

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO TECNOLÓGICO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

CRISTINA CURTI

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA
UTILIZANDO ENZIMAS HIDROLÍTICAS PROVENIENTES DE
ISOLADOS FÚNGICOS**

Vitória

2019

CRISTINA CURTI

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA UTILIZANDO
ENZIMAS HIDROLÍTICAS PROVENIENTES DE ISOLADOS
FÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini

Coorientadora: Dra. Larissa Bernardino Moro

Vitória

2019

CRISTINA CURTI

**PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA UTILIZANDO ENZIMAS
HIDROLÍTICAS PROVENIENTES DE ISOLADOS FÚNGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof.^a Dra. Adriana Márcia Nicolau Korres
Instituto Federal do Espírito Santo – IFES
Examinadora Externa

Prof. Dr. Ing. Ricardo Franci Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Examinador Interno

Prof. Dr. Sérgio Tulio Alves Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Professor Orientador

Vitória, 13 Março 2019

Dedico este trabalho aos meus avós Maria e Giulio

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a cada pessoa que esteve comigo neste percurso de enriquecimento acadêmico e pessoal.

Aos meus companheiros de laboratório... Vocês são pessoas mais que especiais. Obrigada pelos ensinamentos, pelos momentos lindos. Obrigada por tudo!

Muito obrigada, Professor Sérgio Túlio, pela imensa oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Você foi peça chave no meu percurso.

Obrigada Professora Larissa, João e todos os Professores que encontrei durante o meu percurso no Brasil, todos me ensinaram muito!

Ringrazio immensamente la mia Famiglia che è sempre stata al mio lato, mi avete sorretto, spinto e dato la forza di continuare in ogni momento difficile, vi voglio un mondo di bene! Grazie Mamma, Grazie Papà, Grazie Alby e un grazie enorme Nonna e Nonno.

Ringrazio mia moglie Juliana, la mia stella polare, il mio bastone e la mia spalla dove piangere, senza di te questo percorso brasiliano non sarebbe mai esistito! Ti amo!

RESUMO

No processo de produção de biogás, utilizando biomassa microalgácea, o principal desafio é a etapa do pré-tratamento, em específico a hidrólise da parede celular. A degradação da matéria orgânica pode ser realizada por enzimas produzidas por diversos microrganismos, principalmente os fungos filamentosos. Entre os processos de pré-tratamento existentes, o biológico mostrou ser o mais economicamente vantajoso e ecologicamente amigável, embora seja diretamente dependente de alguns fatores como, por exemplo, o tempo de hidrólise ou concentração dos extratos fúngicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o pré-tratamento de biomassa microalgácea utilizando enzimas hidrolíticas produzidas por fungos do solo. Foram isolados 21 fungos filamentosos, e avaliado o potencial de produção enzimática extracelular celulásica, lipásica, pectinásica e proteásica. Os 4 isolados com maior atividade foram utilizados para hidrolisar biomassa microalgácea referenciada de *Chlorella* sp. (crescida em ambiente controlado), e biomassa consorciada derivada de efluente de tratamento anaeróbio. No tratamento com biomassa referenciada, o fungo *Trichoderma* sp. com atividade proteásica, solubilizou 85,33% de matéria orgânica durante 48 h com 20% de extrato enzimático. Em relação à biomassa consorciada, a atividade proteásica obteve 54,33% de DQOs utilizando o fungo *Trichoderma* sp. com 20% de extrato enzimático bruto no tempo final de 48 h. Os resultados mostraram que a biomassa microalgácea referenciada foi hidrolisada 66% a mais do que a biomassa consorciada avaliando o parâmetro DQO solubilizado. Através dos resultados, foi possível concluir que a escolha da atividade enzimática e da concentração dos extratos fúngicos podem ser utilizados como chaves para diminuir uma das desvantagens dos tratamentos biológicos, o tempo de hidrólise.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Biogás. *Chlorella* sp.. Fungo. Solubilização.

ABSTRACT

In the biogas production process, using microalgae biomass, the main challenge is the pretreatment stage, specifically the hydrolysis of the cell wall. Degradation of organic matter can be accomplished by enzymes produced by various microorganisms, especially filamentous fungi. Among the existing pretreatment processes, biological was chosen as the most economically advantageous and ecological-friendly method, although it is directly depends on hydrolysis time. The objective of this work was to evaluate the hydrolysis processes of microalgae biomass using fungi producing hydrolytic enzymes. Twenty-one filamentous fungi were isolated and the cell extractive potential of cellulose, lipase, pectinase and protease were evaluated. The 4 ones with higher activity were used to hydrolyze microalgae biomass referenced to *Chlorella* sp., that grown in controlled environment, and consortium biomass derived from anaerobic effluent. The treatment of the microalgae biomass referenced, the fungus *Trichoderma* sp. with proteinase activity, solubilized 85.33% of organic matter for 48 h with 20% of enzymatic extract. In relation to the biomass derivated by sludge treatment, the protease activity obtained 54.33% of DQOs using the fungus *Trichoderma* sp. with 20% crude enzymatic extract at end of 48 h test. In summary, the microalgae biomass referenced was hydrolyzed 66% more than the mixotrophic biomass evaluating the DQO solubilized. The results showed that the enzymes produced by the isolated fungi have high biomass solubilization capacities. Biological pre-treatment has a great potencial of application in the production of biogas, after the analysis of the results it was possible to conclude that the choice of the enzymatic activity and the concentration of the fungal extracts can be used as keys to reduce the main disadvantage of the biological treatments, the hydrolysis time.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Biogas. *Chlorella* sp.. Fungi. Solubilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 ETES SUSTENTÁVEIS NO BRASIL	15
3.2 AS MICROALGAS	18
3.3 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS	21
3.4 CULTIVO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS	22
3.5 PRÉ-TRAMENTO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA	23
3.5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	27
4. METODOLOGIA	32
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	33
4.1.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	33
4.1.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS POR ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
4.1.3 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	36
4.1.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	36
4.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
4.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	36
4.2.2 EXTRAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO	37
4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	37
4.3.1 ATIVIDADE CELULÁSICA	38
4.3.2 ATIVIDADE LIPÁSICA	39
4.3.3 ATIVIDADE PECTINÁSICA	40
4.3.4 ATIVIDADE PROTEÁSICA	41
4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	41
4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	42
4.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	43

<i>4.7 CULTIVO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA EM FOTOBIORREACTORES.....</i>	<i>44</i>
<i>4.8 SISTEMA PILOTO DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO INTEGRADO COM MICROALGAS.....</i>	<i>46</i>
<i>4.9 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE SECUNDÁRIO DO UASB E DA BIOMASSA</i>	<i>47</i>
4.9.1 ANÁLISE DO EFLUENTE SECUNDÁRIO DE UASB.....	47
4.9.2 ANÁLISE DAS BIOMASSAS	48
<i>4.10 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES HIDROLÍTICAS NAS BIOMASSAS.....</i>	<i>49</i>
<i>4.11 PROCESSOS HIDROLÍTICOS ENZIMÁTICOS.....</i>	<i>49</i>
<i>4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</i>	<i>50</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	51
5.2 CULTIVO DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO MÍNIMO SELETIVO	52
5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA.....	54
5.4 ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO	57
5.5 CULTIVO E ANÁLISE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA..	57
5.6 ANÁLISE DA BIOMASSA CONSORCIADA.....	60
5.7 HIDRÓLISE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA	61
5.7.1 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 10%.....	61
5.7.2 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 20%.....	63
5.8 HIDRÓLISE DA BIOMASSA CONSORCIADA	66
5.8.1 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 10%.....	66
5.8.2 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 20%.....	68
6. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

Os recursos água e energia possuem uma relação simbiótica. É necessária muita água para produzir eletricidade e também de muita eletricidade para bombear, mover, reciclar e reutilizar água. Por isso, muitas cidades começaram a se conscientizar sobre a necessidade de uma maior eficiência energética no saneamento. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), o tratamento de água e esgoto utiliza 75 bilhões de kWh de energia por ano, o suficiente para suprir 6,75 milhões de casas. A EPA identificou a energia como o segundo maior item no orçamento das instalações municipais de água potável e de tratamento de esgoto, depois apenas dos custos de mão de obra. O consumo de energia por água potável e instalações de tratamento de águas residuais pode representar de 30% a 40% da fatura total de energia de um município nos Estados Unidos da América (Ecosan, 2017).

Os bicombustíveis de terceira geração, que utilizam biomassa de microalgas como matéria prima e esgoto doméstico como substrato de crescimento, possuem o potencial para produzir energia e também produtos que podem ser comercializados. Em comparação com as culturas de biocombustíveis de segunda geração, à base de plantas, as microalgas possuem eficiência fotossintética de 5 a 10 vezes maior do que plantas superiores; atingem a maior produtividade autotrófica, por área, dentre todos os cultivares conhecidos; sua produção não segue regime de safras; seu cultivo pode ser realizado em áreas impróprias para cultivo de alimento, não exercendo influência sob preços dos mesmos; possuem conteúdo lipídico alto (até 70%) e ajustável através da composição do meio e fatores operacionais; a adição de fontes de carbono pode aumentar sua produtividade e, principalmente, águas residuárias podem ser utilizadas como meio de cultivo, suprimindo água e nutrientes (SUGANYA et al., 2016; PECCIA et al., 2013; CHISTI, 2008).

A integração de sistemas de produção de biomassa microalgácea com sistemas de tratamento de efluentes tem o potencial para mitigar efeitos relacionados com as mudanças climáticas, visto que com o crescimento autotrófico de microalgas há a fixação de CO₂, um dos principais gases de efeito-estufa. Adicionalmente, há a vantagem de efetuarem o tratamento terciário do efluente, incorporando nitrogênio e fósforo, reduzindo seus excessos e assim a eutrofização

que poderia ocorrer nos corpos hídricos receptores. Além disso, com mais investimentos visando o avanço tecnológico da transformação desta biomassa em biocombustíveis, estes poderiam reduzir parcialmente a dependência por combustíveis fósseis, contribuindo para a mitigação da crise energética. Assim sendo, pesquisas sobre o cultivo de biomassa de microalgas em efluentes de estações de tratamento são justificáveis, pois se inserem no tema da melhoria da qualidade de águas e efluentes em ambientes já impactados, além da produção de uma biomassa altamente aproveitável em termos de energia (CHISTI, 2008).

A biomassa microalgácea em sistemas de tratamento de águas residuárias urbanas varia em função da dinâmica populacional, que inclui mistura com outros organismos como as bactérias, vírus e protozoários. A composição e estrutura da parede celular microalgácea é geralmente rígida, devido às diversas condições dos sistemas de tratamento, da presença de gorduras e elevado conteúdo orgânico destas águas residuárias. Os métodos de pré-tratamento são, portanto, cruciais para melhorar o processo de hidrólise e incrementar a produção de metano, visto que provocam a ruptura das estruturas que compõem a parede celular, levando à sua maior biodisponibilidade e biodegradabilidade no reator (GERKEN et al., 2012; PASSOS et al., 2016).

As técnicas de hidrólise podem ser divididas em quatro categorias: mecânica, física, química e enzimática. Todas provaram ser eficientes para melhorar a solubilização da biomassa. Segundo estudos apresentados por Ometto et al. (2014), a hidrólise enzimática permitiu a solubilização dos constituintes da parede celular. Isso consentiu uma maior produção de biogás em comparação com os pré-tratamentos térmicos e ultrassonográficos responsáveis para a degradação física da parede celular (deformação e ruptura). Um estudo demonstrou que o uso dos métodos de pré-tratamento enzimático levaram a maior biodisponibilidade de nutrientes biodegradáveis do que pré-tratamentos mecânicos (EHIMEN et al., 2012). Paralelamente três técnicas hidrolíticas diferentes foram testadas por Alzate et al. (2012): térmica, com ultrassom e enzimática. Os resultados mostraram que a hidrólise térmica e com ultrassom causaram um aumento significativo na biodegradabilidade das células, atingindo uma biodegradabilidade máxima de 76% na hidrólise térmica porém se demonstrou significativo o consumo de energia no resultado final. Além disso, verificou-se também que a aplicação de um tratamento

enzimático permitiu uma biodegradabilidade de quase 90% das células de microalgas constituídas por uma parede celular muito complexa.

O principal desafio sobre biomassa de microalgas para a produção de biogás é a etapa de pré-tratamento (MAHDY et al., 2014a), em específico a hidrólise da parede celular. A degradação de matéria orgânica pode ser realizada por enzimas presentes em diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias, sendo os fungos filamentosos os mais promissores (SUN et al., 2002; ARANTES et al., 2009; CASTRO, 2010).

Para aperfeiçoar os rendimentos da hidrólise é fundamental conhecer a composição do substrato. A microalga *Chlorella* sp., por exemplo, possui uma parede celular que apresenta: 31% de hemicelulose, 15,4% de celulose e 27% de proteínas (NORTHCOTE et al., 1958). As paredes celulares complexas de microalgas, como as de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., também são compostas por uma camada externa, que pode ser homogênea ou ter uma camada trilaminar (TLS). A TLS é resistente ao processo de degradação anaeróbia uma vez que é composta por esporopolenina, que é um biopolímero parecido com a lignina, formado a partir de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos (KWIETNIEWSKA et al., 2014).

A hidrólise com enzimas celulolíticas pode favorecer a ruptura da parede, mas a ação das enzimas proteásicas poderia aumentar ainda mais a solubilização da biomassa microalgácea devido às várias proteínas intermembrana que seriam biodisponibilizadas. Resultados obtidos por Wieczorek e colaboradores (2014) demonstram um acréscimo na produção de metano a partir da biomassa de *Chlorella vulgaris* da ordem de 70% com uma mistura de celulase (Onozuka R-10-Merck) e hemicelulase (Macerozyme R-10-Sigma). Similarmente, a produção de metano da mesma microalga foi incrementada em 86% com carbohidrolase e protease e segundo o mesmo estudo a hidrólise com proteases dobrou a produção de metano da biomassa não tratada (MAHDY et al., 2014a).

Os métodos sobrecitados mostraram-se promissores e, portanto, neste trabalho a hidrólise enzimática foi explorada como uma ferramenta promissora de pré-tratamento para melhorar a viabilidade técnica e econômica na produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Foram avaliados doses de extrato bruto enzimático e tempos de hidrólise que proporcionaram o melhor pré-tratamento de

biomassa para cada fungo avaliado. Além disso, foram avaliados dois tipos de biomassas, referenciada e consorciada para comparar a eficiência da hidrólise enzimática nas duas categorias de substratos. Este estudo se insere em uma pesquisa científica que pretende entender e melhorar cada etapa de geração do biogás, desde a produção de microalgas, passando pela separação e hidrólise até o reaproveitamento no sistema piloto da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Araças (ES).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o pré-tratamento de biomassa microalgácea utilizando enzimas hidrolíticas provenientes de fungos do solo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar fungos filamentosos com produção de enzimas hidrolíticas;
- Determinar a atividade enzimática específica de cada fungo filamentosos isolado;
- Avaliar atividade hidrolítica de enzimas específicas na biomassa microalgácea;
- Avaliar a hidrólise enzimática de biomassa microalgácea derivada de efluente de tratamento anaeróbio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ETEs SUSTENTÁVEIS NO BRASIL

Desde os antigos romanos, a coleta das águas residuais era de fundamental importância, na cidade de Pompeia (Nápoles - Itália), por exemplo, ainda é possível observar os sistemas de coleta de esgoto. A erupção do vulcão Vesúvio (79 d. C.) favoreceu a conservação do sítio histórico, e é possível observar como as águas residuais eram canalizadas através das ruas até a periferia da cidade.

Além de coletar o esgoto, é fundamental tratá-lo antes do lançamento em corpos hídricos, uma vez que, condições inadequadas de saneamento podem contribuir para a proliferação de inúmeras doenças parasitárias e infecciosas além da degradação dos corpos hídricos adjacentes. O esgoto pode contaminar a água, o alimento, os utensílios domésticos, as mãos, o solo ou ser transportado por moscas, baratas, roedores, provocando novas infecções (PHILIPPI et al., 2005).

Quanto custa o sistema de saneamento no Brasil? A Agência Nacional de Águas (ANA) em 2015 publicou alguns dados que podem servir como base entre as relações de custos, avaliando diferentes sistemas de eficiência (pelos indicadores) e as ETEs (Estações de Tratamento de Esgoto) de diferentes tamanhos (valores per capita) (TABELA 1). Estes dados foram usados para determinação dos valores dos contratos a serem firmados pelo PRODES (Programa Despoluição de Bacias Hidrográficas).

TABELA 1 - Orientações da ANA sobre custos mínimos para diferentes formas de tratamento de efluentes.

Indicador	Padrões de Eficiência para Tratamento de Esgotos								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
DBO	30%	60%	75%	85%	85%	90%	90%	90%	90%
SST	40%	60%	75%*	85%*	85%*	90%	90%	90%	90%
CF					99,999 %		90,9 99%		99,9 99%
PT e/ou NTK								85% e/ou 85%	85% e/ou 85%
Pop. Equivalente (hab.)	Valores pre capita de referência (R\$/hab)								
até 10.000	40	70	110	150	160	190	200	230	230
de 10.001 a 20.000	40	50	90	140	140	180	180	200	220
de 20.001 a 50.000	30	40	80	120	120	150	160	190	200
de 50.001 a 100.000	10	40	80	110	110	140	150	180	190
de 100.001 a 200.000	10	40	80	110	110	140	150	180	190
acima de 200.000	10	40	80	110	110	140	150	180	190

FONTE: ANA Resolução N° 601 (2015).

Nos últimos anos, no Brasil, diversas iniciativas associadas com o biogás de suas ETEs foram desenvolvidas, com o intuito de ratificar seu potencial de recuperação de energia e diminuir os custos. O interesse pelo biogás, no Brasil, intensificou-se nas décadas de 70 e 80, especialmente, entre os suinocultores. Programas oficiais estimularam a implantação de muitos biodigestores, focados principalmente na geração de energia, na produção de biofertilizante e na diminuição do impacto ambiental (ICLEI, 2009).

Nos biodigestores ocorre a transformação de compostos orgânicos complexos em substâncias mais simples, como metano e dióxido de carbono, através da ação combinada de diferentes microorganismos que atuam na ausência de oxigênio. Diversos fatores afetam diretamente a biodigestão: temperatura, tipo de resíduo, tempo de retenção, pH, presença de substâncias tóxicas, relação carbono/nitrogênio e, quantidade de água (CHERNICHARO, 2007).

No final da década de 90, um novo movimento, envolvendo o interesse no biogás, começou a aparecer, motivado pela possibilidade da inserção dos processos de anaerobiose no mercado de carbono via MDL (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo). Em 2005, com a ratificação da Rússia no protocolo de Kyoto, grande euforia foi gerada, principalmente, para a agropecuária, na esperança de que os projetos e as Reduções Certificadas de Emissão - RCE por si só viabilizariam os empreendimentos (ETCHECOIN, 2000).

No final da década passada, a geração de energia elétrica, que até pouco tempo não era considerada nos projetos, passou a ter importância no Brasil, dando um novo impulso ao uso do biogás. Atualmente esse mercado está mais aquecido em função da ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica), que na data de 15 de dezembro de 2009, publicou a Instrução Normativa - IN 390/09, através da qual estabelece a necessária regulamentação do Decreto Lei 5163/04, que institui a Geração Distribuída no Brasil (ANEEL, 2009).

Algumas companhias estaduais de saneamento tiveram iniciativas de sucesso em projetos de recuperação energética do biogás gerado nas estações de tratamento no Brasil (FIGURA 1).



FIGURA 1 - ETEs com recuperação energética de biogás no Brasil (Fonte: autor).

Um exemplo é a COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais) que é responsável por prestar serviços á 625 municípios, atendendo mais de 14 milhões de habitantes. A estação trata o esgoto utilizando reatores anaeróbios (UASB) seguidos de pós-tratamento aeróbio. A estação é projetada para tratar uma vazão média de $2,25 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a uma população atendida de cerca de 1 milhão de habitantes. Está prevista uma futura ampliação da capacidade da ETE para $4,50 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (COPASA, 2012).

O biogás é produzido nos digestores anaeróbios, e para o seu aproveitamento foi implantada uma Pequena Central Termoelétrica (PCT), com potência instalada de 2,4 MW, que consiste em um conjunto de microturbinas movidas a biogás. Todo o biogás gerado, que antes da existência da PCT era queimado sem qualquer aproveitamento energético, é coletado e passa por um sistema de condensação para a retirada da umidade. O biogás é mantido sob pressão em um conjunto de gasômetros que alimentam um sistema de tratamento de gás. Atualmente, o biogás é aproveitado para gerar energia elétrica e calor (ALVES, 2000).

Isso demonstra que as ETEs não são somente um gasto para os municípios, mas podem tornar-se um recurso sustentável, produtor de materiais reaproveitáveis. De acordo com Macedo (2010), no Brasil, ainda são poucos os exemplos de

estações de tratamento de efluentes que utilizam o biogás como fonte renovável de energia. Neste sentido, ressalta-se que o uso de biogás proveniente de ETEs urbanas, além de reduzir as emissões do gás metano e gerar uma forma de energia renovável, propicia a criação de políticas que aproveitem o biogás e assim, contribuem para melhorar o saneamento básico no Brasil.

3.2 AS MICROALGAS

Estudos recentes têm demonstrado que algumas espécies microbianas, tais como leveduras, fungos, e microalgas podem ser usadas como matérias primas potenciais para a produção de biodiesel e bioetanol, devido à capacidade das mesmas de armazenar grandes quantidades de lipídios e carboidratos na sua biomassa e, em específico, devido à sua neutralidade em relação à flexibilidade do ambiente de cultivo, como por exemplo, efluente de tratamento anaeróbio (CHISTI, 2008; DRAGONE et al., 2011; TSIGIE et al., 2013).

Fatores como a elevada eficiência de conversão fotossintética, o rápido crescimento, o elevado teor de lipídios e carboidratos, fazem das microalgas uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biodiesel e bioetanol (CHISTI, 2008; ABREU et al., 2012). As microalgas se tornaram um recurso sustentável na produção de biocombustíveis devido a uma taxa de crescimento rápida (LI et al., 2008), e a uma eficiência fotossintética de 10-50 vezes maior do que a das plantas terrestres (ROSENBERG et al., 2011; KHAN et al., 2009), o conteúdo lipídico das matérias utilizadas é diretamente relacionada à produtividade de biocombustíveis.

