>Spirulina</i> <i>platensis</i>	10,33	37,88	44,06	0,41	7,32
<i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	22,71	27,16	41,55	0,54	8,04

*Os resultados estão expressos em percentual (g/100g)

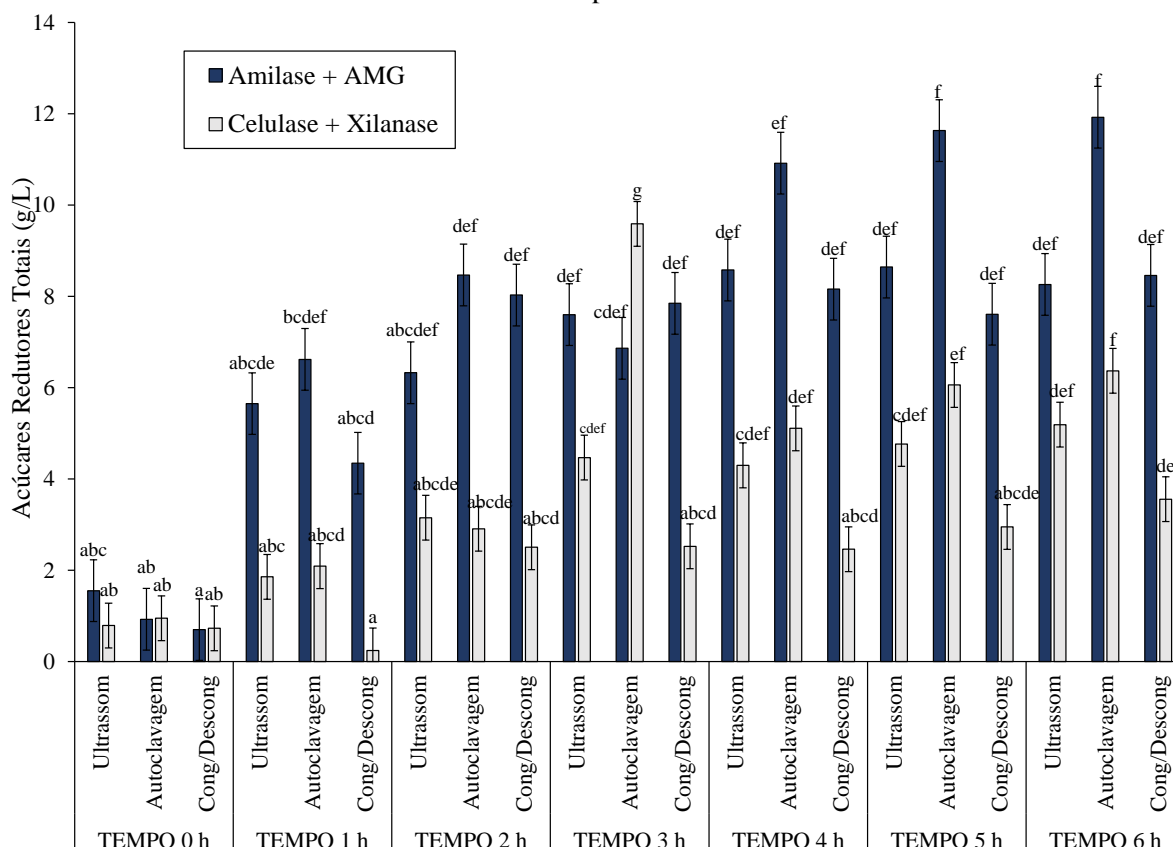
3.1 Testes preliminares de ruptura celular e hidrólise enzimática

A Figura 1 apresenta os resultados de liberação de açúcares redutores totais (AR) para os três tipos de pré-tratamento testados, utilizando enzimas amilase e amiloglicosidade associadas e, também, celulase e xilanase.

Para as enzimas amilase + AMG (Amylase XXL e Saczyme GO 2), observou-se que as maiores médias e igualdade estatística foram obtidas nos tempos 5 h e 6 h de hidrólise ($11,63 \pm 0,69 \text{ g.L}^{-1}$ e $11,93 \pm 1,12 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente), ambos quando utilizada a autoclavagem como pré-tratamento. No tempo 0 h, como não houve a adição de enzimas, é possível avaliar a influência dos pré-tratamentos de forma isolada na liberação imediata de AR. Assim, observou-se que os pré-tratamentos apresentaram resultados iniciais muito próximos, porém, ao longo do tempo, a autoclavagem apresentou as melhores eficiências ($p < 0,05$). Se comparada às demais técnicas utilizadas, a autoclave tem como vantagem a utilização de altas temperaturas e

pressões, fazendo com que ocorra, não só o rompimento celular através da evaporação da água presente intracelularmente na microalga, como também, a gelatinização dos polissacarídeos liberados no meio. Ainda, é possível que o rompimento das células se mantenha de forma gradual durante a sacarificação, quando utilizado o banho termostatizado. O ultrassom, realiza o rompimento celular por cavitação e o congelamento e descongelamento, através de cristais expansivos do processo de congelamento, nesse sentido, mesmo que os dois tratamentos sejam seguidos por gelatinização, ela pode não ser tão eficiente por não utilizar altas pressões no processo e, conseqüentemente, prejudicando o processo de liberação de AR ao longo do tempo.

Figura 1 – Rendimentos de AR* quando utilizadas as enzimas, amilase + AMG e celulase + xilanase, com diferentes pré-tratamentos.



Legenda: Amilase = Amylase XXL; AMG (amiloglicosidase) = Saczyme GO 2; Celulase = Celluclast 1.5 L; Xilanase = Ultraflo Max.

*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

As amilases tradicionalmente apresentam bons resultados de hidrólise enzimática em biomassas microalgais (REMPEL et al., 2018; SOSSELLA et al., 2020; ZAPAROLI et al., 2020), apresentando também, os melhores resultados de eficiência no presente estudo, em comparação com as demais enzimas, o que evidencia a hipótese de a parede celular ser mais

branda nesta microalga, com o amido semelhante aos dos vegetais superiores. Conforme documentação da *Novozymes*®, as enzimas comerciais Amylase AG XXL + Saczyme GO2 atuam na quebra das ligações α -1,4 e α -1,6 glicosídicas. Por sua vez, essas são as principais ligações que formam os polissacarídeos das paredes celulares de glucanos e peptidoglicanos, tanto da *S. platensis* como do *A. niger* (VANEYKELENBURG, 1980; BEAUVAIS et al, 2014).

Nazari et al (2021) realizaram um estudo de hidrólise enzimática de biomassa biofloculada de *S. platensis* e *A. niger* utilizando amilase e amiloglicosidase (Liquozime® Supra 2.2X e AMG® 300L, *Novozymes*®, respectivamente) em concentração de sólidos de 10% (m/v). Os resultados obtidos foram de aproximadamente 6 g.L⁻¹ de AR em 6 horas de hidrólise, sendo o pré-tratamento usado o congelamento/descongelamento seguido de gelatinização. Em nosso estudo, quando utilizada a autoclavagem como pré-tratamento, houve a liberação de aproximadamente 12 g.L⁻¹ com 5 h de hidrólise. Uma possível diferença entre os estudos, entretanto, era a composição química do biofloculado, sendo que na biomassa de nosso estudo, os percentuais de microalga:fungo são superiores (resgatar quanto o Mateus tinha).

A autoclavagem possibilita, através de elevada temperatura e pressão, quebrar os açúcares mais complexos e facilitar a hidrólise por parte das enzimas. Quanto a futuras conversões biotecnológicas, considerando os pré-tratamentos analisados, observa-se que a rota enzimática não obtém elevadas eficiências de hidrólise. Nesse sentido, a utilização de pré-tratamentos químicos pode ser eficaz para romper principalmente a parede celular dos fungos, composta por polissacarídeos complexos (YOSHIMI et al., 2016).

Em relação às enzimas celulase e xilanase (Celluclast 1.5 L e Ultraflo Max), o pré-tratamento que melhor influenciou os resultados de hidrólise foi a autoclavagem, com as maiores médias observadas no tempo de 3 h ($9,58 \pm 2,59$ g.L⁻¹) seguido do tempo 6 h ($6,36 \pm 0,60$ g.L⁻¹). Comparando com estudo de Shokrkar et al. (2017), ao utilizar β -glicosidase/celulase e amilases, com a adição das enzimas realizada de forma individual (dentro das condições ideais otimizadas de cada uma), foram obtidos rendimentos de glicose de aproximadamente 85% em 40 min de ensaio. Ainda, o estudo utilizou a abordagem químioenzimática, com a hidrólise ácida com HCl 0,5 M. Visto a resistência da parede celular fúngica, a metodologia mostra-se promissora. Esses resultados foram obtidos utilizando somente biomassa de *S. platensis* em diferentes concentrações, sendo assim, o presente estudo obteve resultados promissores com a associação de enzimas celulase e xilanase, alcançando eficiências apenas 20% menores que as amilases.

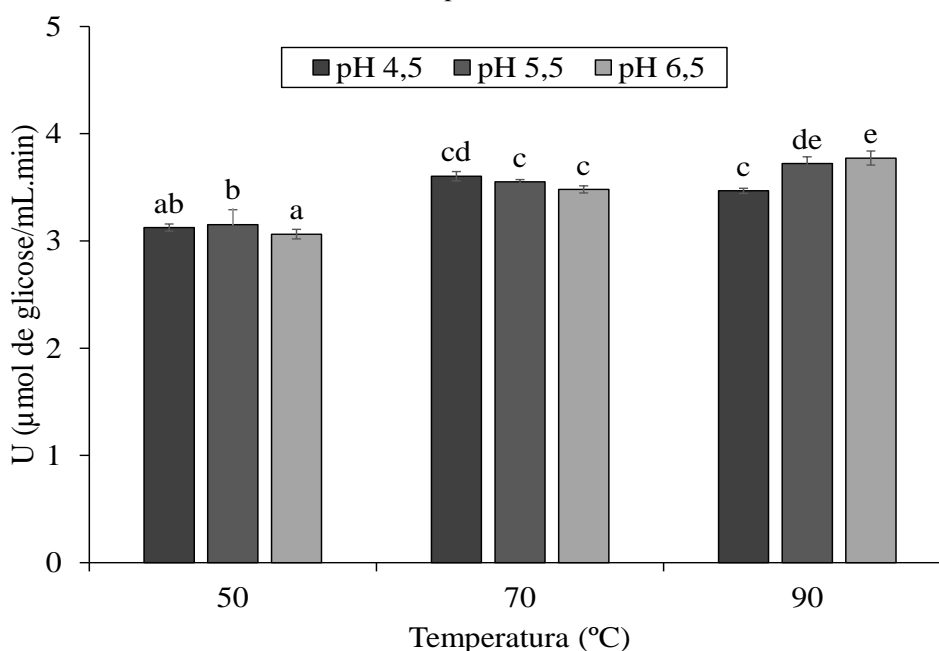
É importante ressaltar que, são poucos os estudos que avaliam a hidrólise de biomassas microalgais biofloculadas por fungos, sendo assim, é importante o estudo de diferentes técnicas

associadas de ruptura celular que possibilitem maior exploração dos compostos presentes na biomassa. Assim, para as próximas etapas, foram selecionadas as técnicas de autoclavagem para ruptura celular da microalga e gelatinização dos polissacarídeos, para posterior hidrólise enzimática.

