



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL  
CENTRO DE TECNOLOGIA - CTEC  
RENORBIO - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA



**MARGARETE CABRAL DOS SANTOS SILVA**

**PRODUÇÃO DE ENZIMA ALGINASE A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS E  
ALGAS MARINHAS MARRONS (*Sargassum*)**

Maceió

2020

**MARGARETE CABRAL DOS SANTOS SILVA**

**PRODUÇÃO DE ENZIMA ALGINASE A PARTIR DE FUNGOS FILAMENTOSOS E  
ALGAS MARINHAS MARRONS (*Sargassum*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Tecnologia Industrial – RENORBIO da Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Josealdo Tonholo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva

Maceió

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586p

Silva, Margarete Cabral dos Santos.

Produção de enzima alginase a partir de fungos filamentosos e algas marinhas marrons (*Sargassum*) / Margarete Cabral dos Santos Silva. – 2021.

112 f. : il. color.

Orientador: José Aldo Tonholo.

Co-orientador: Carlos Eduardo de Farias Silva.

Tese (doutorado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 85-109.

Anexo: f. 110-112.

1. Alginase (Enzima). 2. Macroalgas. 3. *Sargassum*. 4. Fermentação - Estado sólido. 5. Alginatos. 6. Fungos. 7. Fermentação semi-sólida. I. Título.

CDU: 663.15



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, “meu ponto de equilíbrio”, que esteve presente em todos os momentos da vida, me fortalecendo, guiando os meus passos em cada caminhada... Momentos marcantes... de quedas, subidas, perdas, mudança pessoal... Posso dizer que passei momentos de firmeza, frieza, solidão, companheirismo, justiça, injustiça, sorrisos e de lágrimas, tanto de tristeza quanto de felicidade...

À minha família, filhos, neta, irmãos, sobrinhos, noras, sogra, cunhadas(os), pelo apoio, compreensão, paciência, tolerância... Principalmente a responsável por mais uma conquista, minha Mãe (Maria José Cabral), razão do meu viver, minha fortaleza.

A companheira, parceira, cúmplice... Elenita; por ter sido fundamental na elaboração e conquista desse projeto. Minha eterna gratidão. OBRIGADA!

Ao Orientador, Prof.º Dr.º Prof. Dr. Josealdo Tonholo, pelos conhecimentos transmitido, sempre coerente e sábio; compartilhando e estimulando a realização dessa “TESE”. Minha eterna gratidão, respeito e principalmente minha admiração. OBRIGADA!!!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva, carinhosamente, Cadu, que com tanta presteza deu-me a oportunidade de refletir, corrigir, refazer os passos para conclusão dessa tese. Pela orientação e ensinamentos direcionados nessa jornada. Minha eterna gratidão. OBRIGADA!!!

Aos companheiros, amigos, anjos... Josi, Rosana, Leandro, Geórgia, Álvaro... guerreiros, parceiros da luta diária, dos incentivos, da contribuição da realização desse sonho. A todos os integrantes do LTBA, pelo auxílio e companheirismo, tornando o laboratório um lugar agradável e familiar, pela colaboração e atenção em todos os momentos, pelos momentos de risadas, músicas, folia, choro e muito trabalho e de amizade. Vocês são 1000!!!

Às amigas irmãs Renata Rosas, Cleusa e Lívia Luiza, pela presença em todos os momentos, contribuindo efetivamente para formulação de minha tese, por todo carinho, dedicação e amizade depositados.

Aos professores Tania, Edna, Ticiano, Sonia, Izael, e Dayana pelo aprendizado, oportunidade, paciência e por estarem sempre disponível a ajudar em qualquer situação. Meu eterno carinho. OBRIGADA!

Ao Programa RENORBIO e ao LTBA (Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bebidas), na presença de todos os integrantes e funcionários pela agradável recepção e convivência diária.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

*“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca.”*

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo por fermentação semi-sólida utilizando fungo filamentoso da produção de alginase utilizando macroalga marrom como substrato. A macroalga escolhida foi a do gênero *Sargassum*, e das cepas fúngicas testadas, o fungo *Cunninghamella echinulata* mostrou-se mais adequado para a otimização da fermentação. Todas as fermentações ocorreram em frascos vítreos utilizando-se 3g de biomassa macroalgal em temperatura de 30°C, com extrato enzimático obtido em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,2-7,5 através de agitação (150 rpm por 30 min), seguida por filtração e centrifugação (3000 rpm por 15 min) para separar a parte sólida do extrato. A solução nutriente (SN) umidificadora foi composta pela seguinte composição: uréia (0,30 g/L), peptona (0,75 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,40 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,30 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,40 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,40 mg/L), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5,0 mg/L), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (2,0 mg/L) e MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,60 mg/L). Buscou-se otimizar essa solução nutriente em relação aos teores de nitrogênio, e verificou-se que o aumento da concentração de peptona (5 g/L) e inclusão de extrato de levedura (2 g/L) (denominada SN<sub>2</sub> sendo utilizada em todas as fermentações posteriores) favoreceu o aumento do desenvolvimento do fungo com aumento da expressão enzimática de 100 para 225 U/mL. De outro lado, o aumento da concentração de nitrogênio a partir dessa formulação ocasionou uma redução da produção enzimática. O estudo da influência da umidade revelou que ao utilizar níveis de 65-85 obteve-se produção ótima da enzima. Já com uso de umidade entre 80 e 85% a produção enzimática foi insignificante. Picos de produção chegaram a alcançar o rendimento de até 175 U/mL. A variação da concentração de inóculo entre 2.10<sup>6</sup>-1.10<sup>7</sup> esporos/g<sub>biomassa</sub>, não alterou significativamente a produção de alginase, apresentando-se como um intervalo de trabalho seguro. A presença de alginato de sódio como indutor na expressão enzimática permitiu aumento de 43% a produção enzimática, saltando-se de um pico de atividade enzimática de 175 para 250 U/mL, utilizando uma substituição mássica da biomassa de *Sargassum* entre 16,66- 33,33% (m<sub>alginato</sub>/m<sub>total</sub>). O efeito do pH da SN<sub>2</sub> foi estudado no intervalo 2,5-8,5, apresentando máxima produção quando ajustado entre 6,0 e 7,0. Ademais, o extrato enzimático obtido por fermentação semissólida mostrou estabilidade ao congelamento, evidenciando de forma qualitativa a estabilidade e retomada da atividade da enzima e aos componentes presentes no extrato.

**Palavras chaves:** alginase, macroalgas marrons, sargassum, fermentação semi-sólida, fermentação em estado sólido, alginato, fungos filamentosos



## ABSTRACT

This study describes the semi-solid fermentation for producing alginase from filamentous fungi using brown macro algae as substrate. The macroalgae chosen was *Sargassum* genus, and of the fungal strains tested, the fungus *Cunninghamella echinulata* proved to be more suitable for the optimization of fermentation. All fermentations took place in vitro using 3g of macroalgal biomass at a temperature of 30°C, with enzymatic extract obtained in 50 mM tris-HCl pH 7.2- 7.5 through stirring (150 rpm for 30 min), followed by filtration and centrifugation (3000 rpm for 15 min) to separate the solid part of the extract. The humidifying nutrient solution (SN) was composed of the following composition: urea (0.30 g / L), peptone (0.75 g / L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.40 g / L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g / L), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.30 g / L), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.40 g / L), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.40 mg / L), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5.0 mg / L), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.0 mg / L) and MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O (1.60 mg / L). We sought to optimize this nutrient solution in relation to nitrogen levels, and it was found that the increased concentration of peptone (5 g / L) and inclusion of yeast extract (2 g / L) (called SN2 being used in all subsequent fermentations) favored an increase in the development of the fungus with an increase in enzymatic expression from 100 to 225 U / mL. On the other hand, the increase in the concentration of nitrogen from this formulation resulted in a reduction in enzyme production. The study of the influence of humidity revealed that when using levels of 65-85, optimal production of the enzyme was obtained. With humidity between 80 and 85%, the enzyme production was near negligible. Production peaks reached a yield of up to 175 U / mL. The variation of the inoculum concentration between 2.10<sup>6</sup>- 1.10<sup>7</sup> spores / g biomass, did not significantly alter the alginase production, presenting itself as a safe working interval. The presence of sodium alginate as an inducer in enzyme expression allowed an increase of 43% in enzyme production, jumping from a peak of enzymatic activity from 175 to 250 U / mL, using a mass substitution of Sargassum biomass between 16.66- 33.33% (malgianto / mtotal). The pH effect of SN2 was studied in the range 2.5-8.5, with maximum production when adjusted between 6.0 and 7.0. In addition, the enzymatic extract obtained by semi-solid fermentation showed stability to freezing, showing qualitatively the stability and resumption of enzyme activity and the components present in the extract.

**Key words:** alginase, brown macroalgae, sargassum, semi-solid fermentation, solid state fermentation, alginate, filamentous fungi.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |   |
|---------|---|
| RPM     | Rotações por minuto   |
| t       | Tempo de fermentação  |
| DNS     | Ácido 3,5-dinitrosalicílico                                 |
| g       | Unidade de massa, em gramas                                 |
| L       | Unidade de volume, em litro e seus derivados, em mililitros |
| m       | Massa   |
| min     | Minuto  |
| BDA     | Batata-Dextrose-Ágar  |
| SN      | Solução nutriente   |
| UI ou U | Unidade internacional para atividade enzimática             |
| V       | Volume  |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Espécie de <i>Ulva</i> .....   | 24 |
| Figura 2: Espécie de <i>Hypnea</i> .....   | 25 |
| Figura 3: Exemplos de Phaeophytas, Gêneros <i>Sargassum</i> e <i>Padina</i> .....  | 26 |
| Figura 4: Mapa do Estado de Alagoas subdividido em Litoral Sul, Central e Norte.....   | 27 |
| Figura 5: Localização geográfica da área de estudo, linha de costa delimitada pelo Riacho Doce (local da coleta das macroalgas).....   | 28 |
| Figura 6: Estrutura do Alginato: monômeros (a), conformação da cadeia (b) e distribuição dos blocos (c).....   | 40 |
| Figura 7: Estruturas globais das alginases de diferentes famílias.....   | 42 |
| Figura 8: Quantidade de documentos por ano na base <i>Science Direct</i> utilizando a palavra-chave Alginate Lyase.....  | 44 |
| Figura 9: Lavagem das algas.....   | 54 |
| Figura 10: Fungos crescido em meio BDA.....  | 54 |
| Figura 11: Crescimento dos fungos filamentosos em meio líquido para a massa fúngica.....   | 55 |
| Figura 12: Curva padrão de Alginase.....   | 62 |
| Figura 13: Curva padrão de DNS.....  | 64 |
| Figura 14: Curva analítica do padrão de Bradford para análise de proteína frente a reação com albumina.....  | 65 |
| Figura 15: Coleta das microalgas riacho doce.....  | 70 |
| Figura 16: Curva de Secagem das feofíceas.....   | 70 |
| Figura 17: Caracterização físico-química das macroalgas e da massa fúngica.....  | 72 |
| Figura 18: Atividade enzimática nos extratos enzimáticos com as três soluções nutrientes testadas.....   | 73 |
| Figura 19: Atividade alginase em função do teor de umidade da biomassa.....  | 76 |
| Figura 20: Proteínas totais nos extratos enzimáticos em função da umidade.....   | 77 |
| Figura 21: Influência da concentração de inóculo na expressão de atividade da alginase.....  | 78 |
| Figura 22: Influência da adição de alginato de sódio à biomassa de <i>Sargassum</i> na expressão da alginase.....  | 79 |
| Figura 23: Mudança no pH superficial da biomassa após a adição de solução nutriente com pHs diferentes.....  | 80 |
| Figura 22: Expressão da alginase em função do pH da solução umidificadora/solução nutriente (SN <sub>2</sub> ) utilizando somente a biomassa de <i>Sargassum</i> como substrato..... | 82 |

Figura 25: Expressão da alginase em função do pH da solução umidificadora/solução nutriente (SN<sub>2</sub>) utilizando a biomassa de *Sargassum* como substrato adicionada de 16,66% de alginato de sódio (indutor) (% m<sub>alginato</sub>/m<sub>total</sub>).....84

Figura 26: Estabilidade dos extratos enzimáticos ao congelamento. As linhas representadas pelos símbolos (•) e (-) representam a média e o desvio padrão da média de todos os valores.....85

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Principais classes de polissacarídeos e monômeros em macroalgas.....   | 23 |
| Tabela 2: Enzimas obtidas a partir de fungos.....  | 36 |
| Tabela 3: Temperatura e pH ótimo de algumas enzimas e concentrados enzimáticos comerciais na hidrolise de macroalga..... | 38 |
| Tabela 4: Organismos produtores de alginase e a especificidade de sua enzima.....  | 41 |
| Tabela 5: Número de artigos recuperados a partir das palavras-chave por base de periódicos....                           | 43 |
| Tabela 6: Número de artigos recuperados a partir das palavras-chave por base de patentes.....                            | 47 |
| Tabela 7: Resultadís da expressão enzimática nos diferentes estudos.....   | 49 |
| Tabela 8: Diferentes composições de soluções nutriente para fermentação enzimática.....                                  | 60 |
| Tabela 9: Composição dos compostos nitrogenados das soluções nutrientes testadas.....                                    | 66 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>16</b> |
| 1.1.1 <b>Organização do trabalho .....</b>                              | <b>17</b> |
| 1.1.2      Trajetória do Doutorado .....                                | 18        |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1.1 <b>Geral.....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1.2 <b>Específicos.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>                                   | <b>20</b> |
| 3.1.1      O contexto da biomassa no século XXI .....                   | 20        |
| 3.1.2      Biomassa de primeira geração (amiláceas e sacarinas).....    | 21        |
| 3.1.3      Biomassa de segunda geração (lignocelulose).....             | 21        |
| 3.1.4      Biomassa de terceira geração (micro e macroalgas) .....      | 22        |
| 3.1.5 <b>Os Filos das Macroalgas .....</b>                              | <b>23</b> |
| 3.1.6      Chloophyta .....   | 23        |
| 3.1.7      Rhodophyta .....   | 24        |
| 3.1.8      Phaeophyta .....   | 25        |
| 3.1.9 <i>Sargassum spp.</i> .....                                       | 26        |
| 3.1.10 <b>Litoral Alagoano .....</b>                                    | <b>27</b> |
| 3.1.2      Praia e Riacho Doce .....                                    | 28        |
| 3.1.3 <b>Fungos filamentosos .....</b>                                  | <b>28</b> |
| 3.1.4      Biologia dos fungos .....                                    | 28        |
| 3.1.5      Gênero <i>Cunninghamella</i> .....                           | 30        |
| 3.1.6      Gênero <i>Penicillium</i> .....                              | 31        |
| 3.1.7      Gênero <i>Aspergillus</i> .....                              | 32        |
| 3.1.8      Fermentação semi-sólida e produção de enzimas .....          | 33        |
| 3.1.9      Fermentação semi-sólida.....                                 | 33        |
| 3.1.10    Principais enzimas comercializadas e áreas de aplicação ..... | 35        |
| 3.1.11    Fatores que influenciam a atividade enzimática .....          | 38        |
| 3.1.12 <b>Alginato e Alginase.....</b>                                  | <b>39</b> |
| 3.1.13    Alginato.....   | 39        |
| 3.1.14    Alginase ( <i>alginate lyase</i> ) .....                      | 40        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.1.15    | Prospecção tecnológica sobre a produção de alginase microbiana .....                                       | 43        |
| 3.1.16    | Fermentação de alginase .....  | 48        |
| 3.1.17    | Metodologias para determinação de atividade da alginase .....  | 50        |
| 3.1.18    | Aplicações da alginase .....   | 50        |
| <b>4.</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>53</b> |
| 4.1.1     | <b>Coleta das macroalgas .....</b>   | <b>53</b> |
| 4.1.2     | Seleção e manutenção dos fungos filamentosos .....   | 54        |
| 4.1.3     | Caracterização físico-química das macroalgas e fungos.....   | 55        |
| 4.1.4     | Determinação de proteínas totais (Método de Kjeldahl).....   | 55        |
| 4.1.5     | Determinação de lipídios totais (extração com Soxhlet).....  | 56        |
| 4.1.6     | Determinação de Cinzas (resíduo mineral fixo por gravimetria).....   | 56        |
| 4.1.7     | Determinação do teor de umidade (gravimetria) .....  | 57        |
| 4.1.8     | Calculo dos carboidratos totais .....  | 57        |
| 4.1.9     | <b>Fermentação Semi-sólida .....</b>   | <b>57</b> |
| 4.1.10    | Preparação da suspensão de esporos .....   | 58        |
| 4.1.11    | Preparação do meio de fermentação .....  | 58        |
| 4.1.12    | Fermentação e extração enzimática .....  | 60        |
| 4.1.13    | <b>Determinação de atividade enzimática para alginase e determinação de proteínas totais no caldo.....</b> | <b>61</b> |
| 4.1.14    | Determinação de atividade da alginase .....  | 61        |
| 4.1.15    | Preparação do reagente de DNS e da curva padrão .....  | 62        |
| 4.1.16    | Determinação de proateínas totais e preparação da curva padrão.....  | 63        |
| 4.1.17    | Otimização da fonte e concentração de nitrogênio –otimização da solução nutriente.....                     | 64        |
| 4.1.18    | Estudo das variáveis de processo na expressão enzimática .....   | 66        |
| 4.1.19    | Análise do teor umidade .....  | 66        |
| 4.1.20    | Avaliação da concentração de inóculo.....  | 67        |
| 4.1.21    | Influência da presença de um indutor .....   | 67        |
| 4.1.22    | Verificação da influência do pH da solução nutriente .....   | 67        |
| 4.1.23    | Verificação da estabilidade ao congelamento .....  | 67        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>69</b> |
| 5.1.1     | <b>Coleta e triagem das macroalgas .....</b>   | <b>69</b> |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.1.2     | Caracterização físico-química das macroalgas e dos fungos filamentosos.....  | 71        |
| 5.1.3     | Expressão de alginase em função da concentração de nitrogênio da solução nutriente (SN) ( $10^7$ esporos/g <sub>biomassa</sub> , 75% de umidade, pH <sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).....           | 72        |
| 5.1.4     | <b>Expressão de alginase em função da umidade da biomassa (<math>10^7</math> esporos/g<sub>biomassa</sub>, SN<sub>2</sub>, pH<sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).....</b>                              | <b>75</b> |
| 5.1.5     | <b>Expressão de alginase em função da concentração de inóculo (75% de umidade, SN<sub>2</sub>, pH<sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).....</b>  | <b>77</b> |
| 5.1.6     | Influência da adição do indutor (alginato de sódio) na expressão de alginase ( $10^7$ esporos/g <sub>biomassa</sub> , 75% de umidade, SN <sub>2</sub> , pH <sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C) .....   | 78        |
| 5.1.7     | Influência do pH da solução umidificadora (solução nutriente) na expressão de alginase ( $10^7$ esporos/g <sub>biomassa</sub> , SN <sub>2</sub> , 75% de umidade e 30°C) .....                 | 79        |
| 5.1.8     | Usando apenas a biomassa de <i>Sargassum</i> como substrato .....  | 81        |
| 5.1.9     | Usando a mistura de biomassa de <i>Sargassum</i> com alginato de sódio (16,66% m <sub>alginato</sub> /m <sub>total</sub> ) como substrato .....  | 83        |
| 5.1.10    | Estabilidade dos extratos enzimáticos ao congelamento ( $10^7$ esporos/g <sub>biomassa</sub> , 75% de umidade, SN <sub>2</sub> , 30°C, 16,66% de alginato de sódio e 3 dias de fermentação).84 |           |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>87</b> |
| <b>7.</b> | <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>   | <b>89</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>90</b> |



## 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios do setor de bioenergia é a garantia de sustentabilidade por meios de fontes renováveis, devido à escassez das reservas do petróleo, contribuindo com a diminuição de riscos nos setores geopolíticos, econômicos ao meio ambiente.

Nas últimas décadas houve interesse crescente em diversos resíduos e efluentes agroindustriais/florestais/marítimos visando o desenvolvimento de bioprocessos por meio de substratos usuais para produção de moléculas de alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (DAROCH et al., 2013; BRENNAN & OWENDE, 2010). Esses bioprocessos, apesar da necessidade de serem economicamente viáveis, também devem solucionar ou diminuir problemas ambientais decorrentes de seus acúmulos na natureza (DASHTBAN, SCHARAFT, QIN, 2009; ALVIRA et al., 2010; CARDOSO, VIEIRA E MARQUES, 2011).

Diante dessa realidade nasce um novo paradigma: utilizar biomassa complexa depende principalmente da disponibilidade de catalisadores biológicos (enzimas) para a desestruturação da matriz polimérica, estando assim mais disponíveis para processos fermentativos.

As enzimas são macromoléculas proteicas com a capacidade de promover e acelerar as reações químicas com objetivo de manter e regular os organismos vivos. São oriundas de fontes vegetais, animais e microbianas. No processo de aplicação biotecnológica-industrial as microbianas são as mais usadas, devido a vários fatores, entre eles: facilidade de manipulação genética e ambiental e alta escalas e variedade da produção catalítica. (TAVAFI et al., 2017)

As micro e macroalgas, ditas biomassas de terceira geração, possuem muitas vantagens em relação às duas gerações precedentes (biomassas sacarinas e amiláceas como a cana de açúcar e o plantas superiores), capacidade de produção durante praticamente todo o ano em regiões tropicais (ou em caso de iluminação artificial), cultivo tanto em água doce quanto salgada (no último caso, não competindo com a água de irrigação), não necessita de terras aráveis para sua produção (sem competição com os alimentos), não necessita de herbicidas ou pesticidas para o cultivo (minimização do impacto poluidor), possibilita a coprodução de produtos de valor agregado, como pigmentos, proteínas, lipídios de valor funcional e biopolímeros, a exemplo dos hidrocolóides (principalmente nas macroalgas), bem como ausência de lignina em sua composição (diminuição da recalcitrância da biomassa e, portanto, necessidade de condições mais amenas para sua sacarificação) (JOHN et al., 2011; WEI, QUARTERMAN E JIN, 2013; RAWAT et al., 2013; HARUN et al., 2013; MILLEDGE, NIELSEN e BAILEY, 2015).