As microalgas são estudadas para seu uso na produção de diferentes tipos de biocombustíveis, principalmente, a geração de biogás por meio de digestão anaeróbica, sendo uma alternativa com baixos custos operacionais para outros processos (CHRISTI et al., 2008). A digestão anaeróbica consiste na transformação do material orgânico através de uma série de processos bioquímicos: hidrólise, fermentação, acetogênese e metanogênese. Estes processos são realizados por diferentes microorganismos (ANGELIDAKI et al., 2010).

O biogás produzido é composto principalmente de metano, com cerca de 55-70% v/v e dióxido de carbono, 30-40% v/v. Dependendo do substrato utilizado no

processo, é possível que outros compostos estejam presentes, como nitrogênio, <2%; hidrogênio e/ou oxigênio, <1%; sulfato de hidrogênio, 0 a 50 ppm; outros compostos sulfuretos, compostos orgânicos voláteis, aromáticos, e halógenos, 10-270 mg m⁻³; e siloxanos, 80 - 2500 µg m⁻³ (BOHUTSKYI et al., 2013). Diferentes rendimentos de biogás foram reportados para a biomassa de microalgas, e variam em uma ampla faixa de 50 a 800 mL CH₄/gVS (sólidos voláteis), valores que representam cerca de 40-72% do biogás teórico máximo (TABELA 2).

TABELA 2 - Produção de metano a partir de biomassa microalgácea.

Microalgae	Metano (CH ₄ /gSV)	Referencias
<i>Acutodesmus obliquus</i>	218	Gruber-Brunhumer et al., 2015
<i>Arthrospira máxima</i>	1545	Ometto et al., 2014
<i>Chlorella</i> sp.	415	He et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	600	Mahdy et al., 2016
<i>Oocystis</i> sp.	203	Passos et al., 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,08* ¹	Kavitha et al., 2017
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1425	Ometto et al., 2014
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	262,84* ²	Muñoz et al., 2014
<i>Batrycoccus braunii</i>	521	Ciudad et al., 2014

*¹ (g COD/g COD)

*² mL g SSV⁻¹

As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos. A estrutura unicelular das microalgas permite que elas convertam facilmente a energia solar em energia química. Essa conversão bioquímica está sendo aproveitada comercialmente para a obtenção de biomassa de microalgas e, conseqüentemente, de produtos de aplicação comercial (FIGURA 2).

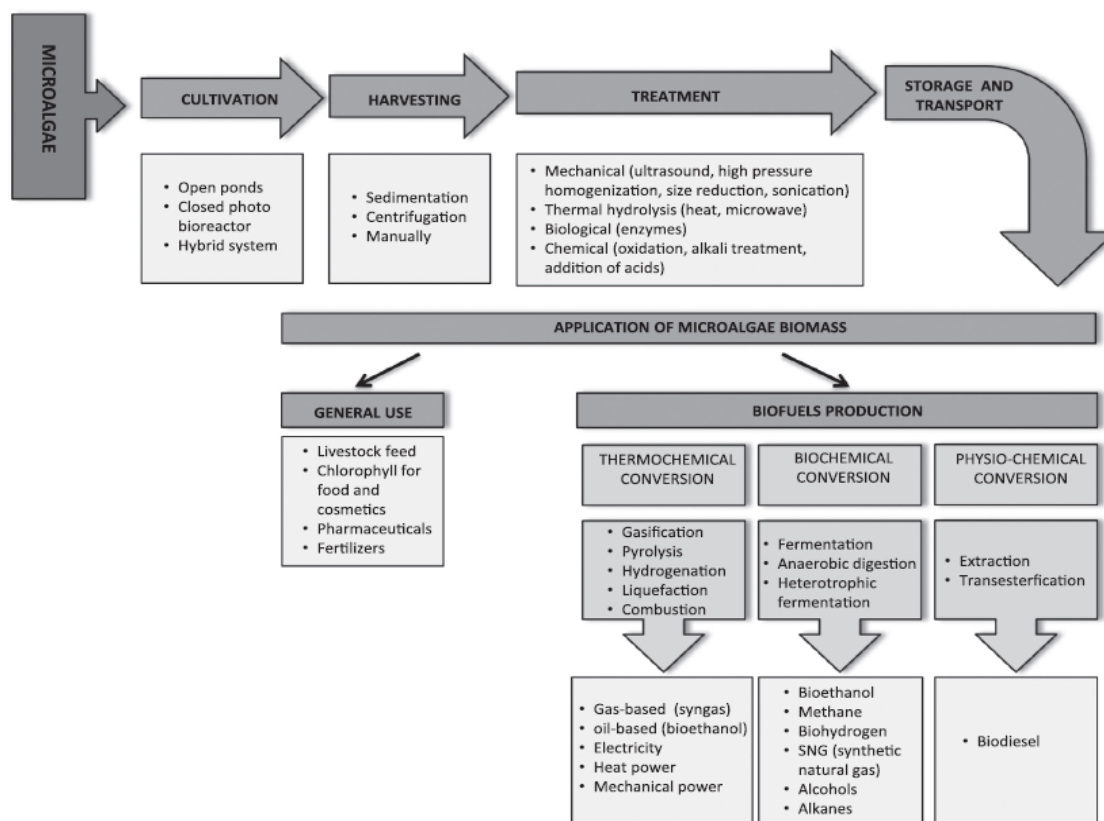


FIGURA 2 - Fluxograma de possíveis usos da biomassa microalgácea (Jankoswa et al., 2017).

As microalgas são algas microscópicas (5-50 μ m), cujas células possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidratos, proteínas, ácidos graxos, etc.) e essa composição pode estar relacionada à especificidade de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e/ou ao meio de cultura utilizado (MIAO & WU 2006, ZAMALLOA et al. 2011). O trabalho realizado por Xu et al. (2006), mostrou que células da microalga *Chlorella protothecoides* têm a sua composição bioquímica diferenciada quando cultivada de forma autotrófica e heterotrófica (TABELA 3).

TABELA 3 - Conteúdo dos principais componentes químicos de células autotróficas e heterotróficas de *Chlorella protothecoides*.

Componente (%)	Autotrófico	Heterotrófico
Proteína	52,64 \pm 0,26	10,28 \pm 0,10
Lípido	14,57 \pm 0,16	55,20 \pm 0,28
Carboidrato	10,62 \pm 0,14	15,43 \pm 0,17
Cinzas	6,36 \pm 0,05	5,93 \pm 0,04
Umidade	5,39 \pm 0,04	1,93 \pm 0,02
Outros	10,42 \pm 0,65	11,20 \pm 0,61

Fonte: Xu et al., 2006.

3.3 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Estima-se que existam mais de 50.000 espécies diferentes, mas apenas um número limitado, cerca de 30.000, foram já objeto de estudo e análise. Os principais critérios na seleção de espécies são: taxa de crescimento, normalmente medida pelo total de biomassa acumulada por unidade de tempo e unidade de volume; distribuição de ácidos graxos livres e triglicerídeos (teor lipídico), um fator crucial na produção de biodiesel; resistência às mudanças das condições ambientais, em particular de temperatura, disponibilidade de nutrientes, luz e competição com outras espécies de microalgas e outros microrganismos como fungos e bactérias; e, fácil recuperação das células da fase líquida (YOO et al., 2010). Na TABELA 4 estão resumidas a composição e estrutura das principais microalgas citadas na literatura.

TABELA 4 - Composição da parede celular e estrutura descrita por diferentes espécies de microalgas.

Espécies	Composição (%)	Estrutura	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	Sacarídeos 30%, Lipídeos 15%, Proteínas 2,46%	Estrutura rígida (porção alcalino-insolúvel) 66,6%, hemicelulose 25%	Abo-Shady et al., 1993
<i>Kirchneriella lunaris</i>	Sacarídeos 75%, Lipídeos 12,5%, Proteínas 3,96%	Estrutura rígida (porção alcalino-insolúvel) 70%, hemicelulose 23%	Abo-Shady et al., 1993
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Ramnose, xilose, arabinose, manose, glicose	Estrutura rígida, porção alcalino-insolúvel e alcalino-solúvel	Tadeka et al., 1978
<i>Chlorella emersonii</i>	TLS, não hidrolisável macromoléculas alifáticas	Estrutura trilaminar externa á parede celular polissacarídeo	Metzger et al., 1996
<i>Chlorella vulgaris</i>	Polissacarídeos	Ausência de parede celular	Metzger et al., 1996
<i>Tetraselmis suecica</i>	Polissacarídeos: Kdo isômeros 54%, ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulose 17%, ácido galacturônico 21%, galactose 6%	-	Kermanshahi-Pour et al., 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Estrutura trilaminar	-	Voigt et al., 2014

3.4 CULTIVO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA PARA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Para o cultivo de microalgas, vários parâmetros devem ser observados, uma vez que diversas espécies apresentam diferentes necessidades para seu desenvolvimento. Por exemplo, *Spirulina* sp. é cultivada em elevados níveis de alcalinidade ($\sim 16\text{g L}^{-1}$ de bicarbonato). Já a *Dunaliella salina*, por sua vez, apresenta um maior crescimento em ambientes muito salinos (100g L^{-1} , $>3\text{x}$ água do mar) (BENEMANN, 2013). De forma geral, as algas necessitam de carbono, nitrogênio e fósforo como fonte de nutrientes para seu crescimento. A possibilidade de utilizar esses elementos presentes nos efluentes provenientes do tratamento de esgoto sanitário, pode resultar em uma redução nos custos finais do tratamento (ASLAN & KAPDAN, 2006; CHO et al., 2011). Ademais, ao realizar a fotossíntese, as algas assimilam CO_2 e, o íon bicarbonato do esgoto (HCO_3^-) tende a se converter em OH^- , aumentando o pH do meio. Esta elevação do pH, além de elevar a toxicidade da amônia, é um dos principais fatores de decaimento bacteriano e possível remoção dos nutrientes: nitrogênio, por meio da volatilização e fósforo por precipitação (GONÇALVES, 2008). A TABELA 5 refere-se a algumas espécies de microalgas já estudadas e referidas com frequência na literatura, quantificando o seu teor lipídico, produtividade volumétrica de biomassa e a produtividade de biomassa por área (MATA et al., 2010).

TABELA 5 - Teor lipídico, produtividade de lipídios e de biomassa de diferentes espécies.

Espécie de microalga	Teor de lipídio (% de peso seco da biomassa)	Produtividade lipídica ($\text{mg L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)	Produtividade volumétrica de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{dia}^{-1}$)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24,0-31,0	-	-
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	0,02
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,036-0,041
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0	0,02-0,20
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0	0,22-0,34
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	0,09
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25,0	-	0,05-0,06
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21,1	40,8-53,9	0,03-0,26

Fonte: Mata et al., 2010.

A produção de Biomassa Micro Algácea (BMA) em fotobiorreatores (FBRs) proporciona um ambiente controlado e alta produtividade. Abastecimento de dióxido de carbono, de água, temperatura ideal, exposição eficiente à luz, níveis de pH, regime de mistura, que facilitam o controle do ambiente de cultivo.

Os reatores em tanques abertos são os sistemas mais antigos e simples de cultivo de microalgas. Para produção em larga escala, os tanques são muito utilizados, uma vez que podem produzir grande quantidade de biomassa a um investimento aplicável (MOAZAMI et al., 2013). As lagoas possuem circuitos geralmente de 0,25 m de largura e 0,4 m de profundidade, através dos quais a água circula por meio de rodas de pedais. Apesar da configuração rasa, para maximizar a penetração de luz, as lagoas requerem grande área de terreno e apresentam baixa produtividade por unidade de área e volume e alta vulnerabilidade à contaminação, quando comparadas aos fechados, o que as tornam muitas vezes inviáveis. Essas lagoas devem ser mantidas em pH alcalino para que prováveis contaminações não ocorram, o que torna a produção limitada a apenas algumas espécies de microalgas. Contudo, as lagoas de alta taxa não requerem resfriamento e não apresenta supersaturação de oxigênio, o que ameaça a produção em sistemas fechados (BAHADAR & KHAN, 2013). Inclusive as lagoas, sendo desenvolvidas em ambientes abertos, impossibilitam o controle da população que habita o meio de cultivo, segundo Hom-Dias (2016), que utilizou *raceway* com meio de efluente de tratamento secundário, a variedade de micro-organismo que encontrou foi composta por *Oocystis* sp., diatomáceas, bactérias e protozoários. Este tipo de biomassa gerada pode ser definida como consorciada, baseada na multiplicidade de população que a compõe.

3.5 PRÉ-TRAMENTO DA BIOMASSA MICROALGÁCEA

Os pré-tratamentos visam romper a parede celular, reduzir o tamanho da partícula das células de biomassa e aumentar a superfície, reduzir a ramificação de alguns materiais fibrosos, solubilizar moléculas recalcitrantes tornando-as biodegradáveis, hidrolisar parcialmente polímeros celulares e/ou desativar materiais tóxicos. Os pré-tratamentos são considerados essenciais para aumentar a biodegradabilidade da biomassa microalgácea e conseqüentemente torná-la mais acessível para a sucessiva digestão anaeróbica visando a produção de biogás.

Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos ou digestivos:

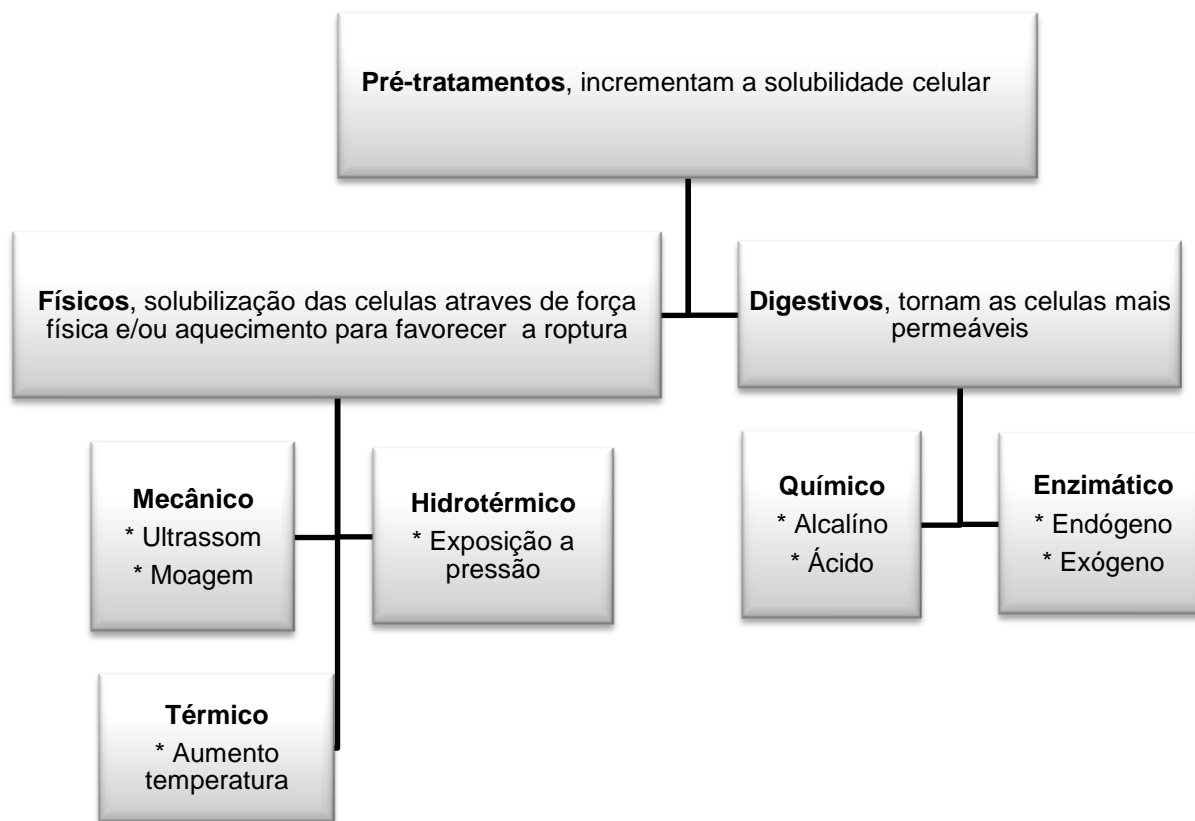


FIGURA 3 - Classificação dos pré-tratamentos da biomassa microalgácea para digestão anaeróbica e consequente produção de biogás (Cordova et al., 2018).

Nos últimos anos, tiveram uma quantidade crescente de pesquisas relacionadas à aplicação de diferentes pré-tratamentos para cultivo de microalgas, a fim de obter subprodutos economicamente viáveis. Neste contexto, tem havido descrições de pré-tratamentos físicos que visam reduzir o tamanho das macromoléculas encontradas na parede celular por meio de força física ou altas temperaturas e / ou pressão (PASSOS et al., 2014). No entanto, este tipo de pré-tratamento está associado à utilização de elevadas quantidades de energia e, adicionalmente, este processo não digere os componentes da parede celular. Outras alternativas são encontradas em pré-tratamentos biológicos que, por exemplo, utilizam a digestão enzimática para extrair as componentes da parede celular, e paralelamente os requisitos de energia são muito mais baixos (OMETTO et al., 2014).

Alzate et al., (2012) avaliaram diferentes pré-tratamentos de microalgas, sendo três opções diferentes selecionadas: hidrólise térmica, ultrassom e pré-

tratamento enzimático. Os resultados mostraram que apenas a hidrólise térmica e ultrassom causaram um aumento significativo na biodegradabilidade das células, sendo mais significativo o maior consumo de energia no resultado final, atingindo uma biodegradabilidade máxima de 76% na hidrólise térmica. Neste trabalho, verificou-se que a aplicação de um tratamento enzimático permitiu uma biodegradabilidade de quase 90% das células de microalgas constituídas por uma parede celular muito complexa. Neste contexto, o pré-tratamento capaz de romper a parede celular de microalgas pode aumentar sua biodegradabilidade.

Similarmente, os estudos desenvolvidos por Passos et al. (2016), mostram a necessidade de usar mix de enzimas para degradar a parede celular de biomassa mixotófica devido à sua elevada seletividade. Também segundo Vanthoor et al. (2013), dependendo da composição da parede celular, uma mistura de enzimas específicas seria necessária para degradar compostos específicos da parede celular. No mesmo contexto, Sander e Murthy (2010), realizaram um experimento com a utilização de *Chlorella vulgaris* e as enzimas Accellerase 1000[®] (uma mistura otimizada de celulase e hemicelulase), Gzyme G699[®] (A1 fosfolipase) e LysoMax[®] (A2 fosfolipase). O ensaio foi realizado a 40°C durante 72 h. Eles confirmaram a ruptura da parede celular pelo aumento da glicose e glicerol como resultado da adição de celulose e degradação a partir da parede celular.

Os resultados obtidos por Ciudad et al, (2014), demonstraram ainda que a utilização de um extrato enzimático de *Anthracoxyllum discolor* 1000 U/L aumentou em cerca de 35% a biodegradabilidade em comparação ao controle.

Segundo Ehimen et al. (2012), a utilização dos métodos enzimáticos de pré-tratamento resultou em maiores concentrações de glicose dissolvida do que os tratamentos mecânicos. A hidrólise da biomassa facilitada pela sinergia de cinco enzimas (lipase, celulase, xilanase, amilase e protease) foi considerada responsável pelo aumento da biodegradabilidade e tempo de digestão mais curto comparado com a utilização de uma única enzima. Segundo os autores, a ação combinada de enzimas diferentes solubilizou-se mais matéria orgânica favorecendo a seguinte digestão anaeróbica. Este resultado poderia ser usado para confirmar que a celulose é o principal componente da estrutura da parede da alga *Rhizoclonium*.

Segundo Ometto et al. (2014), a hidrólise térmica foi a mais eficiente para liberação das proteínas a partir da microalga *Scenedesmus obliquus* (80% de

Demanda Química de Oxigênio-DQO). A matéria orgânica solubilizada foi 2,8 e 4,2 vezes maior do que os pré-tratamentos com hidrólise com ultrassom e enzimática respectivamente. Resultados parecidos foram encontrados com a microalga *Chlorella sorokiniana* pelos mesmos pesquisadores. Em contrapartida com a hidrólise enzimática, grandes quantidades de carboidratos foram liberados, certamente a partir da parede celular. Em específico com a *Scenedesmus obliquus*, a hidrólise enzimática solubilizou-se 135 mg gST^{-1} de carboidratos. Na mesma pesquisa foi efetuada uma análise com microscópio eletrônico de transmissão (TEM), das microalgas hidrolisadas com as três técnicas. Na hidrólise térmica (FIGURA 4: SO2, CS2), a parede celular se expandiu e se destacou com a perda de turgidez. O pré-tratamento com ultrassom causou a perda da elasticidade externa (FIGURA 4: SO3, CS3). No caso da hidrólise enzimática a permeabilidade da parede celular foi completamente afetada, variando sensivelmente a turgidez das microalgas examinadas (FIGURA 4: SO4, CS4).

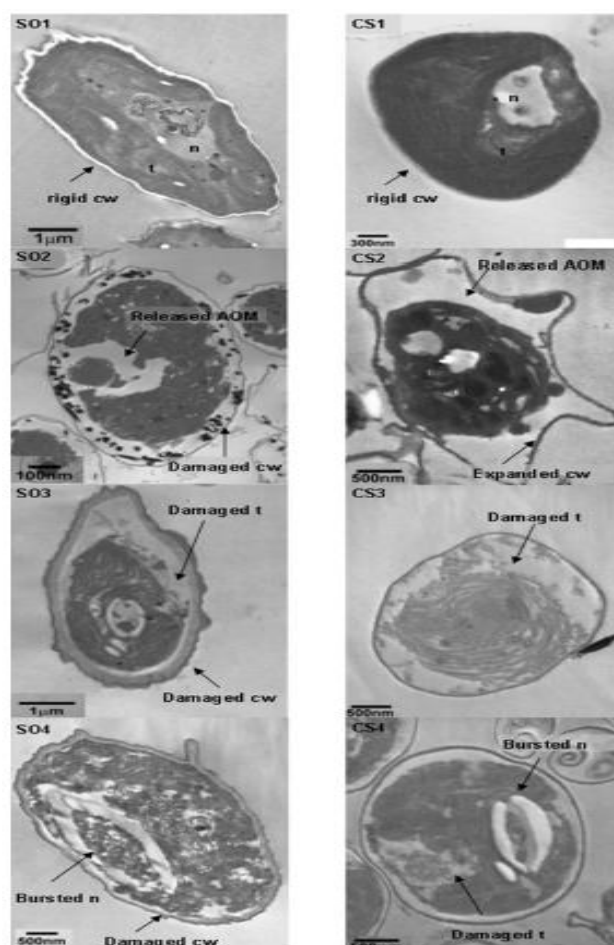


FIGURA 4 - Foto com microscópio eletrônico da microalga *Scenedesmus obliquus* (SO) e *Chlorella sorokiniana* (CS) células, sem tratamento (1), depois de tratamento térmico (2), ultrassom (3) e enzimático (4) Ometto et al.(2014).