3.2 Estudos de caracterização das enzimas: verificação de pH e temperatura ótimos

Para a caracterização da enzima LpHera (α -amilase), utilizando como substrato padrão a solução de amido, as maiores atividades enzimática (U) foram observadas para o experimento de pH 6,5 e temperatura de 90 °C ($3,77 \pm 0,065$ U), igual estatisticamente ($p > 0,05$) ao ensaio de pH 5,5 e temperatura de 90 °C ($3,72 \pm 0,060$ U). Já as menores médias foram observadas quando utilizados pH e temperatura para 6,5 e 50 °C, respectivamente ($3,06 \pm 0,044$ U). A Figura 2 apresenta os resultados de atividade enzimática para a enzima LpHera (α -amilase). Esta enzima possui habilidade de atuar em condições operacionais de gelatinização, devido sua termoestabilidade, o que permitiu que fosse adicionada já nessa etapa.

Figura 2 – Atividade enzimática específica para a enzima LpHera* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.



*Médias \pm desvio padrão.

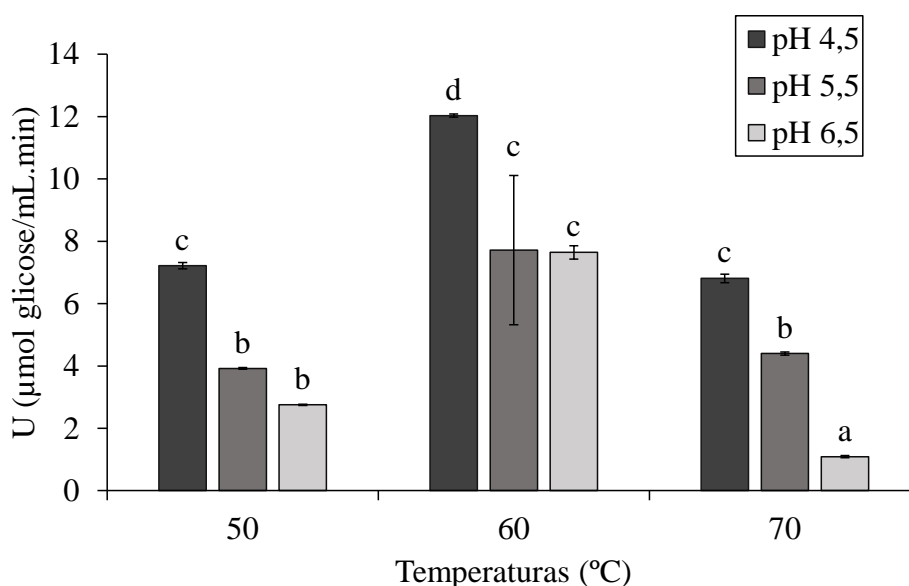
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

A enzima LpHera (α -amilase) é uma das mais utilizadas para a produção de etanol, segundo o fabricante, devido principalmente a sua termoestabilidade. Esta enzima é uma α -

amilase com estabilidade ácida intermediária, permitindo assim a quebra do amido dentro de faixas de pH 4,5-4,8, ao contrário do pH usual que fica entre 5,0-6,5 de operação das α -amilases comerciais utilizadas no mercado atualmente. Para a etapa de sacarificação, normalmente é utilizado o pH 4,5 para que a LpHera cumpra a faixa de atividade da enzima (ESHRA et al., 2014). A faixa de operação desta α -amilase resulta em uma menor demanda de produtos químicos durante o processo de sacarificação, além de aumentar em até 0,2 % os rendimentos de açúcares do processamento do amido, o que faz com que o processo seja mais econômico (PHUONG et al., 2022). Não foram encontrados estudos utilizando a enzima LpHera na hidrólise de carboidratos microalgais.

Quando caracterizada a enzima Saczyme GO 2 (AMG), utilizando como substrato padrão a solução de amido, os melhores resultados de atividade enzimática (U) foram observados para o experimento de pH 4,5 e temperatura de 60 °C ($12,03 \pm 0,049$ U). Já os menores resultados foram observados com o aumento do pH e temperatura para 6,5 e 70 °C, respectivamente ($1,08 \pm 0,035$ U). A Figura 3 apresenta os resultados de atividade enzimática para a enzima Saczyme GO 2.

Figura 3 – Atividade enzimática específica para a enzima Saczyme GO 2* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.



*Médias \pm desvio padrão.

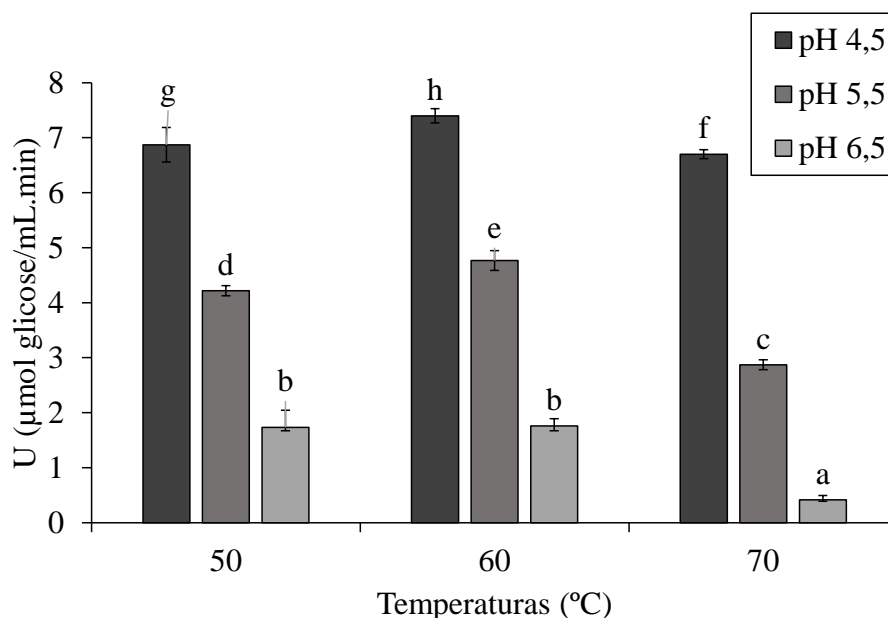
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

Castejón e Marko (2022) utilizaram as enzimas Viscozyme, Celluclast 1.5L e Saczyme GO 2 (AMG), todas fornecidas pela Novozymes®, para a extração de lipídios da microalga *Nannochloropsis gaditana* a partir das condições de pH e temperatura estabelecidos pelo

fabricante (4,5 e 50 °C, respectivamente). Não foi realizada a caracterização das enzimas para garantir melhores resultados de extração, e utilizando somente a enzima Saczyme GO 2 (amiloglicosidase), foram obtidos os maiores rendimentos de lipídios ($25,70 \pm 0,5\%$). De forma geral, os estudos que utilizam a enzima Saczyme GO 2 possuem foco na hidrólise de matérias primas lignocelulósicas (MIRANDA et al., 2019), ou na extração de lipídios de biomassas, sendo o estudo de Castejón e Marko (2022) citado como o primeiro a utilizar a enzima Saczyme GO 2 em microalgas. Além disso, não são realizadas caracterizações de pH e temperatura, para os estudos citados, sendo utilizadas as condições ideais descritas pelo fabricante. Nesse sentido, maiores eficiências poderiam ser alcançadas se, uma caracterização fosse realizada para o lote utilizado e, ao longo do tempo de armazenamento da enzima.

Para a enzima Amylase AG XXL (amilase), da mesma forma, os melhores resultados de atividade enzimática foram observados com pH 4,5 e temperatura de 60 °C ($7,39 \pm 0,130$ U) enquanto os menores valores foram identificados no ensaio de pH 6,5 e temperatura de 70 °C ($0,41 \pm 0,026$ U). A Figura 4 apresenta os resultados de atividade enzimática para a enzima Amylase XXL.

Figura 4 – Atividade enzimática específica para a enzima Amylase AG XXL* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.



*Médias \pm desvio padrão.

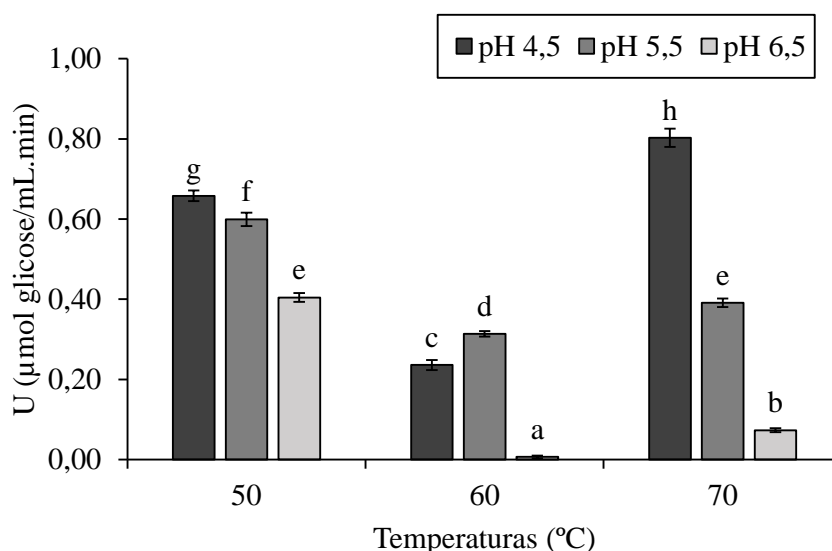
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

Não foram encontrados estudos de hidrólise microalgal utilizando a enzima Amylase AG XXL, porém, alguns estudos testam a enzima AMG 300L da mesma empresa, para a sacarificação de biomassas microalgais e liberação de açúcares redutores totais. Conforme

descrito pela empresa, a faixa de pH e temperatura ideais para o uso da enzima AMG 300L é o mesmo sugerido para a utilização da enzima Amylase AG XXL. Em estudo realizado por Lee et al. (2013) para a hidrólise da microalga *Dunaliella tertiolecta* e obtenção de bioetanol, foi utilizada a enzima AMG 300. Foram utilizados níveis diferentes de temperatura (35 °C; 45 °C e 55 °C) e pH (3,5; 4,5 e 5,5). Os melhores resultados de liberação de açúcares redutores totais foram obtidos utilizando temperaturas de 55 °C e pH 5,5. Valores semelhantes obtidos por Rempel et al. (2019) para a microalga *S. platensis*. Já para o estudo de Pancha et al. (2016) quando utilizada a mesma enzima em diferentes níveis de temperaturas e pH, observou-se que temperaturas abaixo de 30 °C e acima de 55 °C e, pHa abaixo de 3,5 e acima de 6,5 resultaram em menores eficiências de liberação de açúcares redutores totais.

Quando caracterizada a enzima Celluclast 1.5 L em substrato padrão (CMC), os melhores resultados de atividade enzimática foram observados utilizando pH 4,5 e temperatura de 70 °C ($0,8026 \pm 0,022$ U), enquanto os menores valores foram obtidos para o pH 6,5 e temperatura de 60 °C ($0,6579 \pm 0,013$ U). A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para a caracterização da enzima Celluclast 1.5 L em diferentes pHs e temperaturas.

Figura 5 – Atividade enzimática específica para a enzima Celluclast 1.5 L* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.