Diante do exposto, esse trabalho visou a identificação de enzima de interesse para a utilização de biomassa macroalgal residual do Estado de Alagoas, em especial, do gênero *Sargassum*, verificada como espécie mais abundante. Entre seus polímeros está o alginato, utilizado na atualidade devido a facilidade de manipulação e baixo custo, tratamento de fibrose cística (WEI, QUARTERMAN E JIN, 2013), contra bactérias como *P. aeruginosa*, que contribui na intensificação de infecções pulmonares, prevenção de tumores (SIVAKUMAR et al., 2015). Monossacarídeos produzidos na atuação da alginase podem ser utilizados na produção de biocombustíveis, bioquímicos e outros, na odontologia e principalmente na indústria podendo conter até 30% em massa seca; e a enzima degradadora, a alginase (alginate lyase), a qual tem diversas potencialidades de aplicação, principalmente na área médica, química fina e biocombustíveis (WEI, QUARTERMAN E JIN, 2013; MILLEDGE, NIELSEN e BAILEY, 2015; SIVAKUMAR et al., 2015; DEL RIO et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

É de importante ressaltar que as fermentações com alginase, que serão descritas na seção 3, Revisão Bibliográfica, são realizadas por bactérias em fermentação submersa; diferente do proposto por esse trabalho, no qual se utilizou fermentação semi-sólida e fungos filamentosos, garantindo a inediticidade do estudo. Portanto, serão avaliadas cepas fúngicas e macroalga com a finalidade de se desenvolver um processo fermentativo semi-sólido e serão avaliados parâmetros importantes nesse tipo de fermentação, visando contribuir para uma evolução do mesmo como um bioprocessamento consolidado (CBP – Consolidated bioprocess).

## 1.1 Organização do trabalho

Esta tese de doutorado faz parte de uma das linhas de pesquisas desenvolvidas nos Laboratórios de Tecnologia de Bebida e Alimentos (LTBA) do Centro de Tecnologia (CTEC) e Laboratório de Eletroquímica Aplicada no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), ambos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob a orientação do Prof.º Dr.º Josealdo Tonholo e co-orientada pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva.

Nesse contexto, a presente tese de doutorado está estruturada da seguinte maneira:

Após este Capítulo 1, Introdutivo, o Capítulo 2 apresenta os Objetivos Geral e Específicos, sequencialmente, da forma que o trabalho será apresentado.

A Revisão Bibliográfica é descrita no Capítulo 3, onde são abordados o contexto da biomassa no mundo moderno, aspectos relacionados às macroalgas (mencionando o gênero *Sargassum*) e a utilização de fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus*, *Cunninghamella* e *Penicillium* na produção de enzimas para bioprocessos, ressaltando os principais

resultados reportados na literatura em relação principalmente à Alginase (*Alginate lyase*), principal foco desse trabalho; assim como a prospecção tecnológica da fermentação dessa enzima e perspectivas de mercado.

No Capítulo 4, a Metodologia empregada na caracterização físico-química do macroalga e da biomassa fúngica, além dos processos de fermentação semi-sólida e atividade enzimática são apresentados. No Capítulo 5, os Resultados obtidos e uma Discussão baseada na literatura serão apresentados. Importantes parâmetros de fermentação foram avaliados, como o tipo de solução nutriente, umidade, concentração de inóculo, adição de indutor (alginato de sódio), influência do pH da solução nutriente e estabilidade dos extratos enzimáticos obtidos.

Finalmente, no Capítulo 6, estão as Conclusões do trabalho assim como a apresentação das Sugestões para Trabalhos Futuros Capítulo 7. Por fim, as Referências Bibliográficas utilizadas no decorrer de todo trabalho são elencadas.

## **1.2 Trajetória do Doutorado**

A discente foi matriculada no curso de doutorado em 7 de abril de 2016. No primeiro semestre (2016.1) cursou com aprovação as disciplinas de Bionegócios e Marcos Legais em Biotecnologia e Bioinformática. No segundo semestre (2016.2) cursou as disciplinas de Avanços em Biologia Celular e Molecular, Bioquímica de Plantas, Métodos Físicos de Análise e Avanços em Bioquímica e Biofísica.

Concluiu as disciplinas de Seminários de Tese I e II, Estágio Docência I e II e Proficiência em Língua Inglesa e Espanhola, nos dois primeiros anos de doutorado. Qualificou em 2019.1, conforme as regras do programa.

Os produtos de sua tese são:

- 1) Depósito de patente BR 10 2020 024620 8 junto ao NIT da UFAL intitulado:  
“PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENZIMA ALGINASE POR FERMENTAÇÃO FÚNGICA EM ESTADO SEMISSÓLIDO USANDO MACROALGA E/OU ALGINATO E COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TAL”, datado de 02/12/2020.
- 2) Submissão do artigo na Journal of Environmental Chemical Engineering (Qualis CAPES A2 em Biotecnologia) – em fase de submissão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL:

O projeto propõe-se investigar a degradação de biomassa macroalgal de interesse local (*Sargassum*) na produção de enzima por fermentação semi-sólida aplicando fungos filamentosos, utilizando-a como fonte de nutriente e indutor, otimizando sua fermentação.

### 2.2 ESPECÍFICOS:

Os tópicos a seguir apresentam os principais passos para atingir os seguintes objetivos específicos da pesquisa:

- **Coletar a biomassa das macroalgas e a seleção dos fungos filamentosos.** Seleção e coletas da biomassa (macroalgas) realização da coleta da matéria prima no Estado de Alagoas. Assim como a escolha e obtenção das espécies fúngicas;
- **Realizar etapa de *screening*** para se verificar a melhor espécie dentre as selecionadas na etapa anterior e qual a enzima alvo seria produzida por fermentação semi-sólida;
- **Otimizar as condições de fermentação semi-sólida,** avaliando-se a solução nutriente utilizada (fonte de nitrogênio e quantidade), o teor de umidade, concentração de inóculo e pH da solução nutriente;
- **Realizar teste de estabilidade do extrato enzimático** obtido após o congelamento

### 3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Neste capítulo são apresentados os aspectos relevantes à temática abordada; sequencialmente: contexto atual da biomassa para bioprocessos, em destaque, das macroalgas; o papel dos fungos filamentosos na indústria e em especial, na produção enzimática. Em seguida, será apresentado o alginato, polímero presente em algas marrons como o *Sargassum*, gênero marcadamente presente no litoral alagoano; e da alginase, sua prospecção tecnológica e enfatizando os microrganismos produtores, processos de fermentação encontrados, metodologias para determinação de sua atividade e principais aplicações dessa enzima. Essa sequência será seguida com a finalidade de mostrar como as macroalgas (em especial *Sargassum*) poderiam ser utilizados para a produção de alginase microbiana fúngica.

#### 3.1 O contexto da biomassa no século XXI

O século XX foi marcado por um grande avanço da indústria química, tornando-se cada vez mais dependente do petróleo, nesse sentido, a indústria petroquímica protagonizou a maior dependência de fontes fósseis, principalmente por se tratar de indústria de materiais. Contudo, no início do século XXI aumentou-se a pressão pela substituição do petróleo, devido ao temor da escassez do recurso, e também pela poluição ambiental e as mudanças climáticas. No contexto do século XXI, o desenvolvimento científico e tecnológico segue uma linha de transição para um desenvolvimento sustentável, baseada em recursos renováveis. Nesse sentido, ampliou-se a necessidade da substituição do petróleo por novas matérias-primas (GALEMBECK, BARBOSA e SOUSA, 2009). Em consequência das “crises do petróleo”, os países desenvolvidos ampliaram o investimento no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, diminuindo a dependência do petróleo (LORA e ANDRADE, 2004; COELHO et al., 2006).

A biomassa, inclui as matérias orgânicas produzidas a partir da fotossíntese, principalmente madeiras, resíduos da agricultura, microalgas e macroalgas, além de resíduos domésticos, industriais e animais (DEMIRBAS, 2005; WEI, QUARTERMAN e JIN, 2013). A biomassa vegetal é produzida a partir da reação de CO<sub>2</sub> presente no ar, água e luz solar, a fotossíntese é um processo fundamental, responsável pela criação de blocos de carboidratos que juntos formam a biomassa, dessa forma a geração de biomassa vegetal é um processo cíclico, o CO<sub>2</sub> atmosférico garante a produção de nova biomassa (MCKENDRY, 2001).

Além da matéria orgânica vegetal, diversos recursos podem ser caracterizados como biomassa, tornando a conversão da biomassa em energia bastante diversificada. As biomassas podem ser divididas em três categorias: resíduos da produção agrícola, efluentes doméstico e industrial, e resíduos animais; produtos florestais: madeira, arbustos, folhas, serragem e etc.; culturas energéticas: culturas lenhosas, gramíneas, milho, cana-de-açúcar, trigo, cevada, soja, girassol, plantas aquáticas, microalgas e macroalgas (CIUBOTA-ROSIE, GAVRILESCU e MACOVEANU, 2008).

Considerando as biomassas ricas em açúcares, costuma-se dividi-las em três gerações: a primeira se refere aos vegetais que podem também ser usados na alimentação humana, ricos em sacarose e amido, como a cana-de-açúcar e o milho, às de segunda geração como a matéria-prima lignocelulósica e de terceira geração, as micro e macroalgas (SILVA & BERTUCCO, 2016).

#### 3.1.1 Biomassa de primeira geração (amiláceas e sacarinas)

A utilização da biomassa de primeira geração é consolidada industrialmente pois possui menores custos de produção em relação às outras tecnologias. Entretanto, devido ao avanço da população mundial e a necessidade por terras aráveis e, por conseguinte, alimentos, sua expansão torna-se limitada, se não inviável (WEI, QUARTERMAN e JIN, 2013; DAROCH, GENG e WANG, 2013). Um exemplo dessa limitação é a utilização desse tipo de biomassa para produção de bioetanol. Entre 2007 e 2015, a produção mundial de etanol praticamente dobrou, passando a uma produção anual maior que 25 bilhões de galões, ainda que a partir de 2010 a cadeia tenha sofrido uma estagnação devido à limitação de uso das tecnologias de primeira geração (disponibilidade de terras aráveis), principalmente pela questão “food vs fuel” (AFDC, 2016).

#### 3.1.2. Biomassa de segunda geração (lignocelulose)

Buscando uma alternativa às biomassas de primeira geração, encontrou-se como alternativa as biomassas lignocelulósicas (segunda geração), ricas principalmente em lignina, celulose e hemicelulose. Como vantagens em relação à primeira geração, tem-se que biomassa lignocelulósicas pode ser cultivada em quase todas as regiões do planeta, com espécies adaptadas a cada clima e solo, bem como a possibilidade de uso de vários resíduos agroindustriais (como bagaço e palha da cana-de-açúcar e palha de milho) (JOHN et al., 2011). No entanto, a dificuldade da utilização dos açúcares presentes na biomassa, em função de sua recalcitrância, ainda é o principal problema para baixar o

custo do processo, necessitando de pré-tratamentos específicos e uma quantidade de enzimas adicional (SILVA & BERTUCCO, 2016).

### 3.1.3. Biomassa de terceira geração (macroalgas)

As micro e macroalgas, ditas biomassas de terceira geração, são uma fonte atrativa de energia renovável com maior teor de hidratos, e a menor concentração de substratos recalcitrantes muitas vantagens em relação às duas gerações anteriores. Além da produção de biomassa algas não compete com a produção de alimentos, pois não há a necessidade de utilizar terras aráveis. Contudo, o aperfeiçoamento de tecnologias de produção de biocombustíveis e químicos a partir dessa biomassa, esbarra na composição das algas utilizadas como substrato, sendo constituídas principalmente por açúcares mistos e complexos, desfavoráveis a degradação por microrganismos (MILLEDGE, NIELSEN e BAILEY, 2015; WEI, QUARTERMAN e JIN, 2013; HONG, JEON e LEE, 2014).

As macroalgas marinhas são utilizadas como matéria prima em vários setores industrial para produção de vários produtos como por exemplo, medicamentos, combustíveis, cosméticos, além de servirem como alimento animal e humano. São usadas também para branquear papel, na composição do envoltório de cápsulas de medicamentos, na fabricação de tintas, como aditivos na indústria alimentícia e até na regeneração óssea para enxertos odontológicos (TEIXEIRA, 2012).

Além disso, do ponto de vista energético, as macroalgas poderiam fornecer diversos tipos de biocombustíveis em escala industrial, como o metano pode ser obtido pela biodigestão da biomassa de algas (SPOLAORE et al., 2016), além de bioetanol, biodiesel e biohidrogênio (FEDOROV et al., 2006; THOMAS, 2006; SILVA & BERTUCCO, 2016).

Os bancos de algas marinhas destacam-se por serem áreas de reprodução, alimentação e habitat da fauna marinha. No Brasil, pode-se citar, com grande importância ecológica: Arquipélago de Abrolhos na Bahia com suas algas coralinas, além de algas clorofíceas, rodofíceas e feofíceas; as algas marinhas bentônicas do arquipélago de Fernando de Noronha em Pernambuco; o atol das Rocas no Rio Grande do Norte que abriga uma diversificada fauna marinha com recifes de algas calcárias (RASHAD, 2010).

No caso específico das macroalgas, a concentração de carboidratos em biomassa (peso seco) pode variar entre 40 e 85%, constituindo-se numa excelente fonte de açúcares com potencialidade para processos fermentativos e no contexto de química fina (biorefinaria) (WEI, QUARTERMAN e

JIN, 2013; HONG, JEON e LEE, 2014). A Tabela 1 apresenta os principais polissacarídeos presentes em macroalgas, e seus subsequentes monômeros.

**Tabela 1:** Principais classes de polissacarídeos e monômeros em macroalgas.

| Polissacarídeos | Presença/Aplicação  | Principais Monômeros   |
|-----------------|---|--|
| Laminarina      | Polímero de reserva                                       | $\beta$ -1,3-glucose e pequenas quantidades de $\beta$ -1,6-glucose  |
| Alginato        | Polímero linear   | $\beta$ -1,4-D-ácido manurônico e glucose e $\alpha$ -L-ácido gulurônico em sequências alternadas            |
| Celulose        | Polímero linear relacionado à parede celular da macroalga | $\beta$ -1,4-D-glucose   |
| Amido           | Polímero de reserva                                       | $\alpha$ -1,4 e 1,6-D-glucose  |
| Fucoidano       | Polissacarídeo heterogêneo em algas marrons               | $\alpha$ -1,2-L-fucose-4-sulfato com pequenas quantidades de D-xilose, D-galactose, D-manose e ácido urônico |
| Carragena       | Polímero sulfatado  | $\beta$ -D-galactose e $\alpha$ -D-galactose   |
| Agar            | Polímero linear   | $\beta$ -3-D-galactopiranosil e $\alpha$ -4-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranosil                         |

Fonte: WEI, QUARTERMAN e JIN, 2013; ENQUIST-NEWMAN et al., 2014.

### 3.2 Os Filos das Macroalgas

Conhecidas taxonomicamente como Algae, que em latim significa "ervas marinhas", são seres avasculares, ou seja, não possuem vasos condutores de seiva. Conhecidas por suas propriedades exaltadas pela publicidade nas propostas dietéticas, cosmetologia ou talassoterapia, sem esquecer da sua beleza fascinante produzem energia necessária ao seu metabolismo através do processo de fotossíntese. Segundo Barsanti e Gualtieri (2007), as macroalgas (organismos marinhos) constituem aproximadamente metade do total da biodiversidade na Terra e do ecossistema marinho, com suas características biológicas e químicas.

As macroalgas estão inseridas em três filos principais: Algas pardas (Phaeophyta), verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta) (BARSANTI e GUALTIERI, 2007). As Algas pardas pertencentes ao filo Phaeophyta têm em torno 1500 espécies e possuem diversos carotenóides, incluindo a fucoxantina, responsável pela cor característica dos membros desse filo (RAVEN, ANDREWS e QUIGG, 2005).

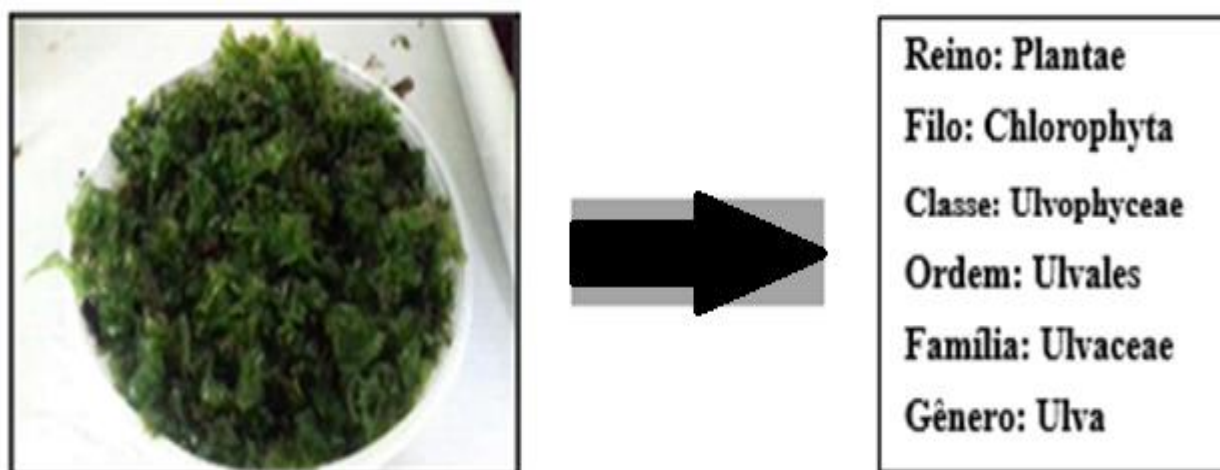
#### 3.2.1 Chlorophyta



As algas verdes (filo Chlorophyta), são encontradas em locais como troncos de árvores, solo e em associações simbióticas com fungos (liquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. A maioria é aquática e incluem pelo menos 1700 espécies (RAVEN, ANDREWS e QUIGG, 2005). Acumulam amido no interior das células e contêm os pigmentos clorofilas a e b, carotenos e xantofilas. Podem também serem ricas em lipídeos, podendo ser utilizadas para a produção de combustíveis renováveis, como biodiesel (GRANHAM, GRANHAM e WILCOX, 2009).

A presença de clorofilas a e b na mesma proporção da que ocorre nas plantas terrestres sustenta a ideia de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas superiores (BARBOSA, VALENTÃO e ANDRADE, 2014). Podem ser unicelulares como pluricelulares. As algas do gênero *Ulva*, exemplo desse grupo (**Figura 1**) são utilizadas para o tratamento de efluentes da maricultura em água de melhor qualidade, sem teores elevados de matéria orgânica (LARTIGUE et al., 2003).

**Figura 1:** Espécie de *Ulva*.



Fonte: Autor, 2020.

### 3.2.2 *Rhodophyta*

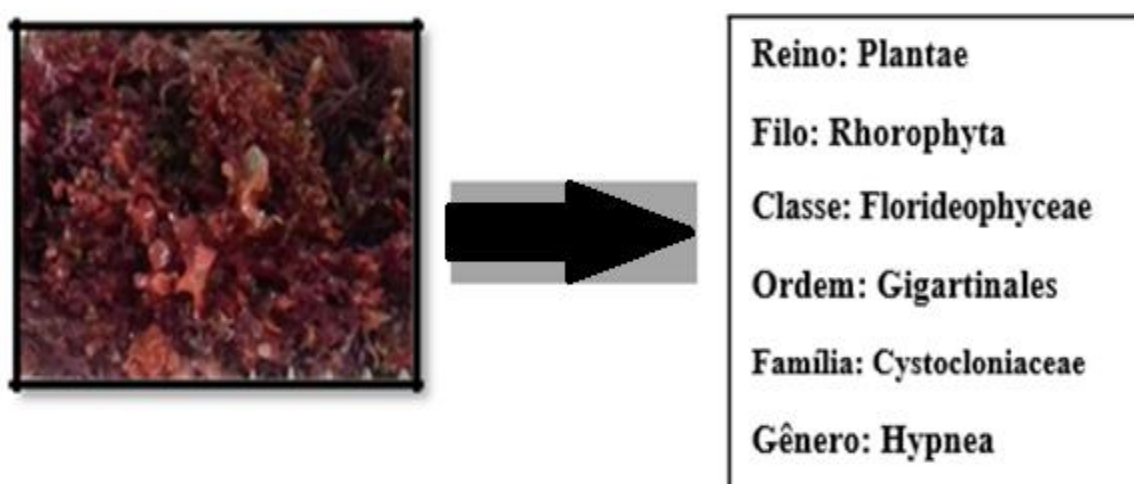
As algas vermelhas que dominam o filo Rodophyta, possuem como principal material de reserva o amido, encontrado no citoplasma, dominam as águas tropicais e quentes, porém podem ser encontradas em região frias. As algas vermelhas possuem clorofilas a e d e carotenoides, e armazenam amido como material de reserva (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

A cor verde da clorofila é mascarada pelo pigmento acessório ficoeritrina, que dá a cor vermelha. (RAVEN, ANDREWS e QUIGG, 2005). As algas podem ser encontradas praticamente em

qualquer lugar, desde nascentes de água doce a oceanos extremamente salinos e regiões polares, apresentando tolerância a uma vasta gama de valores de pH, temperatura, turbidez e concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (BARSANTI e GUALTIERI, 2006).

Em termos de compostos bioativos, considera-se que as Rhodophytas são as mais ricas, com mais de 1.500 substâncias relatadas, tanto em termos de abundância como diversidade. Com a exceção dos florotaninos, todas as principais classes de produtos naturais estão representadas nesse filo (AMSLER, 2008). Na **Figura 2** é possível a visualização do gênero *Hypnea*.