Na mesma publicação os autores realizaram uma comparação entre os pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos analisando os impactos físico sob a biomassa microalgácea, a produção de biogás eo balanço energético final. A produção de biogás com pré-tratamento térmico aumentou de 80-100%, com pré-tratamento físico com ultrassom aumentou de 30 até 60% mas com pré-tratamento enzimático alcançou 270% (FIGURA 5). Paralelamente o balanço energético resultou entre neutro e positivo no tratamento térmico. Com ultrassom devido, ao elevado gasto energético o balanço energético, resultou em negativo, e com o pré-tratamento enzimático, usando extrato bruto de fungo, o balanço resultou positivo.

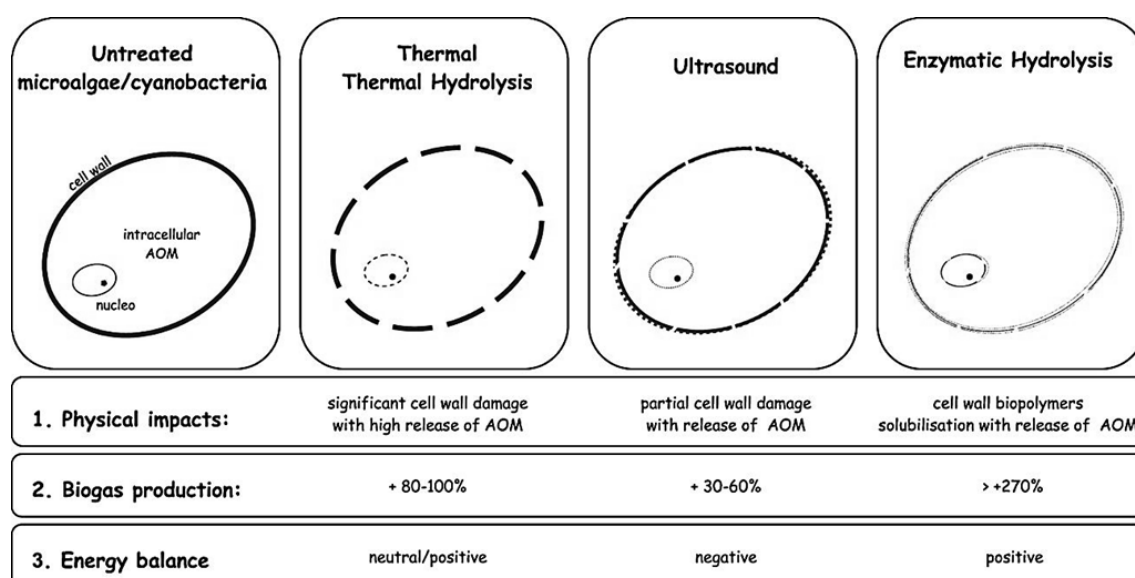


FIGURA 5 - Pré-tratamentos de microalgas para digestão anaeróbica melhorada: tratamento térmico, hidrólise térmica, ultrassom e hidrólise enzimática Ometto et al,(2014).

3.5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

PASSOS et al., (2015) realizaram o pré-tratamento com as enzimas celulase, gluco-hidrolase e uma mistura enzimática composta de celulase, gluco-hidrolase e xilanase. Para avaliar as melhores condições de pré-tratamento, duas doses de enzima foram administradas (0,5 e 1%) ao longo de um tempo de exposição de 6-48 h. A solubilização da biomassa foi aumentada em 110% após pré-tratamento enzimático com celulase e 126% com a mistura de enzimas; a razão para o melhor desempenho da mistura enzimática, segundo os autores, é o efeito sinérgico entre várias macromoléculas contidas na estrutura celular. Isto quer dizer que as enzimas glucohidrolase e xilanase podem ter tido maior atividade enzimática

após a atividade celulolítica. Neste caso a hemicelulose teria ficado mais disponível para as enzimas.

Na pesquisa conduzida por Prajapati et al. (2015a) o pré-tratamento da biomassa microalgácea foi conduzida com enzima bruta produzida a partir de *Aspergillus lentuluse* e *Rhizopus oryzae* usando duas concentrações 10 e 20% em shaker a temperatura de 30°C. O resultado foi monitorado avaliando a concentração de matéria orgânica dissolvida e a análise microscópica usando microscópio de fluorescência e corante Sytox-green® (Thermofisher) que se liga ao material genético assumindo a coração verde. Na FIGURA 6A células de *Chroococcus* sp. sem tratamento (A), pretratadas com enzima bruta de *Aspergillus lentulus* (B) e com *Rhizopus oryzae* (C).

Esta análise microscópica demonstra que o tratamento enzimático aumenta a permeabilidade das células vegetais, possibilitando a entrada do corante Sytox-green® assumindo a coloração verde. Entre os dois pré-tratamentos com extrato fúngico avaliados, o *Aspergillus lentulus* foi o mais eficiente resultando em uma coloração verde mais numerosa (B).

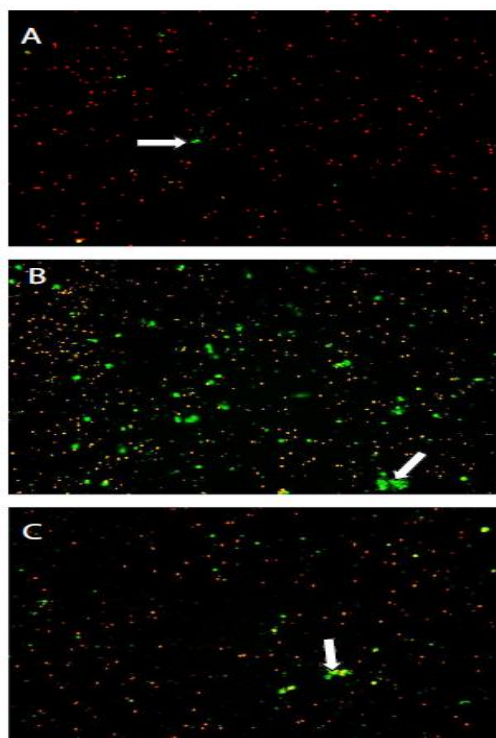


FIGURA 6 - Micrografia a fluorescência com Sytox-green® ligado as células de *Chroococcus* sp. sem tratamento (A) pré-tratadas com enzima bruta de *Aspergillus lentulus* (B) e com *Rhizopus oryzae* (C) Prajapati et al. (2015b).

Gonzalez-Fernandez et al. (2012) realizaram uma análise da parede celular da microalga *Chlorella sorokiniana* durante o processos de hidrólise enzimática concluindo que durante os primeiros 30 minutos a biomassa foi ligeiramente danificada, enquanto após 120 minutos de tratamento foi severamente degradada. Outro estudo sobre a hidrólise enzimática da microalga *Chlorococcum* sp. usando celulase resultou em 64,2% o rendimento de glicose após 11 h de pré-tratamento e permaneceu constante. Na TABELA 6, estão resumidas as espécies de biomassa mais estudadas no mundo científico e os tipos de enzimas utilizadas.

TABELA 6 - Resumo de estudos envolvendo pré-tratamento enzimático de biomassa microalgácea.

Espécies da biomassa	Espécies de fungo/ Enzimas	Análises efetuadas	Referência
<i>Chlorococcum humicola</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	glicose s	Harun et al., 2011
<i>Rhizoclonium</i> sp.	Amylase, Protease, Lipase, Xylanase, Celulase	BMP	Ehimen et al., 2012
<i>Chlorella</i> e <i>Selenastrum</i>	Lysozime, Pectinase, Sulfatase, β -Glucuronidase, Laminarinase	Permeabilidade da parede	Gerken et al., 2012
<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Anthracoephyllum discolor</i>	BMP	Ciudad et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	Protease	ST, SV, glicose t, glicose s, DQOt, DQOs	Mahdy et al., 2014
<i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	Cellulase, Endogalacturonase, Esterase, Protease, α -Amylase, Pectinase, Esterase	DQOt, DQOs, BMP	Ometto et al., 2014
<i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.	Carbohydrase, Protease	glicose t, glicose s, DQO t, DQO s, ST, SV	Mahdy et al., 2015
Não especificada	Cellulase, Hemicellulase, Pectinase	ST, SV, BMP	Passos et al., 2015
<i>Chroococcus</i> sp.	<i>Aspergillus lentulus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	DQO t, DQO s, análise microscópica (SEM)	Prajapati et al., 2015a
<i>Oocystis</i> sp.	<i>Trametes versicolor</i>	glicose s, BMP	Hom-Diaz et al., 2016

BMP: potencial bioquímico do metano; ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; glicose t: análise conteúdo glicose total; glicose s: análise glicose solubilizada; DQOt: demanda química de oxigenio; DQOs: demanda química de oxigenio solúvel; SEM: microscopia eletrônica de varredura.

Comparando os pré-tratamentos da biomassa microalgácea, na TABELA 7 estão resumidos as vantagens e desvantagens de cada técnica de hidrólise (RODRIGUEZ et al. 2015).

TABELA 7 - Comparação de técnicas de pré-tratamento de biomassa microalgácea.

Pré-tratamento	Descrição	Parâmetros que influenciam a solubilização e produção de biogás	Vantagens	Desvantagens
Mecânico	Redução da cristalização da celulose e o tamanho das células	Aumento da produção de biogás mas sem efeitos sobre a solubilização	Aumento da fluidez da biomassa e aumento da área superficial	Elevado dispêndio energético, elevado custos de manutenção do equipamento
Ultrassom	Ultrassom produz cavitação nas células causando a quebra da parede celular	Aumenta a produção de biogás mas tem menor efeito sobre a solubilização	Escalabilidade	Elevada demanda energética
Micro-ondas	Destruição de ligação H, mudança de estruturas proteicas e lipídicas	Elevada dosagem de micro-ondas aumentam a produção de biogás mas tem menor efeito sobre a solubilização	Rápido e uniforme aquecimento	Elevada demanda de energia
Térmico	Elevado aquecimento <100°C	Temperatura e tempo de exposição tem elevado efeito na solubilização da biomassa e produção de biogás	Elevada solubilização, elevado incremento de produção de biogás	Elevada demanda energética
Hidrotérmico	Exposição a temperaturas entre 100-250°C	Temperatura, exposição à pressão tem efeito sobre a solubilização e produção de biogás	Solubilização de biomassa, incremento da produção de metano, desinfecção da biomassa	Elevada demanda energética, possível produção de produtos recalcitrantes
Químico	Adicionando produtos alcalinos ou ácidos, como peróxido de sódio e ácido sulfúrico	Utilização de produtos químico tem grande efeito na solubilização mas tem menos efeito na produção de biogás	Baixa demanda energética, solubilização de hemicelulose	Contaminação química, custo dos produtos químicos, corrosão, produção de produtos inibitórios, mudança de pH

Biológico	Utilização de mix enzimáticos para favorecer a hidrólise	A concentração enzimática tem menor efeito sobre a solubilização e produção de biogás	Baixa demanda energética, não são produzidos produtos inibitórios	Pré-tratamento lento, necessário muito espaço físico, custo das enzimas, custo dos substratos
-----------	--	---	---	---

Fonte: Rodriguez et al. (2015).

4. METODOLOGIA

Para atingir os objetivos deste trabalho, foram realizadas as etapas descritas no fluxograma apresentado na FIGURA 7.



FIGURA 7 - Fluxograma descritivo das principais etapas desenvolvidas para o cumprimento dos objetivos apresentados.

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

4.1.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Para o isolamento dos fungos filamentosos, microambientes foram estabelecidos a partir de recipientes PET de 200 mL, utilizando como inóculo 50g de solo de horta misturado com esterco misto em uma proporção de 50:50. Foram adicionados nutrientes (5% do inóculo) a fim de estimular o crescimento dos fungos. No caso de fungos celulolíticos foi acrescentada carboximetilcelulose, óleo vegetal para fungos lipolíticos, gelatina vegetal no caso de fungos proteásicos e pectina cítrica para fungos com atividade pectinásica para estimular uma primeira seleção (FIGURA 8).

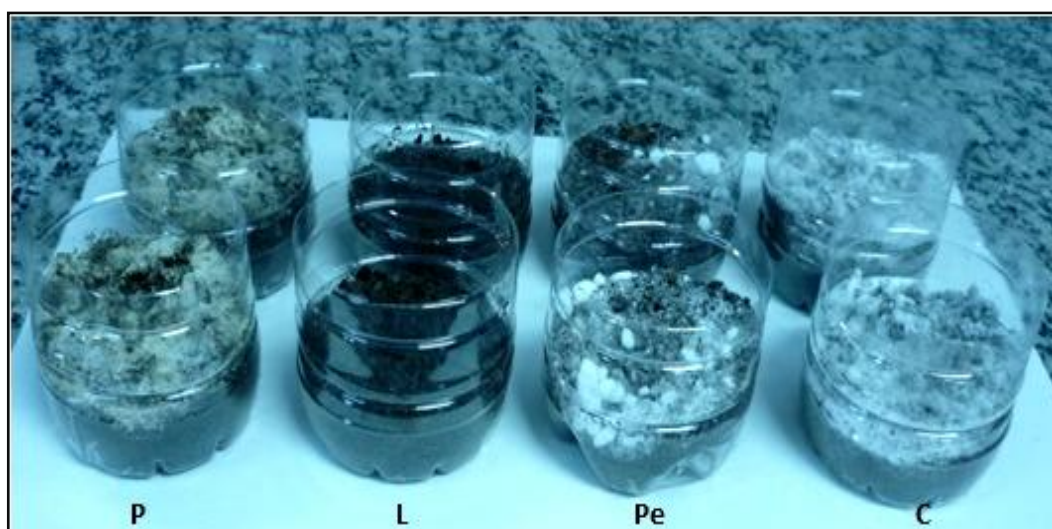


FIGURA 8 - Microambientes para crescimento de fungos filamentosos (P proteásico, L lipásico, Pe pectinásico e C celulásico).

Foram preparados dois frascos para cada atividade enzimática. O cultivo foi efetuado em ambiente externo e interno ao laboratório (incubados a 28°C em BOD). Os microambientes foram monitorados durante 15-20 dias com avaliação do crescimento a cada 5 dias; os fungos foram isolados assim que a colônia ficou visível a olho nu (FIGURA 9).

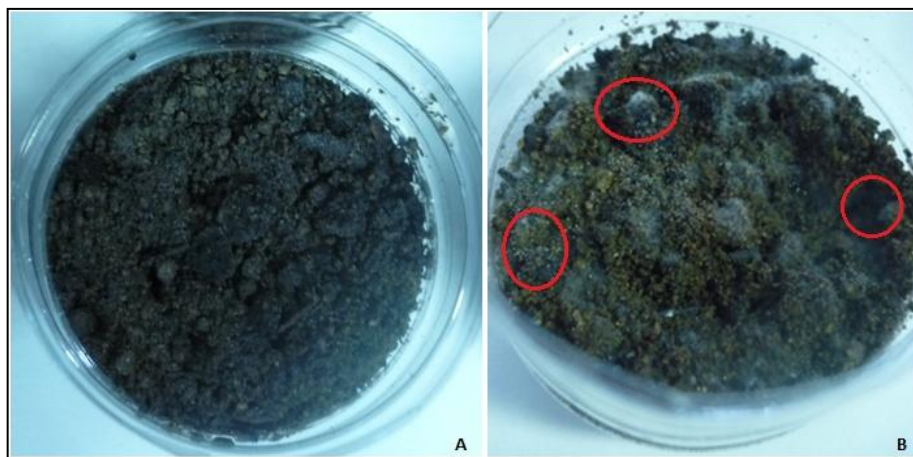


FIGURA 9 - Microambiente adicionado com óleo antes (A) e depois (B) de 15 dias de incubação externa ao laboratório, os círculos vermelhos indicam a presença de colônias.

O método utilizado foi o de isolamento direto, modificado de Menezes e Assis (2004), que consiste na transferência de esporos presentes na superfície do solo contaminado, para placas de Petri contendo 20 mL do meio mínimo (g L^{-1}): NaCl (5), CaCl_2 (0,1), ágar (15) e cloranfenicol (0,025) e incubados em BOD por 48h a 28°C .

4.1.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS POR ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi prosseguida uma primeira seleção dos fungos, dividindo por atividade enzimática, em meios de cultura sólidos, para celulases, lipases, pectinase e proteases. A composição de cada meio foi a seguinte:

- Atividade celulásica (500 mL tampão acetato de sódio 0,1M pH5; 2% ágar; 5% carboximetilcelulose). A carboximetilcelulose (CMC) foi dissolvida em 200 mL de tampão acetato de sódio 0,1M ph 5,0 em agitador magnético. Após a dissolução de CMC, foi adicionado o restante do tampão (300 mL) e em seguida o ágar. O meio de cultura foi homogeneizado e esterilizado a 120°C durante 15 minutos;
- Lipásica (500 mL água destilada; 20g ágar; 5g cloreto de sódio; 5g cloreto de cálcio; 10mL Tween 20);
- Pectinase (500 mL água destilada; 20g ágar; 5g pectina cítrica);
- Protease (500 mL tampão citrato fosfato 0,1M pH5; 2% ágar; 1,0% gelatina). O ágar foi adicionado em 400 mL de tampão citrato fosfato 0,1M pH 5,0, homogeneizado com bastão de vidro e foi esterilizado a 120°C , durante 15 minutos. Para a solução de gelatina a 5% foram adicionados 5g de gelatina em 50 mL de

solução tampão citrato fosfato e foram deixados em repouso durante 3 minutos e em seguida homogeneizados. A solução foi aquecida em banho-maria para a dissolução completa da gelatina e, posteriormente, foi esterilizada a 120°C, durante 15 minutos.

A transferência de esporos fúngicos foi efetuada com utilização de alça de repicagem descartável ou com auxílio de um estilete flambado, que sucessivamente foi acondicionado em Beker de 20 mL contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Esta solução foi homogeneizada ao fim de permitir a total homogeneização dos esporos no meio. Em câmara de fluxo laminar horizontal (PA 1 - Eco, Pachane), uma alíquota de 1 mL desta solução foi colocada em placas Petri contendo meio seletivo (TORTORA et al., 2009). As placas, quatro para cada tratamento, foram incubadas durante 96 h, à temperatura de 28°C (FIGURA 10).

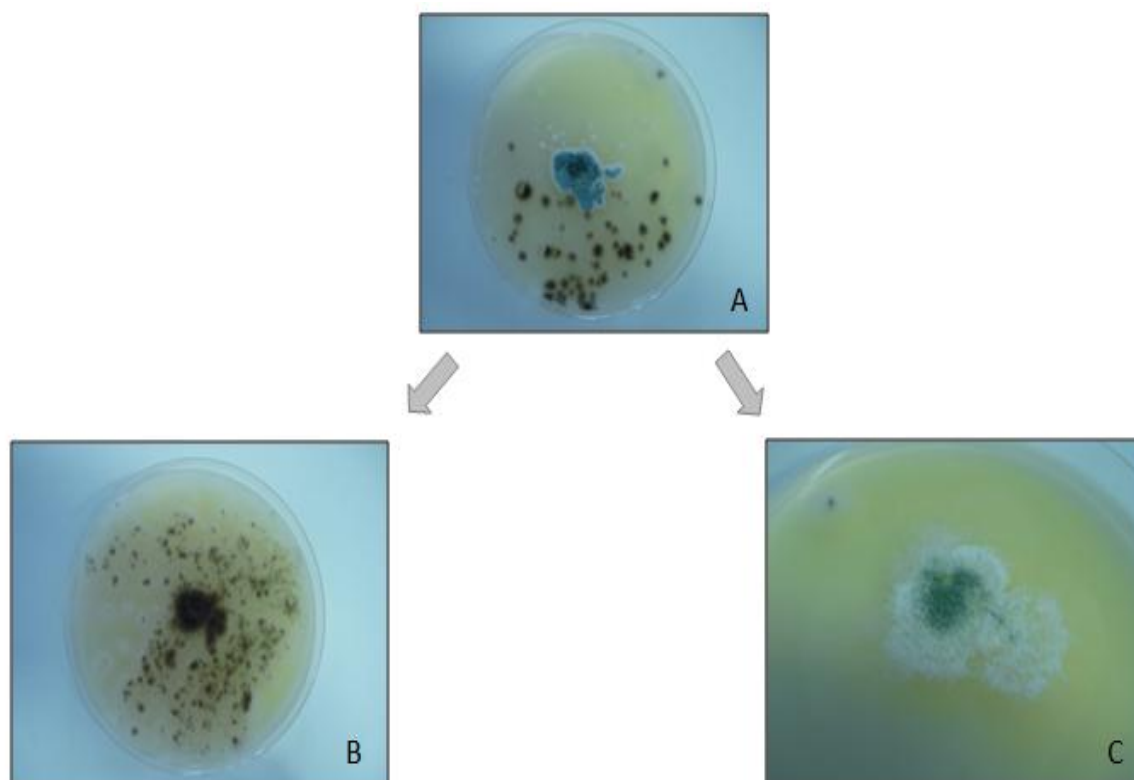


FIGURA 10 - Placa de BDA com colônias que cresceram no microambiente L (A). Os fungos *Aspergillus* sp.(B) e *Penicillium* sp (C) foram isolados a partir da placa na figura A.

Após o período de incubação, as colônias morfologicamente diferentes foram repicadas, sucessivamente, para placas com o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (g L^{-1}): infusão de batata (200), dextrose (20), ágar (17) pH $5,6 \pm 0,2$. As placas foram incubadas em BOD a 25°C por 3 dias. As culturas puras obtidas foram mantidas em tubos de cultura com o meio BDA e armazenadas a 5°C.

4.1.3 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a preservação dos isolados foi utilizado o método de Castellani (1967) que consiste em depositar cinco cubos de micélio do tamanho de 5 mm por 5 mm em um frasco de 20 mL esterilizado, contendo 5 mL de água destilada também esterilizada.