*Médias \pm desvio padrão.

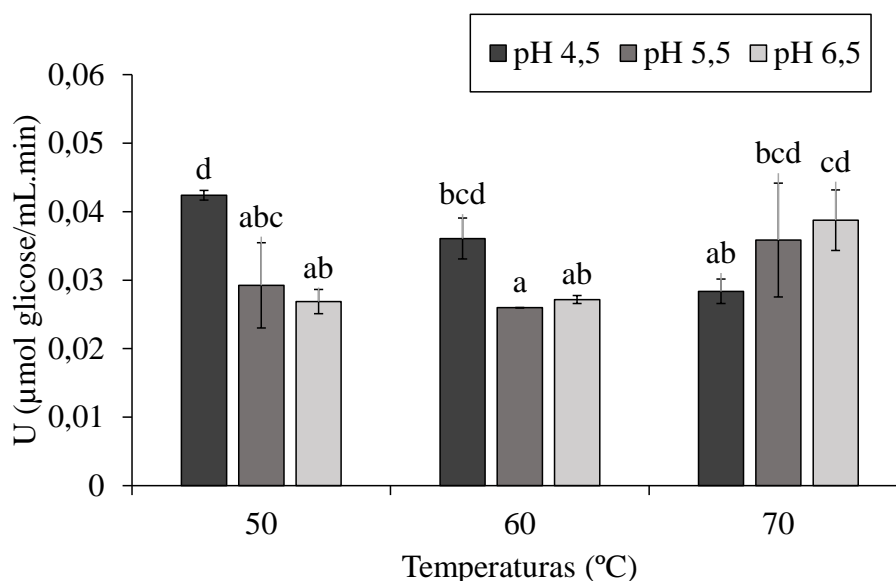
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

No estudo de Rojo et al. (2021) a enzima Celluclast 1.5 L foi utilizada para a liberação de compostos intracelulares de consórcio microalgas-bactérias cultivadas em efluente de suinocultura (A1) e em meio sintético (A2). A enzima foi utilizada com pH 6,5 para A1 e pH

8 para A2, com temperatura de 50 °C para ambos os pHs. Os melhores resultados de liberação de carboidratos foram obtidos para A1 (38,5%) utilizando pH 6,5 e temperatura de 50 °C. Esses valores foram fornecidos conforme o fabricante das enzimas, que é o mesmo fabricante da Celluclast 1.5L utilizada neste estudo. Nesse sentido, conforme a caracterização realizada, utilizando menores valores de pH e maiores valores de temperatura, é possível que os resultados fossem potencializados.

Para a enzima Ultraflo Max as maiores médias e igualdade estatística foram observadas para os experimentos com pH 4,5 e 50 °C ($0,042 \pm 0,0007$ U), seguido dos pHs 6,5 e 5,5 para 70 °C ($0,038 \pm 0,004$ e $0,036 \pm 0,008$ U, respectivamente). Os menores resultados e igualdade estatística foram observados com pH 6,5 e temperaturas de 50 e 60 °C, pH 5,5 e temperaturas de 50 e 60 °C e, também, para pH 4,5 e temperatura de 70 °C. A Figura 6 apresenta os resultados de atividade enzimática específica para a enzima Ultraflo Max.

Figura 6 – Atividade enzimática específica para a enzima Ultraflo Max* quando utilizados diferentes pHs e temperaturas.



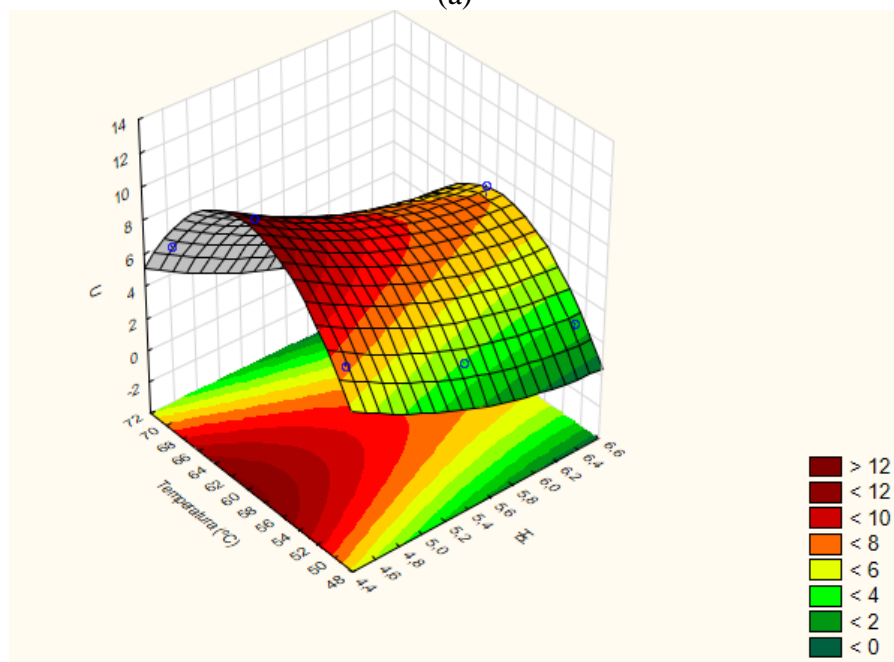
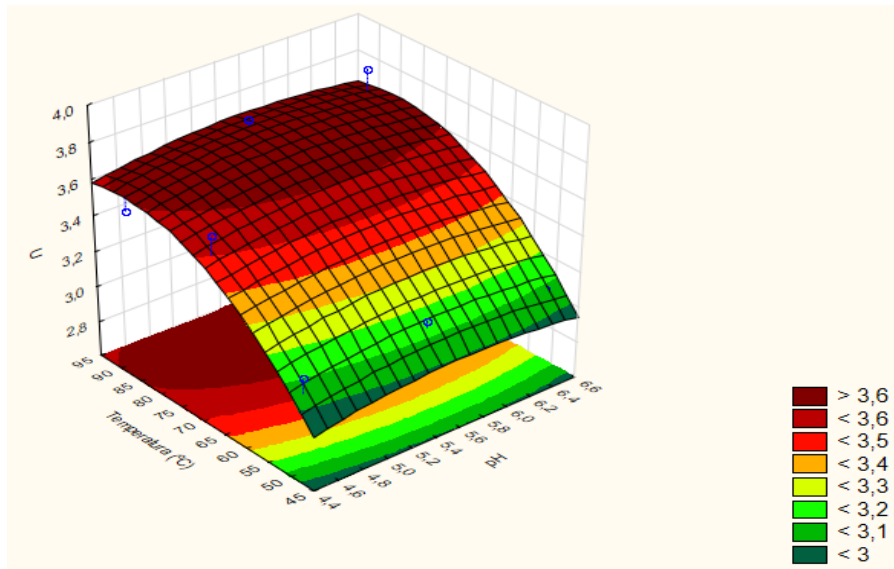
*Médias \pm desvio padrão.

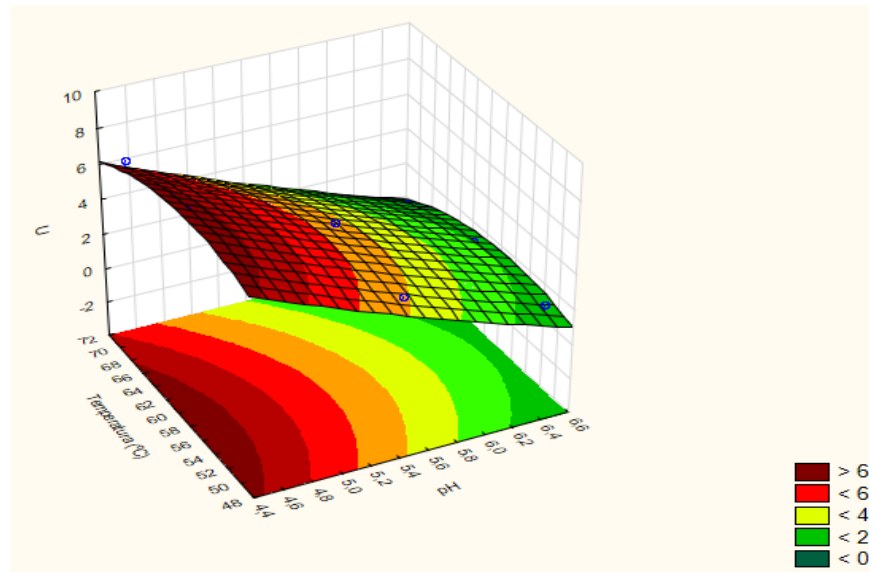
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

Conforme descrito pelo fabricante, as enzimas teriam melhores resultados de hidrólise se utilizadas com pH 4,5 e temperaturas de no máximo 50 °C, exceto LpHera (α -amilase) que trabalha em faixas de até 90°C. No entanto, conforme caracterização realizada, foi possível observar que ao longo do tempo as enzimas podem alterar suas características de atividade e, até mesmo, quando comparadas a lotes diferentes. A Figura 7 apresenta as superfícies de

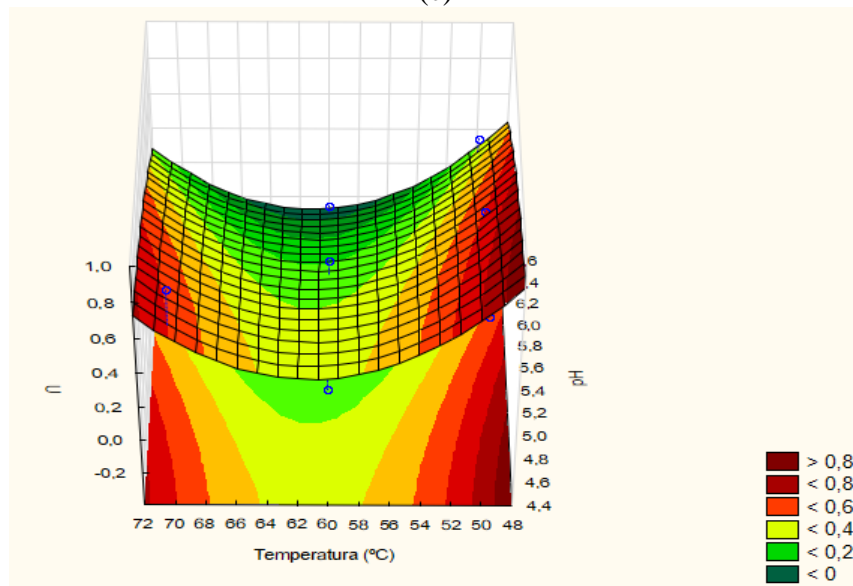
resposta que avaliam a influência do pH e temperatura na atividade enzimática das enzimas estudadas.

Figura 7 – Superfície de resposta para diferentes pHs e temperaturas das enzimas utilizadas neste estudo.