**Figura 2:** Espécie de *Hypnea*.



Fonte: autor, 2020

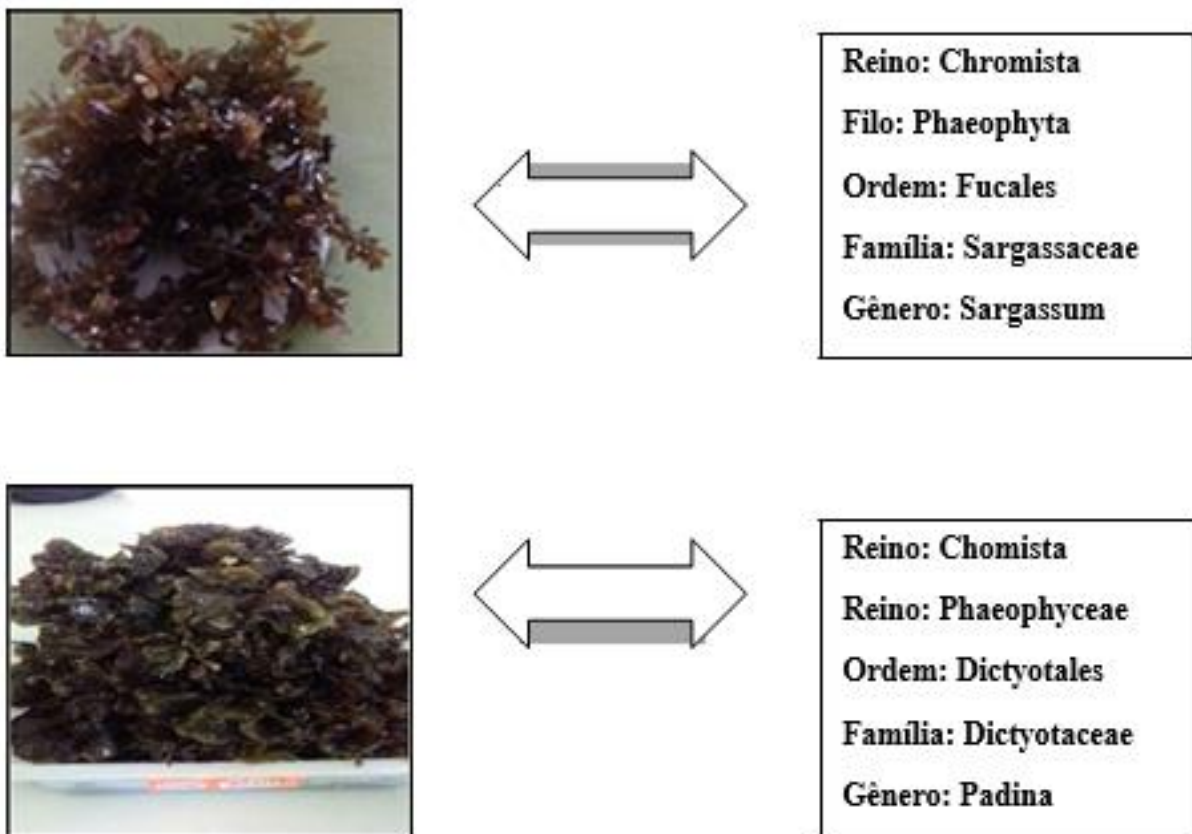
### 3.2.3 Phaeophyta

Ao menos 1500 espécies as macroalgas pardas são pertencentes ao filo Phaeophyta (RAVEN, ANDREWS e QUIGG, 2005). Segundo Vidotti e Rollemberg (2004), as algas pardas apresentam substâncias de reserva, tais como óleos e polissacarídeos e também são encontrados vários pigmentos tais como carotenoides e clorofilas a e c. Seus cloroplastos contêm vários carotenoides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, uma xantofila presente em seus cloroplastos, que mascara a clorofila e proporciona a sua cor característica (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2004).

Segundo Stahl e Sies (2005), os carotenoides desempenham importante papel como precursores de vitaminas antioxidantes e fotoquímicos. Marques et al. (2012) analisaram fucanas sulfatadas de *Padina gymnospora* e obtiveram redução de influxo de leucócitos pelo ensaio de células do exsudado peritoneal, mas nenhuma atividade citotóxica. Dentre os metabólitos secundários, são

encontrados no gênero *Sargassum* classes de compostos como as cumarinas, cromonas do tipo meroterpenoides, quinonas, ácidos quinônicos e terpenoides (ADAMS, GALLAGHER e DANNISON, 2009), alginatos, esteroides e proteínas a base de arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, valina e metionina (LI et al., 2011). (**Figura 3**)

**Figura 3:** Exemplos de Phaeophytas, gêneros *Sargassum* e *Padina*.



Fonte: Autor, 2020.

#### 3.2.4 *Sargassum spp.*

O *Sargassum* é um gênero de algas castanhas encontrado em zonas marítimas de maré baixa, em regiões tropicais e subtropicais, cresce sobre rochas e pedras em regiões de planície de recife (GANZON-FORTES et al., 1993). Em relação a taxonomia, o gênero *Sargassum* apresentam uma complexa forma de classificação, o gênero possui uma ampla variedade fenotípica, atribuída principalmente ao meio em que a espécie se encontra. Além das condições ambientais em que estão inseridas, há a ocorrência de hibridização entre muitas espécies de *Sargassum*. O *Sargassum* é uma

alga de eixo curto e ereto, a planta é constituída por um apressório, que tem a função de fixa da alga ao substrato, um eixo principal e ramos laterais (MOREIRA, CABRERA e SUÁREZ, 2006).

### 3.3 Litoral Alagoano

O Estado de Alagoas está situado na região tropical do Brasil, denominado zona Ocidental, com recifes de arenito espalhados ao longo de toda costa, formações coralinas, falesianas e manguezais mas que ainda não foram estudados de modo sistemático quanto a flora algológica (SILVA et al., 2008). O litoral alagoano está localizado na região nordeste do Brasil possui aproximadamente 230 km de linha de costa, entre as coordenadas geográficas 8°8'12" S e 10°29'12" S, dividido em litoral norte, central e sul (Figura 4) (CORREIA et al., 2015).

O Litoral Norte encontra-se distribuído entre os municípios de Maragogi e Barra de Santo Antônio, tendo ao todo nove municípios, como mostrado na **Figura 4**. O Litoral Central passa a ter 10 municípios, desde o município de Paripueira até Barra de São Miguel. O Litoral Sul compreende os municípios entre Roteiro até Penedo, com o total de seis municípios (CORREIA e SOVIERZOSKI, 2008).

O litoral Alagoano, considerando principalmente os recifes, as praias e os estuários com manguezais existem diferentes ecossistemas costeiros. Estes ecossistemas costeiros são responsáveis por grande parte da manutenção da produtividade pesqueira. As populações litorâneas interagem com estes ecossistemas sob diferentes formas, diretas e indiretas, principalmente através da pesca artesanal (CORREIA e SOVIERZOSKI, 2015).

**Figura 4:** Mapa do Estado de Alagoas subdividido em Litoral Sul, Central e Norte.

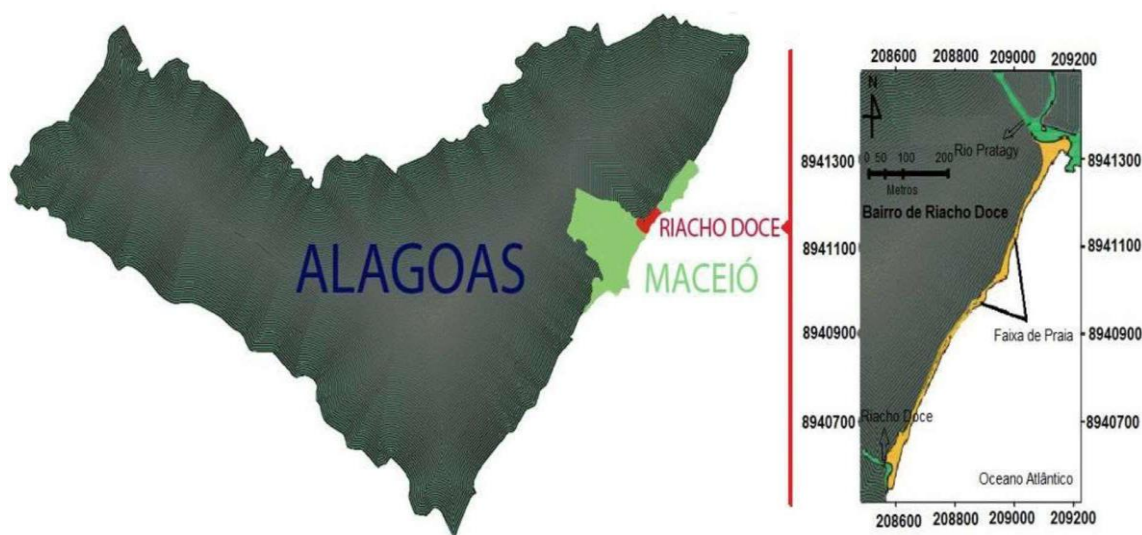


Fonte: ALMEIDA (2012).

### 3.3.1 Praia de Riacho Doce

Localizada na região metropolitana de Maceió, no bairro de Riacho Doce, a praia de Riacho Doce é situada cerca de 10 km do centro da capital, tendo Ipioca e Garça Torta como bairros limítrofes, a norte e sul respectivamente, correspondendo ao trecho da faixa litorânea compreendida entre duas desembocaduras fluviais: Riacho Doce e Rio Pratagy, com aproximadamente 1,047 km de extensão (ALMEIDA, 2012). É delimitada pelo retângulo envolvente através das coordenadas planas UTM N=8941361.0750m, E=209055.7350m e N=8940606.9732m, E=208565.9063m, no sistema de referência SAD69, Fuso 25 e Meridiano Central-33W. A **Figura 6** mostra em detalhes a área descrita.

**Figura 5:** Localização geográfica da área de estudo, linha de costa delimitada pelo Riacho Doce (local da coleta das macroalgas).



Fonte: ALMEIDA et al. (2013).

## 3.4 Fungos filamentosos

### 3.4.1 Biologia dos fungos

Em termos taxonômicos, os fungos verdadeiros estão agrupados em um reino a parte, o Reino Mycetae, mais conhecido como Reino Fungi (RAGHUKUMAR, 2017). Representam um dos grupos mais abundantes em relação à sua onipresença, sua ecologia e suas múltiplas formas morfológicas, contribuindo amplamente na vida cotidiana (WANG et al., 2017a).

Os fungos possuem características que os diferem dos outros seres vivos, compostos por estruturas chamadas de hifas, o conjunto forma o micélio, onde a parede celular é constituída de quitina e  $\beta$ -glucano. São seres eucarióticos, heterotróficos, por serem capazes de absorver energia luminosa e podem utilizar para produção de compostos orgânicos, podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos e tem reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos (WAITES et al., 2014; JUTURU e WU et al., 2014).

As características destes organismos são modelo para investigações genéticas. Por serem de natureza eucariótica mostram muitas das características das células humanas e, deste modo, podem ser usados como modelo mais útil para processos celulares do que bactérias (MORETTI & SARROCCO, 2015; BRANDL e ANDERSEN, 2017). Muitas espécies utilizadas como modelo para avanço de pesquisas compartilham de aspectos em comum: curto ciclo de vida, rápido crescimento, fácil manipulação em ambiente laboratorial e fácil identificação morfológica (WANG et al., 2017a). Além disso, possuem nutrição osmoheterotrófica, isto é, obtêm seus alimentos absorvendo pela superfície celular substâncias orgânicas dissolvidas (RAGHUKUMAR, 2017).

São de extrema e fundamental importância para a sustentação da vida na Terra principalmente, por seu papel ecológico na atuação no ciclo do carbono nos solos além de facilitarem a nutrição mineral para plantas e de carbono para outros organismos (TEDERSOO et al., 2014). Também importantes como fonte natural para obtenção de substâncias biologicamente ativas (VALASQUES et al., 2017). Podem ser encontrados em quase todos os lugares da natureza mostrando adaptação a uma variedade de ambientes diferentes (STÜBINGER et al., 2016), o que facilita sua obtenção e cultivo.

Os fungos filamentosos ditos benéficos são muito estudados devido ao crescimento apical e a capacidade enzimática e metabólica, exibindo assim um grande potencial industrial, trazendo diversas aplicações, como a produção enzimática extracelular (amilase, lipase, inulinase, pectinase, renina e protease), produção de bioemulsificantes, produção de pigmentos, entre outros bioprodutos (SANTIAGO e SOUZA-MOTA, 2008; SANTIAGO, SANTOS e MAIA, 2013).

A biomassa fúngica ou a fermentação com fungos é utilizada na indústria (comercialmente) com finalidade de isolar componentes celulares de interesse biotecnológico: solventes, químicos, enzimas (por exemplo, invertases e glucosidases), nucleotídeos, lipídeos (como exemplos os fosfolipídeos e ergosterol), proteínas (manoproteínas) e polissacarídeos (glucanas, mananas e galactanas) (FUKUDA et al., 2009).

Porém, apesar da eficiência dos fungos filamentos utilizados na biotecnologia inseridos em diversas áreas: alimentos, medicina, meio ambiente, agricultura indústria , fármaco e principalmente na natureza , também possuem impacto negativo, pois um número limitado é capaz de causar infecções oportunistas em plantas e em humanos, principalmente nos imunodeprimidos (PAULUSSEN et al., 2017).

#### 3.4.2. Gênero *Cunninghamella*

O gênero *Cunninghamella* está presente na classe dos Zygomycetes; ele exibe colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação, formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangíolos. Seu micélio, quando jovem, não exibe septo; a presença septação nas hifas está associada à idade da cultura (AHMED et al. 2006).

O gênero produz naturalmente grandes concentrações do ácido gama linolênico, que é um ácido graxo essencial, sendo recomendado no tratamento de tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e em alta pressão sanguínea. O ácido gama vem sendo extraído de plantas, mas neste tipo de produção usa-se grande áreas de plantio, então o estudos voltados par utilização dos microrganismos para produção dos mesmos. (ČERTIK, BALTESZOVA e ŠAJBIDOR, 1997; AHMED et al. 2006; SENA, 2006).

Os fungos do gênero *Cunninghamella* possui crescimento rápido, com esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação, sendo descritas mais de 12 espécies, com variação de coloração de branca a cinza (FREITAS et al., 2007). A *Cunninghamella sp.*, que são microrganismos encontrados em solos e plantas de zonas mediterrâneas e subtropicais, possuem uma importância nos processos biotecnológicos, pela capacidade de metabolizar a maioria dos xenobióticos, como os compostos aromáticos, drogas farmacológicas, ácido  $\gamma$ -linoleico (DAVIS, 1988; SUN et al., 2004).

Os fungos mais estudados são do das espécies *Cunninghamella bertholletiae*, *elegans* e *echinulata*. A *Cunninghamella bertholletiae* e *elegans* apresentam em sua parede celular altos rendimentos de quitina e quitosana, que são utilizados em processos de biodegradação, biorremediação, biotransformação e bioabsorção de metais (WHANG et al., 2008), possuindo também estruturas reprodutivas semelhantes e tem ação patógena nos animais e no ser humano (SUN et al., 2004). Já a espécie *Cunninghamella echinulata* uma das mais estudadas, por ser um produtor de ácido



$\gamma$ -linoleico e lipídeos, utilizando vários tipos de meios de cultura, como em glicose, casca de laranja e resíduo de tomate, entre outros (VICENTE et al., 2010; ROSSI et al., 2011).

### 3.4.3 Gênero *Penicillium*

O *Penicillium* é um gênero de fungos ascomicetos que possui grande potencial para uso em várias aplicações ambientais, biotecnológicas e industriais (YADAV et al., 2017). Composto por mais de 350 espécies que desempenham papel importante em vários processos naturais (NIELSEN et al., 2017). O *Penicillium*, lat. *Penicillus* = pincel, o comum bolor do pão, que cresce em matéria orgânica especialmente no solo e outros ambientes úmidos e escuros.

Chen et al. (2013) investigaram o polissacarídeo (Ps1-1) extracelular isolado de *Penicillium griseofulvum*, caracterizado como galactomanana contendo galactofuranose. Em outro estudo, três polissacarídeos do fungo *Penicillium sp.* foram isolados e caracterizados, sendo principalmente constituídos por manose e quantidades variáveis de glicose e galactose, e potencial propriedades antioxidantes (SUN et al., 2009). aplicações ambientais, biotecnológicas e industriais se dá devido à sua enorme diversidade e existência em ambientes extremos, podendo crescer a uma temperatura em torno de 0°C (MORETTI & SARROCCO, 2015; YADAV et al, 2017).

O interesse na utilização do fungo *Penicillium* está associado à sua capacidade de produção de metabólitos bioativos, o que leva ao crescimento do interesse de estudo desse gênero para exploração biotecnológica, trazendo benefícios nas diversas áreas (NIELSEN et al., 2017). Na indústria farmacêutica, são utilizados na produção de antibióticos (SILVA et al, 2006), sendo que o mais relevante a produção industrial de penicilina, o *Penicillium rubens* (as vezes também identificado como *P. chrysogenum*) (DOMÍNGUEZ-SANTOS et al., 2017), porém outras espécies são usadas para a produção de outros metabólitos secundários de interesse farmacêuticos, como na fabricação de estatinas (BARRIOS-GONZÁLEZ e MIRANDA, 2010).

Na fabricação de produtos alimentares são utilizadas enzimas produzidas por diferentes estirpes de *Penicillium* para melhorar o sabor, a produção de álcool, sabor e clareza de vinho e cerveja (NIGAM, ASTHANA & KUMAR, 2017).

Amplamente utilizado na indústria de laticínios devido a sua facilidade de adaptação aos substratos fornecidos por esta indústria. Diferentes estudos relataram grande potencial biotecnológico decorrente dos metabólitos produzidos por diferentes espécies desses fungos e que podem ser destinados a diferentes ramos industriais (RIZZELLO et al., 2017). Podem produzir celulasas com



um elevado teor específico de atividade, mas baixos títulos percentuais da enzima (SUN & CHENG, 2002).

É um dos fungos mais comuns que ocorrem em vários ambientes, como solo, ar e ambientes extremos (temperatura, salinidade, deficiência de água e pH), além de estar associado com plantas e produtos alimentares específicos.

#### 3.4.4 Gênero *Aspergillus*

O *Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez pelo biólogo italiano, Pietro Micheli no século XVIII. Existem mais de 200 espécies, sendo os mais citados: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (MARTINS et al., 2005; MURRAY et al., 2006; JIANG et al., 2013). Estes pertencem à família das Aspergillaceae, à classe Ascomycetos e à subclasse Euascomycetae. (RICHARDSON & WARNOCK, 2003). O gênero *Aspergillus* é um dos principais representantes dos fungos filamentosos.

Em relação ao *Aspergillus niger*, gênero *Aspergillus*, subgênero *Circumdati*, seção *Nigri* (SAMSON et al., 2014), trata-se de um dos fungos mais comuns do gênero podendo crescer em diferentes localidades associados a altos níveis de umidade e baixa intensidade de luz. É uma espécie conhecida de valor comercial substancial (GOFFREDO et al., 2017).

Consegue suportar locais secos e quentes sendo que a temperatura considerada ideal para seu crescimento seja entre 35-37°C, porém em temperaturas entre 6-47°C consegue também se multiplicar. Quanto ao pH excelente de crescimento é 6, porém, podem crescer entre valores de pH variando entre 1.5 e 9.8 (KRIJGSHELD et al., 2013), mostrando grande capacidade de adaptação. Possui conídios relativamente grandes de coloração negra, popularmente conhecido como “mofo negro” (SAMSON et al., 2014).

Porém, devido ao seu estilo de vida saprofítico, o *A. niger* é responsável pelo crescimento indesejado em alimentos, mas que lhe proporciona uma interessante oportunidade biotecnológica, possibilitando a produção de grande variedade de enzimas degradantes na biomassa, devido à biotransformação de compostos (BRANDL e ANDERSEN, 2017), e também permite a produção de uma diversidade de outros produtos de diferentes utilizações industriais e biomédicas significantes, como ácidos orgânicos de grande interesse econômico (PRAKASH & JHA, 2014).

Entre as enzimas mais proeminentes produzidas pelo *A. niger* estão a glicose oxidase, comumente utilizada para a quantificação de açúcar no sangue e a amilase que é amplamente utilizada

na indústria de alimentos para o processamento de amido (BRANDL e ANDERSEN, 2017). As celulasas têm um potencial de conversão biotecnológico único, sendo utilizadas em diferentes indústrias, como agricultura, cervejarias e vinhos, bioetanol, têxtil, processamento de alimentos, papel e celulose, extração de azeite e também utilizadas em ciências farmacêuticas e médicas (SHARADA et al., 2014).

### **3.5 Fermentação semi-sólida e produção de enzimas**

#### **3.5.1 Fermentação semi-sólida**

Para o processo fermentativo existem dois métodos de processos, desde antiguidade, para a produção de enzimas por microrganismos são conhecidos como fermentação submersa - FSb e no estado sólido ou fermentação semi-sólida – FES. Um dos parâmetros mais exaltados na diferenciação desses dois tipos de processos é o teor de água presente no meio reacional (CASTRO e JUNIOR, 2010).

A água possui diversas funções em um bioprocessos, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional e a absorção destes pelos agentes microbianos, bem como a remoção de metabólitos e a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos e da estabilidade da estrutura lamelar e da conservação da permeabilidade da membrana plasmática. Em relação ao cultivo de fungos filamentosos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas chave do metabolismo das células, ocasionando um desequilíbrio nas vias metabólicas; afetar os processos de germinação, esporulação e formação de metabólitos, assim como reduzir a taxa de crescimento microbiano e aumentar o período de aclimação celular (CASTRO e JUNIOR, 2010).

A fermentação em estado sólido é fundamentada no crescimento de microrganismos sobre a interfase sólidos úmidos na ausência ou próximo da ausência de soluções nutrientes livre entre as partículas de substratos sólidos. Este suporte pode ser qualquer substrato natural, que será usado como fonte de carbono e energia, ou ainda, pode servir como suporte inerte com o objetivo de ser enriquecido com solução nutriente (BHANU-PRAKASH et al., 2008; JONES et al., 2004).

A fermentação submersa (FSB) por sua vez, é definida como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Na FSB a água chega

a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade (SANTOS, 2012). De acordo com Lima, Michels e Amorim, 2000, este processo tem como principais desvantagens o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto/substrato.

Por definição, a fermentação semi-sólida é um processo de crescimento de microrganismos que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, estando a mesma apenas presente na estrutura do substrato sólido. Vários grupos de microrganismos podem crescer em substratos sólidos. Fungos filamentosos, no entanto, possuem maior capacidade de crescer na ausência de água livre (GERVAIS e MOLIN, 2003).

O cultivo de fungos filamentosos em substratos sólidos está sendo vastamente utilizado para diferentes propósitos em escala de laboratório como, por exemplo, fermentação koji, fermentação de lignocelulose, produção de esporos fúngicos e de micotoxinas. Entre as classes de fungos filamentosos, três se destacam por sua alta utilização: Ficomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos (PANDEY et al., 2011). Para a produção de enzimas (celulase, amilase, glucoamilase, etc), a espécie *Aspergillus niger* vem sendo bastante utilizado (PINTO et al., 2005).

Basicamente, o microrganismo é posicionado na superfície do substrato que contém níveis nutritivos e de umidade ótimos para o desenvolvimento do fungo. Resumidamente, existem duas possibilidades de configuração de ambiente para o microrganismo: a mais comum é quando o substrato também serve de suporte físico e tem origem natural (i.e. macroalgas, frutas); a menos comum é a utilização de um suporte inerte impregnado com um meio nutritivo (PINTO et al., 2005).

Outra técnica de fermentação é a submersa, que ao contrário da semi-sólida, acontece em meio onde há fluxo livre de líquido (melaços, caldos, etc). Os compostos bioativos são secretados no caldo de fermentação. O substrato é utilizado rapidamente, justificando a necessidade de reposição contínua dos nutrientes. Essa técnica é utilizada para microrganismos que necessitam de um nível elevado de umidade, como bactérias. A vantagem desse método é a purificação mais fácil dos produtos. É primariamente utilizada para a extração de metabólitos que necessitam ser usados na forma líquida (SANDHYA et al., 2005).

Em relação à produção enzimática, vários autores apresentaram resultados que mostram que a fermentação semissólida é mais eficiente, apresentando maior produção e atividade enzimática.

Justificam esse fenômeno com o fato de que os microrganismos estão naturalmente adaptados à ambientes terrestres (PANDEY et al., 2011). No entanto, as vantagens da fermentação submersa estão no controle do processo, que se levados à escala industrial, viabilizam a obtenção dos produtos desejados.