4.1.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação dos isolados de fungos filamentosos foi realizada com base em exames macroscópicos das colônias (cor, forma, textura) e pelas características morfológicas microscópicas. Para isso, lâminas foram preparadas a partir de pedaços das colônias e observadas ao microscópio óptico (ZEISS® HBO 50/AC). Adicionalmente, foi utilizada a técnica de microcultivo (WATANABE 2010) para melhor visualização das estruturas reprodutivas. A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de chaves de identificação (TORTORA et al., 2009; WATANABE 2010). Após a identificação, cada isolado recebeu um código, composto por letras e números, que correspondem as iniciais do gênero, atividade enzimática e número em ordem crescente dos fungos isolados. Cada fungo foi catalogado por meio de um código de letras e número que especifica o gênero do fungo, a atividade enzimática e um número em ordem crescente.

Para criação do acervo fúngico do LABSAN os fungos isolados foram armazenados seguindo o método Castellani (CASTELLANI, 1967) e fotografados morfológicamente e microscopicamente utilizando respectivamente a câmera Canon EOC 70D e microscópio óptico (ZEISS® HBO 50/AC).

4.2 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.2.1 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os fungos com atividades enzimáticas hidrolíticas foram utilizados em ensaios de fermentação submersa para produção de extratos brutos enzimáticos. O substrato para o processo de fermentação foi um substrato único, meio mínimo (MM) (g L^{-1}): NaCl (5), CaCl_2 (0,1) e cloranfenicol (0,025); acrescido com componentes específicas para cada atividade enzimática. No caso da atividade celulásica foi

carboximetilcelulose, óleo vegetal para a atividade lipásica, pectina cítrica no caso de atividade pectinásica e gelatina vegetal no caso da atividade proteásica.

Para realizar a inoculação dos fungos, cinco fragmentos de 5x5mm de micélio crescido em meio de cultura BDA foram inseridos em cada Erlenmayer com 250 mL de meio mínimo acrescido de cada nutriente correspondente para cada atividade enzimática de 5%v/v (volume/volume). Os frascos foram colocados no agitador orbital (Nova Técnica NT 712) a 150 rpm por 48 horas a 30°C (INFORSATO et al., 2016).

4.2.2 EXTRAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO

Após o período de 48 h foi realizada a extração das enzimas. Foi adicionado aos frascos uma solução tampão de acetato de sódio ($0,2 \text{ mol}^{-1}$, pH 4,5) na relação de 10 mL de tampão para 1 g de substrato (meio mínimo com nutriente). Em seguida, com o auxílio de um agitador magnético de bancada, a mistura contendo o caldo enzimático foi agitada vigorosamente durante 60 min. Após este período a mistura foi filtrada, utilizando filtro qualitativo (Hexis Científica), para a retirada dos esporos e dos fragmentos sólidos como os micélios que se formaram durante o crescimento fúngico. Posteriormente a solução sobrenadante contendo o caldo enzimático foi centrifugada por 10 min a 6000 rpm (Hermle Z320 Labor Technik) para remoção de materiais particulados. O caldo resultante foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e armazenado em congelador a -5°C por até 5 dias para posterior determinação da atividade enzimática.

4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

A determinação da atividade de enzimas fúngicas extracelulares, com substrato específico, foi concentrada em quatro diferentes atividades enzimáticas: celulásica, lipásica, pectinásica e proteásica através das técnicas explicadas em seguida. Análises de controle positivo foram executadas usando enzimas comerciais, celulase de *Trichoderma reesei* 1 U mg^{-1} , lípase obtido de *Mucor mehei* 1 U mg^{-1} , pectinase de *Aspergillus niger* 1 U mg^{-1} e protease obtida a partir do fungo *Aspergillus saitoi* $0,6 \text{ U mg}^{-1}$.

4.3.1 ATIVIDADE CELULÁSICA

Foi utilizada a metodologia segundo Miller (1959), FPase-expressa a atividade de celulose total, utilizando papel de filtro Whatman nº1 (1x6 cm, 50 mg) como substrato. Os açúcares redutores quando em meio alcalino a quente formam enedios e estes atuam como doadores de elétrons, os quais reagem com o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (amarelo) reduzindo-o para o ácido 3-amino-5-nitro-salicílico (laranja avermelhado).

Para a preparação do reagente DNS, foi pesado 10 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle). Para o preparo do reagente foram incorporadas duas soluções:

- Solução A - Em um frasco becker de 400 mL foram dissolvidos 10g de DNS em 200 mL de NaOHaq (2 mol L^{-1});
- Solução B - Em um frasco becker de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada foram adicionados 300g de Sal de Rochelle. Para dissolução completa a solução foi mantida em aquecimento (50°C) e agitação em placa magnética.

Em seguida, as soluções A e B foram misturadas, homogeneizadas e o volume da solução final foi completado para 1000 mL com água destilada. Devido à solução ser fotossensível, essa foi armazenada em um recipiente, envolvido por papel alumínio, na geladeira à temperatura de 5°C por um período de até 2 dias.

Para a obtenção da curva analítica, foram preparadas as soluções de glicose com concentração de 0,00; 0,55; 1,11; 1,66; 2,22; 3,33; 4,44; 4,99 mmol dL^{-1} . Em tubos de ensaio contendo mL de solução DNS adicionar 1 mL de cada solução padrão de glicose. Posteriormente os tubos serão agitados e aquecidos por 5 min à temperatura de 100°C . Após atingir a temperatura ambiente foram adicionados 13 mL de água destilada. O tubo apenas com água destilada (ausência de glicose) foi utilizado como controle negativo (branco) e as leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm Espectrofotômetro (Genesys 30, Thermo Scientific). Os valores de absorbância foram plotados em um gráfico no eixo da ordenada e os valores de concentração na abscissa.

Para determinar a atividade de FPase totais nas amostras de extrato enzimático bruto, foram adicionadas três tiras de papel Whatman nº1 (1 cm x 6 cm,

50 mg) enroladas em formato espiral dentro de 3 tubos de ensaio (uma tira para cada tubo, análise em triplicada) de 9cm contendo em cada tubo 2 mL de solução tampão citrato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 4,8). Em seguida, à temperatura ambiente foi adicionado 1 mL do caldo enzimático fúngico em cada tubo de ensaio. A solução resultante foi homogeneizada e mantida em banho termostático TBI 45/100 (Splabor, São Paulo-Brasil) a 50°C durante 60 min. Posteriormente os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e, foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução, adicionando 3 mL do reagente DNS e 1 mL de água destilada. A solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho-maria 100°C durante 5 min. Em seguida a solução foi resfriada à temperatura ambiente e analisada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959; SILVA et al. 2003). O controle negativo foi realizado seguindo todos os passos descritos anteriormente, exceto que ao invés de utilizar 1 mL do extrato enzimático fúngico adicionar 1 mL de água destilada.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado através da Equação 1 obtendo como resultado unidade de atividade da peroxidase por mL (U mL⁻¹) (ZERAİK et al.,2008).

$$UI = \frac{D \times C \times Vt}{T \times Ve} \quad (1)$$

D - Diluição (realizada quando for preciso)

C - Concentração determinada a partir do método DNS (μmol mL⁻¹)

Vt - Volume total da reação (mL)

T - Tempo de reação (min)

Ve - Volume da solução enzimática (mL)

4.3.2 ATIVIDADE LIPÁSICA

A atividade lipásica foi determinada de acordo com a metodologia de Winkler e Stuckman (1979), com modificações sugeridas por Gupta, Rathi (2002) e Gupta (2005). O meio de reação foi composto por duas soluções misturadas na proporção 0,1:9 (mL), respectivamente:

- Solução A: tampão Tris-HCl a 55 mM, pH 8,0, contendo goma arábica a 0,23% (p/v) e desoxicolato de sódio a 0,11% (p/v);

- Solução B: Palmitato de p-nitrofenila(pNPP) a 0,3% (p/v), preparada em isopropanol a 100% (v/v).

A reação foi iniciada pela adição do extrato bruto enzimático, as amostras foram incubadas a 37°C, em banho-maria, durante 15 min. Decorrido esse tempo, a reação foi parada em banho de gelo (aproximadamente 2°C) e a concentração do p-nitrofenol liberado a partir da hidrólise enzimática do pNPP foi determinada pela absorbância em 410 nm usando um espectrofotômetro (Genesys 30, Thermo Scientific), tomando-se como branco, água destilada e os demais constituintes do meio de reação, mantidos sob as mesmas condições já citadas.

Os resultados expressos em U, ou seja, 1 unidade corresponde a 1mmol de p-nitrofenol min⁻¹ hidrolisado, é calculado através da seguinte equação:

$$UI = \frac{Abs_{410nm} \times V}{\epsilon \times c \times t} \quad (2)$$

V - Volume da amostra (mL)

ϵ - Coeficiente de extinção molar (18,5 mL mol⁻¹ cm⁻¹)

c - caminho óptico da cubeta (cm)

t - Tempo (min)

4.3.3 ATIVIDADE PECTINÁSICA

Foi utilizada pectina cítrica como substrato segundo a metodologia de Albersheim e Killias (1962), baseada no aumento da absorbância devido à formação de produtos insaturados. Um mL de substrato 2,5% p/v em tampão fosfato de potássio 50 mM (ph 6,8) e 1,5 mL de extrato enzimático foram incubados a 40°C por 30 min e a reação paralisada com a adição de 4,5 mL de HCl 0,01 M. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Ultraspec 1000, TecnoLab) a 235 nm contra o branco (utilizando água destilada no lugar do extrato enzimático). Os valores de absorbância foram inseridos na equação (3) para obter o valor de U (atividade enzimática pectinásica), 1U corresponde a 1,0 mol de Δ galactoronídeo min⁻¹.

$$UI = \frac{Abs_{235nm} \times V}{\epsilon \times c \times t} \quad (3)$$

V - Volume da amostra (mL)

ϵ - Coeficiente de extinção molar (5550 mL mol⁻¹ cm⁻¹)

c - caminho óptico da cubeta (cm)

t - Tempo (min)

4.3.4 ATIVIDADE PROTEÁSICA

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada metodologia citada por Fry et al., (1994) de Tseng & Mount (1974). Foi adicionado 1 mL de substrato gelatina 1,0% m/v (tampão Tris-HCl 50mM pH 6,0 contendo 0,01% CaCl₂ p/v) a 1 mL do sobrenadante dos fungos que apresentaram atividade proteolítica. A solução foi agitada suavemente para evitar a formação de espuma, e incubada a 30°C por 30 min. A reação foi paralisada com a adição de 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 15% m/v para os ensaios. O branco foi preparado combinando 3 mL TCA 15% com 1 mL da solução a ser testada e adicionado 1 mL do substrato. A seguir foi centrifugado a 5000 rpm por 15 min. Todos os ensaios foram deixados em repouso por 30 min e sucessivamente filtrados em papel Whatman nº1. A leitura da absorbância do filtrado com relação ao branco foi realizada em cubeta utilizando o espectrofotômetro (Ultraspec 1000, TecnoLab) e foi utilizada a equação (4) para calcular o resultado, uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima requerida para causar um aumento de 0,01 U na absorbância a 280 nm sob as condições do ensaio.

$$UI = \frac{Abs_{280nm} - Branco}{0,01 \times t} \quad (4)$$

V - Volume da amostra (mL)

ϵ - Coeficiente de extinção molar (5550 mL mol⁻¹ cm⁻¹)

c - caminho óptico da cubeta (cm)

t - Tempo (min)

4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Paralelamente, às análises da determinação das atividades enzimáticas fúngicas, foram determinadas as quantidades de proteínas totais conforme a metodologia de Bradford et al. (1976). É um teste colorimétrico usado para dosagem de proteínas totais, com faixa de detecção entre 20 e 2000 µg mL⁻¹, e utiliza a albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

Para a preparação do reagente de Bradford, foi dissolvido 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95% e, em seguida, adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução assim obtida foi avolumada para 1L com água destilada. Após filtração em papel de filtro quantitativo (Whatman n°1), a solução foi mantida em geladeira.

As soluções-padrão foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,05M em pH 4,8, adicionado de NaCl 0,15 M. O tampão foi preparado titulando acetato de sódio 0,05 M com ácido acético 0,05 M até pH final de 4,8 e, em seguida, dissolvendo o NaCl. Uma solução-mãe de albumina bovina foi então preparada no tampão salino e, a partir desta solução-mãe, foram preparadas cinco diluições com as seguintes concentrações: 4,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 20,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 52,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 104,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 208,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em tubos de ensaio, quantidades de 2,5 mL do reagente de Bradford foram misturadas a porções de 0,1 mL de cada uma das diluições da solução-mãe. Em seguida, as respectivas absorvâncias a 595 nm foram determinadas em espectrofotômetro, utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco. Os valores de absorvância foram plotados em um gráfico no eixo da ordenada e os valores de concentração na abscissa.

Para a análise das amostras de extratos fúngicos, quantidades de 0,1 mL de cada uma foram misturados com 2,5 mL de reagente de Bradford em tubo de ensaio. Sucessivamente as respectivas absorvâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 30, Thermo Scientific) e através da curva de calibração foi possível determinar a concentração proteica em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA

Paralelamente, com as análises de atividades enzimáticas com substrato específico, foi avaliado o conteúdo proteico de cada extrato enzimático através do test de Bradford, sendo assim possível determinar a atividade enzimática específica de cada extrato enzimático através da equação (5):

$$\text{Atividade enzimática específica (atividade * } \mu\text{g proteína)} = \frac{\text{Atividade enzimática}}{\text{Quantificação proteínas totais}} \quad (5)$$

Foi realizada a análise ANOVA com um fator e o teste de Tukey HSD (IC=95%; $\alpha=0,05$) dos resultados obtidos para verificar diferenças significativas entre os fungos, através do programa SPSS 17.0[®] (Inc. USA para Windows).

4.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A produção do extrato enzimático, para sucessiva utilização na hidrólise da biomassa, foi efetuada utilizando quatro Erlenmeyers de 250 mL preenchidas com 20 g de vermiculita e 80 g de areia, ambos esterilizados; 60% da capacidade de campo foi ocupada utilizando MM (meio mínimo, receita no parágrafo 4.1.1) com adição de 5% nutriente específico para estimular a atividade enzimática. Foram utilizados estes compostos (vermiculite e areia) para favorecer a homogenização e aeração no processo de fermentação em estado sólido. Cada Erlenmeyer foi inoculada com cubos de micélio do tamanho de 5 mm por 5 mm incubado a 30°C, 150 rpm (rotações por minuto) (Nova Técnica NT 712) (INFORSATO et al., 2016).

Depois de 48 h de incubação, o extrato enzimático bruto foi filtrado e a solução sobrenadante contendo o caldo enzimático foi centrifugada por 10 min a 3500 rpm (Hermle Z320 Labor Technik) para remoção de materiais particulados. O caldo resultante foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e armazenado em congelador a -5°C por no máximo cinco dias para posterior determinação da atividade enzimática e analisado quimicamente para determinar o aporte de nutrientes no processo hidrolítico (TABELA 8). Para avaliação da quantidade de proteínas, foi medida a concentração de nitrogênio total Kjeldahl em seguida multiplicado pelo fator de conversão 5,95 sugerido por López et al. (2010).

TABELA 8 - Parâmetros a serem utilizados para a avaliação do aporte de nutriente no extrato enzimático bruto.

Parâmetro	Método	Instrumento utilizado	Referência
pH	Força eletromotriz	Medidor de pH Orion 4 Star, ThermoScientific [®]	-
ST (mg L ⁻¹)	Gravimétrico	Estufa, Nova Ética [®]	APHA, 2012
SFT (mg L ⁻¹)	Gravimétrico	Estufa, Nova Ética [®]	APHA, 2012
SVT (mg L ⁻¹)	Gravimétrico	Estufa, Nova Ética [®]	APHA, 2012
DQO (mg L ⁻¹)	Colorimétrico	Espectrofotômetro DR/2000, HACH [®]	APHA, 2012
Carboidratos (% SVT ⁻¹)	Colorimétrico	Espectrofotômetro DR/2000,	APHA, 2012

		HACH®	
Lipídios (% SVT ⁻¹)	Gravimétrico	Soxhlet	APHA, 2012
Proteínas (% SVT ⁻¹)	Titulométrico	Destilador Kjeldahl, Quimis®	APHA, 2012

4.7 CULTIVO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA EM FOTOBIORREATORES

Para aperfeiçoar o crescimento microalgáceo foram projetados seis fotobiorreatores fechados, de estrutura tubular em acrílico com 18cm de diâmetro e 1m de comprimento, com volume de 25L cada um (FIGURA 11). Os fotobiorreatores foram expostos à luz solar numa inclinação de 60° com o solo utilizando uma estrutura de fibra de vidro. Antes do preenchimento, cada FBR foi desinfetado com 25 mL de produto bactericida, fungicida, viricida, Biofol® (Chemitec) durante 1h. Os fotobiorreatores foram alimentados com meio efluente de tratamento anaeróbio de esgoto sanitário esterilizado (Autoclave vertical Phoenix luferico – São Paulo BR), da ETE de Araçás (Estação de Tratamento de Esgoto), usando como inóculo a microalga *Chlorella* sp. já isolada e disponível no acervo do Laboratório de Saneamento (LABSAN). Um compressor de ar com vazão 50L min⁻¹, 0,028mPa (Boyu - ACQ-009) garantiu fornecimento constante de dióxido de carbono durante 24 horas por dia para acelerar o crescimento microalgáceo, e favorecer a homogeneização; a entrada de ar do compressor foi filtrada usando um filtro Vetripure cromatográfico de 0,22 µm (Vertical - Tailândia). Os FBRs foram fechados com seis tampas de isopor lacradas com gaze, um furo foi aberto para passagem da mangueira de ar e outro foi criando para saída de ar colocando um filtro de 0,22 µm para evitar contaminações.

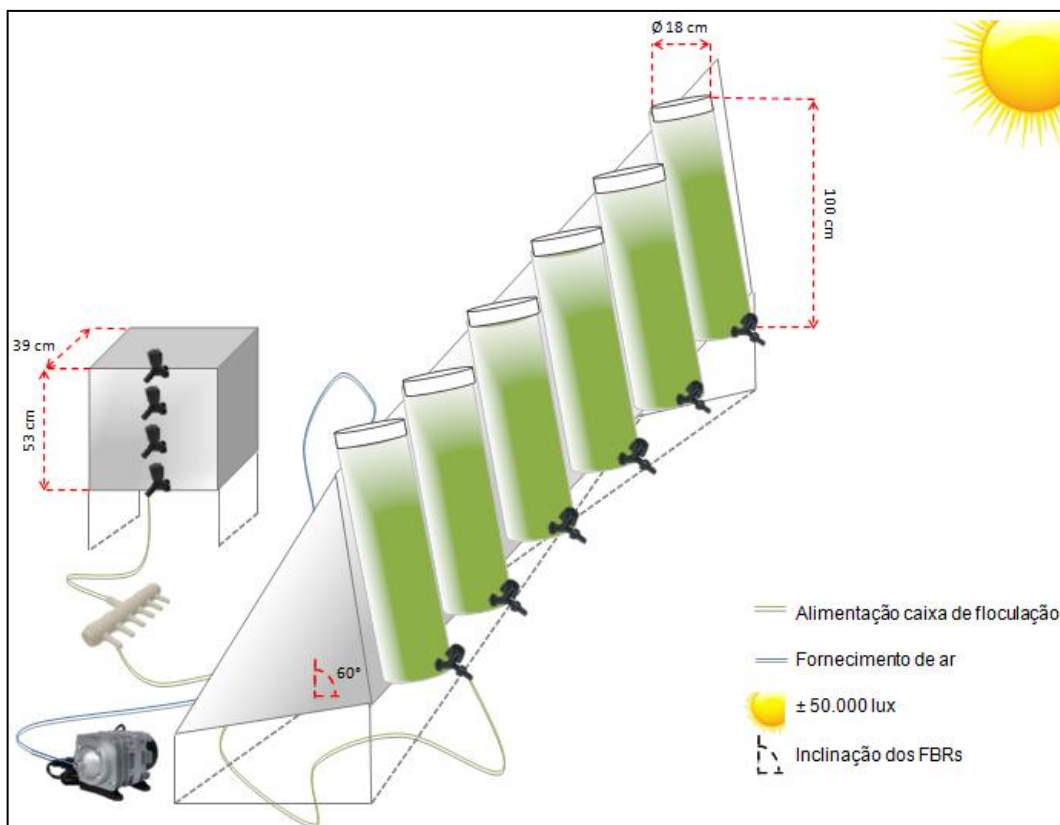


FIGURA 11 - Esquema ilustrativo do sistema piloto de produção de BMA referenciada.

Com a finalidade de monitorar a evolução do crescimento da microalga *Chlorella* sp., foram avaliados parâmetros físicos, químicos e microbiológicos por meio de coletas de volume de 50 mL nos 6 FBRs cada dois dias (TABELA 9).

TABELA 9 - Parâmetros que foram utilizados para monitoramento do crescimento de microalgas em regime de batelada.

Parâmetro avaliado	Periodicidade da coleta	Instrumento utilizado	Referência
Clorofila <i>a</i> <i>in vivo</i>	Cada dois dias	Fluorímetro, AquaFluor®	APHA, 2012
Contagem microalgas em câmara de Neubauer	Cada dois dias	Câmara de Neubauer, Boeco®	BMM 5777
Contagem bactérias heterotróficas	Cada dois dias	Low temperature incubation 815, Precision Scientific	Cetesb norma L5.201
ST (mg L ⁻¹)	Cada dois dias	Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
SVT (mg L ⁻¹)	Cada dois dias	Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
pH	Cada dois dias	Medidor de pH Orion 4 Star, ThermoScientific®	-

Em seguida, a biomassa microalgácea obtida no crescimento a partir dos fotobiorreatores foi coletada em uma caixa de fibra de vidro, construída atrás dos FBRs, com dimensões de 39cm x 39cm x 53cm e volume de 80L e equipada com 4 torneiras, em posições verticais, com distancia entre uma e a outra de 10cm. A biomassa passou por um processo físico-químico de separação utilizando como coagulante Tanfloc SS[®] (50 mg L⁻¹), agitando com pá mecânica durante 5 min 300 rpm e 15 min 50 rpm e filtrando a biomassa com tecido comum para separar a parte sólida (biomassa microalgácea) da líquida (efluente). A BMA foi conservada em temperatura de 5°C por no máximo cinco dias até os testes de hidrólise fúngica.