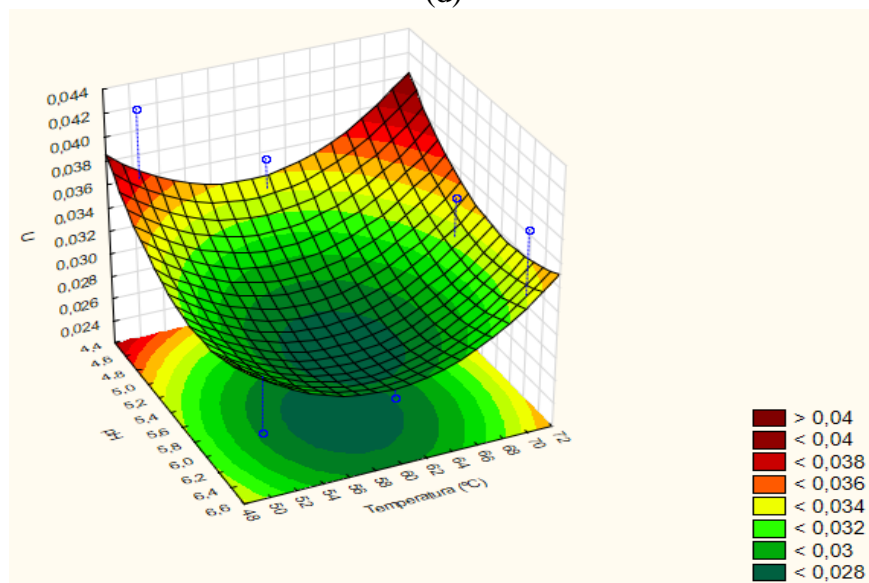




(c)



(d)



(e)

Ao analisar os resultados para a enzima LpHera (α -amilase), tanto o pH quanto a temperatura apresentaram resultados significativos com efeito positivo (3,4337 e 0,5412, respectivamente), sendo assim, maiores valores de pH e temperatura podem apresentar maiores rendimentos de açúcares redutores. Ainda, houve efeito significativo e positivo (0,1831) de interação entre as variáveis de estudo.

Para a enzima amiloglicosidase (Saczyme GO 2), tanto o pH quanto a temperatura apresentaram resultados significativos, porém, com efeitos opostos, sendo o pH com efeito negativo e a temperatura positivo. Isso sugere que menores valores de pH e maiores valores de temperatura poderiam ser ideais para o uso da enzima. Ainda, não houve efeito significativo de interação entre as variáveis de estudo na liberação de açúcares redutores totais.

Quando analisada a enzima Amylase AG XXL, pH apresentou efeito significativo e negativo, enquanto a temperatura apresentou efeito significativo e positivo. A interação entre as variáveis foi significativa e teve efeitos negativos. Para a enzima celulase Celluclast 1.5 L todas as variáveis foram significativas com efeito negativo, inclusive para a interação entre pH e temperatura. Isso sugere que valores mais baixos de pH e temperatura poderiam alcançar maiores rendimentos de açúcares redutores totais.

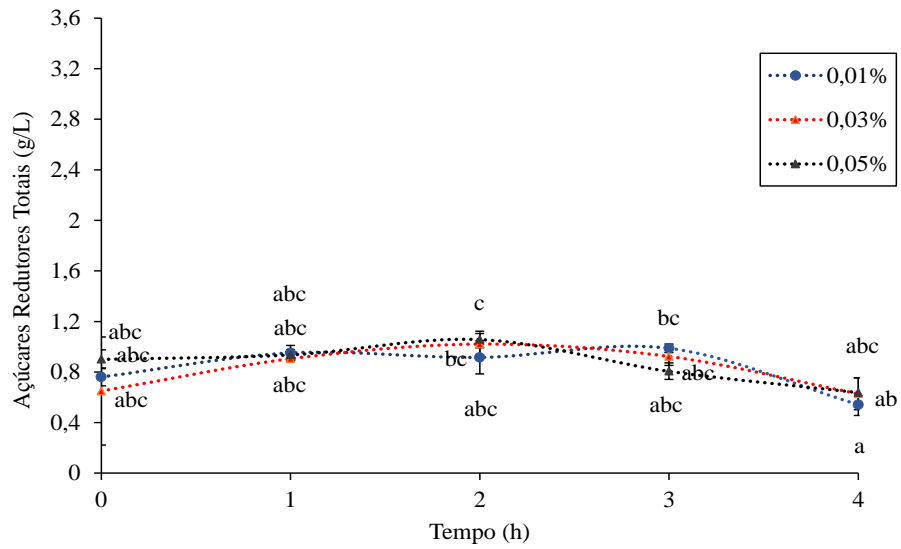
Quando avaliada a enzima Ultraflo Max (xilanase), o pH e a temperatura não apresentaram efeitos significativos. Ainda, em relação a interação entre as variáveis, houve significância com efeito negativo.

Assim, para os testes de percentual de adição de enzima e tempo de hidrólise, foi selecionado o pH 4,5 para todas as enzimas, enquanto a temperatura dos ensaios será de 60 °C para Saczyme GO 2 e Amylase AG XXL, 70 °C para Celluclast 1.5 L, 50 °C para Ultraflo Max e 90 °C para a LpHera.

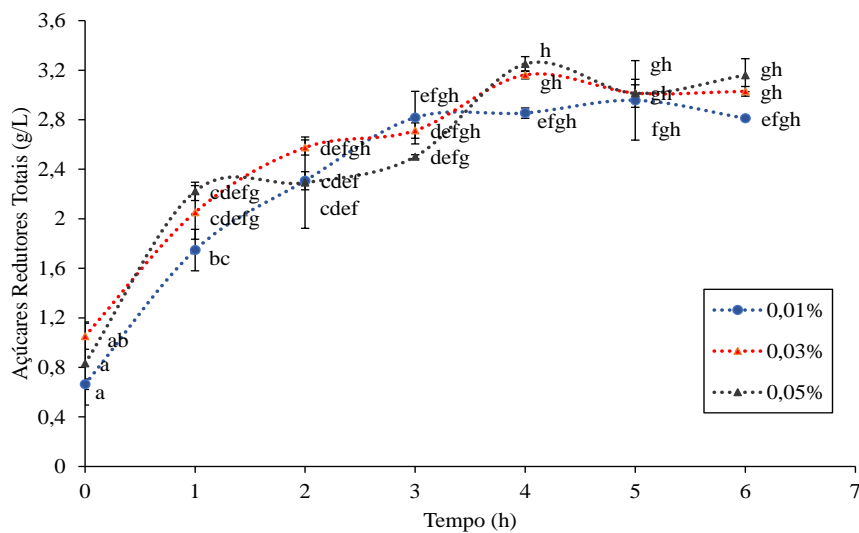
3.3 Estudo da carga enzimática e tempos de hidrólise

Foram realizados ensaios com cargas enzimáticas de 0,01%, 0,03% e 0,05% de cada enzima de forma individual sobre a biomassa biofloculada, sendo que cada uma foi incubada nas temperaturas e pHs específicos selecionados na etapa de caracterização. A Figura 8 apresenta os rendimentos de açúcares redutores totais nos testes das enzimas LpHera (amilase) – a; Saczyme GO 2 (amiloglicosidase) – b; Amylase AG XXL (amilase) – c; Celluclast 1.5 L (celulase) – d; Ultraflo Max (xilanase) – e.

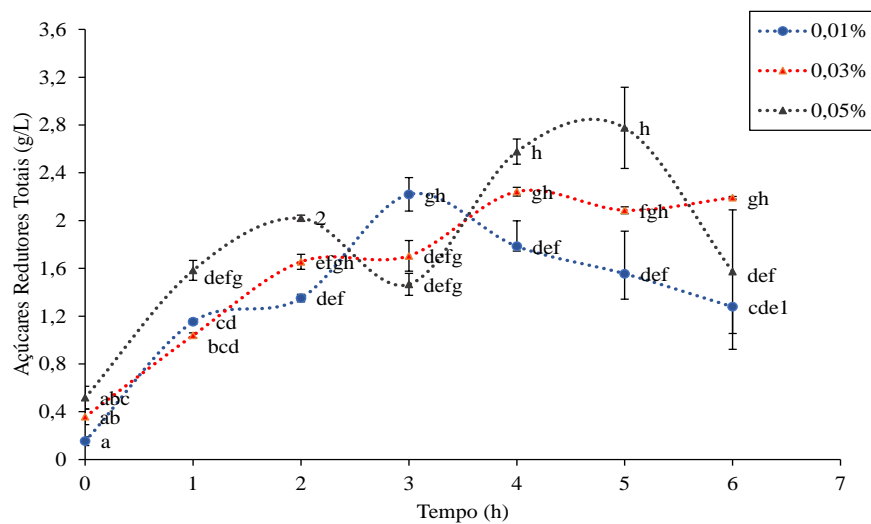
Figura 8 – Açúcares redutores totais* para a enzima LpHera para as diferentes concentrações testadas.



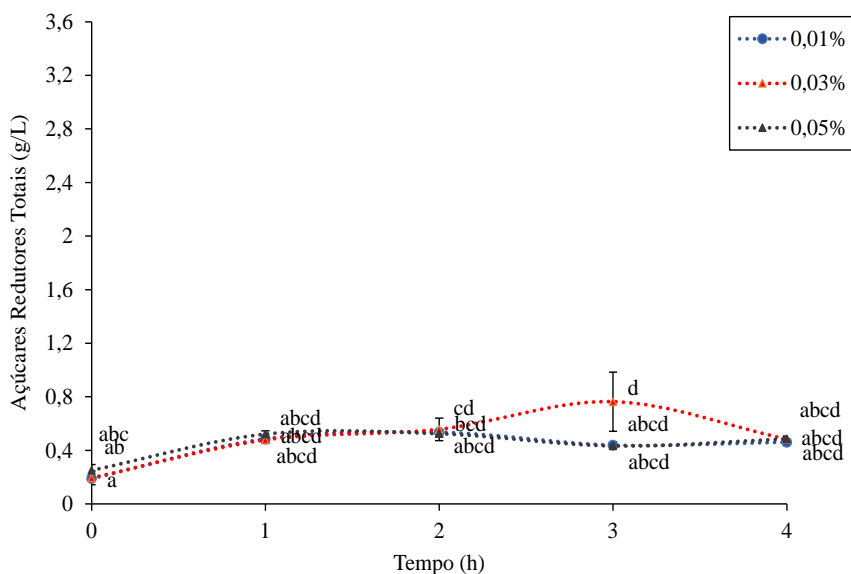
(a)



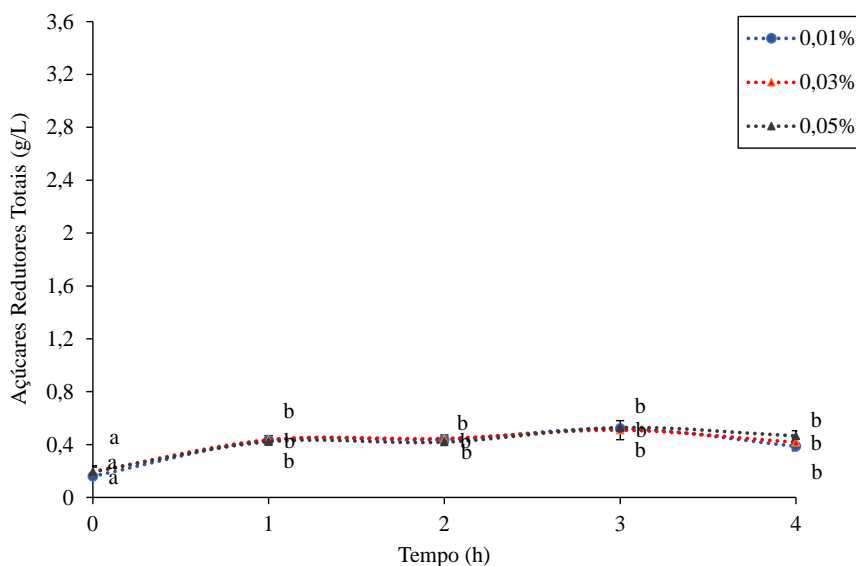
(b)



(c)



(d)



(e)

*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

Para a enzima LpHera as maiores médias foram observadas para 0,05% de adição de enzima no tempo 2h ($1,05 \pm 0,060 \text{ g.L}^{-1}$), seguidas do ensaio contendo 0,03%, no mesmo tempo ($1,02 \pm 0,084 \text{ g.L}^{-1}$), porém sem diferença estatística entre as médias. As menores médias foram observadas para os ensaios com adição de 0,01% de enzima. As menores médias foram observadas para o tempo 4h ($0,54 \pm 0,086 \text{ g.L}^{-1}$). A enzima teve ação desde o início do processo, com estabilidade nos rendimentos de açúcares redutores ao longo das 4 h de ensaio.