A fermentação sémi-sólido tem varias vantagens, entre as mais importante: o meio é constituído de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para crescimento microbiano; o tratamento de efluentes e disposição de resíduos é geralmente simples ou minimizados; o custo de esterilização é reduzido, pois se aquece menos água; o meio é facilmente aerado; redução, sensivelmente, o problema de contaminação bacteriana; torna-se possível a obtenção de esperos que são impossíveis de se obter em cultura submersa; entre outros. Entre as desvantagens, temos em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido; o controle de temperatura é crítico; entre outros (SANDHYA et al., 2005).

Temperatura, pH, tamanho da partícula e concentração inicial do inóculo, são algumas das variáveis que pode influenciar a fermentação. Dentre todos as variavies que influenciam a fermentação neste caso, a água tem papel de destaque, por causa do seu alto grau de interação com as substâncias que presentes na fase sólida. Na fermentação semi-sólida, água está co-relacionada a duas variáveis, a umidade, que estar relacionada à porcentagem de água na massa total do meio e a atividade de água ( $a_w$ ), relacionada a um parâmetro termodinâmico do potencial químico da água (GERVAIS e MOLIM, 2003).

### 3.5.2 Principais enzimas comercializadas e áreas de aplicação

As enzimas aceleram a velocidade de reações, são proteínas especializadas em catálise. Podem ser obtidas de diversas fontes como microbianas, animal e vegetal; e os processos em que se usam as enzimas como catalisadores são mais rápidos e eficientes. Sua aplicação é ampla na indústria, sendo utilizada nas indústrias têxteis, farmacêuticas, de alimentos e papel e celulose. (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Mundialmente, a aplicação das enzimas envolve diversas áreas de Biotecnologia, principalmente em áreas ligadas a Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharia Química. Seu uso é fundamental no desenvolvimento de novas matérias-primas, além da melhoria de processos industriais já existentes. Portanto, uma boa enzima irá agregar qualidade ao produto final do processo

em que foi utilizada, podendo reduzir custos de produção, e ampliar a fabricação de produtos em quantidades reduzidas disponíveis no mercado (LIMA et al., 2011).

No Brasil, atualmente, quando se propõe o uso de biomassa complexa (vegetal ou macroalgal), o grande gargalo tecnológico é o processo enzimático de hidrólise, considerado de enorme potencialidade. Isso se deve a grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras ser importada. Isso poderia ser mudado, visto que o país é considerado uma grande potência em biodiversidade de microrganismos e biomassas que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de bioprocessos promissores (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Na **Tabela 2**, se encontram algumas espécies de fungos filamentosos e as enzimas de interesse que produzem.

**Tabela 2:** Enzimas obtidas a partir de fungos.

| <b>Fungo produtor</b>            | <b>Enzimas comerciais</b>   |
|----------------------------------|---|
| <i>Aspergillus aculeatus</i>     | $\beta$ -glucanase, pectinase   |
| <i>Aspergillus melleus</i>       | protease  |
| <i>Aspergillus niger</i>         | aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, $\alpha$ -galactosidase, catalase, celulase, fitase, $\beta$ -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase. |
| <i>Aspergillus oryzae</i>        | aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, lactase, protease  |
| <i>Aspergillus pulverulentus</i> | pectinase   |
| <i>Chaetomium erraticum</i>      | dextranase  |
| <i>Chryphonectria parasitica</i> | protease aspártica  |
| <i>Humicola insolens</i>         | celulase, $\beta$ -glucanase, xilanase  |
| <i>Penicillium camembertii</i>   | lipase  |
| <i>Penicillium citrinum</i>      | lrotease  |
| <i>Penicillium funiculosum</i>   | pectinase, xilanase   |
| <i>Penicillium lilacinum</i>     | dextranase  |
| <i>Penicillium roqueforti</i>    | lipase  |
| <i>Rhizopus delemar</i>          | glucoamilase  |
| <i>Rhizopus niveus</i>           | glucoamilase, protease  |
| <i>Rhizopus oryzae</i>           | aminopeptidase, glucoamilase, lipase  |
| <i>Talaromyces emersonii</i>     | $\beta$ -glucanase  |
| <i>Trichoderma reesei</i>        | celulase, xilanase  |
| <i>Trichoderma viride</i>        | celulase  |

Fonte: Adaptado de MONTEIRO e SILVA, 2009.

Os desenvolvimentos de novas tecnologia possibilitou a ampliação do uso das enzimas, as “enzimas especiais” são utilizadas na medicina para o uso terapêutico, diagnósticos e pesquisas, há uma grande variedade de enzimas obtidas de diferentes fontes para usos terapêuticos. O Brasil possui um grande potencial de desenvolvimentos de novos fármacos enzimáticos, levando em consideração a vasta variedade de produtos naturais e de microrganismos (ZIMMER et al., 2009).

Na indústria têxtil, enzimas são utilizadas na redução do conteúdo poluente do efluente produzido durante os processos, também podem ser utilizadas para alterar a textura das fibras têxteis, sem a necessidade de adicionar nesse processo produtos nocivos ao meio ambiente. Para melhorar a qualidade dos fios de fibras têxteis, utiliza-se na indústria a goma de amido, que durante o processo elimina  $\alpha$ -amilase para que o processo de coloração não seja prejudicado (BON, FERRAMA e CORVO, 2008; MONTEIRO & SILVA, 2009).

Na indústria de papel e celulose, as enzimas mais utilizadas são a xinalase e celulase, ambas são utilizadas no branqueamento das pastas, substituindo o cloro, que tradicionalmente é utilizado para no processo (BON, FERRAMA e CORVO, 2008). Na indústria de cosméticos, as enzimas podem atuar de diversas formas, dificultam o aceleram reações bioquímicas, removem totalmente ou parcialmente estruturas da pele, ou podem proteger ou reparar a pele (SIM et al., 2003).

Na indústria alimentícia as enzimas têm ampla funcionalidades. Na panificação, a amilase e protease são adicionadas à massa de pão para facilitar a manipulação nas máquinas, além disso, a amilase aumenta a concentração de açúcares na massa, o que melhora o sabor do pão (AQUARONE et al., 2001). Na indústria de sucos de frutas, utiliza-se a pectinase para melhorar a extração, filtração e clarificação do suco, no processo de clarificação age desestabilizando substâncias flocculantes, havendo a clarificação. Na indústria de alimentos há uma ampla variedade de aplicações enzimáticas, incluem-se, aplicação em laticínios, produtos de limpeza, produção de xaropes, extração de óleos, extração de vinho e etc. (BON, FERRAMA e CORVO, 2008).

Setor de grande demanda atual, é o de biomassa para fins energéticos e de química fina, utilizando enzimas na desconstrução da biomassa lignocelulósica e micro/macroalgal com a finalidade de utilizar, principalmente, seus polissacarídeos em processos biotecnológicos. Enzimas produzidas a partir de 2010 pelas empresas Genencor e Novozymes visando, entre outras, aplicação em biomassa lignocelulósica são: Genencor - Accellerase 1500, Accellerase XPAccellerase XC, Accellerase BG, Accellerase Duet (contém xilanases) e Novozymes - Cellic Ctec, Cellic Htec.

No entanto para macroalgas, ainda é deficiente no que se refere a complexos enzimáticos adaptados, e estudos são conduzidos com complexos que geralmente são usados para biomassa

lignocelulósica. Como exemplos, complexos enzimáticos comerciais que estão sendo testados para a conversão das macroalgas incluem o uso de celulasas (YANAGISAWA et al., 2011; KUMAR et al., 2013; BORINES, LEON e E CUELLO, 2013; TRIVEDI et al., 2013; HONG, JEON e LEE, 2014; TAN e LEE, 2014; KIM, LEE e JEONG, 2014; WU et al., 2014), hemicelulasas (YANAGISAWA et al., 2011; HONG, JEON e LEE, 2014), laminarinases (ADAMS, GALLAGHER e DANNISON, 2009), lactases (HONG, JEON e LEE, 2014) e amilases (HONG, JEON e LEE, 2014; YANAGISAWA et al., 2011). Algumas enzimas comerciais e parâmetros ótimos de hidrólise de biomassa de macroalgas podem ser verificados na **Tabela 3**. Percebe-se que ainda é limitado a quantidade de dados disponíveis sobre o tema.

**Tabela 3:** Temperatura e pH ótimo de algumas enzimas e concentrados enzimáticos comerciais na hidrólise de macroalgas.

| Complexo enzimático | Tipo principal da enzima | Temp. de ação (°C) | pH de ação | Referência              |
|---------------------|--------------------------|--------------------|------------|-------------------------|
| Lactozym            | Lactase                  | 37                 | 6,5        | Hong, Jeon e Lee (2014) |
| Spirizyme           | Celulase                 | 60 - 63            | 4,2 - 4,5  | Hong, Jeon e Lee (2014) |
| Viscozyme L         | Celulase e xilanase      | 25 - 55            | 3,3 - 5,5  | Hong, Jeon e Lee (2014) |
| AMG                 | Glucoamilase             | 60                 | 4,5        | Hong, Jeon e Lee (2014) |
| Celulase            | Celulase                 | 55 - 65            | 4,5 - 5,0  | Tan e Lee (2014)        |
| B-glucosidase       | Celulase                 | 55 - 65            | 4,5 - 5,0  | Tan e Lee (2014)        |

Fonte: Autor, 2020.

### 3.5.3 Fatores que influenciam a ação enzimática

Condições de reação (tempo, temperatura e pH), as quais normalmente são amenas, bem como a composição do meio específico e o tempo de fermentação também apresentam grande importância no processo enzimático (SUN & CHENG, 2002; COELHO, SALGADO e RIBEIRO,

2008). Essas condições de reação são importantes seja na produção enzimática por fermentação/extração que em reações conduzidas para se quantificar a enzima produzida em extratos ou testar sua eficácia em substratos específicos.

Segundo, Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), fatores que influem sobre a eficiência da ação enzimática são a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Devido a suas características, as enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH e são sensíveis às mudanças de acidez ou alcalinidade em seu meio.

Em temperaturas elevadas, a velocidade de desnaturação da enzima é muito alta podendo acontecer que a atividade enzimática se anule pouco tempo após o início do ensaio. Em relação a influência do pH, em ensaios pode-se utilizar tampão para garantir a faixa estreita de ação da enzima e garantir-lhe maior estabilidade (FONTES, RIBEIRO e SILLERO, 2012).

Tamanho das partículas, pode ser um fator inibitório e a taxa de hidrólise se torna mais lenta, visto que, a área superficial disponível para as enzimas é menor (GAN, ALLEN e TAYLOR, 2003). Presença de matérias que não estejam sob a ação da enzima em questão, como por exemplo, a lignina da biomassa lignocelulósica em presença de celulase (ZHENG et al., 2009). Portanto, a remoção da lignina durante o pré-tratamento é essencial para aumentar a taxa de hidrólise (RAMOS, 2003).

### **3.5 Alginato e Alginase:**

#### **3.6.1 Alginato**

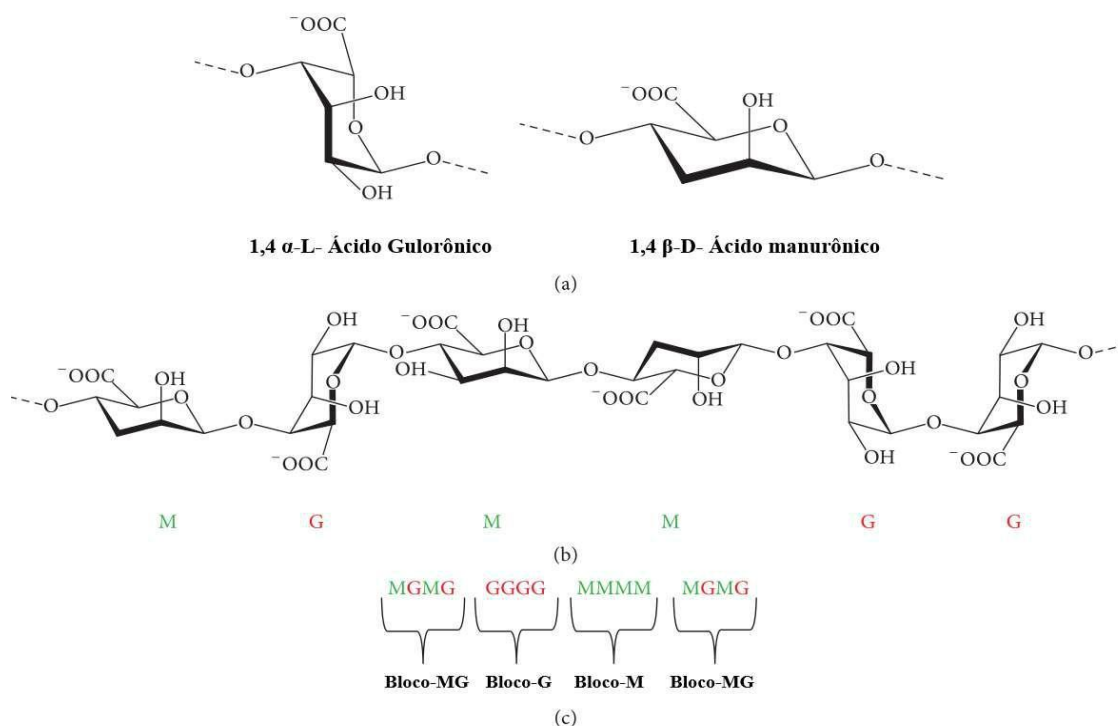
Os alginatos são um grupo de polissacarídeo aniônico de ocorrência natural, derivado principalmente das algas marrons, incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, e *Macrocystis pyrifera* (SMIDSROD e SKAJÂK-BRAEK, 1990), de espécies de *Sargassum* (REGALADO et al., 2007; BERTAGNOLLI et al., 2014), além de alguns gêneros bacterianos (*Azotobacter*, *Pseudomonas*) (WONG et al., 2000). O alginato comercial geralmente é extraído das algas marrons (Phaeophyceae) a partir de soluções alcalinas, frequentemente é usado o NaOH (CLARK e GREEN, 1936). O extrato obtido é filtrado e adiciona-se cloreto de sódio ou de cálcio, formando um sal de alginato, que a partir de um tratamento com HCl pode ser convertido em ácido algínico.

Os Alginatos são constituído pelos ácidos 1,4  $\beta$ -D-ácido manurônico (M) e 1,4  $\alpha$ -L-ácido Gulorônico (G) (Figura 6). O Alginato pode ser organizado em três blocos, dois homogêneos,  $\beta$ -D-manuronato(polyM) e  $\alpha$ -L-guluronato(polyG), e um heterogêneo, heteropolímero (polyMG). Embora



um alginato possua predominantemente apenas um bloco, todos os três podem estar presentes em uma única molécula de alginato (WONG et al., 2000; SZEKALSKA et al., 2016).

**Figura 6:** Estrutura do Alginato: monômeros (a), conformação da cadeia (b) e distribuição dos blocos (c).



Fonte: SZEKALSKA et al. (2016).

### 3.6.2 Alginase (alginate lyase)

A alginase atua como catalisador da despolimerização do alginato por meio de reação de  $\beta$ -eliminação de 4-O-glycosyl para formar uma ligação dupla entre os carbonos C4 e C5 das ligações glicosídicas, produzindo piranossiluronato de 4-desoxi-L-eritro-hex-4-eno na extremidade não redutora dos oligossacarídeos resultantes (PREISS e ASHWELL, 1962). Sua atividade enzimática vem sendo estudada em uma grande variedade de substratos, já que as especificidades dos substratos influenciam diretamente no grau de polimerização da alginase sobre o alginato (Tabela 4). Essa enzima tem sido isolada e caracterizadas a partir de algas marrons, moluscos marinhos, bactérias marinhas e bactérias terrestres. Além desse organismo, a alginase também foi descoberta em fungos e vírus (WONG et al., 2000; ZHU e YIN, 2015).

**Tabela 4:** Organismos produtores de alginase e a especificidade de sua enzima.

| <b>Organismo</b>                    | <b>Especificidade do substrato</b> |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Bactérias terrestres:</b>        |                                    |
| <i>Sphingomonas sp. strain A1</i>   | PolyM                              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | PolyM                              |
| <i>Pseudomonas sp. QD03</i>         | PolyM                              |
| <i>Azotobacter vinelandii</i>       | PolyM                              |
| <i>Azotobacter chroococcum</i>      | PolyM                              |
| <i>Enterobacter Cloacae</i>         | PolyG                              |
| <i>Corynebacterium sp.</i>          | PolyG                              |
| <b>Bactérias marinhas:</b>          |                                    |
| <i>Alteromonas sp. strain H-4</i>   | PolyM, PolyG e PolyMG              |
| <i>Vibrio sp. 510</i>               | PolyG                              |
| <i>Vibrio sp. O2</i>                | PolyM                              |
| <i>Vibrio sp. QY 101</i>            | PolyM e PolyG                      |
| <i>Streptomyces sp. ALG-5</i>       | PolyG                              |
| <i>Pseudoalteromonas sp. SM0524</i> | PolyM e PolyG                      |
| <b>Moluscos e crustáceos:</b>       |                                    |
| <i>Littorina spp.</i>               | PolyM                              |
| <i>Littorina brevicula</i>          | PolyM e PolyG                      |
| <i>Haliotis spp.</i>                | PolyM                              |
| <i>Haliotis tuberculata</i>         | PolyM e PolyG                      |
| <i>Haliotis discus</i>              | PolyM e PolyG                      |
| <i>Haliotis iris</i>                | PolyM e PolyG                      |
| <i>Orchonectes rusticus</i>         | PolyM e PolyG                      |

Fonte: Adaptado de SUBARYONO et al. (2013)

De acordo com a especificidade do substrato, a alginase pode ser classificada em dois grupos, no primeiro, a alginase despolimeriza o bloco polyM, formando a poli ( $\beta$ -D-manuronato) liase (EC4.2.2.3), já o segundo grupo, com a consequência da atividade hidrolítica, a alginase atua no bloco polyG, formando a poli ( $\alpha$ -L-guluronato) liase (EC 4.2.2.11) (SUBARYONO et al., 2013). Grande

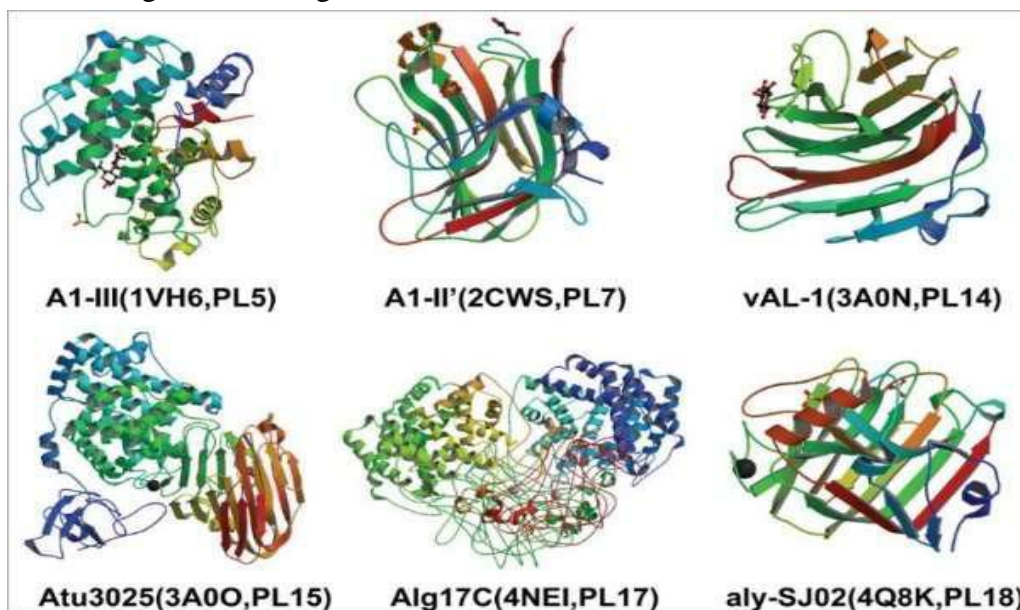
parte das enzimas estudadas, apresentam maior afinidade pelo substrato polyM. Contudo, há aquelas com afinidade ao substrato polyG (WONG et al., 2000).

De acordo com seu modo de ação, a alginase pode ser classificada como endolítica, quando essa enzima cliva as ligações glicosídicas no interior do polímero alginato e ocorre a liberação de oligossacarídeos insaturados (di-, tri- e tetrassacarídeos) como principais produtos (KIM et al., 2012), ou como exolítica, quando os monômeros ou dímeros de alginatos são removidos nas extremidades do polímero (WONG et al., 2000). Baseado em semelhanças nas sequências de aminoácidos, as alginases são distribuídas em sete famílias de polissacarídeo liase (PL, 5, 6, 7, 14, 15, 17 e 18), com a base de dados Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) (**Figura 7**) (CANTAREL et al., 2009; AGULHON et al., 2012).

A maioria das alginases endolíticas bacterianas fazem parte das famílias PL-5 e PL-7, já as alginases bacterianas exolíticas estão agrupadas nas famílias PL-15 e PL-17, dessa forma, a grande maioria das alginases provenientes de bactérias são dessas famílias. As alginases isoladas de moluscos e vírus marinhos estão associadas à PL-14. As alginases bifuncionais pertencem à família PL-18, as demais enzimas estão dispostas nas outras seis famílias (HEHEMANN, BORASTON e CZJZEK, 2014).

Outra classificação para a alginase relaciona o seu peso molecular em três grupos: pequeno (25-30 kDa), tamanho médio (aproximadamente 40 kDa) e grande (>60 kDa) (ZHU e YIN, 2015).

**Figura 7:** Estruturas globais das alginases de diferentes famílias.



Fonte: DONG et al. (2014).

### 3.6.3 Prospecção tecnológica sobre a produção de alginase microbiana

Analisando a busca por novas tecnologias, realizou-se uma prospecção tecnológica de artigos científicos e em base de patentes buscando se confirmar a baixa disponibilidade de literatura do tema abordado nessa tese. A prospecção foi baseada no levantamento de artigos científicos, utilizando as bases SCIENCE DIRECT (SCIENCE DIRECT, 2020), (SCIELO, 2020) e SCOPUS (SCOPUS, 2020). Na prospecção das patentes, foram utilizadas as bases: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2020), World Intellectual Property Organization (WIPO, 2020), versão free do Patent inspiration (PI, 2020), EspaceNet Patent search (EspaceNet, 2020) e Derwent World Patents Index (DWPI, 2020), sendo que a pesquisa de patentes ficou entre os anos de 1997 a 2018, com algumas patentes protegidas pelo período de sigilo, mas incluídas na investigação (as pesquisas foram realizadas no mês de Abril de 2020).

Considerando a investigação referente às pesquisas científicas em artigos publicados em periódicos especializados, foram obtidos os resultados que estão colocados na **Tabela 5**, quanto ao número de artigos encontrados.