4.8 SISTEMA PILOTO DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO INTEGRADO COM MICROALGAS

No sistema piloto de tratamento de esgoto sanitário integrado com microalgas, o esgoto bruto foi captado e submetido a um tratamento preliminar, com o objetivo de remover sólidos grosseiros, e areia, por meio de mecanismos de ordem física. O efluente pré-tratado foi direcionado para o processo de tratamento secundário, constituído por dois reatores anaeróbios do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) em escala piloto, para tratamento biológico com redução da carga orgânica e nutrientes que funcionavam em regime de codigestão com vazão média de $0,12 \pm 0,03 \text{ L s}^{-1}$ e tempo de detenção hidráulica de $9,03 \pm 2,43 \text{ h}$.

O pós-tratamento do efluente secundário do UASB ocorreu em lagoas de alta taxa. Uma descrição completa do sistema pode ser encontrada na publicação de Gonçalves (2016) (FIGURA 12). O efluente secundário, bem como o lodo microalgáceo a serem caracterizados e utilizados no decorrer da pesquisa foram coletados a partir da lagoa de alta taxa, sendo que a separação da biomassa microalgácea (lodo) ocorreu a partir do processo de coagulação e floculação, com uso do coagulante químico comercial Tanfloc SS[®] (50 mg L⁻¹), seguido de filtração física utilizando um tecido comum.

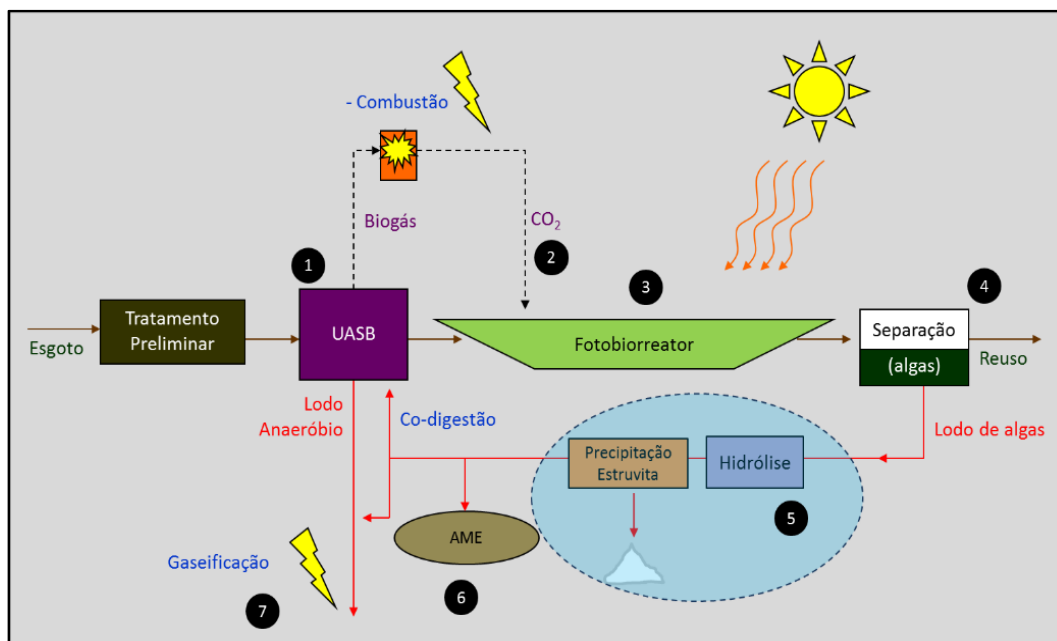


FIGURA 12 - Esboço de um sistema de tratamento integrado ao sistema de microalgas em fotobiorreatores (Gonçalves, 2016).

Neste tipo de cultivo, o termo biomassa microalgácea ou lodo microalgáceo, refere-se à cultura mista de microalgas, principalmente *Chlorella* sp., diatomáceas, bactérias e outros microrganismos como os protozoários.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE SECUNDÁRIO DO UASB E DA BIOMASSA

4.9.1 ANÁLISE DO EFLUENTE SECUNDÁRIO DE UASB

O efluente que foi coletado para utilização como meio de cultivo da microalga *Chlorella* sp. nos FBRs, foi esterilizado e caracterizado físico-quimicamente segundo os parâmetros resumidos na TABELA 10.

TABELA 10 - Parâmetros analisados na caracterização do efluente secundário de UASB.

Parâmetro	Método	Instrumento utilizado	Referência
Clorofila <i>a in vivo</i>	Fluorímetro	Fluorímetro, AquaFluor®	APHA, 2012
DQO (mg L ⁻¹)	Colorimétrico	Espectrofotômetro	APHA, 2012

			DR/2000, HACH®	
Fósforo (mg L^{-1})	Colorimétrico		Espectrofotômetro DR/2000, HACH®	APHA, 2012
NTK (mg L^{-1})	Titulométrico		Destilador Kjeldahl, Quimis®	APHA, 2012
ST (mg L^{-1})	Gravimétrico		Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
SVT (mg L^{-1})	Gravimétrico		Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
Contagem bactérias heterotróficas	Contagem		Low temperature incubation 815, Precision Scientific	Cetesb norma L5.201
pH	Força eletromotriz		Medidor de pH Orion 4 Star, ThermoScientific®	-

4.9.2 ANÁLISE DAS BIOMASSAS

As biomassas foram caracterizadas físico-quimicamente, após o tratamento de coagulação e filtração, segundo os parâmetros elencados na TABELA 11. As biomassas analisadas na presente pesquisa foram de duas fontes diferentes, na primeira parte, foi utilizada biomassa referenciada de *Chlorella* sp., cultivada em FBRs com efluente secundário de UASB esterilizado e na segunda parte da pesquisa, biomassa crescida em lagoas no sistema piloto de tratamento de esgoto sanitário em Araçás sendo assim definido cultivo mixotrófico.

TABELA 11 - Parâmetros analisados na caracterização da biomassa microalgácea.

Parâmetro	Método	Instrumento utilizado	Referência
DQO (g L^{-1})	Colorimétrico	Espectrofotômetro DR/2000, HACH®	APHA, 2012
ST (g L^{-1})	Gravimétrico	Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
SVT (g L^{-1})	Gravimétrico	Estufa, Nova Ética®	APHA, 2012
Proteínas (% SVT ⁻¹)	Titulométrico	Destilador Kjeldahl Quimis®	APHA, 2012
Carboidratos (% SVT ⁻¹)	Colorimétrico	Espectrofotômetro DR/2000, HACH®	APHA, 2012
Lipídios (% SVT ⁻¹)	Gravimétrico	Soxhlet	APHA, 2012
pH	Força eletromotriz	Medidor de pH Orion 4 Star, ThermoScientific®	-

4.10 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES HIDROLÍTICAS NAS BIOMASSAS

Os testes de solubilização foram realizados em frascos Erlenmeyers de 150 mL, em triplicata, com 20 g de biomassa microalgácea por frasco, mantidos sob agitação de 150 rpm, em shaker a 30°C (PRAJAPATI et al., 2015b; PASSOS et al., 2016). Foram avaliados diferentes tempos de reação (6, 12, 24 e 48 h), e duas doses dos extratos brutos enzimáticos (10 e 20% v/v) (HOM-DIAS et al., 2016) com o propósito de otimização das condições de solubilização do material orgânico. Amostras de 3 mL foram retiradas dos frascos de acordo com os tempos reacionais estabelecidos, e submetidas à temperatura de 75°C por 15 minutos em banho Maria TBI 45/100 (Splabor, São Paulo-Brasil), para desativação das enzimas (MAHDY et al 2014). Após a desativação foram armazenadas à temperatura de 4°C até a realização da análise de DQO solubilizado (DQOs.). Os parâmetros avaliados foram analisados conforme Apha (2012) e encontram-se, assim como o princípio de cada método utilizado, citados na TABELA 12.

Para o pré-tratamento da biomassa microalgácea visando avaliar sua solubilização (hidrólise biológica) foram efetuados análise de controle negativo, ou seja, os mesmos tratamentos foram efetuados na biomassa sem adicionar extrato enzimático utilizando os mesmos tempos reacionais (6, 12, 24 e 48 h).

TABELA 12 - Parâmetros utilizados para avaliação da hidrólise enzimática das biomassas.

Parâmetro	Método	Instrumento utilizado	Referência
DQOs (%)	Colorimétrico	Espectrofotômetro DR/2000, HACH®	APHA, 2012

4.11 PROCESSOS HIDROLÍTICOS ENZIMÁTICOS

A análise de solubilidade indica maior disponibilidade do material orgânico para o processo de digestão anaeróbia, e a eficiência do processo de hidrólise (PRAJAPATI et al., 2015a). A partir do gráfico de solubilidade foi possível analisar os valores de concentração enzimáticas mais eficientes e tempo de reação que ofereceram melhor eficiência de hidrólise biológica e assim maior potencial de biodegradabilidade da biomassa microalgácea.

Foi possível avaliar a biodegradabilidade, usando como parâmetro de referência a demanda química de oxigênio, de acordo com a porcentagem de DQO

biodisponibilizada, calculada através da reação entre DQO solubilizada final filtrada (mg L^{-1}) chamada t final na Equação 6 e DQO filtrada inicial (mg L^{-1}) chamada t 0 (PRAJAPATI et al.,2015b):

$$\text{Solubilização DQO (\%)} = \frac{\text{DQOs t final} - \text{DQOs t 0}}{\text{DQOs t 0}} * 100 \quad (6)$$

Para avaliar somente a porção solúvel, a biomassa foi centrifugada por 15 min a 3500 rpm e em seguida filtrada com microfiltro em fibra de vidro GF-3 0,80 μm (Merck Millipore - São Paulo).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados, pelo menos, em triplicata. Os resultados apresentados nos gráficos são as médias de três repetições relatadas como média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise ANOVA com três fatores dos resultados obtidos para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, através do programa SPSS 17.0[©] (Inc. USA para Windows).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Ao longo dos 20 dias de incubação, foram isolados no total 21 fungos filamentosos de origem ambiental, pertencentes a diferentes gêneros (FIGURA 13).

FIGURA 13 - Fungos filamentosos (21) isolados e armazenados em tubo vertical de BDA.



Em específico: 11 pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp., 2 ao gênero *Penicillium* sp., 3 ao gênero *Trichoderma* sp., 1 ao gênero *Fusarium* sp. e 4 ao gênero *Mucor* sp.. Dos 21 fungos, 5 foram isolados a partir de amostras doadas pelo Professor João Addad e identificados a nível de gênero, como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (TABELA 13).

TABELA 13 - Elenco dos fungos isolados com seus respectivos códigos e ambientes de cultivo.

Código	Gênero/Espécie	Local de cultivo
FTC01	<i>Trichoderma</i> sp. 1	out
FAC02	<i>Aspergillus niger</i> 1	out
FMC03	<i>Mucor</i> sp. 1	out
FPL04	<i>Penicillium</i> sp. 1	out
FAL05	<i>Aspergillus niger</i> 2	out
FFP06	<i>Fusarium</i> sp.	out
FTP07	<i>Trichoderma</i> sp. 2	out
FAP08	<i>Aspergillus niger</i> 3	out
FMPe09	<i>Mucor</i> sp. 2	out

FAPe10	<i>Aspergillus niger</i> 4	out
FTPe11	<i>Trichoderma</i> sp. 3	out
FMC12	<i>Mucor</i> sp. 3	in
FAP13	<i>Aspergillus niger</i> 5	in
FMC14	<i>Mucor</i> sp. 4	in
FAPe15	<i>Aspergillus niger</i> 6	in
FAL16	<i>Aspergillus niger</i> 7	in
FAC17	<i>Aspergillus</i> sp. 1	out* ¹
FAL18	<i>Aspergillus</i> sp. 2	out* ¹
FAP19	<i>Aspergillus</i> sp. 3	out* ¹
FPPe20	<i>Penicillium</i> sp. 2	out* ¹
FAL21	<i>Aspergillus</i> sp. 4	out* ¹

out/in localização do cultivo

*¹ doação Prof. João Addad

5.2 CULTIVO DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO MÍNIMO SELETIVO

Os fungos que cresceram em meio celulásico foram 5, dos quais, 3 em ambiente externo (FTC01 *Trichoderma* sp., FAC02 *Aspergillus niger*, FMC03 *Mucor* sp.) e 2 em ambiente interno (FMC12 *Mucor* sp., FMC14 *Mucor* sp.). No meio lipásico cresceram 3 fungos, 2 em ambiente externo (FPL04 *Penicillium* sp., FAL05 *Aspergillus niger*) e 1 em ambiente interno (FAL16 *Aspergillus niger*). Os fungos que cresceram em meio mínimo acrescido de pectinase cítrica foram 4, 3 em ambiente externo (FMPe09 *Mucor* sp., FAPe10 *Aspergillus niger*, FTPe11 *Trichoderma* sp.), 1 em ambiente interno (FAPe15 *Aspergillus niger*); na última atividade enzimática estudada, a proteásica, 4 fungos foram isolados 3 em ambiente externo (FFP06 *Fusarium* sp., FTP07 *Trichoderma* sp., FAP08 *Aspergillus niger*), somente 1 em ambiente interno (FAP13 *Aspergillus niger*) (TABELA 14 e 15).

TABELA 14 - Análise qualitativa das atividades enzimáticas dos fungos isolados.



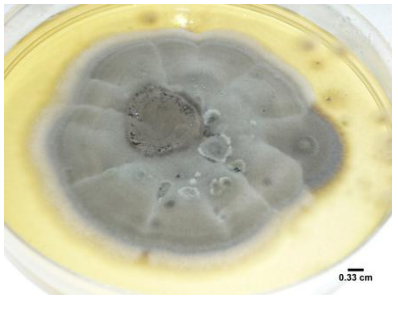
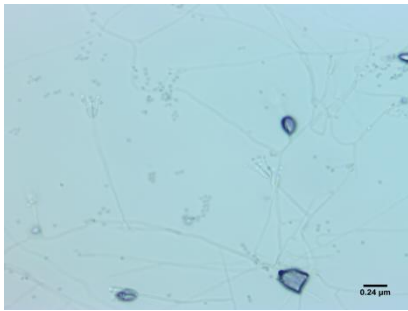

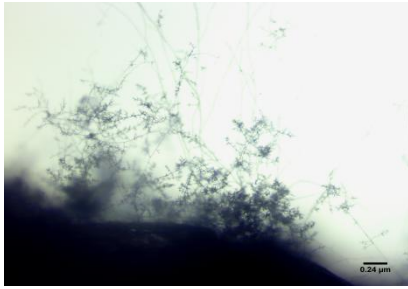
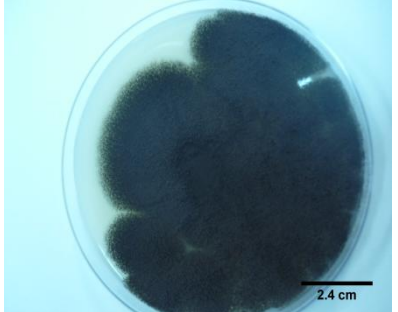
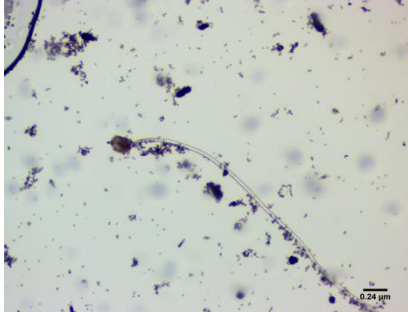
Isolado	Enzimas			
	Celulásica* ²	Lipásica* ²	Pectinásica* ²	Proteásica* ²
FTC01 <i>Trichoderma</i> sp. 1	+out			
FAC02 <i>Aspergillus niger</i> 1	+out			
FMC03 <i>Mucor</i> sp. 1	+out			
FPL04 <i>Penicillium</i> sp. 1		+out		
FAL05 <i>Aspergillus niger</i> 2		+out		
FFP06 <i>Fusarium</i> sp.				+out
FTP07 <i>Trichoderma</i> sp. 2				+out
FAP08 <i>Aspergillus niger</i> 3				+out
FMPe09 <i>Mucor</i> sp. 2			+out	
FAPe10 <i>Aspergillus niger</i> 4			+out	
FTPe11 <i>Trichoderma</i> sp. 3			+out	
FMC12 <i>Mucor</i> sp. 3	+in			
FAP13 <i>Aspergillus niger</i> 5				+in
FMC14 <i>Mucor</i> sp. 4	+in			
FAPe15 <i>Aspergillus niger</i> 6			+in	

FAL16 <i>Aspergillus niger</i> 7		+in		
FAC17 <i>Aspergillus</i> sp. 1	+* ¹			
FAL18 <i>Aspergillus</i> sp. 2		+* ¹		
FAP19 <i>Aspergillus</i> sp. 3				+* ¹
FPPe20 <i>Penicillium</i> sp. 2			+* ¹	
FAL21 <i>Aspergillus</i> sp. 4		+* ¹		

*1 Fungos doados pelo professor João Addad

*2 Meio de cultivo especificado no parágrafo 4.1.1

TABELA 15 - Imagens morfológicas e microscópicas de quatro exemplares de fungos filamentosos isolados.

Isolado	Atividade enzimática	Imagem morfológica	Imagem microscópica
FTC01 <i>Trichoderma</i> sp.	Celulásica		
FPL04 <i>Penicillium</i> sp.	Lipásica		
FTP07 <i>Trichoderma</i> sp.	Proteásica		
FAPe10 <i>Aspergillus niger</i>	Pectinásica		

Como ulterior resultado, esta pesquisa de mestrado e, conseqüentemente, todo os fungos isolados, foram cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do

Patrimônio e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). O SisGen é uma plataforma eletrônica de cadastramento de pesquisas experimentais ou teóricas que permite a conservação e divulgação do patrimônio genético brasileiro (número do cadastro AD8B312).

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA

Todos os 21 fungos foram submetidos ao processo de fermentação submersa para produção do extrato enzimático bruto (FIGURA 14). Depois da filtração e centrifugação, foi efetuada a análise de atividade enzimática. Alguns fungos como o FAL05 tiveram uma produção de micélio mais pronunciada comparando com os outros fungos filamentosos isolados, mas este aspecto não foi proporcional à atividade enzimática. Alguns apresentaram bolhas nas primeiras horas do tratamento em shaker, como o fungo FPL04 isso demonstra uma atividade emulsionante, aspecto interessante para futuras pesquisas.

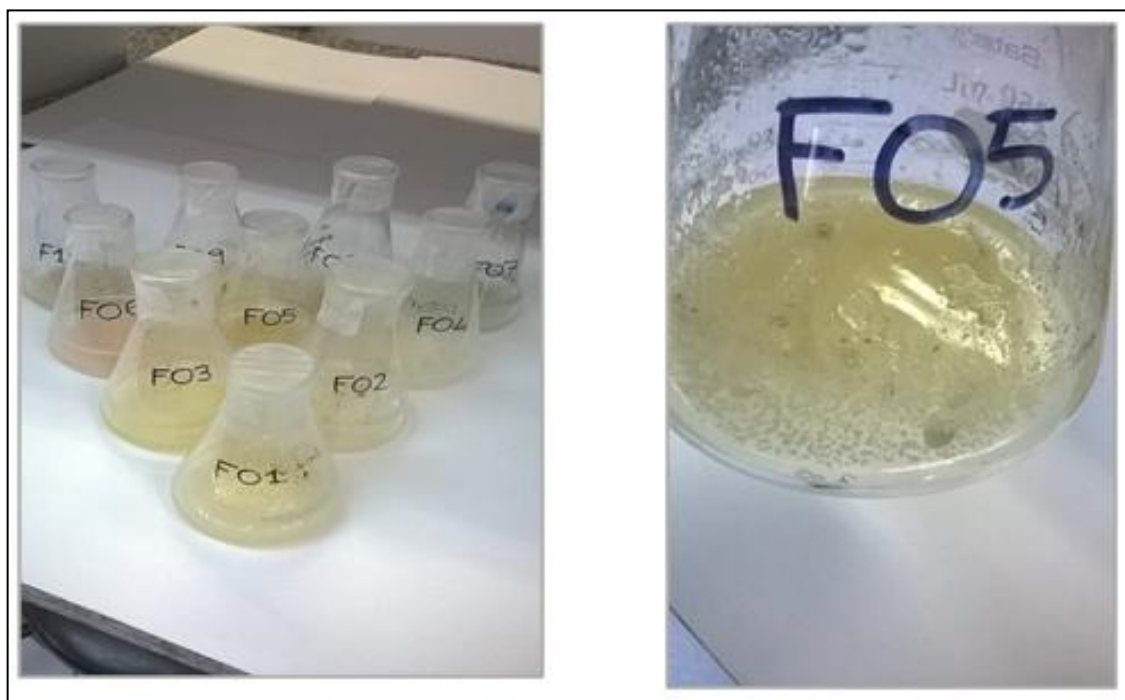


FIGURA 144 - Extratos enzimáticos brutos de 10 fungos filamentosos (A); Extrato enzimático bruto antes da filtração (B).

O fungo FTC01 *Trichoderma* sp. destacou-se na atividade celulásica com $0,108\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ proteínas, na atividade lipásica, o fungo FPL04 *Penicillium* sp. teve uma atividade específica de $0,152\text{U } \mu\text{g}^{-1}$, paralelamente para atividade pectinásica o fungo FAPe10, *Aspergillus niger*, obteve $0,534\text{U } \mu\text{g}^{-1}$, na última atividade enzimática

avaliada, a proteásica, o fungo FTP07 *Trichoderma* sp. destacou-se na atividade enzimática específica com $18,26 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$. Alguns fungos deram resultados positivos em mais de uma atividade enzimática, na TABELA 16 foram colocados em preto os valores que se destacaram e em cinza os que deram sobreposição. Como confirmado na literatura (INFORSATO et al., 2016) também houve sobreposição de atividade enzimática em específico celulásica e proteásica como no caso do FTC01 e FTP07.

De acordo com a análise ANOVA de um fator houve diferença significativa entre as atividades específicas dos fungos $p < 0,05$ $F_{(4,62)} = 2,744$. Foi necessário transformar os dados (raiz quadrada) ao fim de respeitar a normalidade e homogeneidade dos mesmos. A análise de Tukey HSD (IC=95%) ranquiou as médias das atividades enzimáticas, grupos com letras diferentes são estatisticamente significativos ($\alpha=0,05$) (TABELA 16).

TABELA 16 - Atividades específicas ranquiadas segundo o teste de Tukey e médias das atividades enzimáticas e dos conteúdos proteicos de 21 fungos filamentosos para produção de celulase, lipase, pectinase e protease.