Para a enzima Saczyme GO 2, as maiores médias foram observadas para 0,05% de adição de enzima no tempo 4h ($3,25 \pm 0,059 \text{ g.L}^{-1}$), seguidas do ensaio contendo 0,03%, no

mesmo tempo ($3,16 \pm 0,032 \text{ g.L}^{-1}$), porém sem diferença estatística entre as médias. De forma geral, as menores médias foram observadas para os ensaios com adição de 0,01% de enzima. As menores médias foram observadas para o tempo 0h em todos os ensaios, visto que, não houve adição de enzimas, sendo resultado somente do pré-tratamento.

Da mesma forma que para a LpHera (α -amilase) e Saczyme GO 2, a Amylase AG XXL, apresentou as maiores médias e igualdade estatística observadas nos tempos 4h ($2,58 \pm 0,106 \text{ g.L}^{-1}$) e 5h ($2,78 \pm 0,34 \text{ g.L}^{-1}$) utilizando 0,05% de concentração, seguida da concentração de 0,03% em 4h ($2,57 \pm 0,106 \text{ g.L}^{-1}$). Ao utilizar 0,01% de enzima, foi observado médias iguais estatisticamente ($2,22 \pm 0,140 \text{ g.L}^{-1}$) com os experimentos de 0,05% e 0,03%, porém em menor tempo de ensaio (3h). Ao longo do tempo de hidrólise espera-se o aumento no rendimento de açúcares redutores, visto hidrólise dos polissacarídeos pela enzima, porém, houve uma queda no tempo 3 h que pode estar associada a erros experimentais. Segundo Pancha et al. (2010), variações de temperatura, agitação e pH podem ocasionar variações nos rendimentos de AR ao longo do processo de hidrólise.

Conforme observado para a enzima Celluclast 1.5 L, a maior média foi obtida para o ensaio com 0,03% de enzima em 3h ($0,76 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$). O ensaio teve igualdade estatística se comparado com os demais a partir do tempo 1h, visto elevado desvio padrão entre as amostras testadas. Ainda, as menores médias foram observadas para o ensaio com 0,01% de adição de enzima no tempo 0h, sendo igual estatisticamente a maioria dos demais ensaios. Visto isso, os ensaios foram encerrados em 4h, diferente dos demais que alcançaram estabilidade após 6h de ensaio, exceto LpHera (α -amilase).

Para a enzima Ultraflo Max, não houve diferença estatística entre os três tratamentos para o tempo 0h, sendo que, a partir da primeira hora de ensaios, houve estabilidade nos resultados de liberação de açúcares redutores totais.

Mesmo em condições otimizadas de pH e temperatura, os resultados de hidrólise foram baixos, se comparados a estudos conduzidos somente com microalgas (ONAY, 2019; PERON-SCHLOSSER et al., 2021). Isso mostra a resistência do fungo ao processo de rompimento da parede celular. Ainda, a forma de adição das enzimas pode variar, alguns estudos utilizam enzimas amilases inicialmente e, após período de ação da enzima, são adicionadas enzimas celulases (SHOKRKAR et al., 2018a; 2018b). Outros estudos, utilizam a abordagem inversa, com o uso de celulases por 1 hora, para depois adicionar as amilases no meio (CONSTANTINO et al., 2021). Além disso, enzimas podem ser utilizadas de forma combinada (HOSSEINI et al., 2020; REMPEL et al., 2019). O tempo de uso das enzimas de forma individual vai depender da caracterização realizada, que neste estudo, sugere que as amilases e possuem atividade em

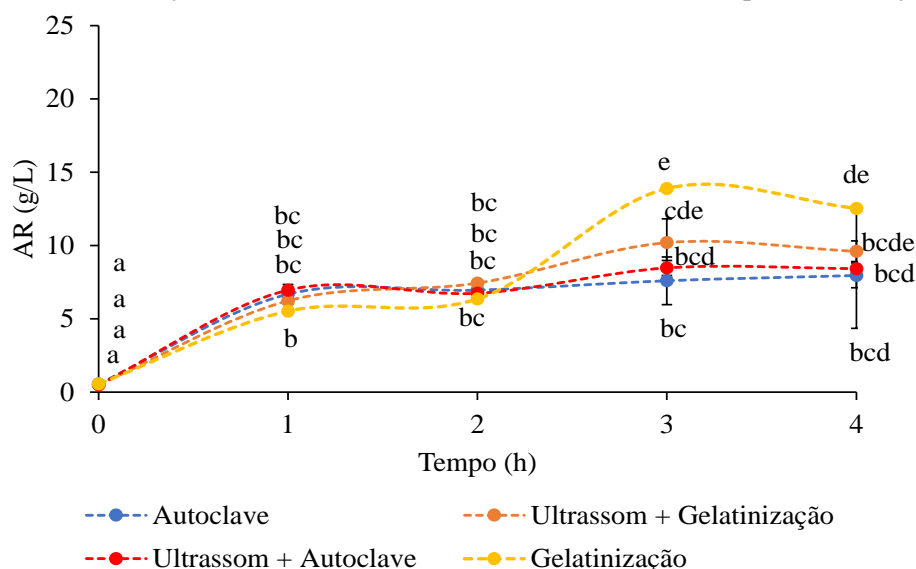
relação aos seus substratos por até 4 h de ensaios, enquanto a celulase e xilanase, após 1 h, alcançam os maiores rendimentos de açúcares redutores. Assim, para a hidrólise da biomassa microalgal biofloculada, as enzimas podem ser adicionadas de forma sequencial para maximizar os rendimentos de açúcares redutores. Nesse sentido, conforme especificado na metodologia, para a próxima etapa, foram selecionadas enzimas específicas, conforme testes realizados e parede celular microbiana, para avaliar o seu uso associado. Será utilizada a enzima LpHera (α -amilase) inicialmente por um período de 2 horas, com posterior adição de enzimas associadas (Saczyme GO 2, Celluclast 1.5 L e Ultraflo Max), em diferentes blends, por mais duas horas de ensaios. O pH de estudo será mantido em 4,5 e, as temperaturas utilizadas serão de 90 °C para a enzima LpHera e 60 °C para as demais enzimas. De forma geral, não houve diferença estatística para a utilização dos diferentes percentuais de enzimas utilizados nos testes, sendo assim, optou-se por padronizar o uso de 0,01% para todas as enzimas.

3.4 Estudo do uso associado de enzimas

3.4.1 Blend 1: LpHera e Saczyme GO 2

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de uso associado de enzimas para as enzimas LpHera (α -amilase) e Saczyme GO 2 (AMG).

Figura 9 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera e Saczyme GO 2.



*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

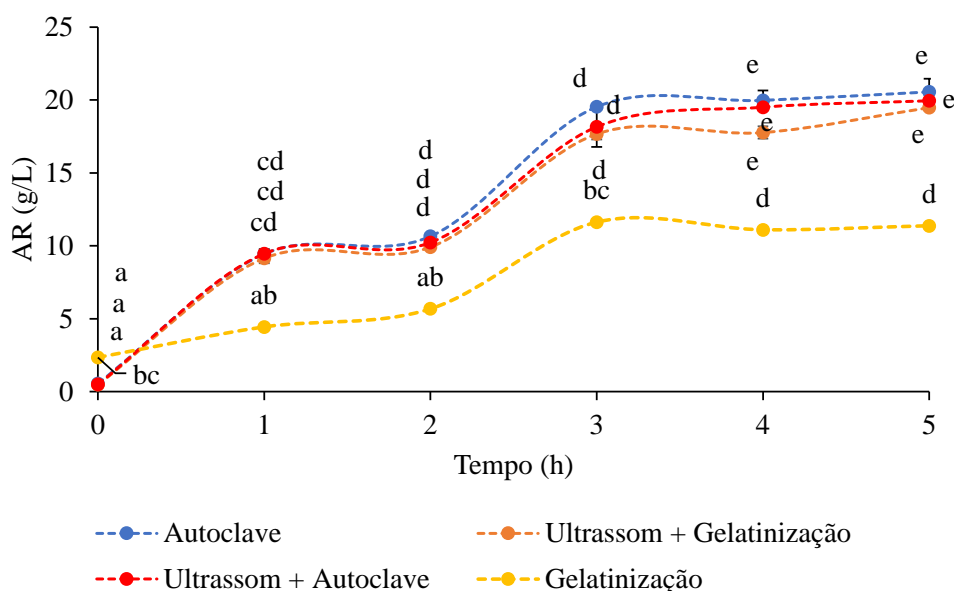
Nos diferentes pré-tratamentos utilizados para esse blend de enzimas, observou-se que as maiores médias de açúcares redutores foram obtidas em 3 h de ensaio, após a adição da enzima Saczyme GO 2 ($13,88 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$), utilizando a gelatinização, sendo que em 4 h para o mesmo pré-tratamento houve estabilidade dos resultados. A LpHera (α -amilase) obteve rendimentos máximos já na primeira hora de ensaios com igualdade estatística para todos os pré-tratamentos analisados, apresentando estabilidade nas duas horas, quando foi inserida a amiloglicosidase. As menores médias foram observadas para o tempo zero (t0h) no qual não há a adição da enzima, somente a liberação de açúcares através dos pré-tratamentos utilizados.

A enzima α -amilase atua transformando o amido em dextrinas e oligossacarídeos devido a hidrólise das ligações α -1,4 e em seguida, as ligações α -1,4 e α -1,6 são hidrolisadas pela ação da enzima amiloglicosidase, realizando assim a transformação dos oligossacarídeos em monômeros de glicose de baixo peso molecular (SHOKRKAR et al., 2017).

3.4.2 Blend 2: LpHera + Saczyme GO 2 + Celluclast 1.5 L

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de uso associado de enzimas para as enzimas LpHera (α -amilase), Saczyme GO 2 e Celluclast 1.5 L.

Figura 10 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera, Saczyme GO 2 e Celluclast 1.5 L.