**Tabela 5:** Número de artigos recuperados a partir das palavras-chave por base de periódicos.

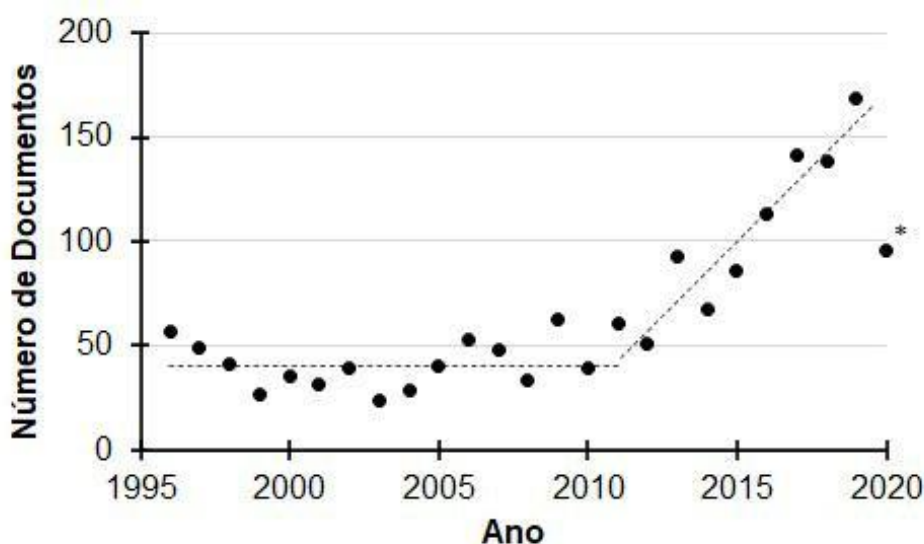
| PALAVRAS CHAVES                                | BANCOS DE DADOS |               |            |
|--|-----------------|---------------|------------|
|  | Science Direct  | Scopus        | Scielo     |
| “Enzyme Fermentation”                          | 107.672         | 34.535        | 278        |
| “Alginate”                                     | 57.281          | 36.974        | 351        |
| “Alginate lyase”                               | 2.111           | 771           | 2          |
| “Alginate lyase and Fermentation”              | 927             | 51            | 1          |
| “Bacteria and Alginate lyase”                  | 1.446           | 363           | 1          |
| “Fungi and Alginate lyase”                     | 786             | 26            | 0          |
| “Bacteria and Fermentation and Alginate lyase” | 769             | 22            | 0          |
| “Fungi and Fermentation and Alginate lyase”    | 506             | 4             | 0          |
| “Alginate lyase and semissolid fermentation”   | 0               | 0             | 0          |
| <b>TOTAL</b>                                   | <b>170.223</b>  | <b>72.720</b> | <b>633</b> |

Fonte: Autor, 2020.

Analisando a Tabela 5 pode-se observar a grande imponente que a fermentação enzimática possui nos textos científicos, superando os 100 mil documentos no banco do Science Direct. Além disso, também percebe-se a grande quantidade de artigos relacionados ao polímero alginato, constituindo quase 60 mil documentos, principalmente a suas propriedades como hidrocoloide. Nesse sentido, o número de documentos relacionados a enzima alginase é bem menor, um pouco mais de 2 mil documentos, no entanto, deve-se ressaltar que na maioria das vezes não está diretamente ligado ao trabalho desenvolvido nessa tese, que é a avaliação de condições de fermentação de alginase microbiana; ao invés de, por exemplo; caracterização estrutural química da enzima, purificação e estabilidade, ou utilização direta da enzima aplicada em bioprocessos. Por isso a examinação dos títulos e resumos desses documentos é de extrema importância para uma triagem inicial e posterior análise na íntegra dos documentos.

De forma a ressaltar o aumento da relevância dessa pesquisa, na **Figura 8**, se verifica a quantidade de documentos publicados tendo como palavra-chave alginase (alginate lyase) na base Science Direct (a mais expressiva dentre as presentes na Tabela 5); entre 1996-2020 e percebe-se que a partir de 2010 há um interesse crescente nessa classe de enzimas.

**Figura 8:** Quantidade de documentos por ano na base Science Direct utilizando a palavra-chave Alginate Lyase.



\*A pesquisa foi realizada até abril de 2020.

Fonte: Autor, 2020.

Foram encontrados 30 documentos que descreviam em detalhes o processo fermentativo de alginase microbiana, compostos pelas seguintes referências: Hansen et al. (1984), Schaumann e Weide (1990), Sawabe, Ezura e Kimura (1992), Boyd e Chakrabarty (1994), Effekhar e Schiller (1994), Malissard et al. (1995), Nagakawa et al. (1998), An et al. (2008), An et al. (2009), Kobayashi et al. (2009), Konno et al. (2009), Li et al. (2011a), Li et al. (2011b), Elahwany e Elborai (2012), Huang et al. (2013), Lavin et al. (2013), Koti et al. (2014), Sivakumar, Sathysa e Ponmanickam (2015), Beltagy et al. (2016), Li et al. (2017), Shankar et al. (2016), Zhu et al. (2016), Tavafi et al. (2017), Wang et al. (2017b), Chen et al. (2018), Hifney et al. (2018), Li et al. (2019), Sun et al. (2019), Mohapatra (2020), Qiao et al. (2020).

Todos os documentos estavam relacionados a fermentação submersa, utilizando alginato de sódio como indutor e, geralmente, cepas bacterianas, portanto; com características totalmente diferentes da proposta dessa tese, que englobam fermentação semissólida, utilização de biomassa macroalgal residual in natura (não apenas alginato de sódio puro) e utilização de fungo filamentoso, e, por essa razão; não serão destrinchados nesse momento por não haverem possibilidade de compração efetiva com o trabalho desenvolvido nessa tese.

Alguns detalhes podem ser mencionados, como por exemplo, a presença de fungos filamentosos produtores de alginase, que, quando mencionado, é feito por fermentação submersa como *Trichoderma reesei* (KONNO et al., 2009), *Aspergillus oryzae* (SINGH et al., 2011) e *Aspergillus fumigatus* (PAPI et al., 2012), *Aspergillus niger*, *Dendryphiella arenaria*, *Eurotium chevalieri*, *Chaetomium funicola*, *Stachybotrys chartarum* e *Emericella nidulans* (SCHAUMANN e WEIDE, 1990; HIFNEY et al., 2018); portanto, apesar de utilizar geralmente cepas bacterianas, fungos também são capazes de produzir essa enzima. Não se encontrou trabalhos utilizando *Cunninghamella echinulata*.

Além disso, engenharia genética tem sido usada utilizada para expressar essa enzima incluir essa característica em *Escherichia coli*, que recebeu genes de outras espécies, como por exemplo, *Vibrio* sp. QY102 (RAVANAL et al., 2017; SUN et al., 2019) e com a levedura *Yarrowia lypolitica* que recebeu genes de *Agarivorans* sp. L11 (LI et al., 2019).

Por outro lado, no levantamento de informações referentes às patentes disponíveis nas bases de pesquisa, foram obtidos os resultados que estão dispostos na **Tabela 6**. Pelo que se percebe, interessantemente, houve um maior número de documentos assinalados em relação ao número de artigos nas bases pesquisadas, isso pode ressaltar que há uma demanda tecnológica por esse produto.

Houve uma leitura de seus resumos para triagem das publicações relacionadas a fermentation and alginate lyase, e embora um alto número de resultados tenha sido obtido, muitas das publicações não eram correlatas com o tema proposto nessa tese. Para exemplificar, encontrou-se, entre outros: método para aumento na taxa de micorriza fúngica (JPH09241112A) (TAKAAKI et al., 1997), métodos de tratamento contra o câncer (US10517897B1) (AVAK et al., 2019) e processo de biodegradação de resíduo de pescado utilizando flora microbiana marinha (EP2515674) (LÓPEZ-CERVANTES, SÁNCHEZ-MACHADO e ROCHIN, 2016).

Nesse sentido, relacionados a fermentação microbiana para a produção de alginase foram encontrados 8 documentos, relacionados exclusivamente com cepas bacterianas e utilizando cultivos submersos e agitados e/ou aerados, notadamente diversos da proposta dessa tese, fermentação semi-sólida estática utilizando fungo filamentosos, a citar: Murata et al., (2012) (US20120220004), Zhang et al. (2012) (CN102586150A), Li e Wang (2013) (CN102864136A), Xiao et al. (2015) (CN104651339B), Li et al. (2018) (CN108277184A), Chen et al. (2019) (CN109295043A) e Zhang (2019) (CN110195051A).

As principais espécies, quando citadas, foram *Bacillus* sp. (LI et al., 2018), *Sphingomonas* sp. (MURATA et al., 2012) e *Tamlana* et al. (ZHANG et al., 2012), mas interessantemente, assim como na prospecção dos artigos encontrou-se documentos sobre cepas de *Escherichia coli* (bactéria) modificadas geneticamente para produzir alginase (LI e WANG, 2013; CHEN et al., 2019)

**Tabela 6:** Número de documentos recuperados a partir das palavras-chave por base de patentes.

| PALAVRAS CHAVES                                | BANCOS DE DADOS |                |                |                |                    |
|--|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
|  | INPI            | WIPO           | Derwent        | EspaceNet      | Patent Inspiration |
| “Alginate”                                     | 246             | 488.871        | 234.453        | 275.268        | 229.924            |
| “Enzyme Fermentation”                          | 95              | 203.197        | 132.546        | 2.324          | 127.568            |
| “Alginate lyase”                               | 0               | 10.501         | 2.345          | 828            | 4269               |
| “Alginate lyase and Fermentation”              | 0               | 3.201          | 756            | 294            | 48                 |
| “Bacteria and Alginate lyase”                  | 0               | 6.118          | 210            | 533            | 35                 |
| “Fungi and Alginate lyase”                     | 0               | 3.991          | 324            | 218            | 1                  |
| “Bacteria and Fermentation and Alginate lyase” | 0               | 2.085          | 190            | 252            | 8                  |
| “Fungi and Fermentation and Alginate lyase”    | 0               | 1.992          | 78             | 109            | 0                  |
| “Alginate lyase and semisolid fermentation”    | 0               | 0              | 0              | 0              | 0                  |
| <b>TOTAL</b>                                   | <b>341</b>      | <b>719.956</b> | <b>370.902</b> | <b>279.826</b> | <b>361.853</b>     |

Fonte: Autor, 2020.

Comercialmente, foram encontradas dois produtos para venda com informações técnicas suficientes. O primeiro, da Sigma-Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1603?lang=pt&region=BR>), no qual a alginase custava R\$ 1.152/100mgproduto com atividade de  $\geq 10.000\text{U/g}$  (considerando como atividade (U) o aumento de 1,0 na absorbância a 235 nm de uma solução de 0,1% de alginato de sódio por minuto por mL; cotação feita em 12/04/2020).

A outra alginase foi apresentada pela Megazyme ® (<https://www.megazyme.com/Alginate-lyase-sphingomonas-sp>), com preço de \$ 205.20 por 5 mil unidades; produto com atividade de 2500 U/mL e atividade específica de 120U/mgproduto, a partir de Sphingomonas sp. recombinante (U definida como o incremento de 1 na absorbância de uma solução de alginato de sódio a 235 nm em pH 7,2 (Tris-HCl 100 mM) a 40°C por minuto por mL; cotação verificada em 12/04/2020).

Além desses, se verificou também quatro produtos oferecidos pela Creative Enzymes®, nos quais dois são os supracitados, e os outros dois se referiam a uma alginase específica para manuronatos (mannuronate-specific alginate lyase) e uma alginase de Saccharophagus degradans recombinante (E. coli), mas sem informações técnicas adicionais como atividade do produto.



Esses valores mostram que a alginase representa uma ótima alternativa para a obtenção de um produto de valor agregado.

### 3.6.4 Fermentação de alginase

Como mencionado anteriormente, muitos estudos buscaram aperfeiçoar processos fermentativos, tendo como finalidade a produção de enzimas. Para ampliar a escala de produção enzimática, é necessário determinar previamente o microrganismo que será empregado no processo, o meio de cultura e as condições adequadas de agitação e aeração. Portanto esse trabalho, analisou alguns estudos da literatura e verificou os parâmetros utilizados que foram utilizados na fermentação de alginase. Em sua maioria, foram utilizadas cepas bacterianas marinhas e fermentação submersa, utilizando cultivos a 30°C e agitados, as vezes aerados, tendo alginato de sódio como indutor.

Em seu estudo, Li et al. (2011a) inoculou a bactéria *Pseudoalteromonas sp.* SM0524 em 150 mL de um meio líquido otimizado, contendo 0.5% de peptona, 0.1% de extrato de levedura, 0.2% de alginato de sódio, 2.5% de NaCl (pH 7.0), em um bioreator de 500 mL e incubou em um agitador rotativo (180 rpm) em 15°C por 60 h para atingir a maior atividade enzimática da alginase no meio de cultura. Por outro lado, Beltagy et al. (2016) inoculou *Pseudomonas stutzeri* MSEA04 em meio contendo 2% alginato de sódio, 0,4% extrato de levedura, 0,2%  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0,001%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 5% NaCl. Depois foi incubada a 37°C por 24 h em uma rotação de 120 rpm.

*Bacillus sp.* Alg07 foi cultivado em um meio líquido, contendo 1 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 9 g/L de alginato de sódio, 5 g/L de NaCl, 1 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5 g/L de KCl e 4 g/L de  $CaCl_2$  (pH 6.5), por 24 h a 30°C com uma rotação de 180 rpm (CHEN et al. 2018). A bactéria *Vibrio sp.* SY08 foi cultivada em um meio líquido, contendo 5 g/L de alginato de sódio, 30 g/L de NaCl, 0,01 g/L de  $MgSO_4$ , 2 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,02 g/L de  $FeSO_4$ , 3 g/L  $K_2HPO_4$  e 7 g/L  $KH_2PO_4$ , por 48 h a 25°C com uma rotação de 120 rpm (LI et al. 2017).

A bactéria *Agarivorans sp.* JAM-A foi inoculada em meio líquido contendo 0,5% polipeptona, 0,5% de extrato de levedura, 2% de NaCl, 0,2% de alginato de sódio, 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01%  $K_2HPO_4$  e 0,002%  $MnCl_2$ ; durante 24h a 30°C (KOBAYASHI et al. 2009). *Flavobacterium sp.* S20 foi incubada em um meio, contendo 0,7% de alginato de sódio, 0,5 % de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5% de NaCl, 0,1% de  $KH_2PO_4$ , 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02%  $CaCl_2$  e 0,002 %  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (pH 7.2), por 36 h a 30°C. Após isso as colônias eram colocadas em um meio líquido, constituído de 1% de alginato de

sódio, 0,1% de peptona, 0,1% extrato de levedura e os mesmos sais minerais descritos acima, incubadas por 2 dias a 30°C com uma rotação de 150 rpm (HUANG et al., 2013).

Na **Tabela 7**, podem ser verificados os máximos valores de atividade enzimática encontrados nos diferentes estudos mencionados acima, é importante ressaltar que as metodologias, assim como o conceito de atividade enzimática são diferentes e isso evita uma comparação adequada entre os estudos, mas isso será descrito em detalhes na seção 3.6.4.

Encontrou-se a produção por fermentação submersa utilizando biomassa macroalgal (*Crystoseira trinodis*) como substrato a partir das espécies fúngicas *Aspergillus niger*, *Dendryphiella arenaria*, *Eurotium chevalieri*, *Chaetomium funicola*, *Stachybotrys chartarum* e *Emericella nidulans*, a 28 °C e 120 rpm com a biomassa macroalgal e água do mar para crescimento obtendo-se até 20U/mL (incremento de 0,01 na absorbância a 235 nm por min por mL) (HIFNEY et al., 2018).

O único artigo encontrado de fermentação semi-sólida utilizando macroalga rica em alginato para alguma finalidade foi o proposto por Wang et al. (2016) e intitulado “Response surface methodology based on the optimization for degradation of algin in *Laminaria japonica* feedstuff via fermentation by *Bacillus* in *Apostichopus japonicus* farming”. Nesse artigo, uma fermentação semi-sólida foi conduzida utilizando uma cepa de *Bacillus* (bactéria) com a finalidade da biodegradação de grande quantidade de alginato presente na *L. japonica* com o objetivo de verificar a capacidade de utilização da macroalga semidigerida como uma fonte de alimento vegetal de alta qualidade no cultivo de pepinos do mar, aumentando-se a bio-disponibilidade de nutrientes, removendo ou reduzindo os componentes de difícil digestibilidade, os convertendo em formas mais assimiláveis.

**Tabela 7:** Resultados da expressão enzimática nos diferentes estudos.

| Organismo                              | T (°C) | pH ideal | U <sub>máxima</sub> | Referência              |
|--|--------|----------|---------------------|-------------------------|
| <i>Pseudoalteromonas sp.</i><br>SM0524 | 50     | 8,5      | 62,6 U/mL           | (LI et al. 2011a)       |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i><br>MSEA04  | 37     | 7,5      | 121,8 U/mg          | (BELTAGY et al. 2016)   |
| <i>Bacillus sp.</i><br>Alg07           | 40     | 7,5      | 8306,7 U/mg         | (CHEN et al. 2018)      |
| <i>Vibrio sp.</i><br>SY08              | 40     | 7,6      | 1070,2 U/mg         | (LI et al. 2017)        |
| <i>Agarivorans sp.</i><br>JAM-11m      | 30     | 10,0     | 108,5 U/mg          | (KOBAYASHI et al. 2009) |
| <i>Flavobacterium sp.</i><br>S20       | 45     | 8,5      | 1,34 U/mL           | (HUANG et al. 2013)     |

Fonte: Autor, 2020.

### 3.6.5 Metodologias para determinação de atividade da alginase

A grande dificuldade de comparação dos artigos existentes é a dificuldade de medir a expressão e atividade enzimática, e nessa revisão bibliográfica, também, teve-se a função de levantar essa discussão e mostrar a necessidade de uniformização dessa representação para possibilitar uma coerente comparação entre os estudos publicados.

Os principais métodos usados para o cálculo da atividade de extratos contendo alginase são: utilizando a redução da viscosidade de uma solução de alginato de sódio (NAGAKAWA et al., 1998; AN et al., 2008; AN et al., 2009), diferença de absorbância por grupos específicos a 235 nm (SAWABE, EZURA e KIMURA, 1992; LI et al., 2011a; KOTI et al., 2014; WANG et al., 2017b; TAVAFI et al., 2017; HIFNEY et al., 2018; LI et al., 2019; MOHAPATRA, 2020), formação de  $\beta$ -formil-piruvato (método do ácido tiobarbitórico) com leitura espectrofotométrica em 548 nm (SCHAUMANN E WEIDE, 1990; BOYD e CHAKRABARTY, 1994; EFFEKHAR E SCHILLER, 1994; TAVAFI et al., 2017), e medição dos monossacrídeos liberados por DNS a 540 nm (LAVIN et al., 2013; SIVAKUMAR et al., 2015; SHANKAR et al., 2016; SUN et al., 2019; QIAO et al., 2020); esses três últimos medindo os produtos de liberação da reação enzimática do extrato e de solução de alginato de sódio.

Nesses métodos a conceituação de atividade enzimática pode ser expressa como:

- 1 U = quantidade necessária para diminuir a viscosidade de uma solução de alginato de sódio em 50% em 20 min;
- 1 U = aumento de 0,01, 0,1 ou 1,0 unidade de absorbância a 235 nm por min; 1 U = formação de 1 nmol de  $\beta$ -formil-piruvato por min;
- 1 U = formação de 1  $\mu$ mol de monossacárideo por min (geralmente utilizada para diversas enzimas).

### 3.6.6 Aplicações da alginase

As principais aplicações citadas em literatura para a alginase, *in natura*, ou na produção de compostos de degradação de alginato, são nas áreas médica (diagnose e atividade antimicrobiana contra patógenos formados de biofilme além de atividade antitumoral, antihipertensiva, antidiabética, anticoagulante e etc.), compostos naturais na área de alimentos (produtos de degradação de alginato que podem ser usados como crioprotetores, suplementos alimentares, antioxidantes, agentes gelificantes, prebióticos e viscosificador), agricultura (oligossacárideos de alginato que podem servir

como estimulante vegetal, biofertilizante) e biorefinaria (biocombustíveis e química fina) (MOHAPATRA, 2020).

Em um novo tratamento, microesferas biopoliméricas contendo alginase e ciprofloxacina são administradas oralmente para o tratamento de fibrose cística (ISLAN, BOSIO e CASTRO, 2013). Bactérias como a *P. aeruginosa*, produz um biofilme que contribui na intensificação de infecções pulmonares. O alginato bacteriano produzido faz com que as células da *P. aeruginosa* tornem-se mais resistentes às células fagocitárias e aos efeitos de antibióticos. A administração da alginase como um biofármaco pode degradar o alginato bacteriano, aumentando a eficiência das células de defesa e de fármacos (KIM, LEE e LEE, 2011).

A alginase tem papel fundamental na produção de oligossacarídeos funcionais provenientes do Alginato. Os oligossacarídeos apresentam grande eficácia em atividade fisiológica, atuando na prevenção de tumores, no estímulo à produção de citocina e na regulação de lipídeos e açúcares no sangue (ZHU e YIN, 2015).

Combinada com a celulase, a alginase melhora a liberação enzimática de glicose nas algas marrons, quando associada com celulase fúngicas, a alginase contribui na remoção do alginato presente na parede celular das algas, dessa forma, há um aumento na liberação de glicose (MANNIS et al., 2016). Outra aplicação da alginase tem relação com os blocos polyM e polyMG, ao estudar as especificidades desses blocos, os resultados obtidos podem contribuir para investigar a especificidade de substratos para outras enzimas (WONG et al., 2000).

Monossacarídeos produzidos na atuação da alginase podem ser utilizados na produção de biocombustíveis e bioquímicos. Nas algas marrons o alginato pode constituir até 40% do seu peso seco, com ação de enzimas os alginatos podem ser convertidos em monossacarídeos insaturados, os monossacarídeos produzidos podem originar piruvato, o piruvato pode ser então convertido em biocombustíveis e bioquímicos (KIM, LEE e LEE, 2011).

A alginase pode ser utilizada como aditivo alimentar, devido sua possibilidade de transferência de íons metálicos. O ácido urônico que contém polissacarídeos interage com cátions, a alginase é utilizada para a obtenção de alginatos despolimerizados (MICHAUD et al., 2003). A alginase foi também empregada na extração de protoplastos de algas marinhas, os protoplastos extraídos foram utilizados em pesquisas em alimentos, além de atuar na regeneração da variedade de espécies de algas (WONG et al., 2000).