Isolado	Atividade enzimática ($\text{U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$) ^{*1}				C.P. ^{*2}	A. E. ^{*3}
	Celulásica	Lipásica	Pectinásica	Proteásica	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\text{U } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de proteínas)
FAPe10 <i>Aspergillus niger</i>	-	-	18,85 ± 2,02	-	35,32 ± 1,88	0,783 a
FTC07 <i>Trichoderma</i> sp.	0,19±0,18	-	-	18,26 ± 1,50	32,15 ± 0,70	0,774 ab
FAP13 <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	13,09 ± 1,13	36,78 ± 2,69	0,656 bc
FAP19 <i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	10,46 ± 1,26	32,91 ± 0,84	0,586 cd
FAP08 <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	9,54 ± 1,21	35,41 ± 1,81	0,559 cd
FAPe15 <i>Aspergillus niger</i>	-	-	8,52 ± 1,30	-	34,44 ± 3,18	0,525 d
FPL04 <i>Penicillium</i> sp.	-	5,05 ± 1,36	-	0,007±0,82	33,13 ± 2,10	0,387 e
FFC06	0,11±0,69	-	-	4,56 ±	30,40 ± 0,67	0,386 e

<i>Fusarium</i> sp.				0,58		
FAL05	-	3,91 ±	-	-	35,75 ± 2,13	0,341
<i>Aspergillus niger</i>		1,18				ef
FPPe20	-	-	3,42 ± 0,93	0,015±1,96	33,18 ± 0,70	0,332
<i>Penicillium</i> sp.						efg
FTC01	3,41 ± 0,01	-	-	0,009±1,15	31,69 ± 1,16	0,328
<i>Trichoderma</i> sp.						efg
FAC17	2,23 ± 0,09	-	-	-	32,42 ± 0,59	0,265
<i>Aspergillus</i> sp.						efgh
FAL16	-	2,32 ±	-	-	35,63 ± 2,10	0,254
<i>Aspergillus niger</i>		0,39				fghi
FTPe11	0,22±0,55	-	1,97 ± 1,08	-	32,25 ± 0,61	0,243
<i>Trichoderma</i> sp.						fghi
FMPe09	-	-	1,45 ± 0,98	-	30,67 ± 1,31	0,209
<i>Mucor</i> sp.						ghij
FAC02	1,27 ± 0,14	-	-	0,002±1,25	37,04 ± 1,64	0,198
<i>Aspergillus niger</i>						hij
FAL21	-	1,18 ±	-	-	33,78 ± 1,64	0,177
<i>Aspergillus</i> sp.		0,98				hij
FMC12	0,96 ± 0,24	-	-	0,017±1,87	27,21 ± 1,77	0,173
<i>Mucor</i> sp.						hij
FMC14	0,56 ± 0,11	-	-	-	27,77 ± 2,37	0,132
<i>Mucor</i> sp.						ij
FMC03 <i>Mucor</i> sp.	0,40 ± 0,21	-	-	0,011±1,81	29,91 ± 3,17	0,108
FAL18	-	0,35±0,10	-	-	32,69±1,06	0,102
<i>Aspergillus</i> sp.						j
Celulase obtida de <i>Trichoderma reesei</i>	10,72±0,82	-	-	-	76,96±2,54	825,011
Lipase obtida de <i>Mucor mehei</i>	-	15,83	-	-	61,82±1,99	978,611
Pectinase obtida de <i>Aspergillus niger</i>	-	-	11,21±1,41	-	79,15±0,97	887,271
Protease obtida de <i>Aspergillus saitoi</i>	-	-	-	7,91±0,97	51,27±06,29	405,546

*[†] Média (n=3) ± desvio padrão, obtidos após 48h de incubação.

*² C. P.: conteúdo proteico.

*³ A. E.: atividade específica. Os valores foram transformados (raiz quadrada) ao fim de respeitar a normalidade e homogeneidade dos dados. Grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey HSD ($p > 0,05$).

(-) Valores de atividade enzimática não detectáveis através dos métodos analíticos utilizados. Em cinza os fungos que apresentaram sobreposição de atividade enzimática.

5.4 ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

Os quatro fungos que se destacaram durante as análises de atividade específica foram selecionados para a produção dos correspondentes extratos brutos enzimáticos através da fermentação em estado sólido. Estes foram: FTC01 *Trichoderma* sp. na atividade celulásica, FPL04 *Penicillium* sp. destacou-se na atividade enzimática lipásica, FAPe10 *Aspergillus niger* na atividade pectinásica, FTP07 *Trichoderma* sp. na última atividade enzimática avaliada, a proteásica.

Os valores dos extratos enzimáticos brutos (TABELA 17), depois de serem filtrados e centrifugados, foram analisados físico-quimicamente e mostraram uma elevada concentração de proteínas (76% SVT⁻¹), porém, o aporte de sólidos totais (2,26 g L⁻¹) foi muito baixo e, conseqüentemente, ignorado no aporte de nutriente.

TABELA 17 - Análise dos extratos enzimáticos dos quatro fungos selecionados para hidrolizar a biomassa.

Parâmetro	Média ± desvio padrão*
ST (mg L ⁻¹)	2,26±3,21
SFT (mg L ⁻¹)	0,75±4,76
SVT (mg L ⁻¹)	1,51±1,56
DQO (mg L ⁻¹)	2,17±5,37
Carboidratos (% SVT ⁻¹)	21,55±0,91
Lipídios (% SVT ⁻¹)	2,14±3,64
Proteínas (% SVT ⁻¹)	76,31±4,74
pH	4,31±0,65

*Média±desvio padrão (n=3) dos quatro extratos enzimáticos fúngicos.

5.5 CULTIVO E ANÁLISE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA

O crescimento da BMA (Biomassa Micro Algácea) referenciada foi efetuado em batelada em seis fotobiorreatores de 25 L cada um (FIGURA 15), o efluente de

UASB foi coletado na ETE de Araçás e esterilizados em autoclave. Os resultados das análises físico-químicas demonstraram as seguintes concentrações de nutrientes: DQO (medida indireta da concentração de matéria orgânica) $150,05 \text{ mg L}^{-1}$, nitrogênio total Kjeldahl $27,61 \text{ mg L}^{-1}$ e fósforo $4,54 \text{ mg L}^{-1}$. A contagem heterotrófica resultou negativa confirmando um bom processo de autoclavagem e consequentemente a ausência de possíveis contaminações do cultivo. Os outros valores se encontram na (TABELA 18).

TABELA 18 - Análises do efluente de UASB esterilizado.

Parâmetro	Média \pm desvio padrão*
Clorofila <i>a in vivo</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$2,03 \pm 1,36$
DQO (mg L^{-1})	$150,05 \pm 4,68$
Fósforo (mg L^{-1})	$4,54 \pm 1,12$
NTK (mg L^{-1})	$27,61 \pm 4,07$
ST (mg L^{-1})	$763,15 \pm 7,74$
SFT (mg L^{-1})	$460,21 \pm 5,36$
SVT (mg L^{-1})	$302,94 \pm 6,81$
Contagem bactérias heterotróficas	0
pH	$8,78 \pm 0,33$

*Média \pm desvio padrão (n=3).

A biomassa foi monitorada durante 60 dias de crescimento, a luminosidade média e a temperatura no período de cultivo (Setembro-Outubro 2018) foram respectivamente de 50.000 lux e 28°C , às 11:00 da manhã (FIGURA 15).



FIGURA 15 - Crescimento da biomassa microalgácea referenciada.

O parâmetro sólidos voláteis revelou a concentração máxima de $1,65 \text{ g L}^{-1}$ no final da fase lag, início da fase plateau. A concentração da clorofila-a seguiu o mesmo andamento dos sólidos voláteis (FIGURA 16).

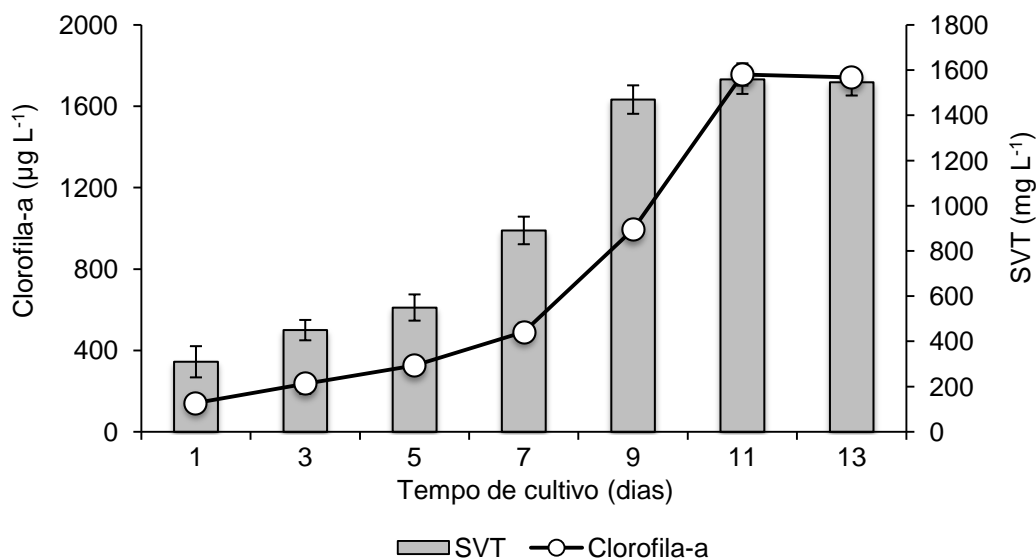


FIGURA 16 - Monitoramento dos parâmetros SVT e Clorofila-a durante o crescimento da BMA referenciada em FBRs.

A observação microscópica revelou, ao longo do crescimento, uma concentração predominante de *Chlorella* sp., mas no final do cultivo foi confirmada a presença de *Scenedesmus* sp., provavelmente devido à contaminação externa contudo, não ultrapassando 35% da concentração de microalgas totais. Através da análise CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), norma L5.201, foi verificada a presença de bactérias heterotróficas, devido também à contaminação externa. A concentração máxima detectada foi de 10^4 (TABELA 19).

TABELA 19 - Análises físico-químicas executadas para monitorar o crescimento da biomassa microalgácea referenciada.

Parâmetro avaliado	Média ± Desvio padrão*
Clorofila a <i>in vivo</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	568,97±2,07
Contagem microalgas	657±27
<i>Chlorella</i> sp.- <i>Scenedesmus</i> sp. (%)	80% - 20%
Contagem bactérias heterotróficas	10^2
ST (g L^{-1})	1,51±6,95
SFT (g L^{-1})	0,45±5,56

SVT (g L ⁻¹)	1,06±6,31
pH	10,11±0,41

*Média±desvio padrão (n=3).

Paralelamente a biomassa foi analisada para avaliar as concentrações de nutrientes (TABELA 20). As análises revelaram que 72% dos SVT são compostos por proteínas, 25% carboidratos e 3% lipídios. O pH da biomassa, após floculação resultou em 8,18, e, a relação entre SVT/ST alcançou 75%. Resultados publicados por Mahdy et al. (2014), se demonstraram próximos com 63% da biomassa representada por proteínas, 19% por carboidratos, porém 18% de lipídeos, a biomassa cultivada pelo pesquisador era também *Chlorella* sp. mas utilizando meio sintético (TABELA 19).

TABELA 20 - Análise físico-química da biomassa referenciada depois do processo de floculação-filtração.

Parâmetro	Média±Desvio padrão*
DQO (g L ⁻¹)	30,86±2,01
ST (g L ⁻¹)	5,09±2,36
SVT (g L ⁻¹)	3,82±3,12
SVT/ST (%)	75,05
Proteínas (% SVT ⁻¹)	72,09±2,13
Carboidratos (% SVT ⁻¹)	25,01±1,98
Lipídios (% SVT ⁻¹)	2,90±1,19
pH	8,18±0,58

*Média±desvio padrão (n=3).

5.6 ANÁLISE DA BIOMASSA CONSORCIADA

A biomassa do sistema piloto de Araçás foi coletada e analisada, a relação entre SVT/ST resultou em 65%, estudos publicados por Hom-Dias (2016) tiveram resultado parecido, crescendo biomassa consorciada em *raceway*, 63%. As concentrações de proteínas, carboidratos e lipídeos foram, respectivamente, 67%, 22% e, 11% (TABELA 21). A pesquisadora Passos e colaboradores (2016) também

cultivou microalga consorciada em *raceway* utilizando efluente secundário como meio de cultivo e obteve concentrações de proteínas de 58%, carboidratos 22 e lipídeos 20%.

TABELA 21 - Análise físico-química da biomassa consorciada depois do processo de floculação-filtração.

Parâmetro	Média±Desvio padrão
DQO (g L ⁻¹)	39,65±3,09
ST (g L ⁻¹)	69,17±2,15
SVT (g L ⁻¹)	44,81±1,74
SVT/ST (%)	64,78
Proteínas (% SVT ⁻¹)	67,02±3,05
Carboidratos (% SVT ⁻¹)	22,12±1,17
Lipídios (% SVT ⁻¹)	10,86±2,07
pH	7,80±0,55

*Média±desvio padrão (n=3).

5.7 HIDRÓLISE DA BIOMASSA MICROALGÁCEA REFERENCIADA

5.7.1 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 10%

Durante a análise química da biomassa microalgácea referenciada, foram encontrados 30,86g L⁻¹ de DQO, 72% de SVT compostos por proteínas (72%), 25% por carboidratos e 3% de lipídios. Como antecipado na revisão bibliográfica a parede celular das microalgas, em específico a *Chlorella* sp. é composta por até 70% de celulose. Por isso, a hidrólise enzimática tem grande possibilidade de quebrar a resistente parede celular e liberar o conteúdo que pode ser aproveitado durante a digestão anaeróbia para a produção de biogás. Na análise de DQO o fungo *Trichoderma* sp. (FTP07) com atividade proteásica teve a maior porcentagem de solubilização 44,5% com tempo de hidrólise de 24 h e concentração de extrato enzimático de 10% (FIGURA 17). Paralelamente a atividade celulásica do fungo *Trichoderma* sp. (FTC01) alcançou 33,5% de DQO solubilizada em 48 h.

Os resultados apresentados por Mahdy e colaboradores (2014) evidenciaram que a hidrólise de biomassa referenciada de *Chlorella vulgaris*

utilizando enzimas comerciais, carbohidroláse e protease, apresentaram resultados de DQO solubilizado de 86%; paralelamente os pesquisadores avaliaram também a produção metanogênica da biomassa hidrolisada que resultou em uma maior produtividade de 75%.

Analisados os resultados das outras atividades enzimáticas avaliadas, lipásica e pectinásica, foram obtidos resultados inferiores de solubilização, é possível que estas atividades enzimáticas necessitem de mais tempo ou precisem atuar em conjunto com outra atividade enzimática, como a proteásica e celulásica, para alcançar melhores valores de hidrólise, Passos et al. (2016), confirmou que misturas enzimáticas com pectinase funcionam melhor que a singula atividade enzimática.

Avaliando somente o tempo de hidrólise, pode-se concluir que os resultados obtidos em 24 h de hidrólise já alcançaram a fase plateau do processo, no caso da atividade proteásica e celulásica, porque nas 12 h não teve um aumento significativo dos resultados (1,25%).

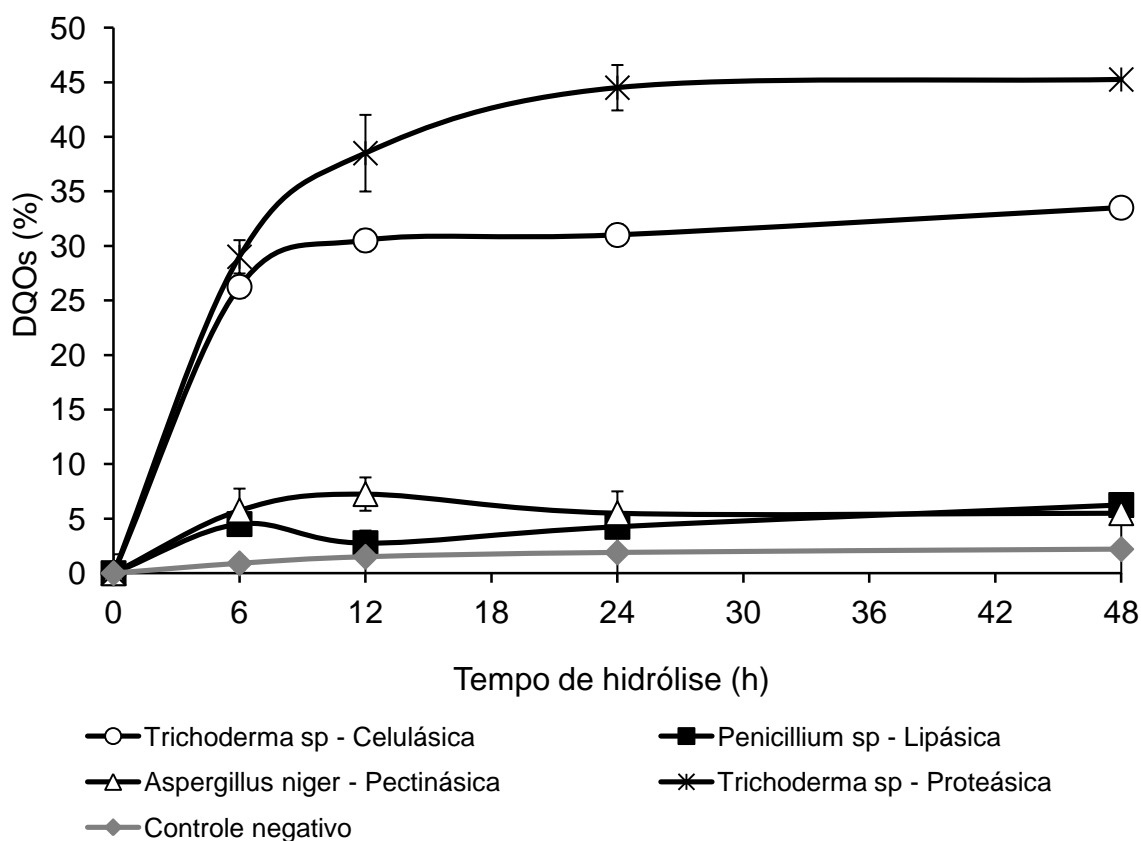


FIGURA 17 - DQO solubilizadas durante o tratamento de hidrólise de biomassa microalgácea referenciada utilizando extrato bruto enzimático com concentração 10%.

Para cada extrato enzimático foi calculado o incremento de solubilização ao longo do tempo de hidrólise (FIGURA 18). No caso do fungo *Trichoderma* sp. com atividade proteásica e 10% de extrato enzimático, é possível notar uma diminuição da ação enzimática ao longo das 48 h por isso é plausível concluir que o tempo ideal de hidrólise é 12 h. Em contrapartida, no tratamento utilizando o fungo *Penicillium* sp. com atividade lipásica 10% de extrato, os valores de solubilização aumentam ao longo das 48 h, por causa disso, em caso de biomassas ricas de lipídios são necessários tempo de hidrólise maiores.

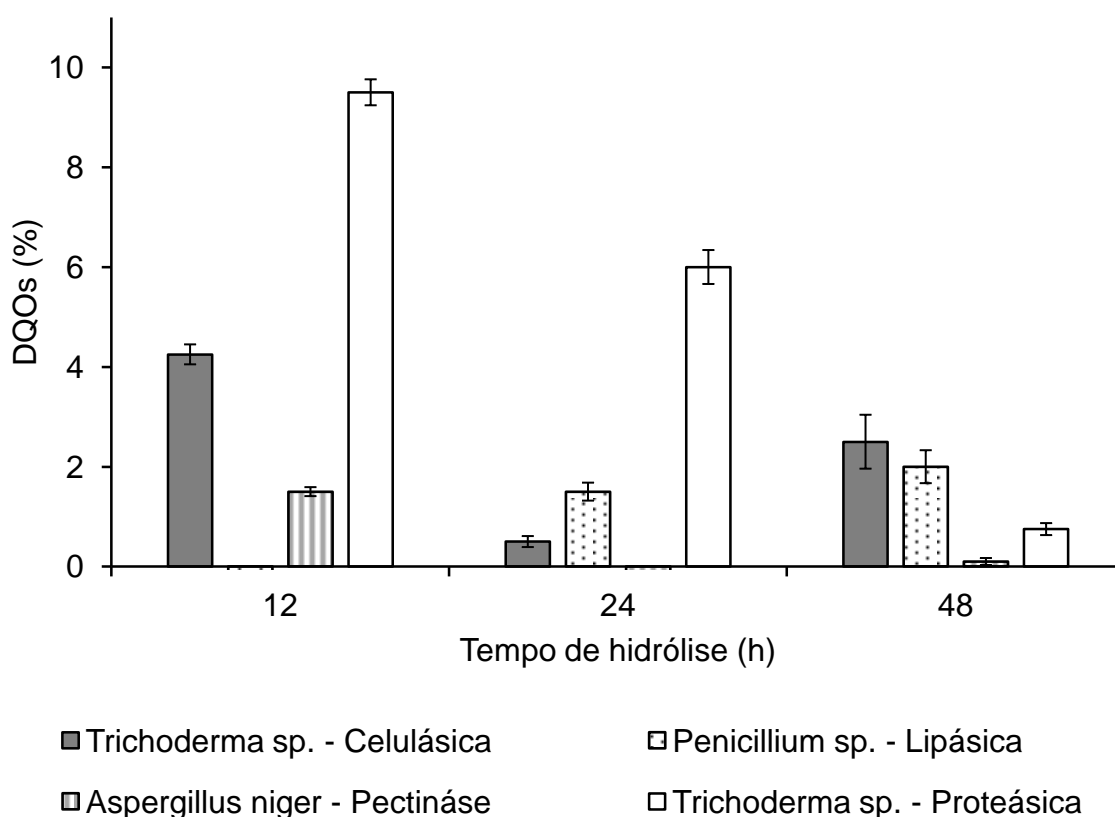


FIGURA 18 - Incremento de solubilização ao longo do tempo de hidrólise utilizando biomassa referenciada com extrato enzimático 10%.

5.7.2 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 20%

A hidrólise foi testada utilizando também 20% v/v de extrato bruto enzimático, os resultados de DQO solubilizada são proporcionais aos resultados usando 10%. A atividade enzimática proteásica do fungo FTP07 (*Trichoderma* sp.) alcançou 85,33% no tempo de hidrólise 48 h, paralelamente o fungo *Trichoderma* sp. FTC01 com atividade celulásica 47% com 24 h de hidrólise (FIGURA 19).

Como já evidenciado nos resultados utilizando 10% de extrato enzimático a atividade lipásica e pectinásica não forneceram resultados de hidrólise elevados tanto quanto as atividades proteásica e celulásica.