*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

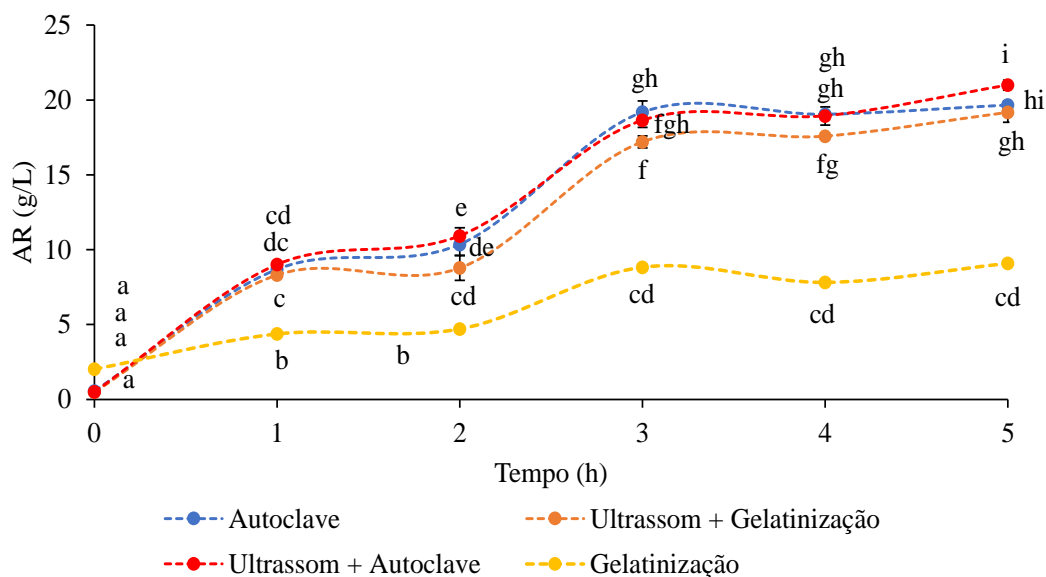
Ao associar as enzimas α -amilase, AMG e celulase foram obtidos maiores rendimentos de açúcares redutores se comparado aos ensaios utilizando somente α -amilase e AMG. As maiores médias foram observadas em 5 h ($20,55 \pm 0,90 \text{ g.L}^{-1}$) para os ensaios utilizando a autoclavagem como pré-tratamento. Os ensaios utilizando a gelatinização como pré-tratamento obtiveram os menores rendimentos ao longo do tempo, se comparados aos demais. Os pré-tratamentos de autoclavagem, ultrassom + autoclave e ultrassom + gelatinização apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo, com igualdade estatística em todos os tempos analisados ($p < 0,05$).

No estudo conduzido por Peron-Schlosser et al. (2021), foram utilizadas em conjunto as enzimas α -amilase e amiloglicosidase (AMG) para determinar as melhores condições do processo de hidrólise enzimática de resíduos da extração de proteínas da célula de *S. platensis*. Os resultados indicam que com ambas as enzimas amilolíticas adicionadas simultaneamente no processo de hidrólise enzimática, obteve-se maior liberação de açúcares redutores no meio, tornando a estratégia promissora para a conversão à bioetanol.

3.4.3 Blend 3: LpHera + Saczyme GO 2 + Ultraflo Max

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de uso associado de enzimas para as enzimas LpHera (α -amilase), Saczyme GO 2, Celluclast 1.5 L e Ultraflo Max. Utilizando as quatro enzimas de forma conjunta, houve uma queda nos rendimentos de açúcares redutores ao longo do tempo, após 2 h de ensaios. As maiores médias foram observadas em 5 h de ensaios ($14,37 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$). Para os ensaios utilizando autoclavagem, ultrassom + autoclave e ultrassom + gelatinização, houve estabilidade nos rendimentos de açúcares redutores a partir das 3h de ensaios, sendo que, os dois primeiros pré-tratamentos apresentaram igualdade estatística ($p < 0,05$) nos mesmos tempos descritos. A redução nos rendimentos de açúcares redutores, pode estar associada ao uso conjunto das enzimas celulase e xilanase, pois ambas utilizam dos mesmos substratos, podendo ocorrer interferências no processo de hidrólise.

Figura 11 – Rendimento de açúcares redutores totais* utilizando as enzimas LpHera, Saczyme GO 2, e Ultraflo Max.



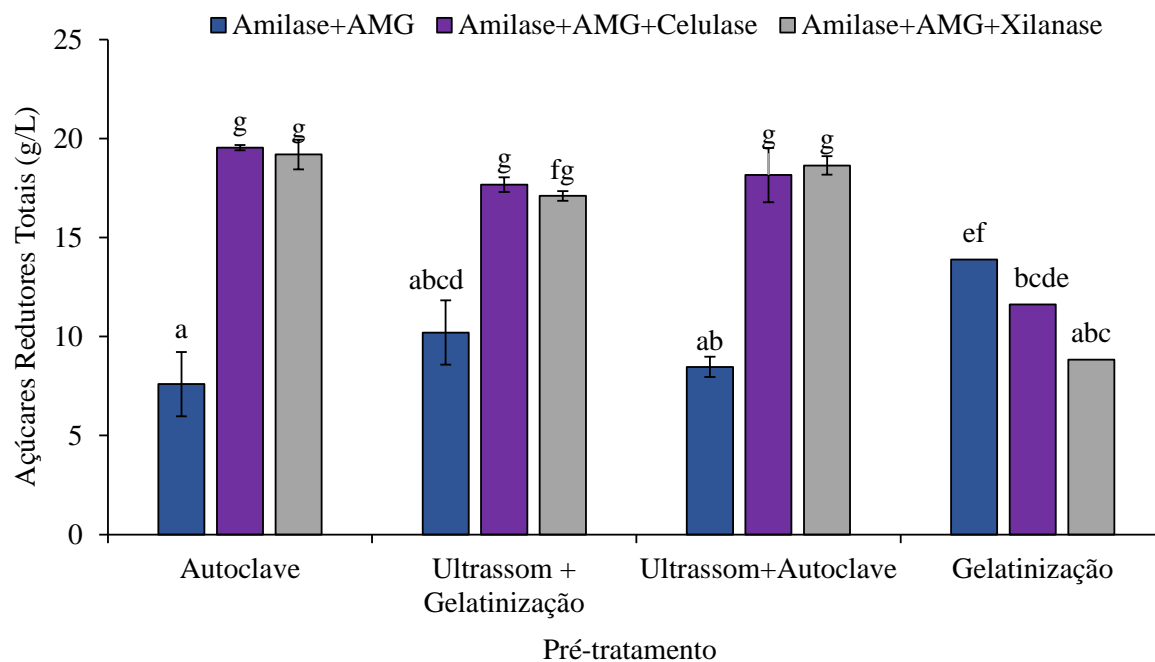
*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

De forma geral, as associações de enzimas apresentaram o mesmo comportamento, e ação quase imediata após a adição. A enzima LpHera (α -amilase) apresentou estabilidade de resultados a partir de 1 h de experimentos e, após a adição das demais enzimas, indiferente do blend utilizado, após mais uma hora de ensaios, houve estabilidade nos rendimentos de açúcares redutores. A ação da enzima α -amilase ocorre em duas etapas, segundo Reguly (1996), sendo a primeira etapa composta pela liberação rápida de açúcares redutores através da quebra de açúcares mais complexos, transformando amido em dextrinas. Sendo que na sequência, a sacarificação ocorre de maneira mais lenta, sendo necessária a adição de outro catalisador. A α -amilase atua nas ligações internas 1,4 sem interferir nas ligações 1,6, assim, diminui a viscosidade do meio, permitindo a ação da enzima amiloglicosidase em seguida.

Conforme observado nos resultados obtidos, para avaliar qual associação de enzimas e pré-tratamento é mais eficiente, optou-se por realizar análise estatística do tempo 3 h, onde houve estabilidade nos rendimentos de AR para a maioria dos ensaios. A Figura 12 apresenta os resultados obtidos para os diferentes blends de enzimas no tempo 3 h.

Figura 12 – Rendimentos de açúcares redutores totais para as diferentes associações de enzimas no tempo 3h.



Legenda: Amilase = LpHera; AMG = Saczyme GO 2; Celulase = Celluclast 1.5 L; Xilanase = Ultraflo Max.

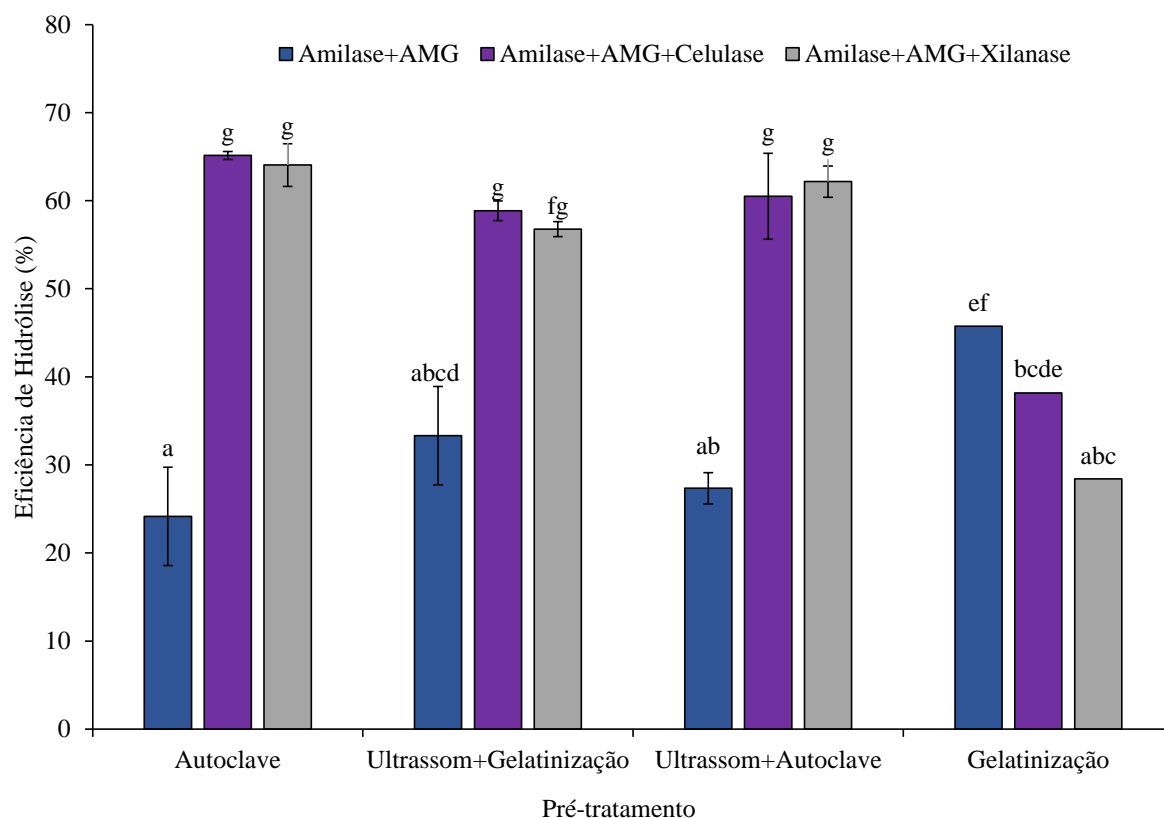
*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

As maiores médias foram obtidas utilizando as enzimas, LpHera + Saczyme GO 2 + Celluclast 1.5 L ($19,53 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$), utilizando a autoclavagem como pré-tratamento. O mesmo blend de enzimas apresentou igualdade estatística para os tratamentos utilizando ultrassom + gelatinização e ultrassom + autoclave. Ainda, ao utilizar a associação de LpHera + Saczyme GO 2 + Ultraflo Max, foram obtidos resultados iguais estatisticamente para os mesmos pré-tratamentos ($p < 0,05$). Os menores rendimentos foram obtidos utilizando os demais blends de enzimas, indiferente do pré-tratamento utilizado.