Segundo Wanderley, Neves e Andrade, 2011, as proteínas sintetizadas na célula são enzimas, referidas como enzimas intracelulares, citoplasmáticas, que somente podem ser obtidas por quebra

da célula. Os microrganismos que também têm a capacidade de sintetizar enzimas que são expelidas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo ou de propagação celular, sendo mais facilmente isoladas e avaliadas e são chamadas de enzimas extracelulares. Quase todas as enzimas preparadas em escala industrial até hoje são extracelulares, pois seu isolamento dos meios ou caldos de cultivo é geralmente mais simples, embora se encontrem diluídas nestes meios, o que pode tornar seu isolamento muito dispendioso (WANDERLEY, NEVES e ANDRADE, 2011).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesse capítulo se seguirá uma descrição de como as macroalgas foram coletadas e os fungos filamentosos obtidos. Em seguida o procedimento de fermentação semi-sólida, metodologia escolhida para determinação da atividade da enzima de interesse, nesse caso selecionada como alginase. Em seguida, a avaliação de alguns parâmetros de fermentação, como por exemplo, fonte e concentração de nitrogênio adicionado em conjunto com a solução nutriente, usada também para umidificar a biomassa. Também se avaliará o teor de umidade, a concentração de inóculo, influência da adição de alginato de sódio à biomassa (indutor) e pH da solução nutriente. Por fim, se estudará a estabilidade dos extratos enzimáticos ao congelamento.

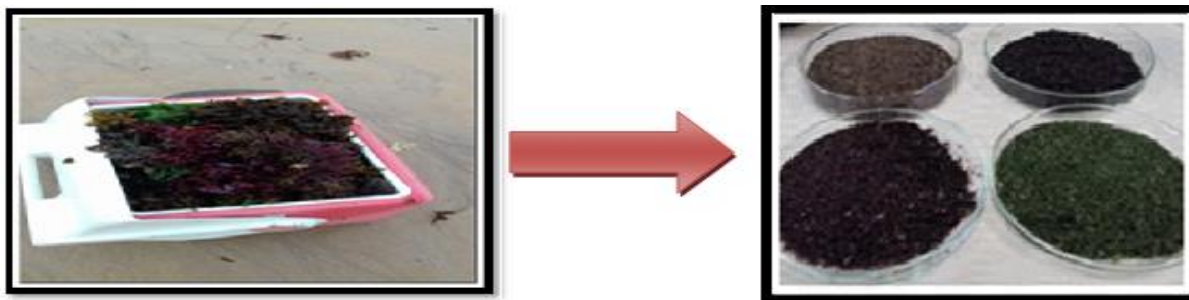
### 4.1 Coleta das macroalgas

A seleção das algas para estudo foi realizada de acordo com a abundância encontrada em meio ambiente Alagoano, sendo a coleta realizada manualmente entre os meses de março a dezembro de 2017-2019 no litoral norte da praia de Riacho Doce em Maceió-AL (à aprox. 10 km do centro da capital), durante maré baixa, em profundidades entre 20 a 150 cm.

O material coletado foi transportado em sacos plásticos, contendo água do mar e alguns sedimentos, para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bebidas (LTBA) do Centro de Tecnologia (CTEC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), local de execução da pesquisa. Em seguida, as macroalgas passaram por triagem, eliminando-se os resíduos indesejáveis ao mesmo tempo em que aquelas presentes em maior quantidade foram separadas, e em seguida sendo verificado o gênero mais abundante e, portanto, o selecionado para o estudo.

Posteriormente, a etapa de separação e seleção, as algas foram lavadas, o excesso de água removido, e então secas a 45 °C estufa termostatzada (Quimis), até peso constante, sendo em seguida triturada em moinho de facas, (IKA, modelo A11 Basic), com objetivo de obtenção de partículas pequenas para os procedimentos analíticos, e acondicionadas em recipientes herméticos. Conforme a **Figura 9**.

**Figura 9:** Lavagem das algas.



Fonte: Autor, 2020.

#### 4.2 Seleção e manutenção dos fungos filamentosos

As espécies de fungos filamentosos adquiridas frente a Micoteca URM da Universidade Federal de Alagoas (UFPE) (<https://www.ufpe.br/micoteca/>). As espécies selecionadas foram o *Aspergillus niger* Tiegh URM 7282, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom URM 7170 e *Cunninghamella echinulata* Thaxt URM 7150. As espécies fúngicas foram mantidas em meio BDA (Batata Dextrose Agar (infusão de 140 g/L da água da batata inglesa, 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) esterilizado à 121 °C, 1 atm por 15 min em autoclave (Figura 10).

**Figura 10:** Fungos crescendo em meio BDA.



Fonte: Autor, 2020.

Para que se pudesse produzir uma quantidade de biomassa suficiente para as caracterizações físico-químicas da biomassa fúngica, os mesmos foram crescidos em meio BD (mesma composição do BDA sem a adição de ágar bacteriológico como solidificante). Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio de cultivo, utilizando 200 rpm por 10 dias a 28°C em shaker rotativo

(TECNAL, modelo TE 424) utilizando como inoculo duas seções circulares (aprox. 1,5 cm) do fungo crescido em meio sólido, conforme visualizado em **Figura 11**.

**Figura 11:** Crescimento dos fungos filamentosos em meio líquido para o massa fúngica.



Fonte: Autor, 2020.

Passado o período de incubação, os fungos foram separados do meio líquido por filtração utilizando filtro de papel qualitativo, e em seguida lavados com água destilada e secos em estufa a 45°C até peso constante, seguindo por trituração em almofariz e pistilo, e conservados em recipientes herméticos.

### 4.3 Caracterização físico-química das macroalgas e fungos

Na caracterização físico-química das algas e dos fungos filamentosos foram realizadas as análises de proteínas totais, lipídios totais, teor de cinzas (resíduo mineral fixo) e de umidade, obtendo-se por diferença de carboidratos totais.

#### 4.3.1 Determinação de proteínas totais (Método de Kjeldahl)

Na determinação de proteínas totais, a primeira etapa do processo foi a digestão da matéria orgânica – pesou 0,5 g de matéria seca das algas ou fungo para um tubo de Kjeldahl e adicionou-se 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8). Depois adicionou-se ao tubo de digestão 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Acoplou-se o tubo ao digestor de Kjeldahl. A cada 15 min elevar a temperatura suavemente (50°C) até que a mesma chegasse a 350°C e manteve-se constante até que a mistura se torne incolor/verde claro e, então deixasse esfriar.



A segunda etapa do processo foi a destilação do nitrogênio (resultado da digestão da amostra) - transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de ácido bórico 4% e adicionou 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas de indicador verde de bromocresol, 0,2% adicionou ao tubo e 5 gotas de fenolftaleína 1%. Acoplou-se o tubo ao destilador de nitrogênio e adicionou-se NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa).

Para finalizar, a terceira etapa do processo foi a titulação do nitrogênio – titulou-se a solução do erlenmeyer da segunda etapa com ácido clorídrico 0,1 N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada (IAL,2005). A porcentagem de proteínas em biomassa é calculada pela

**Equação 1:**

$$Proteínas Totais (\%) = \frac{V_{HCl} \cdot F \cdot N_{HCl} \cdot 1,4}{P} \quad (Eq. 1)$$

Onde: NHCl = normalidade da solução de HCl utilizada na titulação; VHCl = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N; fHCl = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N; FHCl = fator de correspondência nitrogênio – proteína. O valor de F para alimentos em geral é 6,25; P = massa tomada de amostra.

#### 4.3.2 Determinação de lipídios totais (Extração com Soxhlet)

Na determinação de lipídios totais pesou-se entre 2g da amostra internamente em cartucho de Soxhlet (preparado com papel de filtro ou de celulose). Transferiu-se o cartucho ou o papel de filtro amarrado para o aparelho extrator. Acoplou-se o extrator ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicionou-se o solvente (hexano) em quantidade suficiente para um cartucho e meio. Adaptou-se a um condensador e se manteve sob aquecimento em chapa elétrica entre 8-24 horas. Após o tempo de extração, retirou-se o cartucho ou o papel de filtro amarrado, destilou-se o solvente e transferiu-se o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora, resfriando-se em dessecador até a temperatura ambiente e pesando-se até valor constante (IAL, 2005). A % de lipídios totais na amostra é calculada pela **Equação 2**.

$$Lipídios (\%) = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (Eq. 2)$$

onde: N = Massa de Lipídeos (massa final do balão menos a tara do balão); P = Peso da amostra.

#### 4.3.3 Determinação de Cinzas (resíduo mineral fixo por gravimetria)

A amostra foi transferida para cadinhos de porcelana, previamente identificados e tarados. Em seguida a amostra foi calcinada lentamente em 100°C por aproximadamente 30 min (retirada da parte volátil mais significativa). Posteriormente, a amostra foi levada a mufla, sendo aquecida até temperaturas de 550°C por 5-7 horas (até que o resíduo estivesse branco/cinza claro) (IAL,2005). A % de resíduo mineral fixo na amostra é calculada pela **Equação 3**:

$$Cinzas (\%) = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (Eq. 3)$$

Onde: N = Massa de Cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho); P = Peso da amostra.

#### 4.3.4 Determinação do teor de umidade (gravimetria)

A umidade foi determinada em triplicata, pesando-se 3 g de amostra fresca, limpa e sem excesso de água. Em seguida em estufa foram submetidas a uma temperatura de 105 °C durante 2 horas em estufa de secagem, ou até peso constante. O valor da umidade foi expresso em percentagem, tomando como base a perda de massa (água) em relação ao valor inicial conforme a **Equação 4** (IAL,2005):

$$Umidade (\%) = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (Eq. 4)$$

Onde: N = Massa de Cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho); P = Peso da amostra.

#### 4.3.5 Cálculo dos carboidratos totais

A % de carboidratos totais nas amostras por serem representados por diferentes estruturas, desde os resíduos monoméricos quanto poliméricos, de alta à baixa degradabilidade. Portanto, o teor total de carboidratos costuma ser calculado por diferença das análises supracitadas (proteínas totais, lipídios totais, resíduo mineral fixo e umidade) conforme **Equação 5** (IAL,2005):

$$\begin{aligned} &Carboidratos Totais (\%) \\ &= 100 - Proteínas Totais (\%) - Lipídios Totais (\%) - Cinzas (\%) \\ &- Umidade (\%) \end{aligned} \quad (Eq. 5)$$

### 4.4 Fermentação Semi-sólida

Utilizou-se a produção para expressão da enzima de interesse por fermentação semi-sólida, por se obter um extrato enzimático mais concentrado e ser mais facilmente verificado por medidas de atividade enzimática, principalmente em um estudo inicial de prospecção enzimática. Por essa razão, as etapas de uma

fermentação semissólida serão descritas sequencialmente, desde a preparação do fungo e da biomassa, assim como a fermentação e extração enzimática e análise de sua atividade, após isso os parâmetros estudados serão descritos.

#### 4.4.1 Preparação da suspensão de esporos

Para preparação das suspensões de esporos, as espécies fungicas foram crescidas em meio BDA até que a fase esporulada se tornasse visível e abundante (cerca de uma semana). Em seguida utilizou-se uma solução de Tween 80 (0,1%), sendo os fungos raspados superficialmente com uma alça de níquel e cromo devidamente flambada e estéril, para máxima extração dos esporos para a fase líquida. Em seguida, para conhecimento da concentração de esporos, houve contagem em microscópio óptico (Série Eco, K112L, KASVI/Motic) em Câmara de Neubauer. A concentração de esporos pode ser obtida pela **Equação 6**.

$$Cv \left( \frac{\text{Esporos}}{\text{mL}} \right) = 10^4 \cdot D \cdot M \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: Cv = concentração volumétrica de esporos em esporos/mL; D = é a diluição utilizada para que se mantesse uma visualização entre 20-100 esporos por campo de contagem; M = a média de esporos dos 5 campos contados.

#### 4.4.2 Preparação do meio de fermentação

Inicialmente foram testados as três espécies fungicas para se verificar a afinidade dos mesmos pela biomassa utilizada. Em recipientes vitreos, foram pesados 3g da macroalga escolhida, seca e triturada, foram cobertos com tampão de algodão e alumínio, sendo esterilizados a 121°C e 1 atm por 15 min.

Em seguida estimou-se a quantidade de líquido a se adicionar a biomassa para que contivesse, inicialmente, uma umidade final entre 70-80%, geralmente utilizada em fermentações semi-sólida (GROWTHAMAN, KRISHNA e MOO-YOUNG, 2001; SILVA et al., 2018), de acordo com a **Equação 7**:

$$Umidade_{biomassa} (\%) = \frac{Matéria_{seca}}{Matéria_{inicial}} \cdot 100 = \frac{M_{macroalga}}{M_{macroalga} - M_{líquido}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde: M – refere-se a massa considerada. Como se conhece a umidade desejável e o a massa de macroalga inicial ( $M_{macroalga}$ ), isola-se a massa de líquido ( $M_{líquido}$ ) a ser adicionado.

A partir disso, o volume de suspensão de esporos precisa-se também ser conhecida para a concentração de inóculo desejada. Como a concentração mássica de esporos, concentração volumétrica de esporos e massa de macroalgas são conhecidas ou decidida em função da literatura; o volume da suspensão de esporos ( $V_{\text{esporos}}$ ) que precisa ser utilizada, pode ser calculada pela **Equação 8**.

$$C_M \left( \frac{\text{Esporos}}{g_{\text{biomassa}}} \right) = \frac{C_M \left( \frac{\text{Esporos}}{g_{\text{biomassa}}} \right) V_{\text{esporos (mL)}}}{M_{\text{macroalga (g)}}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde:  $C_M$  = refere-se a concentração mássica de esporos por grama de biomassa;  $C_v$  = refere-se a concentração volumétrica de esporos na suspensão de Tween 80;  $M_{\text{macroalga}}$  = massa utilizada em gramas, nesse caso de macroalgas.

Como a concentração mássica de esporos, concentração volumétrica de esporos e massa de macroalgas são conhecidas, o volume da suspensão de esporos que precisa ser utilizada, pode ser encontrada.

A umidificação da biomassa é feita em parte com a suspensão de esporos e em parte com a solução nutriente, a qual teve, inicialmente a seguinte composição: uréia (0,30 g/L), peptona (0,75 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,40 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,30 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,40 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,40 mg/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5,0 mg/L),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,0 mg/L) e  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,60 mg/L), baseada na Tabela 8.

A partir das **Equações 7 e 8**, pode-se estimar a quantidade de líquido necessária para umidificar a biomassa e a quantidade de líquido fornecida pela suspensão, respectivamente. A partir da **Equação 9**, pode-se calcular qual o volume da solução nutriente que deve ser adicionada para garantir a umidade da biomassa requerida.

$$V_{SN} = V_{\text{total}} - V_{\text{esporos}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde:  $V_{SN}$  = volume de solução nutriente a ser adicionado;  $V_{\text{total}}$  = volume total a ser adicionado, vinculado a  $M_{\text{liquido}}$  necessária a manter a umidade da biomassa;  $V_{\text{esporos}}$  = volume da suspensão de esporos necessária a manter a quantidade de inóculo.

**Tabela 8:** Diferentes composições de soluções nutriente para fermentação enzimática.

| NUTRIENTES                           | AUTORES      |                  |                         |                    |                         |                      |                    |                      |                      |
|--------------------------------------|--------------|------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
|                                      | (JECU, 2000) | HU et al., 2011) | (BOGGIONE et al., 2016) | ABUD et al., 2015) | (SANCHE Z et al., 2015) | (CUNHA et al., 2012) | (GAO et al., 2008) | (NARRA et al., 2012) | (LEVER et al., 2013) |
| CONCENTRAÇÃO (g/L)                   |              |                  |                         |                    |                         |                      |                    |                      |                      |
| (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>    | 10,00        | 10,00            | -                       | 10,00              | 3,50                    | 1,40                 | 3,50               | 1,86                 | 10,00                |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 3,00         | 3,00             | -                       | 3,00               | 3,00                    | 2,00                 | 3,00               | 2,00                 | 3,00                 |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,50         | -                | 0,30                    | 1,00               | 0,50                    | 0,20                 | 0,50               | 0,30                 | 0,50                 |
| MgSO <sub>4</sub>                    | -            | 0,50             | -                       | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O  | 0,50         | -                | -                       | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | -            | -                | -                       | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | 0,50                 |
| CaCl <sub>2</sub>                    | -            | 0,50             | -                       | 0,50               | 0,50                    | 0,30                 | 0,50               | 0,30                 | -                    |
| Peptona                              | -            | -                | 1,00                    | -                  | -                       | 5,00                 | -                  | 8,00                 | -                    |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | -            | -                | -                       | 0,005              | -                       | 0,005                | -                  | 0,005                | -                    |
| FeSO <sub>4</sub>                    | -            | -                | 0,005                   | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O | -            | -                | 0,0016                  | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  | -            | -                | -                       | -                  | -                       | 0,0016               | -                  | 0,0016               | -                    |
| MnSO <sub>4</sub>                    | -            | -                | -                       | 0,005              | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | -            | -                | 0,0014                  | -                  | -                       | 0,0014               | -                  | 0,0014               | -                    |
| ZnSO <sub>4</sub>                    | -            | -                | -                       | 0,005              | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | -            | -                | 0,02                    | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |
| CoCl <sub>2</sub>                    | -            | -                | -                       | -                  | -                       | 0,002                | -                  | 0,002                | -                    |
| Ureia                                | -            | -                | 0,30                    | -                  | -                       | 0,30                 | -                  | 0,30                 | -                    |
| Extrato de Levedura                  | -            | -                | 0,25                    | -                  | -                       | 2,00                 | -                  | 4,08                 | -                    |
| CuCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O | -            | -                | 0,001                   | -                  | -                       | -                    | -                  | -                    | -                    |

Fonte: Autor, 2020.

#### 4.4.3 Fermentação e extração enzimática

Conhecendo-se todos os parâmetros supracitados, os recipientes vitreos estéreis com a macroalga são levados a capela de fluxo laminar onde são adicionados o volume de suspensão de esporos e de solução nutriente, calculados pelas equações 9 e 10, respectivamente. Para as primeiras fermentações se considerou um volume de suspensão de esporos para que se alcançasse uma concentração final de inóculo em torno de  $1.10^7$  esporos/gmacroalga (GROWTHAMAN, KRISHNA e MOO-YOUNG, 2001; LIAO et al., 2015; SILVA et al., 2018) . Os experimentos foram conduzidos com umidade inicial em torno de 75% (RAIMBAULT, 1998; GROWTHAMAN, KRISHNA e MOO-YOUNG, 2001; OLIVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2018) e a 28-30°C (temperatura ambiente), por 7 dias de fermentação, Isso para que se detectasse alguma atividade e se pudesse realizar o screening da espécie fúngica.

Para extração do caldo enzimático utilizou-se o tampão tris-HCl a 50 mM e pH 7,2-7,5, pois como visto em literatura, a enzima alginase se mostra mais estável em pH alcalino (maior que 7) (NAGAKAWA et al., 1998; AN et al., 2008; AN et al., 2009; SIVAKUMAR et al., 2015; ZHU et al., 2016).

A preparação da solução tampão tris-HCl 50 mM consistiu-se de dissolver 6,057g de Tris-HCl em 800 mL de água destilada, em seguida se afere o pH com NaOH 10% gotejando até pH em torno de 7,2-7,5, e por fim completar para 1L de solução.

Adicionou-se 50 mL de tampão em cada recipiente (com 3g de biomassa de macroalga fermentada pelo fungo), sendo agitado em shaker (TECNAL, modelo TE 424) a 30 °C e 150 rpm por 30 min. Após isso a suspensão é filtrada em gaze para remoção das partes mais grosseiras e a suspensão resultante levada a centrifugação (NT 810 Novatécnica) a 3000 rpm por 15min. Em seguida o extrato filtrado e centrifugado é levado a congelamento entre -12 e - 18 °C (FRICON HCED-503) até a determinação de atividade enzimática e de proteínas totais, inicialmente.

#### **4.5 Determinação de atividade enzimática para alginase e determinação de proteínas totais no caldo.**

##### **4.5.1 Determinação de atividade da alginase**

Para determinar a atividade da enzima, verificou-se a quantidade de monossacarídeos liberada em reação entre o extrato enzimático e alginato de sódio (substrato). Para a determinação dos monossacarídeos utilizou-se o método colorimétrico do DNS (MILLER, 1959), conforme Figura 12

A reação enzimática foi feita adaptando-se a metodologia de Sivakumar et al. (2015) em tubos de ensaio de 9 cm contendo em cada tudo 0,5 mL de solução de alginato 2% (% m/m), em seguida adicionou-se 0,25 mL do extrato enzimático fúngico, aquecendo-o em banho (SL-158/A, SOLAB) a 40 °C por 30 min. Em seguida, adiciona-se 0,25 mL do reagente de DNS, submete-se todo o volume a 100 °C por 5 min. Os tubos são resfriados em banho de gelo e completa-se com 4 mL e a amostra reagida é lida em espectrofotômetro UV-vis (BEL, modelo SP 2000UV) a 540 nm. Para o branco, utilizou-se ao invés do 0,25 mL do extrato fúngico, 0,25 mL de água destilada, e que a medida de atividade fosse realizada em triplicata.

Também deve-se realizar uma reação com extrato enzimático inativado, para retirar as interferências de reações indesejáveis e/ou resultantes do aquecimento do extrato e solução de alginato. Para tanto extratos foram inativados por aquecimento em banho-maria fervente por 30 min.

**Figura 12:** Determinação de atividade da alginase.



Fonte: Autor, 2020.

Uma atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de monossacarídeo por min (SIVAKUMAR et al., 2015). A atividade dos extratos foi calculada de acordo com a **Equação 10**. É recomendada a determinação da atividade pelo menos em triplicata, devido a variabilidade que pode ocorrer na reação.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{C_{\text{glicose}} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) V_{\text{reação}} (\text{mL})}{\text{Tempo} (\text{min}) \quad MM_{\text{glicose}} \left( \frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}} \right) V_{\text{extrato enzimático}} (\text{mL})} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde:  $C_{\text{glicose}}$  = é a concentração de glicose (açúcares redutores – monossacarídeos); Tempo = tempo de reação exercido, nesse caso, de 30 min;  $MM_{\text{glicose}}$  = massa mola da glicose em  $\text{mg}/\mu\text{mol}$ ;  $V_{\text{reação}}$  foi de 0,75 mL e  $V_{\text{extrato enzimático}}$  igual a 0,25 mL. Vesporos = volume da suspensão de esporos necessária a manter a quantidade de inóculo.

#### 4.5.2 Preparação do reagente de DNS e da curva padrão

Para a preparação do reagente DNS pesou-se 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 preparadas duas soluções:

- Solução A - Em um frasco béquer de 400 mL dissolveu-se 10 g de DNS em 200 mL de NaOH (2 mol/L).
- Solução B - E um frasco béquer de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada adicionou-se o 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 e homogeneizadas e o volume da solução final foi completado para 1000 mL. Devido a solução ser fotossensível, foi armazenada em um recipiente envolvido por papel alumínio e armazenada na geladeira à temperatura de 5-8°C.