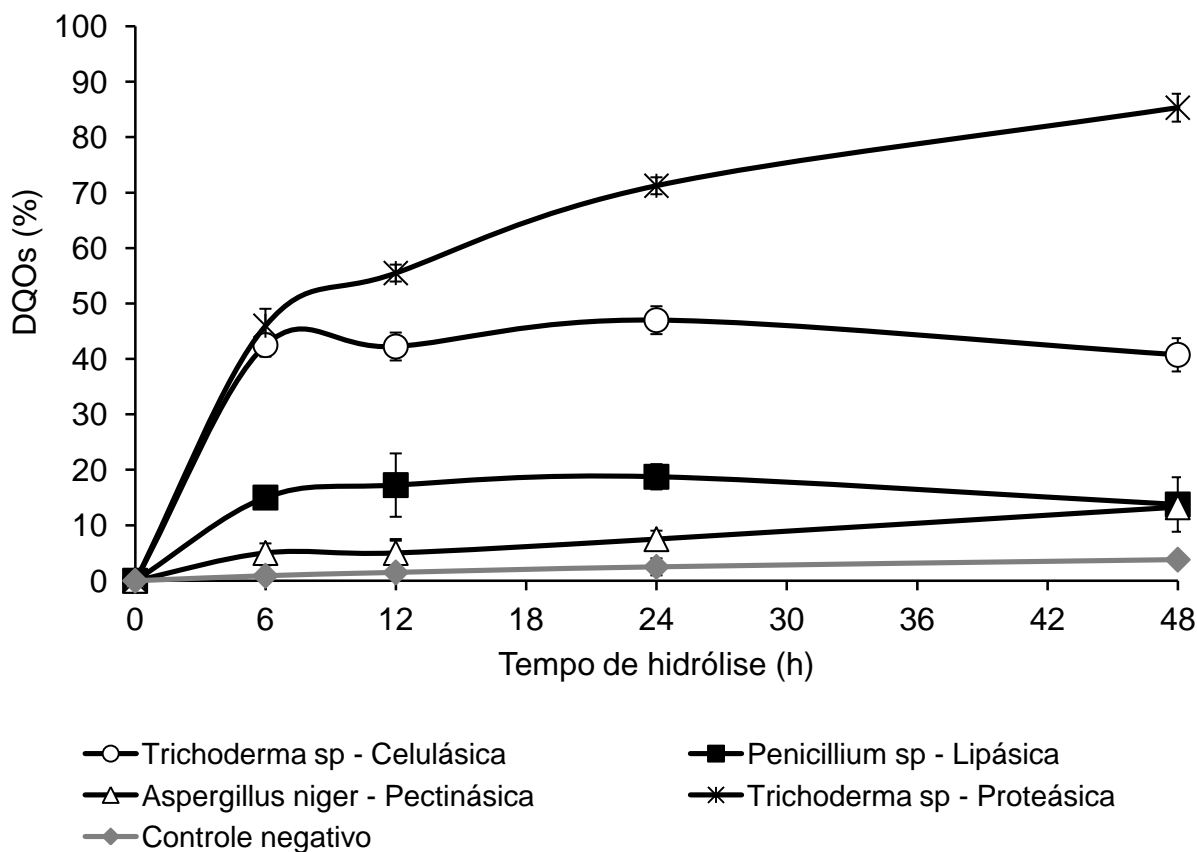


FIGURA 19 - DQO solubilizadas durante o tratamento de hidrólise de biomassa microalgácea referenciada utilizando extrato bruto enzimático com concentração 20%.

O incremento de solubilização foi calculado também nos tratamentos utilizado 20% de extratos enzimáticos (FIGURA 20). Assim sendo, a hidrólise com o fungo proteásico *Trichoderma* sp. teve um incremento até as 24 h de tratamento, desta forma é possível estabelecer que este tempo é o mais performante. O fungo *Aspergillus niger* com atividade pectinásica demonstrou um incremento de solubilização durante todo o tempo de hidrólise estudado, como demonstrado por Passos e colaboradores (2016) a enzima pectinase precisa de mais tempo para obter resultados de solubilização comparáveis com as enzimas celulásica ou proteásica.

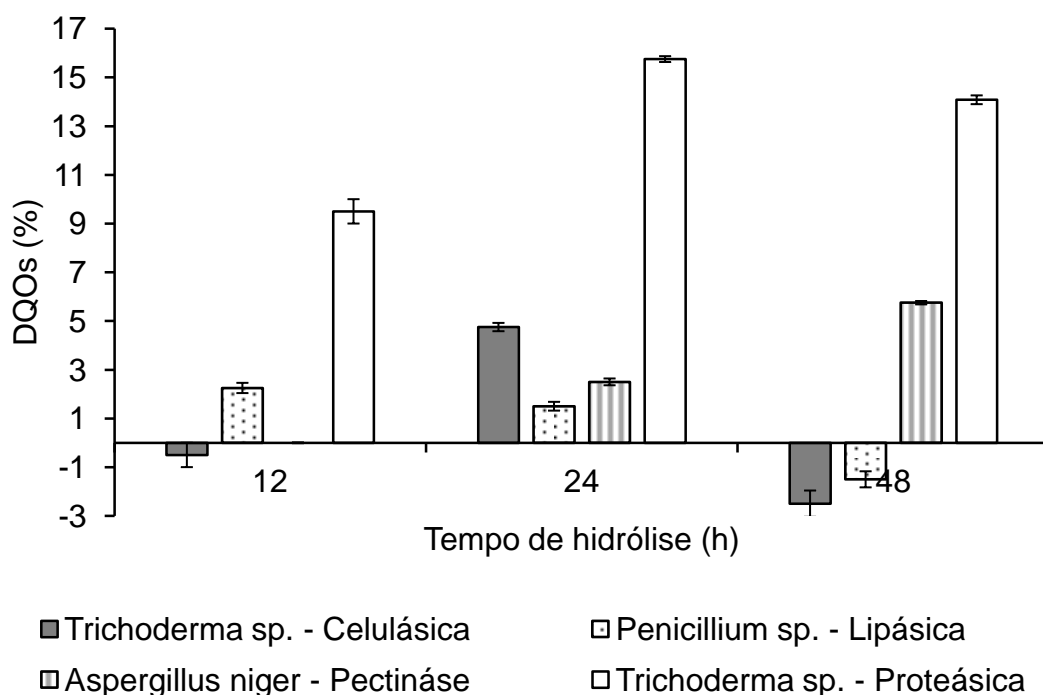


FIGURA 20 - Incremento de solubilização ao longo do tempo de hidrólise utilizando biomassa referenciada com extrato enzimático 20%.

Os resultados de hidrólise de biomassa referenciada foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS 17.0[®]; o teste de Levene verificou a homogeneidade dos valores resultando, $p > 0,191$ para DQOs (10 e 20%) (TABELA 22). As três variáveis independentes, fungo, tempo de hidrólise e concentração de extrato enzimático, foram testadas estatisticamente através de uma análise ANOVA com três fatores. Cada variável foi testada singularmente e em combinação, em todos os casos resultaram significativas com $p < 0,05$, no caso da interação entre as três variáveis (Fungo*Concentração de extrato*Tempo de hidrólise), do parâmetro DQO solubilizada, os resultados foram significativos ($p < 0,01$), $F_{(9,64)} = 7,60$.

Analisando os valores de Eta quadrado parcial das variáveis independentes, fornecidos através da análise ANOVA de três fatores, o fator que influenciou mais os resultados de hidrólise, do parâmetro DQOs, foi a variável fungo com 99%, em seguida a concentração do extrato enzimático com 92,6% e por último o tempo de hidrólise com 79,4%. O tratamento estatístico demonstrou que os resultados obtidos são significativos estatisticamente e que a variável que afeta a hidrólise é o tipo de atividade enzimática utilizada para quebrar a parede celular e que na verdade a variável tempo, principal ponto negativo da hidrólise biológica, não é tanto determinante quanto a concentração do extrato enzimático.

TABELA 22 - Análise estatística da variável dependente DQOs durante a hidrólise de biomassa microalgácea referenciada.

Fatores	MQ	GL	F	p	Eta quadrado parcial
Fungo	10676,556	3	2017,617	0,000	0,990
Tempo de hidrólise	436,028	3	82,399	0,000	0,794
Concentração extrato enzimático	4213,500	1	796,252	0,000	0,926
Fungo*Tempo de hidrólise*Concentração extrato enzimático	40,213	9	7,599	0,000	0,517
Erro	5,292	64	-	-	-

5.8 HIDRÓLISE DA BIOMASSA CONSORCIADA

5.8.1 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 10%

A biomassa consorciada é representada por uma variedade populacional de organismos, e paralelamente, uma oscilação na carga de nutrientes do meio de cultivo (efluente de UASB); isso se reflete na composição química que apresentou concentrações menores de proteínas e carboidratos, respectivamente 67% e 22%, mas conteúdo maior de lipídios (11%) comparando com a biomassa microalgácea referenciada. Este fato deveria ser interpretado como um desafio na hidrólise enzimática, pois quanto mais variado é o substrato, maior é a dificuldade de hidrolisar com somente uma atividade enzimática por processo. Nos dados de DQOs que foram gerados durante o processo de hidrólise, predominou a atividade proteásica através do fungo FTP07 (*Trichoderma* sp.) com 35,25% de matéria orgânica solubilizada em 48 h utilizando 10% do extrato enzimático (FIGURA 21). O fungo *Trichoderma* sp. (FTC01) com atividade celulásica seguiu o mesmo andamento alcançando um valor máximo de 20,50% na hidrólise com duração de 48 h.

A atividade lipásica teve resultados mais elevados, comparando com os resultados de hidrólise da biomassa referenciada, provavelmente devido também à tipologia de lipídeos mais 'acessíveis' com cadeia mais curtas pré-digeridos da

multiplicidade de organismos que constituíam a biomassa consorciada, o valor máximo foi 13,75% no tempo 48 h. A atividade pectinásica porém, resultou em uma baixa solubilização de matéria orgânica como aconteceu também na biomassa referenciada.

Um detalhe que corrobora os resultados de hidrólise utilizando extrato enzimático 10%, é que os valores máximos relevados, foram todos no tempo de hidrólise 48 h, com um aumento médio de 7% comparado com o tempo anterior (24 h), sendo assim possível concluir que no caso da biomassa consorciada, poderiam ser alcançados resultados mais elevados aumentando o tempo de hidrólise.

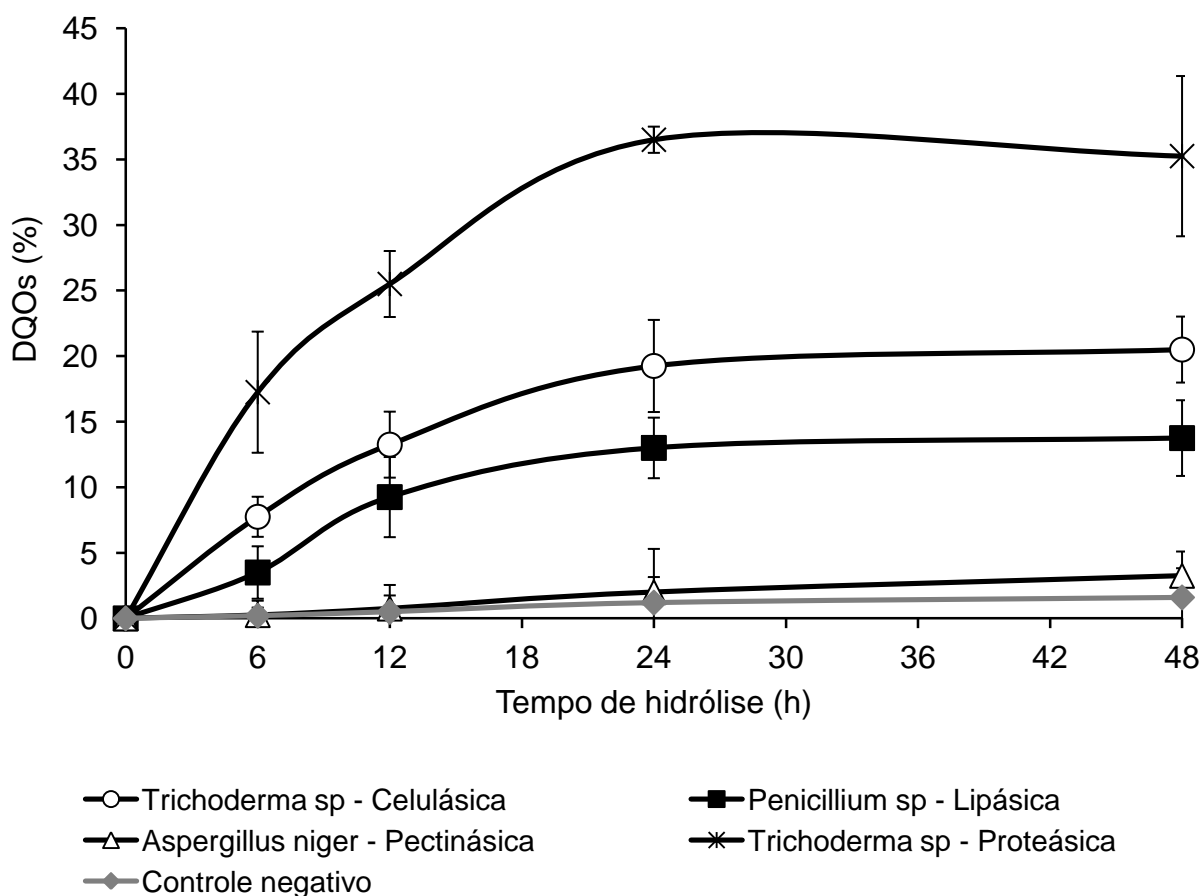


FIGURA 21 - DQO solubilizadas durante o tratamento de hidrólise de biomassa consorciada utilizando extrato bruto enzimático com concentração 10%.

Foi calculado o incremento de solubilização para cada tratamento enzimático e tempo de hidrólise utilizando extrato enzimático 10% com substrato a biomassa consorciada. A atividade proteásica gerada pelo fungo *Trichoderma* sp. cresceu até as 24 h depois ouve uma diminuição. Na hidrólise proporcionada pelo fungo

celulásico *Trichoderma* sp. ouve o mesmo comportamento, entre 12 e 24 h o incremento foi constante (FIGURA 22).

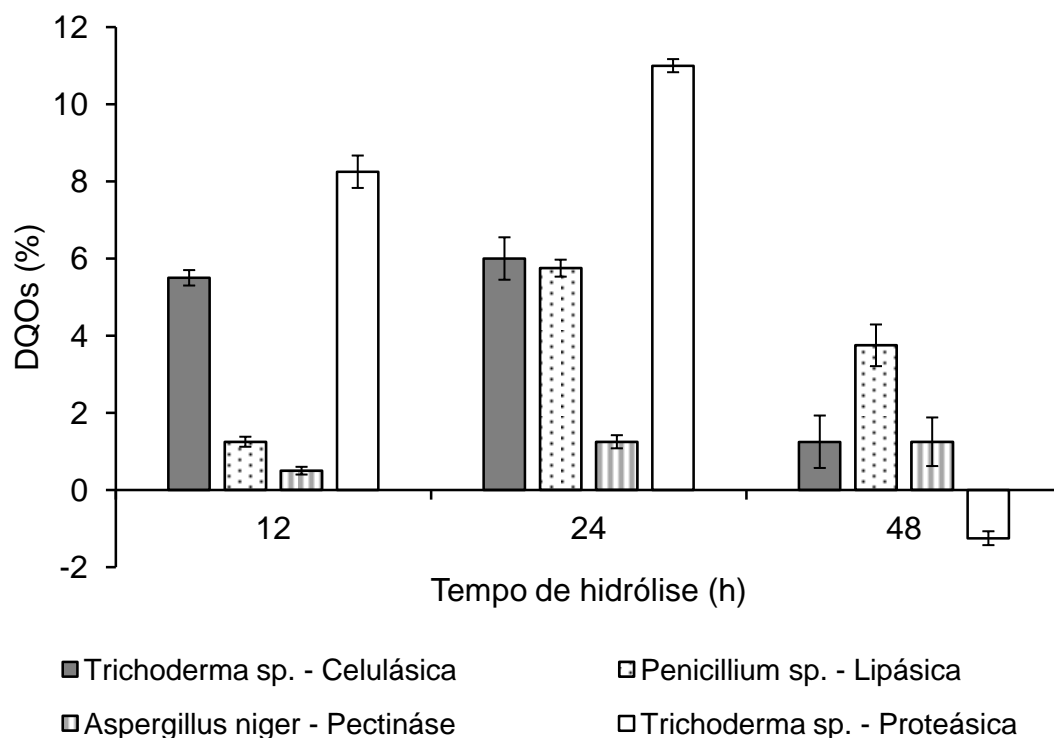


FIGURA 22 - Incremento de solubilização ao longo do tempo de hidrólise utilizando biomassa referenciada com extrato enzimático 10%.

5.8.2 HIDRÓLISE COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS 20%

Segundos estudos publicados por Prajapati e colaboradores (2015b), 46% de DQO foi solubilizado utilizando o extrato enzimático bruto do fungo *Aspergillus lentulus* (atividade celulásica) na concentração de 20% e tempo de hidrólise de 48 h. Na presente pesquisa, utilizando a mesma concentração de extrato bruto foram alcançados valores de DQOs de 54,33% no mesmo tempo de ação enzimática utilizando o fungo proteásico *Trichoderma* sp.. Cerca da metade da DQOs (29,5%) foi solubilizada utilizando o fungo FTC01 com atividade celulásica no tempo 24 h (FIGURA 23). Os valores de matéria orgânica solubilizada pela ação do fungo *Penicillium* sp., que possui atividade lipásica, foram parecidos com a atividade celulásica considerando a margem de desvio padrão. A atividade pectinásica teve um andamento diferente dos outros resultados obtidos utilizando o fungo *Aspergillus niger* (FAPe04), porque cresceu durante todo o tempo de hidrólise chegando a valor máximo de 10,5% no tempo 48 h.

Resultados apresentados por Passos e colaboradores (2016) utilizando como substrato de hidrólise biomassa consorciada e, enzimas comerciais com concentração de 1%, alcançaram valores máximos de solubilização de matéria orgânica no tempo de hidrólise 12 h com a enzima celulase, de cerca 480 mg L^{-1} de SV a 690 mg L^{-1} , este valores superaram os resultados obtidos utilizando mix enzimáticos compostos por celulase, glucohidrolase e xilanase.

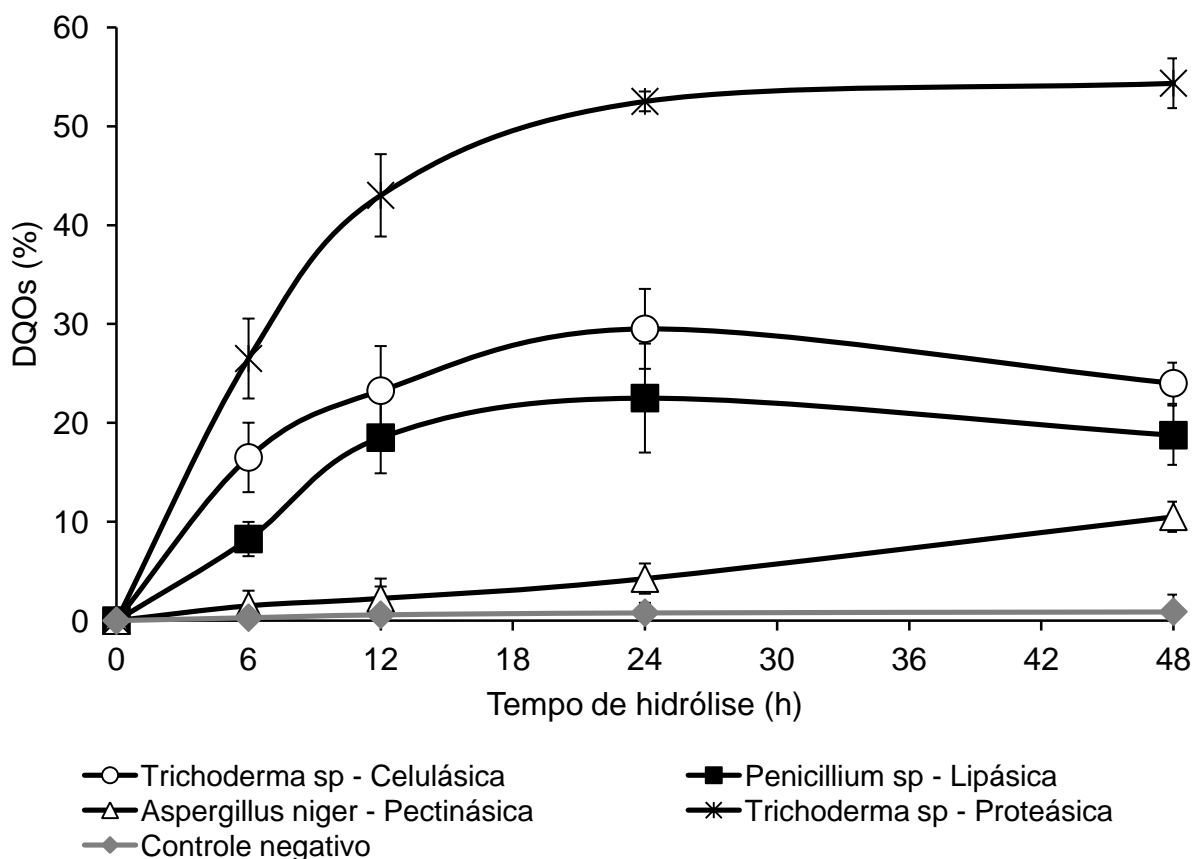


FIGURA 23 - DQO solubilizadas durante o tratamento de hidrólise de biomassa consorciada utilizando extrato bruto enzimático com concentração 20%.

Na biomassa consorciada, o incremento de solubilização utilizando 20% de extrato enzimático do fungo *Trichoderma* sp. (celulásico) e o fungo *Penicillium* sp. (lipásico) demonstraram o mesmo andamento ao longo do tempo de hidrólise, ou seja, foi constante no tempo 12 e 24 h mas depois decresceu no 48 h. Em contrapartida, o fungo proteásico (*Trichoderma* sp.) teve um incremento nas primeiras 12 h e depois um decréscimo de 50% nas 12 h seguintes (FIGURA 24).