Além disso, foi calculada a eficiência de hidrólise, através dos carboidratos presentes na biomassa. A partir dos resultados de composição centesimal, foi calculada a eficiência de hidrólise para o mesmo tempo de 3h, para os diferentes blends de enzimas e pré-tratamentos. Os resultados apresentam somente a ação das enzimas, sendo excluídos o tempo t_0 que corresponde à ação dos pré-tratamentos. A Figura 13 apresenta os resultados de eficiência de hidrólise enzimática.

Figura 13 – Eficiência da hidrólise enzimática nos diferentes tratamentos no tempo de 3h.



*Médias \pm desvio padrão.

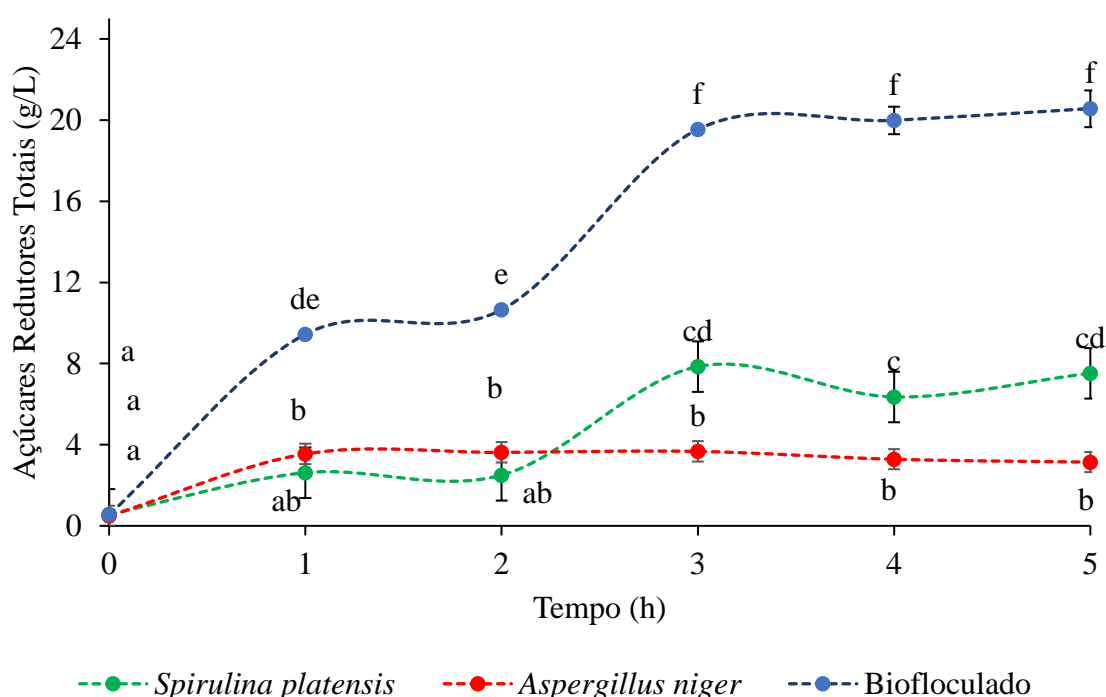
Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

Os pré-tratamentos apresentaram eficiência no t0 (sem adição de enzimas) de aproximadamente 4%. Para a ação enzimática, as maiores médias foram observadas utilizando as enzimas LpHera + Saczyme GO 2 + Celluclast 1.5 L ($65,13 \pm 0,46\%$). Utilizando o ultrassom ou ultrassom + autoclave, não houve diferença estatística ($p < 0,05$). Os ensaios que utilizaram as enzimas LpHera + Saczyme GO 2 + Ultraflo Max, apresentaram resultados semelhantes e igualdade estatística com os ensaios do blend anterior. Em relação à eficiência de hidrólise para diferentes biomassas, Nazari (2020) obteve resultados de $56,93 \pm 3,64\%$, $96,61 \pm 20,26\%$ e $45,68 \pm 0,22\%$ para a biomassa de *A. niger*, *S. platensis* e *A. niger* + *S. platensis*, respectivamente. Como considerações para a baixa eficiência de hidrólise para a biomassa biofloculada contendo células fúngicas, destaca-se que o pré-tratamento de congelamento/descongelamento + gelatinização não apresentou eficiência de quebra das matrizes mais resistentes da parede celular do fungo, composta majoritariamente por polissacarídeos (YOSHIMI et al., 2016).

A partir dos resultados obtidos, optou-se por realizar a hidrólise da microalga e do fungo de forma individual, utilizando a associação de enzimas, LpHera + Saczyme GO 2 + Celluclast

1.5 L, nas mesmas condições de concentração e tempos de ação. O blend foi escolhido conforme eficiência, mas também, na atuação que as mesmas possuem em relação às ligações químicas presentes na parede celular microbiana. Tanto a celulase quanto a xilanase atuam na hidrólise de ligações (1,4)- β -D-glicosídica, porém a celulase apresenta ação específica na celulose, presente tanto na célula microalgal quanto na fúngica (VELÁZQUEZ-LUCIO et al., 2018; FONTAINE et al., 2000). A Figura 14 apresenta os rendimentos de açúcares redutores totais para as biomassas de forma individual.

Figura 14 - Rendimento de açúcares redutores* totais para as diferentes biomassas de estudo.



*Médias \pm desvio padrão.

Letras iguais significam que não há diferença estatística entre os ensaios enquanto, letras diferentes significam que há diferença estatística entre os ensaios ($p < 0,05$).

A biomassa biofloculada apresentou maiores rendimentos de açúcares redutores, se comparada com os ensaios da *S. platensis* e *A. niger*, de forma individual. Isso se deve a composição de carboidratos presente nas biomassas que difere de uma para a outra e, também, a complexidade para romper a célula do fungo. A partir dos rendimentos, foi possível calcular as eficiências de hidrólise para as biomassas de estudo. Como citado anteriormente, a biomassa biofloculada apresentou eficiências de $65,13 \pm 0,46\%$, já a *S. platensis* teve resultados de $71,16 \pm 2,17\%$ e o *A. niger* de $13,71 \pm 2,05\%$. A microalga possui parede celular menos complexa, se comparada ao fungo, por isso, apresenta maiores eficiências de hidrólise. Ainda, o biofloculado apresentou eficiências próximas da microalga pois é composto de uma proporção 1:8 (fungo:

microalga), tendo o incremento de carboidratos na biomassa, mas em proporções menores, que não interferem na hidrólise enzimática. Salientando que os resultados de eficiência estão levando em consideração somente a ação enzimática, havendo ainda a ação do pré-tratamento de autoclave que foi utilizado inicialmente (aproximadamente 4%).

De forma geral, a microalga *S. platensis* apresenta, em sua composição, menor composição de lipídios do que a apresentada neste estudo, assim, pode haver interferência nos processos de hidrólise. Assim, para estudos futuros, sugere-se realizar o fracionamento das biomassas para realização da hidrólise somente dos carboidratos concentrados. Nesse sentido, é possível obter maiores eficiências de hidrólise.

4 Conclusão

A partir dos estudos de caracterização das enzimas foi possível obter as condições ótimas de ruptura e hidrólise enzimática para a biomassa biofloculada: pH 4,5; temperatura de 90 °C para a enzima LpHera (α -amilase) e 60 °C para as demais enzimas; adição sequencial das enzimas, sendo inicialmente a Lphera por 2h e, em seguida as enzimas Saczyme GO 2 e Celluclast 1.5 L, todas na mesma concentração de 100 mL/m³ (0,01%). O uso de enzimas de forma associada apresentou melhores resultados do que o uso das enzimas de forma isolada, principalmente devido à complexidade das paredes celulares microbianas. Até o momento, não foram encontradas produções científicas que abordem a hidrólise de biomassa microalgal biofloculada com a eficiência obtida neste estudo. O estudo traz uma compreensão aprofundada do uso de enzimas, tanto de forma individual quanto associada, na hidrólise de biomassas microbianas de parede celular complexa (como a biofloculada – microalga e fungo), para conversão em bioprodutos. Ainda, mostra a necessidade de estudos do uso e aplicação de enzimas, visto que, conforme biomassa de estudo, a eficiência de ruptura celular pode ser reduzida.

Referências

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B. S.; BHAVYA D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B. S.; VARALAKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 576-581, 2007.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. Washington, DC: AOAC, 2000.

ASTOLFI, A. L.; REMPEL, A.; CAVANHI, V. A. F.; ALVES, M.; DEAMICI, K. M.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Simultaneous saccharification and fermentation of *Spirulina* sp. and corn starch for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with high antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122698, 2020.

BEAUVAIS, A.; FONTAINE, T.; AIMANIANDA, V.; LATGÉ, J. P. Aspergillus cell wall and biofilm. **Mycopathologia**, v. 178, p. 371-377, 2014.

CABRERA, E. E.; PATRA, J. K.; RODRIGUEZ-TORRES, M. D. P. Biotechnology and Its Connection to Renewable Energies: Biofuels Production. **In** Biotechnology in the generation of biofuels. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 13-26, 2023.

CASTEJÓN, N.; MARKO, D. Fatty Acid Composition and Cytotoxic Activity of Lipid Extracts from *Nannochloropsis gaditana* Produced by Green Technologies. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3710, 2022.

CHENG, P.; CHEN, D.; LIU, W.; COBB, K.; ZHOU, N.; LIU, Y.; WANG, Q.; CHEN, P.; ZHOU, C.; RUAN, R. Auto-flocculation microalgae species *Tribonema* sp. and *Synechocystis* sp. with T-IPL pretreatment to improve swine wastewater nutrient removal. **Science of The Total Environment**, v. 725, p. 138263, 2020.

CHO, H. H.; STREZOV, V.; EVANS, T. J. A review on global warming potential, challenges and opportunities of renewable hydrogen production technologies. **Sustainable Materials and Technologies**, e00567, 2023.

CONSTANTINO, A.; RODRIGUES, B.; LEON, R.; BARROS, R.; RAPOSO, S. Alternative chemo-enzymatic hydrolysis strategy applied to different microalgae species for bioethanol production. **Algal Research**, v. 56, p. 102329, 2021.

ESHRA, D. H.; EL-IRAKI, S. M.; BAKR, A. Performance of starch hydrolysis and production of corn syrup using some commercial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 2, 2014.

FONTAINE, T.; SIMENEL, C.; DUBREUCQ, G.; ADAM, O.; DELEPIERRE, M. et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **Journal Biologic Chemical**, v. 275, n. 36, p. 27594–27607, 2000.

GARCÍA, J. R.; FERNÁNDEZ, F. A.; SEVILLA, J. F. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 164-170, 2012.