Para a obtenção da curva analítica preparou-se as soluções de glicose com concentração de 2g/L, obtendo-se por diluição seriada as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,25, 1,5, 1,75 g/L (mg/mL).

Em seguida, a reação de DNS é realizada da mesma forma como designada anteriormente: 0,25 mL da amostra, 0,5 mL de água (ou solução de alginato de sódio) e 0,25 mL do reagente de DNS, levados a banho fervente por 5 min, sendo então resfriados em banho de gelo, adicionados de 4 mL de água destilada e então lidos em espectrofotômetro UV-vis (BEL, modelo SP2000 UV) a 540 nm. O tubo controle, ou branco, é realizada com 0,75 mL de água destilada (ou 0,25 mL de água destilada e 0,5 mL da solução de alginato de sódio) e 0,25 mL do reagente DNS.

Por fim uma correlação linear entre as absorbâncias e as concentrações de DNS é obtida. Na Figura 12, é possível visualizar a correlação utilizada no estudo, com ótimo coeficiente de correlação ( $R^2$ ), próximo a 1.

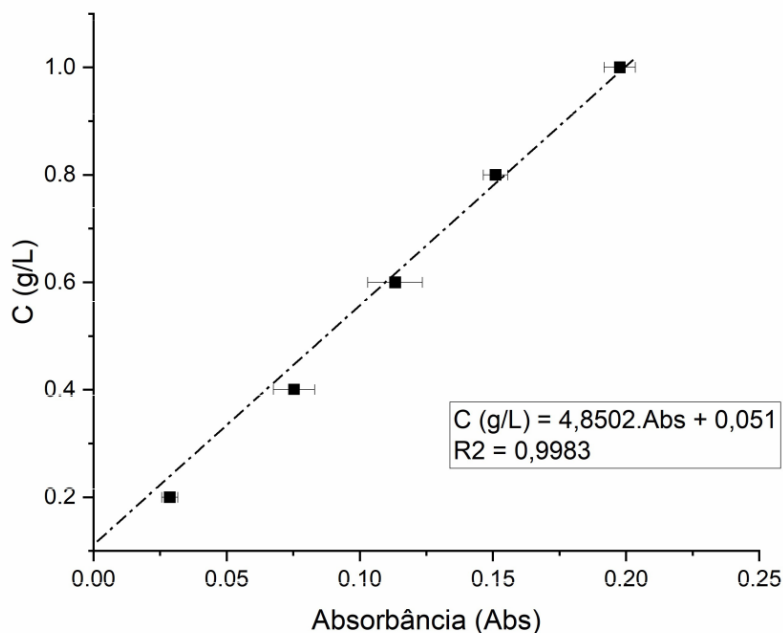
#### 4.5.3 Determinação de proteínas totais e preparação da curva padrão

A reação de Bradford tem sido amplamente aplicada para determinação de proteínas totais em extratos enzimáticos, sendo que sua mecanização, além de possibilitar a realização das análises de forma mais simples, gera resultados mais precisos, confiáveis e com menor custo.

Durante a formação deste complexo, dois tipos de interação acontecem. As interações iônicas e hidrofóbicas estabilizam a forma aniônica do corante, causando uma mudança visível da cor. É um método sensível, pois o complexo proteína-corante apresenta um coeficiente de extinção molar elevado (BRADFORD, 1976).



**Figura 13:** Curva padrão de DNS.



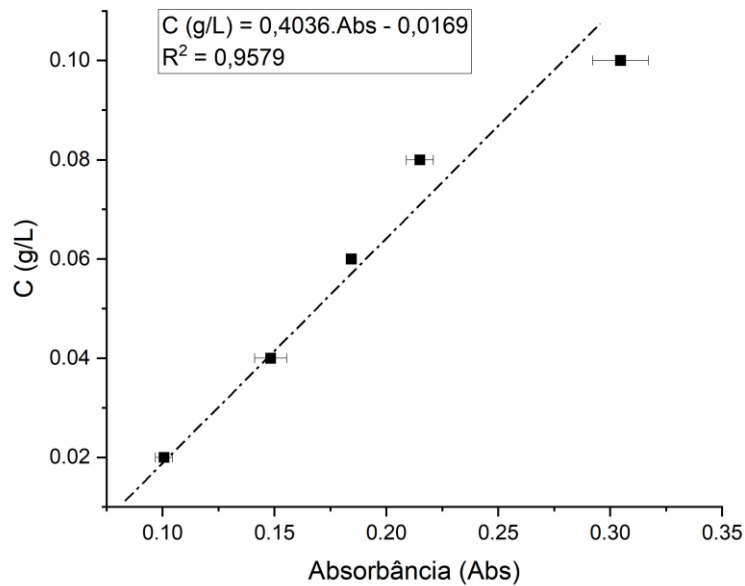
Fonte: Autor, 2020.

Para a preparação do reagente Azul Brilhante de Coomassie pesou-se 50 mg em 25mL etanol 95% e sob agitação foram adicionados 50mL de ácido fosfórico (85%), compeltando-se o volume para 500 mL. A solução foi mantida sob agitação por 1h, após esse tempo a solução foi mantida em frasco âmbar e na geladeira.

A reação de Bradford é feita adicionando-se 0,5 mL da amostra mais 5,0 mL do reagente de Bradford, com a mistura deixada em reação por 10 min à temperatura ambiente. Após isso, a mudança de absorção do reagido é verificado no espectrofotômetro UV-vis (BEL, modelo SP2000 UV) a 600 nm.

A curva padrão é feita com a partir de uma solução-mãe de 0,1 g/L de albumina bovina, diluída entre aliquotas de 0,02-0,1 g/L. O controle, ou branco, é feito utilizando 0,5 mL de água destilada e 5 mL do rreagente de Bradford. DA mesma forma que para DNS, uma correlação é obtida entre as absorbâncias e as concentrações de albumina. Na **Figura 14** é possível visualizar a correlação obtida para o estudo com aceitável correlação linear ( $R^2$ ).

**Figura 14:** Curva analítica do padrão de Bradford, para análise de proteína frente a reação com albumina.



Fonte: Autor, 2020.

#### 4.6 Otimização da fonte e concentração de nitrogênio – otimização da solução nutriente

Além da solução nutriente (SN) testada na seção 4.4.2, foram testadas 2 formulações adicionais. A diferença entre elas foi a adição de extrato de levedura visto que pode constituir um ótimo substrato para o desenvolvimento fúngico e aumentar a atividade enzimática obtida (FENICE et al., 1998; NAMPOOTHIRI et al., 2004). Além disso, aumentou-se a concentração dos compostos nitrogenados da solução nutriente, como resumido na Tabela 9. Essa otimização se fez necessária devido ao baixo desenvolvimento fúngico quando a SN da seção 4.4.2 foi usada.

**Tabela 9:** Composição dos compostos nitrogenados das soluções nutrientes testadas.

|   | <b>Peptona</b> | <b>Extrato de Levedura</b> | <b>Uréia</b> | <b>Sulfato de Amônia</b> |
|---|----------------|----------------------------|--------------|--------------------------|
| <b>Solução nutriente (Seção 4.4.2) (SN)</b>                                   | <b>0,75</b>    | <b>0</b>                   | <b>0,3</b>   | <b>1,4</b>               |
| <b>Solução nutriente com extrato de levedura (SN<sub>2</sub>)</b>             | <b>5</b>       | <b>2</b>                   | <b>0,3</b>   | <b>1,4</b>               |
| <b>Solução nutriente com extrato de levedura concentrado (SN<sub>3</sub>)</b> | <b>15</b>      | <b>6</b>                   | <b>0,9</b>   | <b>4,2</b>               |

Fonte: Autor, 2020.

As condições de fermentação foram:  $10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub> como inóculo usando a SN<sub>2</sub> pH 5,5, 75% de umidade, a 30°C e 3-7 dias de fermentação. Os extratos enzimáticos foram congelados em freezer (FRICON HCED-503) a -12 e -18 °C. Ao final de todas as fermentações os extratos foram descongelados para que se fizesse a determinação da atividade enzimática presente no extrato obtido.

#### 4.7 Estudo das variáveis de processo na expressão enzimática

As variáveis estudadas foram a umidade, concentração de inóculo, presença de indutor (alginato de spódio) e pH da solução nutriente em presença da biomassa in natura e com indutor adicionado. Os extratos enzimáticos após serem obtidos foram congelados em freezer (FRICON HCED-503) a -12 e -18 °C. Ao final de todas as fermentações os extratos foram descongelados para que se fizesse a determinação da atividade enzimática presente e da concentração de proteínas totais.

##### 4.7.1 Análise do teor de umidade

Em relação ao teor de atividade foram avaliados 65, 70, 75, 80 e 85%, pois são valores frequentes em trabalhos de fermentação semi-sólida para produção enzimática, tendo cada classe de enzima intervalos específicos de melhor produção (GROWTHAMAN, KRISHNA e MOO-YOUNG, 2001 SILVA et al., 2018; MERINO et al., 2019; AITA et al., 2019).

As condições de fermentação foram:  $10^7$  esporos/g<sub>biomass</sub> como inóculo usando a SN<sub>2</sub> pH 5,5, a 30°C e 1-7 dias de fermentação. Nesse caso, os testes para a determinação de atividade enzimática foram realizados com soluções de alginato de sódio 0,5, 1 e 2% (%m/m) com o intuito de confirmar a presença enzimática, uma vez que, a reatividade dos extratos deve ser em função da concentração de substrato presente.

#### 4.7.2 Avaliação da concentração de inóculo

Foram testadas três concentrações de inóculo de acordo com Growthaman, Krishna e Mooyoung (2001); de 0,2, 0,6 e  $1.10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub>. As condições de fermentação foram: SN<sub>2</sub>, pH 5,5, 75% de umidade, a 30°C e 3-7 dias de fermentação.

#### 4.7.3 Influência da presença de um indutor

A adição de um indutor pode potencializar a ação enzimática (MERINO et al., 2019). Nesse sentido, utilizou-se alginato de sódio em adição a biomassa macroalgal nas proporções de 16,66 e 33,33%. As condições experimentais foram:  $10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub> como inóculo; 75% de umidade, a 30°C e 3-7 dias de fermentação.

#### 4.7.4 Verificação da influência do pH da solução nutriente

O pH da solução nutriente pode afetar a produção enzimática e mesmo pequenas variações da ordem de 0,5 pode resultar em diferentes resultados ((SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2018). Nesse sentido foram preparados duas bateladas de experimentos. A primeira utilizou apenas a biomassa macroalgal e a segunda com a adição de indutor (16,66% de alginato de sódio).

Foram testados 5 pHs diferentes da solução nutriente (SN<sub>2</sub>), 2,5, 4,0, 5,5, 7,0 e 8,5. As condições experimentais foram:  $10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub> como inóculo, 75% de umidade, a 30°C e 3-7 dias de fermentação.

O pH inicial das fermentações umedecidas com SN<sub>2</sub> em pHs diferentes foi medido utilizando 50 mL de água destilada nas extrações seguindo o mesmo procedimento de extração com tris-HCl, partindo com agitação da massa umedecida e da água destilada estéril sendo posteriormente filtrada e centrifugada, sendo o pH medido no extrato obtido.

### 4.8 Verificação da estabilidade ao congelamento

Os extratos enzimáticos para esse teste foram obtidos nas seguintes condições de fermentação:  $10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub> como inóculo, 75% de umidade, usando a SN<sub>2</sub> pH entre 2,5-8,5, com 16,66% de alginato de sódio (indutor), a 30°C e 3 dias de fermentação). Os extratos enzimáticos foram congelados em freezer (FRICON HCED-503) a -12 e -18 °C; sendo descongelados apenas para a

determinação da atividade enzimática e proteínas totais no período avaliado (3 a 7 dias de congelamento).

Essa avaliação é importante para verificar se durante a fermentação também foram produzidos compostos que afetam sensivelmente a estabilidade dessas enzimas, sendo presentes no extrato enzimático obtido, tornando o processo mais suscetível a perda enzimática e requerendo rápida purificação para ser usada (BORZANI et al., 2001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequencialmente serão apresentados os resultados obtidos, assim como a discussão deles, na seguinte ordem: identificação e caracterização geral da macroalgas e da biomassa fúngica, *screening* fúngico na expressão enzimático, otimização da concentração de nitrogênio na solução nutriente utilizada, avaliação do teor de umidade, concentração de inóculo, adição de indutor (alginato de sódio) em conjunto com a macroalga, pH da solução nutriente e estabilidade dos extratos ao congelamento.

### 5.1 Coleta e triagem das macroalgas

Na **Figura 15**, podemos verificar desde o local de coleta, até a forma de condução ao local de pesquisa e a triagem dos gêneros encontrados. Percebe-se que entre as Rodófitas (Rodophyta), o gênero *Hypnea* foi o mais abundante. Para as Feofíceas (Phaeophyta), o *Sargassum* e a *Padina*, se mostraram mais presentes. Por outro lado, para as Clorófitas (Chlorophyta), a *Ulva* foi mais verificada. Dentre todas, as feofíceas foram as mais abundantes, principalmente o *Sargassum*, e isso influenciou na escolha desse filo e gênero para as posteriores análises e condução das fermentações.

A expressão enzimática iria depender dos polímeros presentes na biomassa macroalgal, e por isso, foi realizada uma caracterização físico-química da biomassa macroalgal e fúngica (**seção 5.2**). Como o intuito inicial do projeto é para aplicações bioenergéticas, e nisso, se entram também, mas não apenas, os biocombustíveis, se pensou inicialmente na fração de carboidratos.

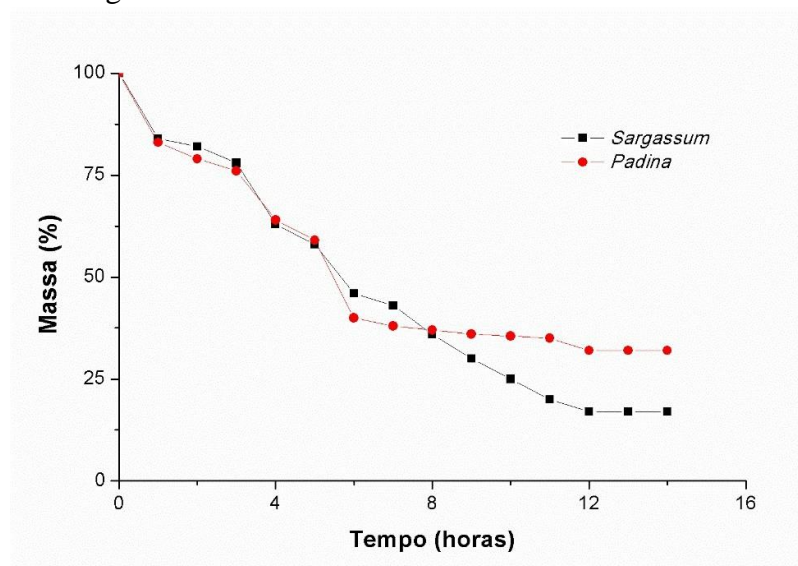
Em relação a secagem da biomassa, o objetivo foi apenas preservá-la em quantidade razoável para a condução dos experimentos com reprodutibilidade, ou seja, sem preocupação com diversas coletas que poderiam ser influenciadas pela sazonalidade da biomassa. Utilizando uma temperatura de 45 °C, precisou-se de cerca de 12 horas (**Figura 16**). O gênero *Sargassum* perdeu um teor de umidade na secagem em torno de 85%, enquanto que a *Padina* de 75%. Biomassa úmida possui um elevado teor de umidade, e valores entre 70-90% de perda de massa como água na secagem é esperado.

**Figura 15:** Coleta das microalgas riacho doce.



Fonte: Autor, 2020.

**Figura 16:** Curva de secagem das feofíceas.



Fonte: Autor, 2020.

## 5.2 Caracterização físico-química das macroalgas e dos fungos filamentosos.

Em relação a caracterização físico-química é importante ressaltar que o gênero *Sargassum* possui um elevado teor de carboidratos, próximo a 50% da matéria seca (**Figura 16**). Esse valor está de acordo com o exposto na revisão bibliográfica, que macroalgas possuem um teor de carboidratos totais entre 40 e 85% (WEI, QUARTERMAN e JIN, 2013; HONG, JEON e LEE, 2014). No caso específico da biomassa de *Sargassum* se sabe que ela possui um alto teor de alginato, servindo inclusive como fonte desse carboidrato, polímero (MAFRA Jr e CUNHA, 2002; TORRES et al., 2007; ANDRIAMANANTOANINA e RINAUDO, 2010; CONG et al., 2014; BERTAGNOLLI et al., 2014). Esse polímero se encontra em espécies de *Sargassum* em porcentagens entre 15-26% (ANDRIAMANANTOANINA e RINAUDO, 2010; BERTAGNOLLI et al., 2014).

Ao contrário das macroalgas, os fungos filamentosos se destacam mais pelo elevado teor de lipídios e proteínas, em torno de 30% (**Figura 17**), mostrando possibilidade de aplicação tecnológica diferente da biomassa macroalgal. Entre elas, se destacam a alimentação animal e produção de biodiesel, referindo-se respectivamente às frações de proteínas e lipídios; melhor citadas abaixo.

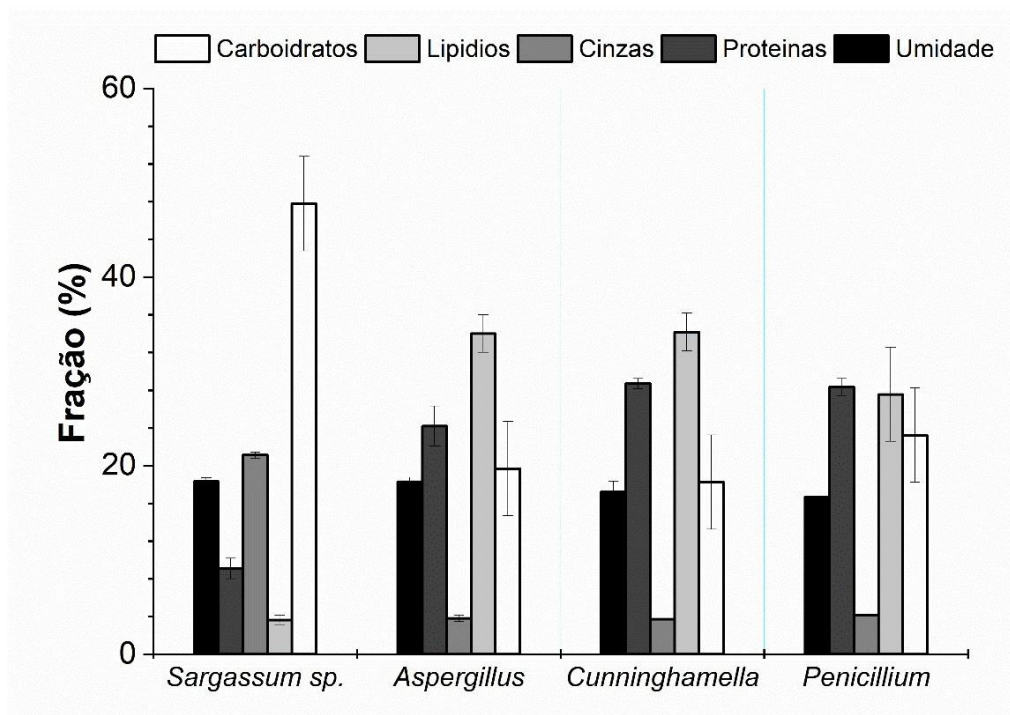
Biomassa fúngica rica em proteína, proveniente do fungo *Rhizopus microsporus* (var. *oligosporus*), utilizando vinhaça como fonte de carbono, foi aplicada no enriquecimento proteico da ração para peixes. A biomassa analisada possuía em sua composição cerca de 45% de proteína, apresentando também alto teor de aminoácidos (NITAYAVARDHANA et al., 2010). Outros artigos também mostraram a capacidade de produção de biomassa fúngica utilizando água residual de vinícolas (GRAMINHA et al., 2007). Ou seja, qualquer resíduo que sirva como fonte de carbono, está sujeito a testes para a produção de biomassa.

Outra aplicação da biomassa fúngica se concentra também em um aspecto renovável, a produção de biodiesel. A crescente demanda por energia, causada pelo crescimento da população e o aumento exponencial de indústrias, além da busca por fontes de energia sustentáveis, levou à análise da biomassa fúngica como possível fonte energética. Foi verificado que alguns fungos exibem capacidade de acumular lipídios intracelulares em excesso em cerca de 70% da sua biomassa, durante períodos metabólicos sob efeito de estresse. A possível conversão desses lipídios em combustível foi estudada e, verificou-se que, após um pré- tratamento e



transesterificação do lipídio fúngico, o biodiesel produzido é bastante econômico e *eco-friendly*, por conta do baixo teor de carbono, diminuindo a emissão de possíveis poluentes após combustão (VELAYUTHAM e NITHYA, 2011).

**Figura 17:** Caracterização físico-química das macroalgas e da massa fungica.



Fonte: Autor, 2020.

Confirmado pela caracterização, percebe-se elevado teor de carboidratos na macroalga, e pela literatura o *Sargassum* é uma das fontes de alginato explorados pela indústria de biopolímeros, percebeu-se que seria interessante estudá-la como fonte da enzima alginase (alginato liase) e como explorado pela revisão bibliográfica, é escasso o uso de fungos filamentosos para fermentar macroalgas e, principalmente; na produção dessa enzima.

### 5.3 Expressão de alginase em função da concentração de nitrogênio da solução nutriente (SN) ( $10^7$ esporos/g<sub>biomassa</sub>, 75% de umidade, pH<sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).

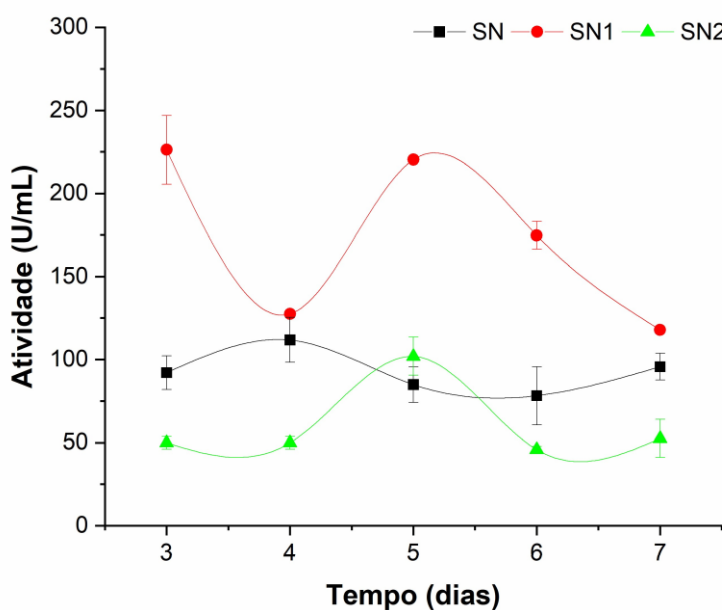
Apesar de terem sido testados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cunninghamella*; apenas esse último se desenvolveu de forma satisfatória preenchendo toda a superfície da macroalga, e por essa razão, única espécie utilizada durante todo o trabalho. Pelos resultados obtidos na **Figura 18**, percebe-se que a adição de extrato de levedura (SN2) influenciou significativamente na expressão da alginase. A produção enzimática em fungos filamentosos está

fortemente associada a manipulação das fontes de nutrientes, especialmente, os fluxos de carbono e nitrogênio disponíveis (ZHAO et al., 2019). Fenice et al. (1998) e Nampoothiri et al. (2004) também verificaram uma correlação positiva entre a adição de extrato de levedura na solução nutriente e a produção de quitinase.