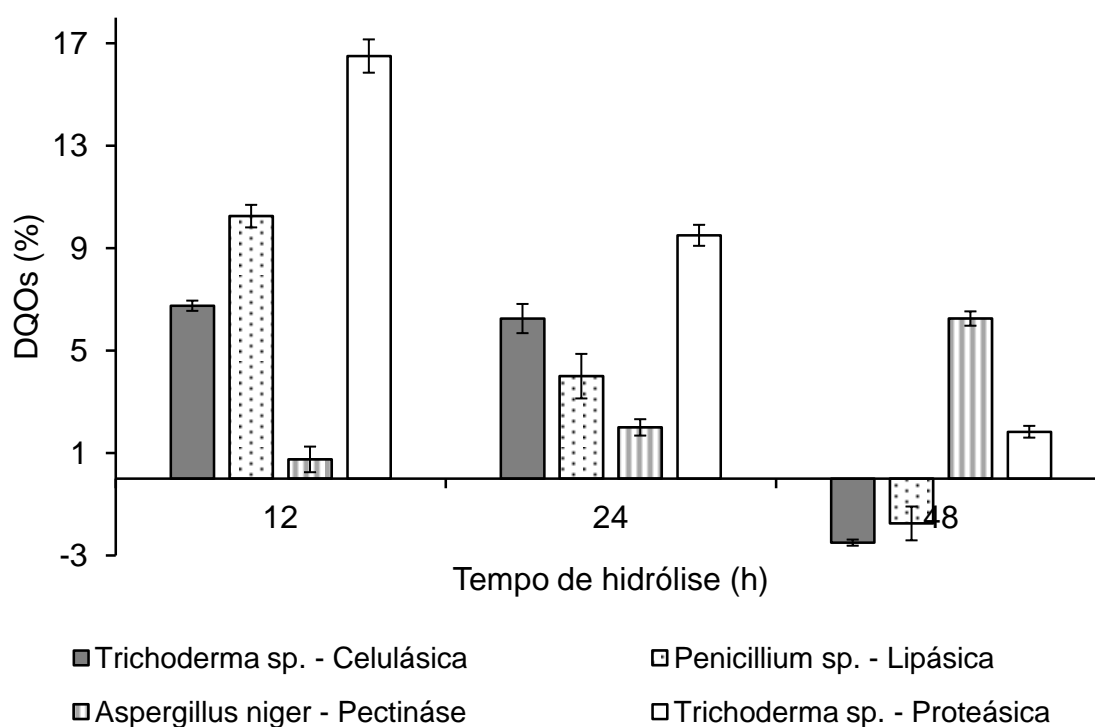


FIGURA 24 - Incremento de solubilização ao longo do tempo de hidrólise utilizando biomassa referenciada com extrato enzimático 20%.

Como na biomassa microalgácea referenciada, também para a biomassa consorciada, foi elaborada uma análise estatística utilizando o programa SPSS 17.0[®]; os dados foram primeiramente analisados através do teste de Levene que verifica a homogeneidade dos mesmos, os dados resultaram homogêneos ($p > 0,64$).

A análise estatística comparou as variáveis independentes singularmente e as interações: fungo, concentração do extrato enzimático e tempo de hidrólise. Para o parâmetro DQOs, os resultados foram todos significativos, com $p < 0,01$ sendo que a única análise que não foi significativa foi a interação entre variáveis (Fungo*Concentração do extrato enzimático*Tempo de hidrólise), que resultou $p > 0,552$ $F_{(9,64)} = 0,875$ (TABELA 23). Isso significa que analisando as variáveis independentemente ou as interações entre somente duas variáveis, foram obtidos resultados significativos mas analisando a interação entre três variáveis não confirmou o mesmo resultado. Ou seja, no caso da biomassa consorciada seria mais adequado analisar somente duas variáveis por experimento, diferentemente da biomassa referenciada, que sendo mais 'padronizada', consente a avaliação de três variáveis contemporaneamente.

Examinando os resultados de Eta quadrado parcial da variável dependente DQOs, a interação dos resultados foi correlacionada 95,8% com a escolha do fungo (ou seja o tipo de ação enzimática), 86,8% com o tempo de hidrólise, e 73,2% com a concentração do extrato enzimático. Estes dados comprovam que, como aconteceu na biomassa microagácea referenciada, também na consorciada e fundamental a escolha da atividade enzimática, mas, diferentemente da biomassa de *Chlorella* sp., em segundo lugar é importante estudar e testar tempos diferentes de hidrólise, que como foi comprovado nos gráficos, aumentando-os poderíamos alcançar porcentagem de solubilização de biomassa maiores.

TABELA 23 - Análise estatística da variável dependente DQOs durante a hidrólise da biomassa consorciada.

Fatores	MQ	GL	F	p	Eta quadrado parcial
Fungo	4301,514	3	484,678	0,000	0,958
Tempo de hidrólise	1241,125	3	139,845	0,000	0,868
Concentração extrato enzimático	1552,042	1	174,878	0,000	0,732
Fungo*Tempo de hidrólise*Concentração extrato enzimático	7,764	9	0,875	0,552	0,110
Erro	8,875	64	-	-	-

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a hidrólise biológica, utilizando extratos enzimáticos fúngicos, de biomassa microalgácea referenciada ou consorciada, é uma técnica promissora. Quatro fungos foram selecionados, entre os 21 isolados, para produção dos extratos brutos enzimáticos em fermentação sólida. Cada fungo tinha atividade enzimática específica: celulásica, lipásica, pectinásica ou proteásica. Pode-se constatar que a biomassa referenciada de *Chlorella* sp. foi hidrolisada com mais facilidade comparando com a biomassa consorciada de efluente de tratamento anaeróbio, em média 66% a mais avaliando o parâmetro DQOs. O *Trichoderma* sp. foi, entre os quatro fungos filamentosos estudados, o que desempenhou maior atividade de solubilização de biomassa seja referenciada ou consorciada. Através da análise estatística observou-se que para ambas as biomassas é crucial a escolha da atividade enzimática específica para alcançar resultados de solubilização mais satisfatórios. Porém diferentemente da biomassa consorciada, na biomassa de *Chlorella* sp., a concentração do extrato enzimático é a segunda variável mais importante, sendo assim, o tempo de hidrólise o menos influente na solubilização entre os três. Na biomassa consorciada, que se demonstrou uma matriz mais complexa, o tempo de hidrólise apresentou um Eta quadrático parcial de 86,7% contra somente 73,2% da variável concentração enzimática para o parâmetro DQOs.

Na maioria das publicações sobre hidrólise biológica, são utilizadas enzimas comerciais avaliando somente uma ou no máximo duas atividades enzimáticas e usando como substrato biomassa cultivada em meio sintético. Diferentemente, nesta pesquisa, foram utilizadas enzimas extraídas de fungos filamentosos, comparando quatro atividades enzimáticas em duas biomassas, referenciada e consorciada. Os resultados demonstraram como os substratos são diferentes e complexos e que precisam de atividades enzimáticas específicas, possivelmente utilizadas em combinação. Futuras pesquisas poderiam completar o estudo, avaliando o desempenho das duas biomassas em reatores anaeróbios para produção de biogás e tentar combinar atividade enzimática com a proteásica e celulásica no mesmo processo de hidrólise para potencializar o resultado. Seria interessante também, em estudos futuros, calcular o balanço energético e econômico do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P.; KILLIAS, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 97, p.107-115, 1962.
- ALVES, J. W. S. **Diagnóstico técnico institucional da recuperação e uso energético do biogás gerado pela digestão anaeróbica de resíduos**. 2000. 165 f. Dissertação (Mestrado em Energia)- Universidade de São Paulo - PIPGE/USP, São Paulo, 2000.
- Resolução ANA n. 601**, de 25 DE maio de 2015. Documento nº 00000.029617/2015-00. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/sala-de-situacao/sao-francisco/colecao-documentos.htm>> Acesso em: out. 2018.
- Agência Nacional de Energia Elétrica – ANEEL (2009). **Banco de Informações de Geração**. Disponível em: <www.aneel.org.br>. Acesso em: 15 Ago 2018.
- ABO-SHADY, A. M.; MOHAMED, Y. A.; LASHEEN, T. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. **Biol Plant**, v. 35, p. 629-632, 1993.
- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61-66, 2012.
- ALMEIDA, M. C. O. **Indução de celulases e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variable* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos**. 2012. 145f . Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2012.
- ALZATE, M. E.; MUNOZ, E.; ROGALLA, F.; FERNANDEZ-POLANCO, F.; PEREZ-ELVIRA, S. I. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. **Bioresource technology**, n. 123, p.488-494, 2012.
- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Appl Energy**, n.88, p. 3402-3410, 2011.
- ANDRADE, V.S.; SARUBBO, L.A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glicose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 106-110, 2002.
- ANGELIDAKI I.; BASTONE, D. .J. Anaerobic digestion: process. 2 In Christensen T., editor. **Solid waste technology management** 1. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; p 538-600, 2010.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21sted. Washington, DC, New York: American Public Health Association; 2005
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.
- ASLAN, S; KAPDAN, I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v.28, p. 64-70, 2006.

- BAHADAR, A.; KHAN, M.B. Progress in energy from microalgae: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 27, p. 128-148, 2013.
- BENEMANN, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. **Energies**, v.6, p. 5869-5886, 2013.
- BOHUTSKYI, P.; BOUWER, E. **Biogas production from algae and cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs**. In: Lee WJ, editor. Adv. biofuel bioproducts. New York, NY: Springer New York; p. 873-975, 2013.
- BORDES, F.; TRANIER, S.; MOUREY, L.; MARTHY, A. Crystal structure of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* at 1.7 Å resolution. **Biophys**, v. 99, p. 2225-2234, 2010.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BMM 5777**: Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia. (s.d.). Obtido em 29 de Maio de 2014, de <http://www.ufrgs.br/>
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal Applied Microbiological**, v. 93, p. 1020-1025, 2002.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Mclean, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHERNICHARO, C. A. de L. **Reatores Anaeróbios. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Volume 5. 2ª edição. Belo Horizonte. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CHO, S.; LUON, T.T.; LEE, D.; OH, Y.K.; LEE, T. Reuse of effluent water from municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v.102, p. 8639-8645, 2011.
- CIUDAD, G.; RUBILAR, O.; AZÓCAR, L.; TORO, C.; CEA, M.; TORRES, A.; RIBERA, A.; NAVIA, R. Performance of an enzymatic extract in *Botryococcus braunii* cell wall disruption. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, p. 75-80, 2014.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais). **Relatório de sustentabilidade**. Belo Horizonte, 2012.

CORAL, G.; ARIKAN, B.; UNALDI, M. N.; GUVENMEZ, H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. **Analysis of Microbiological**. v. 4, p. 491- 498, 2003.

CORDOVA, O.; SANTIS, J.; RUIZ-FILLIPI, G.; ZUNIGA, M. E.; FERMOSE, F. G.; CHAMY, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 82, p. 2806-2813, 2018.

De GREGORIO, A.; MANDALANI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; Lo CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

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

ECOSAN. **Como criar um sistema de saneamento ecológico**. abr. 2017. Disponível em: <ecosan.ga>. Acesso em: 14 dez. 2018.

EHIMEN, E. A.; HOLM-NIELSEN, J. B.; POULSEN, M. BOELSMAND, J. E. Influence of different pretreatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae. **Renewable Energy**, n. 50, p. 476-480, 2012.

ESPÓSITO, T. S. **Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE, Recife, 2006.

ETCHECOIN, C. **Protocolo de Kyoto: Passaporte das Futuras Gerações**. In: Cenbio Notícias, v. 3 n. 8, p. 4, 2000.

FALCONE, C. O. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento**. 2009. 71 f. (Monografia Graduação em Engenharia Ambiental)-Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito, UFES, Vitória, 2009.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos. Princípios e prática**. 2 ed. Ed Artmed, 2006.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, 2007.

FRY, S. M.; HUANG, J. S.; MILHOLLAND, R. D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Biochemistry and cell biology**, v. 84, p. 357-363, 1994.

GERKEN, H. G.; DONOHOE, B.; KNOSHAUG, E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta**, n. 237, p. 239-253, 2012.

- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N.; SOCCOL, C.R. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.
- GONÇALVES, E. A. P. **Caracterização da Comunidade Fitoplanctônica e Fatores Ambientais Correlacionados em Lagoa de Estabilização**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em XX)-Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Pernambuco, 2008.
- GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, 2007.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. **Biofuels**, v. 6, p. 205-218, 2012.
- GUPTA, A.; BHATLA, S. C. Spatial and temporal changes in lipase activity sites during oil body mobilization in protoplasts from sunflower seedling cotyledons. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 11-17, 2005.
- GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.
- GRUBER-BRUNHUMER, M. R.; JERNEY, J.; ZOHAR, E. *Acutodesmus obliquus* as a benchmark strain for evaluating methane production from microalgae: influence of different storage and pretreatment methods on biogas yield. **Algal research**, p. 230-238, 2015.
- HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273-278, 2007.
- HARUN, R.; DANQUAHA, M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 1079-1084, 2011.
- HASHEM, A.M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 219-222, 2000.
- HE, S.; FAN, X.; KATUKURRI, N.; YUAN, X.; WANG, F.; GUO, R. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. **Bioresource technology**, p. 145-151, 2014.
- HOM-DIAZ, A.; PASSOS, F.; FERRER, I.; VICENT, T.; BLÁNQUEZ, P. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. **Algal Research**, v. 19, p. 184-188, 2016.
- ICLEI. **Governos Locais pela Sustentabilidade Manual para aproveitamento do biogás: volume um, aterros sanitários** (adaptado). Secretariado para América Latina e Caribe, São Paulo, 80p. 2009.
- INFORSATO, F. J.; PORTO, A. L. Atividade enzimática de celulasas pelo método dns de fungos isolados de sementes em germinação. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 4, p. 444-465, 2016.

JANKOSWA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting, pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 692-709, 2017.

JENSEN, B.; NEBELONG, P.; OLSEN, J.; REELEY, M. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 41-45, 2002.

KAREMORE, A.; PAL, R.; SEN, R. Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococccum infusionum* as bioenergy feedstock. **Algal Research**, n. 2, p. 113-121, 2013.

KAVITHA, S.; SUBBULAKSHMI, P.; RAJESH BANU, J.; GOBI, M. Enhancement of biogas production form microalgal biomassa through cellulolytc bacteria pretreatment. **Bioresource Technology**, p. 34-43, 2017.

KERMANSHAHI-POUR, A.; SOMMER, T. J.; ANASTAS, P. T.; ZIMMERMAN, J. B. Enzymatic and acid hydrolysis of *Tetraselmis suecica* for polysaccharide characterization. **Bioresour Technology**, v. 173, p. 415-421, 2014.

KHAN, S. A.; RASHMI; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U. C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renew Sust Energy Rev**, n. 13, p. 2361-2372, 2009.

KLASSEN, V. BLIFERNEZ-KLASSEN, O.; WOBBE, L.; SCHLUTER, A.; KRUSE, O.; MOSSGNUM, J. H. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. **Journal of Biotechnology**, n. 234, p. 7-26, 2016.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUMAR, S.; SHARMA, N. S.; SAHARAM, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, p. 5-15, 2005.

KWIETNIEWSKA, E.; TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. **Renewable Sustainable Energy Review**, n. 34, p. 491-500, 2014.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Articles: biocatalysts and bioreactor design. **Biotechnology**, v. 24, p. 815-820, 2008.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Ed. Bluncher, 2001.

LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. D. C. C.; FRANCISCO, G. A. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource technology**, n. 101, p. 7587-7591, 2010.

MACEDO, L. V. **Manual para aproveitamento do biogás: volume dois, efluentes urbanos**. ICLEI - Governos Locais pela Sustentabilidade, Secretariado para América Latina e Caribe, Escritório de projetos no Brasil. São Paulo, 2010.

- MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BLANCO, S. BALLESTEROS, M. GONZALEZ-FERNANDEZ, C., Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. **Bioresource Technology**, n. 171, p. 421-427, 2014.
- MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLES-FERNÁNDEZ, C. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-continuous anaerobic digestion. **Fuel**, v. 158, p. 35-41, 2015 a.
- MAHDY, A.; MENDEZ, L.; TOMAS-PEJO, E.; DEL MAR MORALES, M.; BALLESTEROS, M.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. **Journal Chemical Technology Biotechnol**, v. 91, p. 1299-1305, 2015 b.
- MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production Influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 319-325, 2016.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M.K. Thermophilic Fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 461-488, 2000.
- MATA, M. T.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B.; FURIGO JÚNIOR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305. 2005.
- MENGER-KRUG, E.; NIEDERSTE-HOLLENBER, J.; HILLENBRAND, T. HIESSL, H. Integration of microalgae systems at municipal wastewater treatment plants: implications for energy and emission balances. **Environmental Science & Technology**, n. 46, p. 11505-11514, 2012.
- METZGER, P.; LARGEAU, C.; CONNAN, J.; BERKALOFF, C.; ROUSSEAU, B. Bacterial degradation of green microalgae: Incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. **Organic Geochemistry**, v. 25, p. 117-30, 1996.
- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841-846, 2006.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOAZAMI, N.; ASHORI, A.; RANJBAR, R.; TANGESTANI, M.; EGHTESEADI, R.; NEJAD, A.S. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 449-453, 2013.
- MUÑOZ, C.; HIDALGO, C.; ZAPATA, M.; JELSON, D.; RIQUELME, C.; RIVAS, M. Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. **Appl. Environment Microbiology**, p. 4199-4206, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lenhinger**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

NERY, V.L.H.; LIMA, J.A.F.; MELO, R. C.A.; FIALHO, E.T. Adição de Enzimas Exógenas para Leitões dos 10 aos 30 kg de Peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, p. 794-802, 2000.

NORTHCOTE, D. H.; GOULDING, K. J.; HORNE, R. W. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. **Biochemical Journal**, n. 3, p. 391-401, 1958.

OLIVEIRA, M. D.; BIAGGIO, R. T.; CABRAL, D. Bioprospecção de Proteases em Microrganismos Isolados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1-4, 2002.

OMETTO, F.; QUIROGA, G.; PSENICKA, P.; WHITTON, R.; JEFFERSON, B.; VILLA, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. **Water Research**, v. 65, p. 350-361, 2014.

PASSOS, F.; UGGETTI, E.; CARRERE, H; FERRER, I. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. **Bioresource Technology**, n. 172, p. 403-412, 2014.

PASSOS, F.; HOM-DIAZ, A.; BLANQUEZ, P.; VINCENT, T. FERRER, I. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. **Bioresource Technology**, n. 199, p. 347–351, 2016.

PECCIA J.; HAZNEDAROGLU B.; GUTIERREZ J.; ZIMMERMAN J.B. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 134-138, 2013.

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 2002.

PHILIPPI JR, A.; MALHEIROS, T. F. **Saneamento e saúde pública: integrando homem e meio ambiente**. Barueri, SP: Manole, 2005.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIR, M.; TORRES, E.A.; LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. P. Biodiesel: An Overview. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1313-1330, 2005.

PRAJAPATI, S.K.; BHATTACHARYA, A.; MALIK, A.; VIJAN, V.K. Pretreatment of algal biomass using fungal crude enzymes. **Algal**, v. 8, p. 8-14, 2015 a.

PRAJAPATI, S.K.; ANUSHREE, M.; VIJAYC, V.K.; SREEKRISHNAND, T.R. Enhanced methane production from algal biomass through short duration enzymatic pretreatment and codigestion with carbon rich waste. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 67175-67183, 2015 b.

PZSCZOLA, D. E. From soybeans to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technology**, n. 55, p. 54-62, 2001.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 21, p. 63-66, 2001.

- RODRIGUEZ, C.; ALASWAD, J.; MOONEY, T.; PRESCOTT, A. G. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. **Fuel Processing Technology**, n. 138, p. 765-779, 2015.
- ROSENBERG, J. N.; MATHIAS, A.; KORTH, K.; BETENBAUGH, M. J.; OYLER, G. A. Microalgal biomass production and carbon dioxide sequestration from an integrated ethanol biorefinery in Iowa: a technical appraisal and economic feasibility evaluation. **Biomass Bioenergy**, n. 35, p. 3865-3876, 2011.
- RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Jréia-Itatins, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 27, p. 205-211, 2004.
- SANDER, K.; MURTHY, G. S. Life cycle analysis of algae biodiesel. **International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 15, p. 704-714, 2010.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Ed. Bluncher, 2001.
- SILVA, G.A.B.; ALMEIDA, W.E.S.; CORTES, M.S.; MARTINS, E.S. Produção e caracterização de protease obtida de *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 3, p. 28-41, 2009.
- SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; QUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n.3, p. 337-341, 2003.
- SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 1, p. 200-216, 2010.
- SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, p. 174-189, 2016.
- SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909-941, 2016.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- TADEKA, H.; HIROKAWA, T. Studies on the cell wall of *Chlorella* I. Quantitative changes in cell wall polysaccharides during the cell cycle of *Chlorella ellipsoidea*. **Plant Cell Physiology**, v. 19, p. 591-598, 1978.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2009.
- TSENG, T. C.; MOUNT, M. S. Toxicity of endopolygalacturonate trans-eliminase, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue. **Phytopathology**, v. 64, p. 229-236, 1974.
- TSIGIE, A. Y.; WUA, C. H.; HUYNH, L. H.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Bioethanol production from *Yarrowia lipolytica* Po1g biomass. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 210-216, 2013.

- TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1553–1558, 2003.
- VANTHOOR-KOOPMANS, M; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142-149, 2013.
- VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802**. 2009. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- VITOLO, M. **Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos**. In: Aquarone et al. *Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- 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* related to the cell-wall glycoprotein gp3 of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science**, v.215, p. 39-47, 2014.
- VULFOSON, E. N. **Lipases - their structure, biochemistry and application**. Cambridge University Press: Cambridge, 1994.
- WATANABE, T. **Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species**. 2 ed. Boca Raton FL: Ed. CRC Press, 2010.
- WIECZOREK, N.; KUCUKER, M.A.; KUCHTA, K. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two-stage combined process. **Applied Energy**, n. 132, p. 108-117, 2014.
- WINKLER, U. R.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.
- XU, X. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, p. 287-303, 2000.
- XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499-507, 2006.
- YOO, C.; JUN, S.; LEE, J. Selection of microalgae for lipid production under levels carbon dioxide. *Bioresource technology*, p. 71-74, 2010.
- ZAMALLOA, C.; VULSTEKE, E.; ALBRECHT, J.; VERSTRAETE, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1149-1158, 2011.
- ZANPHORLIN, L; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme reduction and its partial characterization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.
- ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento de atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.