GIANG, T. T.; LUNPROM, S.; LIAO, Q.; REUNGSANG, A.; SALAKKAM, A. Enhancing hydrogen production from *Chlorella* sp. biomass by pre-hydrolysis with Simultaneous Saccharification and Fermentation (PSSF). **Energies**, v. 12, n. 5, p. 908, 2019.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; ...SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulase mixtures

for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.

HAMRAOUI, K.; GIL, A.; EL BARI, H.; SILES, J. A.; CHICA, A. F.; MARTIN, M. A. Evaluation of hydrothermal pretreatment for biological treatment of lignocellulosic feedstock (pepper plant and eggplant). **Waste Management**, v. 102, p. 76-84, 2020.

HOSSEINI, A.; JAZINI, M.; MAHDIEH, M.; KARIMI, K. Efficient superantioxidant and biofuel production from microalga *Haematococcus pluvialis* via a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123100, 2020.

JUÁREZ, J. M.; HERNANDO, A. L.; TORRE, R. M.; LANZA, S. B.; RODRÍGUEZ, S. B. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 265-271, 2016.

KHAN, M. I.; LEE, M. G.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. Pretreatment optimization of the biomass of *Microcystis aeruginosa* for efficient bioethanol production. **Amb Express**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

KURNIAWAN, S. B.; AHMAD, A.; IMRON, M. F.; ABDULLAH, S. R. S.; OTHMAN, A. R.; HASAN, H. A. Potential of microalgae cultivation using nutrient-rich wastewater and harvesting performance by biocoagulants/bioflocculants: Mechanism, multi-conversion of biomass into valuable products, and future challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 132806, 2022.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomass and bioenergy**, v. 46, p. 89-101, 2012.

LEE, O. K.; KIM, A. L.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; JUNG, Y. 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.

MAGHZIAN, A.; ASLANI, A.; ZAHEDI, R. Review on the direct air CO₂ capture by microalgae: Bibliographic mapping. **Energy Reports**, 8, 3337-3349.

MALIHA, A.; ABU-HIJLEH, B. A review on the current status and post-pandemic prospects of third-generation biofuels. **Energy Systems**, 1-32, 2022.

MANICKAM, N. K.; RAJARATHINAM, R.; MUTHUVELU, K. S.; SENNIYAPPAN, T. New insight into the effect of fungal mycelia present in the bio-pretreated paddy straw on their enzymatic saccharification and optimization of process parameters. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 291-302, 2018.

MANMAI, N.; BALAKRISHNAN, D.; OBEY, G.; ITO, N.; RAMARAJ, R.; UNPAPROM, Y.; VELU, G. Alkali pretreatment method of dairy wastewater based grown *Arthrospira platensis* for enzymatic degradation and bioethanol production. **Fuel**, v. 330, p. 125534, 2022.

MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugar. **Anal. Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, I., SIMÕES, R., MEDEIROS, B., NAMPOOTHIRI, M., SUKUMARAN, R. K., RAJAN, D., FERREIRA-DIAS, S. Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121936, 2019.

MOREIRA, J. B.; SANTOS, T. D.; DUARTE, J. H.; BEZERRA, P. Q. M.; DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Role of microalgae in circular bioeconomy: from waste treatment to biofuel production. **Clean Technologies and Environmental Policy**, p. 1-11, 2021.

NAZARI, M. **Colheita de *Spirulina platensis* via biofloculação fúngica e uso da biomassa em bioprocessos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2020.

NAZARI, M. T.; RIGUETO, C. V. T.; REMPEL, A.; COLLA, L. M. Harvesting of *Spirulina platensis* using an eco-friendly fungal bioflocculant produced from agro-industrial by-products. **Bioresource Technology**, v. 322, p. 124525, 2021.

NGUYEN, T. D. P.; LE, T. V. A.; SHOW, P. L.; NGUYEN, T. T.; TRAN, M. H.; TRAN, T. N. T.; LEE, S. Y. Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent. **Bioresource technology**, v. 272, p. 34-39, 2019.

ONAY, M. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetracontoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. **Fuel**, v. 239, p. 1315-1323, 2019.

PANCHA, D; JAIN, A; SHRIVASTAV, S. K; MISHRA, B; SHETHIA, S; MISHRA, B. PANCHA, I; CHOKSHI, K; MAURYAA, R; BHATTACHARYAB, S; BACHANIA, P; MISHRAA, S. Comparative evaluation of chemical and enzymatic saccharification of mixotrophically grown de-oiled microalgal biomass for reducing sugar production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 9-16, 2016.

PERON-SCHLOSSER, B.; STOBIENIA, M.; BISPO, L.O.; COLLA, L. M.; BARALDI, I. J.; COLLA, E. Residual fractions from *Arthrospira platensis* protein extraction as feedstock for ethanol production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 5, p. 378–388, 2021.

PHUONG, H.; MASSÉ, A.; DUMAY, J.; VANDANJON, L.; MITH, H.; LEGRAND, J.; ARHALIASS, A. Enhanced Liberation of Soluble Sugar, Protein, and R-Phycoerythrin Under Enzyme-Assisted Extraction on Dried and Fresh *Gracilaria gracilis* Biomass. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 4, p. 21, 2022.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, p. 1, 2015.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. 1^a ed. Pelotas - RS: Universitária/UFPEL, 1966.

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

REMPEL, A.; SOSSELLA, F. S.; MARGARITES, A. C.; ASTOLFI, A. L.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A.; COLLA, L. M. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy efficient approach. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121588, 2019.

RODRIGUES, É. F.; FICANHA, A. M. M.; DALLAGO, R. M.; TREICHEL, H.; REINEHR, C. O.; MACHADO, T. P.; COLLA, L. M. Production and purification of amyolytic enzymes for saccharification of microalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 134-141, 2017.

ROJO, E. M.; PIEDRA, I.; GONZÁLEZ, A. M.; VEGA, M.; BOLADO, S. Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 335, p. 125256, 2021.

ROY, M.; MOHANTY, K. A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. **Algal Research**, v. 44, p. 101683, 2019.

SANKARAN, R.; CRUZ, R. A. P.; PAKALAPATI, H.; SHOW, P. L.; LING, T. C.; CHEN, W. H.; TAO, Y. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. **Bioresource technology**, v. 298, p. 122476, 2020.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J. H. C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, **Bioenergy Research**, v. 1, p. 20–43. 2008.

SINGH, R.; KRISHNAA, B. B.; KUMARA, J.; BHASKAR, T. Opportunities for utilization of non-conventional energy sources for biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v.199, p. 398-407, 2016.

SHOKRKAR, H.; EBRAHIMI, S.; ZAMANI, M. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. **Fuel**, v. 200, p. 380-386, 2017.

SHOKRKAR, H.; EBRAHIMI, S.; ZAMANI, M. Enzymatic hydrolysis of microalgal cellulose for bioethanol production, modeling and sensitivity analysis. **Fuel**, v. 228, p. 30-38, 2018a.

SHOKRKAR, H.; EBRAHIMI, S. Evaluation of different enzymatic treatment procedures on sugar extraction from microalgal biomass, experimental and kinetic study. **Energy**, v. 148, p. 258-268, 2018b.

SOSSELLA, F. S.; REMPEL, A.; NUNES, J. M. A.; BIOLCHI, G.; MIGLIAVACA, R.; ANTUNES, A. C. F.; COSTA, J. A.V.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Effects of harvesting *Spirulina platensis* biomass using coagulants and electrocoagulation–flotation on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123526, 2020.

VANEYKELENBURG, C. Ecophysiological studies on *Spirulina platensis* effect of temperature, lightintensity and nitrate concentration on growth and ultrastructure. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 113-127, 1980.

VELAZQUEZ-LUCIO, J.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; COLLA, L. M.; SÁENZ-GALINDO, A.; CERVANTES-CISNEROS, D. E.; AGUILAR, C. N.; RUIZ, H. A. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review, **Biofuel Reserch Journal**, v. 5, p. 780–791, 2018.

YOSHIMI, A.; MIYAZAWA, K.; ABE, K. Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 9, p. 1700-1711, 2016.

YU, K. L.; CHEN, W. H.; SHEEN, H. K.; CHANG, J. S.; LIN, C. S.; ONG, H. C.; SHOW, P. L.; LING, T. C. Bioethanol production from acid pretreated microalgal hydrolysate using microwave-assisted heating wet torrefaction. **Fuel**, v. 279, p. 118435, 2020.

YUAN, Z. Y.; LI, G. D.; WEI, W. Q.; WANG, J. R.; FANG, Z. A comparison of different pre-extraction methods followed by steam pretreatment of bamboo to improve the enzymatic digestibility and ethanol production. **Energy**, v. 196, 2020.

ZABED, H. M.; AKTER, S.; YUN, J. H.; ZHANG, G. Y.; AWAD, F. N.; QI, X. H.; SAHU, J. N. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v. 105, p. 105-128, 2019.

ZAPAROLI, M. **Estresse celular para a produção de biocompostos em *Spirulina platensis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2019.

ZHAO, K.; ZHANG, M.; TIAN, H.; LEI, F.; HE, D.; ZHENG, J.; ZHANG, L. Effects of Structural and Compositional Changes of *Nanochloropsis oceania* after Enzyme Treatment on EPA-Rich Lipids Extraction. **Marine Drugs**, v. 20, n. 3, p. 160, 2022.

5 CONCLUSÃO GERAL

O uso de biofloculante fúngico associado com o ajuste de milivoltagem para a neutralização de cargas entre a microalga e o fungo permitiu a separação da biomassa microalgal com eficiência ($\approx 100\%$). O uso do ajuste de milivoltagem permite que a microalga seja separada com eficiência nas diferentes fases de crescimento microalgal, pois com a neutralização de cargas os microrganismos se unem para formar flocos com maior estabilidade. Ainda, o uso de diferentes concentrações de biofloculante com ajuste de milivoltagem não interferiu na separação da biomassa, sendo assim, foi selecionado o uso de menores concentrações de biofloculante pensando em processos biotecnológicos futuros, visto a complexidade da parede celular do fungo *A. niger*.

Para a hidrólise do biofloculado (*S. platensis* + *A. niger*), a autoclavagem foi selecionada como o melhor pré-tratamento para ruptura da parede celular. O processo foi utilizado para a liberação de carboidratos intracelulares que foram hidrolisados utilizando diferentes enzimas comerciais. Dentre os diferentes blends de enzimas aplicados, o uso associado de α -amilase (LpHera), amiloglicosidade (Saczyme GO2) e celulase (Celluclast 1.5 L), apresentou os maiores rendimentos de açúcares redutores. O processo de hidrólise obteve eficiência de aproximadamente 70%, sendo que, de forma geral, 4% são resultado do pré-tratamento utilizado e o restante, do uso de enzimas específicas.

A biofloculação é um processo que não interfere na biomassa final, pois não utiliza reagentes químicos para a separação. Visto isso, a biomassa pode ser utilizada em processos de hidrólise para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, como o bioetanol. O estudo da parede celular microbiana e diferentes métodos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, permitiu alcançar eficiência de hidrólise. Atualmente são estudados métodos de hidrólise de biomassas microalgais, sendo escassos os estudos com biomassa biofloculada.



UPF
UNIVERSIDADE
DE PASSO FUNDO

UPF Campus I - BR 285, São José
Passo Fundo - RS - CEP: 99052-900
(54) 3316 7000 - www.upf.br