No entanto, quando as concentrações das fontes de nitrogênio foram aumentadas, a solução nutriente (SN3) inibiu a expressão enzimática da alginase. Aita et al. (2019) e Merino et al. (2019) mencionam que excesso de fonte de nitrogênio adicionada pode desestimular a produção da enzima de interesse pelo microrganismo. Marraiki et al. (2019) explica que é necessário adicionar a quantidade de nitrogênio adequada para o consumo da fonte de carbono (substrato) que se deseja na biomassa, produzindo a enzima de interesse. Outra hipótese é que o excesso de fontes de nitrogênio possa afetar significativamente a atividade microbiana devido as mudanças de pH no meio sólido durante a fermentação (SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992).

Portanto, um excesso de fontes de nitrogênio que acabam indo em conjunto com carbono quando essa fonte é orgânica pode desestimular o fungo a procurar nutrientes na biomassa. Logo, nas próximas fermentações se utilizará a solução nutriente SN2. Picos de atividades foram verificados nos dias 3 e 5 de fermentação alcançando em torno de 225 U/ml.

**Figura 18:** Atividade enzimática nos extratos enzimáticos com as três soluções nutrientes testadas.



Fonte: Autor, 2020

É de extrema importância ressaltar que as fermentações com alginase, como descritos em revisão bibliográfica, são realizadas por bactérias em fermentação submersa; diferente do proposto por esse trabalho, no qual se utilizou fermentação semi-sólida e fungo filamentosos. Além disso, os métodos utilizados para expressar a atividade enzimática diferem bastante, e podem ser diretos ou indiretos.

Os principais são: utilizando a redução da viscosidade de uma solução de alginato de sódio (NAGAKAWA et al., 1998; AN et al., 2008; AN et al., 2009), absorvância por grupos específicos a 235 nm (SAWABE, EZURA e KIMURA, 1992; KOTI et al., 2014; WANG et al., 2017b; TAVAFI et al., 2017), formação de  $\beta$ -formil-piruvato (método do ácido tiobarbitórico) com leitura espectrofotométrica em 548 nm (TAVAFI et al., 2017), e medição dos monossacrídeos liberados por DNS a 540 nm (SIVAKUMAR et al., 2015; SHANKAR et al., 2016); esses três últimos medindo os produtos de liberação da reação enzimática do extrato e de solução de alginato de sódio.

Por simplicidade e reprodutibilidade, escolheu-se o método de medição dos monossacarídeos (método do DNS) liberados por uma solução de alginato de sódio após reação enzimática. Utilizando esse método, as principais contribuições comparáveis com esse trabalho foram feitos por Sivakumar et al. (2015) e Shankar et al. (2016), que obtiveram atividades entre 1-12 U/mL, e o estudo feito por Hifney et al. (2018) no qual se conduziu fermentação submersa utilizando biomassa macroalgal (*Cryptoseira trinodis*) como substrato a partir das espécies fúngicas *Aspergillus niger*, *Dendryphiella arenaria*, *Eurotium chevalieri*, *Chaetomium funicola*, *Stachybotrys chartarum* e *Emericella nidulans*, a 28 °C e 120 rpm com a biomassa macroalgal e água do mar para crescimento obtendo-se até 20 U/mL, sendo menores que os encontrados nesse estudo.

Nesse sentido, os resultados obtidos serão discutidos sempre que possível, baseados em artigos de fermentação submersa com alginase, no entanto, por não ser uma fermentação altamente difundida e não possuir diversos produtos facilmente comercializáveis; têm sido pouco explorada, mesmo com as potenciais aplicações na área de saúde e biocombustíveis discutidos anteriormente. Além do fato da fermentação conduzida aqui ser semissólida a qual possui parâmetros diferentes dos observados em uma fermentação submersa.

Logo, se utilizará o estudo de fermentação enzimática por fungos utilizando outras biomassas na obtenção de outras enzimas para avaliar a influência das variáveis umidade,

concentração de inóculo, presença de indutor, pH da solução nutriente (SN) e estabilidades dos extratos ao congelamento.

#### **5.4 Expressão de alginase em função da umidade da biomassa ( $10^7$ esporos/g<sub>biomassa</sub>, SN<sub>2</sub>, pH<sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).**

Como se percebe pela **Figura 19**, a umidade influenciou significativamente na fermentação de alginase, no entanto o efeito positivo da umidade se verificou a 65, 70 e 75% (**Figura 19A-C**), decrescendo para os valores de 80-85% (**Figura 19D-E**). A máxima expressão foi em torno de 175 U/mL quando 75% de umidade foi usada, com picos no 3º e 5º dia, portanto os próximos experimentos serão monitorados a partir do 3º dia. Percebeu-se também que houve uma proporcionalidade entre a expressão de atividade e concentração de substrato usado, confirmando a presença de enzima degradadora de alginato de sódio.

Pouca umidade reduz a difusão de nutrientes, o crescimento microbiano, a estabilidade enzimática e o inchaço do substrato. Por outro lado, um conteúdo elevado leva a aglomeração excessiva das partículas de biomassa, limitação da transferência gasosa (fungos filamentosos são aeróbios) e maior competição com bactérias (devido ao aumento da atividade de água) (GROWTHAMAN, KRISHNA e MOO-YOUNG, 2001; AITA et al., 2019), corroborando os resultados obtidos e fixando em 75% a melhor umidade para a espécie fúngica (*Cunninghamella echinulata*) e biomassa (*Sargassum sp.*) utilizadas.

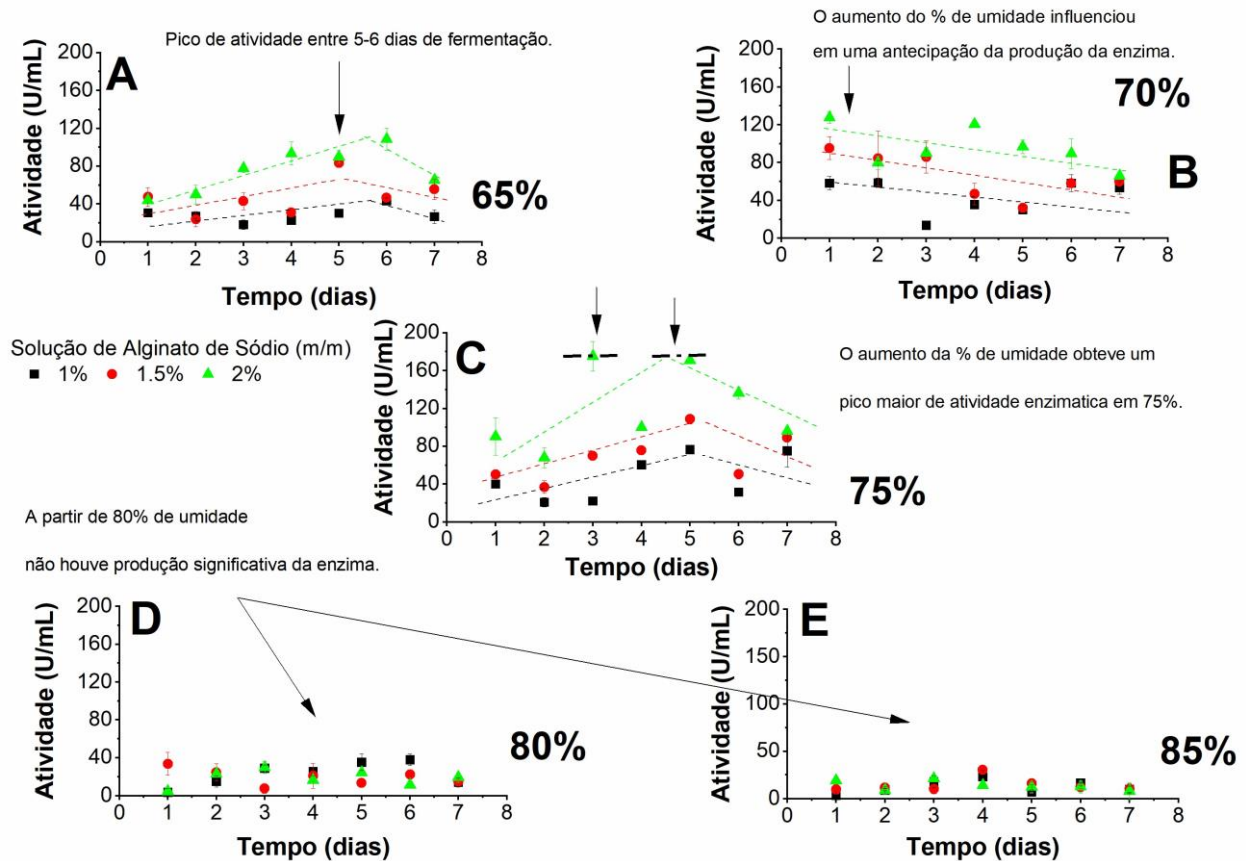
A umidade possui uma alta sensibilidade na fermentação semi-sólida; além de que os valores de produção ótima da enzima podem diferir em função da espécie fúngica, da biomassa e do tipo de enzima que se deseja produzir.

Zhou et al. (2016) utilizando *Bacillus thuringiensis* e resíduos de alimentos, testou umidades de 50, 75 e 99%, alcançando melhores resultados em 75%. Kotwal et al. (1998) produzindo  $\alpha$ -galactosidase com o fungo *Humicola sp.* alcançou pico de atividade em 85% de umidade, cessando-se totalmente quando 90% foi usada. Oliveira et al. (2018) produzindo celulasas com *Aspergillus fumigatus* testou umidades entre 35-82% e alcançou melhores resultados em 50%. Silva et al. (2018) produzindo celulasas com *Trichoderma reesei* CCT- 2768 indicaram 60% de umidade. Merino et al. (2019) utilizaram umidades entre 60-80% para fermentação de resíduos agroindustriais usados em adsorção de corantes.

Como é possível verificar na **Figura 20**, a concentração proteica aumentou com o aumento da % de umidade da biomassa, e também em função do tempo de fermentação. Esse resultado é

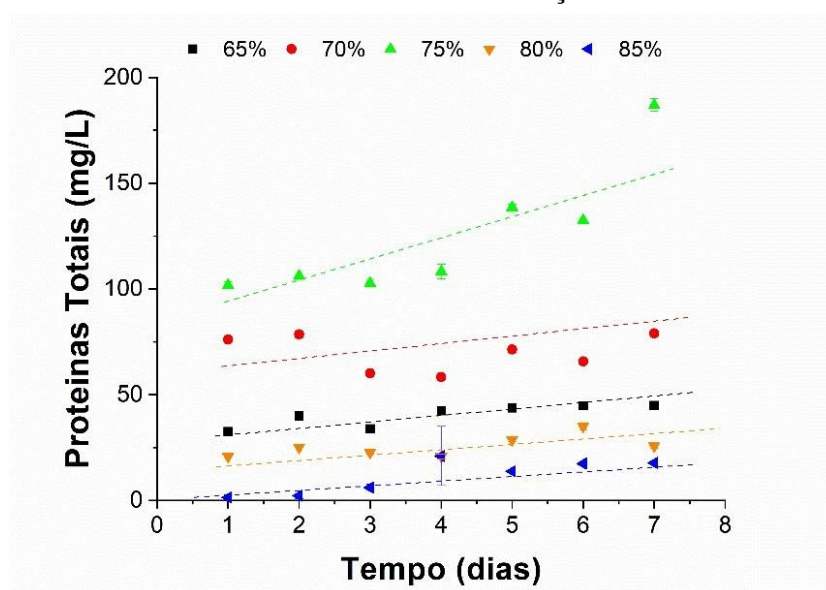
coerente com os resultados de atividade enzimática que também aumentaram, e pode ser um indicativo qualitativo de uma maior produção enzimática por parte do fungo quando a umidade é considerada. Esse range de valores, em mg/L, é similar a outros estudos.

**Figura 19:** Atividade de alginase em função do teor de umidade da biomassa.



Fonte: Autor, 2020.

**Figura 20:** Proteínas totais nos extratos enzimáticos em função da umidade.



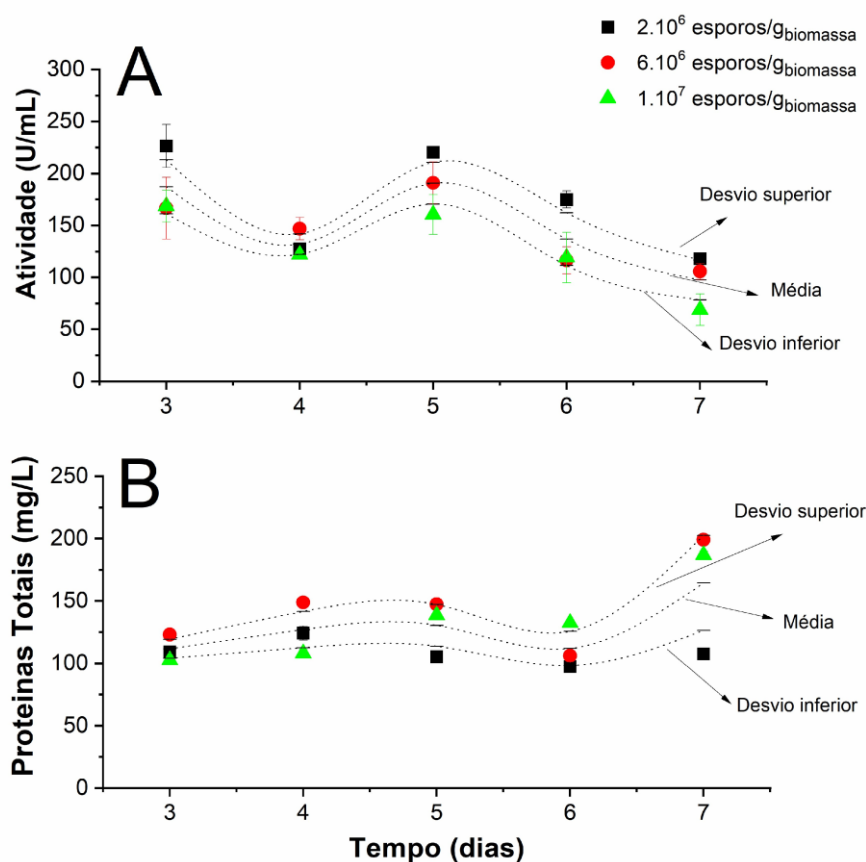
Fonte: Autor, 2020.

### 5.5 Expressão de alginase em função da concentração de inóculo (75% de umidade, $\text{SN}_2$ , $\text{pH}_{\text{SN}} = 5,5$ e $30^\circ\text{C}$ ).

Em relação a concentração de inóculo, percebe-se que as três concentrações de inóculo utilizadas levaram ao mesmo perfil e atividades enzimáticas semelhantes (**Figura 21A**). A concentração de inóculo pode influenciar significativamente na rapidez de crescimento fúngico e produção enzimática, sendo recomendados entre  $10^6$ - $10^7$  esporos/gsubstrato (GROWTHAMAN et al., 2001). Ao se usar biomassa em fermentação semissólida se utilizam  $10^7$  esporos/gbiomassa (LIAO et al., 2015; SILVA et al., 2018). Da mesma forma que os resultados anteriores, os picos de atividades se situaram no 3 e 5º dia, variando entre 175-225 U/mL.

Nesse caso, não houve interferência altamente expressiva podendo-se assim, se utilizar o intervalo de  $0,2$ - $1 \cdot 10^7$  esporos/gmacroalga na fermentação semi-sólida de alginase com *Cunninghamella echinulata*. Para proteínas totais no extrato enzimático não houve uma tendência facilmente visualizável como nos experimentos de avaliação da umidade (**Figura 21B**).

**Figura 21:** Influência da concentração de inóculo na expressão de atividade da alginase.



Fonte: Autor, 2020.

### 5.6 Influência da adição do indutor (alginato de sódio) na expressão de alginase (10<sup>7</sup> esporos/g<sub>biomassa</sub>, 75% de umidade, SN<sub>2</sub>, pH<sub>SN</sub> = 5,5 e 30°C).

Em relação a adição de indutor (alginato de sódio - substrato) se percebeu uma correlação positiva tanto no aumento da atividade enzimática expressa, passando-se de aproximadamente 175 para 250 U/mL (**Figura 22A**). No entanto, o grande ganho foi que houve uma produção contínua de alginase entre 3 e 7 dias quando se adicionou alginato de sódio à biomassa, principalmente porque quando a biomassa era usada sozinha sempre a partir do 5º dia há um decréscimo acentuado da atividade de alginase. A concentração de proteínas nos extratos foi similar, indicando que houve um melhoramento na fermentação da alginase, uma vez que a concentração proteica é similar, mas exibindo maiores atividades (**Figura 22B**).

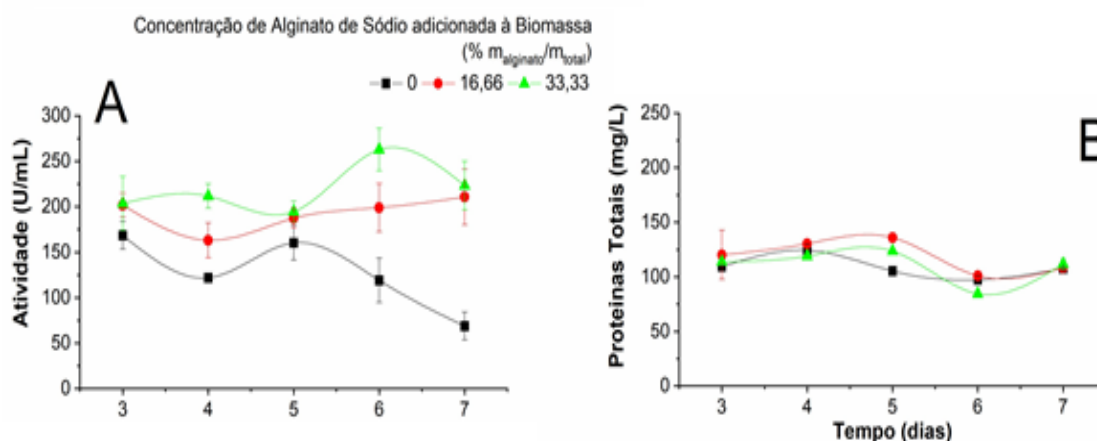
Pode-se pensar o porquê de não se usar o alginato diretamente na fermentação semi- sólida como feito em diversas fermentações submersas utilizando bactérias (BOYD e

CHAKROBARTY, 1994; NAGAKAWA et al., 1998; AN et al., 2009; EFTEKHAR e SCHILLER, 1994; KOTI et al., 2014; SIVAKUMAR et al., 2015; ZHU et al., 2016; TAVAFI et al., 2017; WANG et al., 2017b). *Sargassum* é uma biomassa residual alagoana recolhida em larga quantidade nas praias, praticamente a custo zero, além disso possui diversos nutrientes adicionais à fermentação semi-sólida como sais minerais e proteínas vegetais; além de fornecer uma superfície compacta para fácil desenvolvimento fúngico.

Se fizeram testes apenas com alginato de sódio, mas o estado de agregação para performar a fermentação não se mostrou eficiente com pouco crescimento do fungo e dificuldade na obtenção do extrato enzimático que carregava grande quantidade de alginato solubilizado e dificultava a determinação de atividade enzimática.

O uso de indutor pode ser altamente eficaz em fermentação semi-sólida (MERINO et al., 2019). Para produção da alginase por fermentação submersa, Tavafi et al. (2017) com *Bacillus sp.* TAG8 e Wang et al. (2017b) utilizando *Bacillus halosaccharovorans* verificaram que a expressão dessa enzima era proporcional ao aumento da concentração de alginato de sódio no meio de cultura. Ao se misturar o alginato de sódio.

**Figura 22:** Influência da adição de alginato de sódio à biomassa de *Sargassum* na expressão da alginase.



Fonte: Autor, 2020.

### 5.7 Influência do pH da solução umidificadora (solução nutriente) na expressão de alginase ( $10^7$ esporos/g<sub>biomassa</sub>, SN<sub>2</sub>, 75% de umidade e 30°C).

Em uma fermentação semi-sólida, diferentemente de uma fermentação submersa, facilmente homogeneizável e cujo controle do pH é feito facilmente no seio do líquido, é



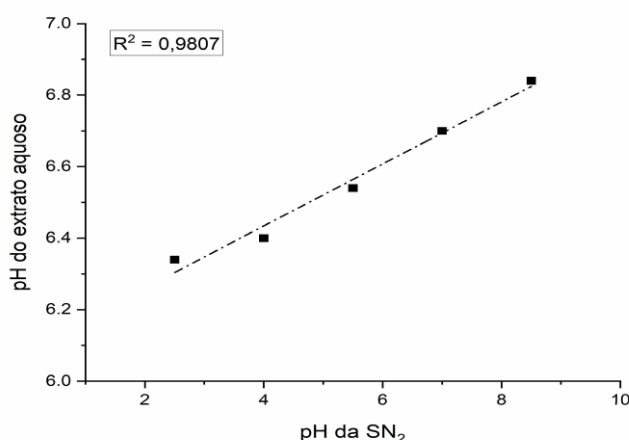
dependente da carga superficial da matriz sólida. O pH durante a fermentação semi-sólida se altera e pode alcançar níveis consideráveis, ácidos ou alcalinos; com grande influência a formação de ácidos durante o crescimento fúngico ou fonte excessiva de nitrogênio adicionada (SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992).

Geralmente esse controle costuma ser feito alterando-se o pH da solução nutriente ou utilizar tampões (que também tem função umidificadora da biomassa), no entanto é um parâmetro empírico e validado em relação a expressão enzimática obtida (SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1992; SAXENA e SINGH, 2011; OLIVEIRA et al., 2018).

Oliveira et al. (2018) verificou diferença significativa na produção e celulasas por *Aspergillus fumigatus*, mesmo com uma variação de pH na solução nutriente pequena, entre 3,1-5,9; usando bagaço de cana de açúcar e obtendo um valor ótimo de 4,5. Saxena e Singh (2011) produziram amilases com *Bacillus sp.* utilizaram tampões para fazerem a umidificação da biomassa e perceberam que mudanças de pH da ordem de 1,0 influenciaram significativamente na expressão enzimática obtida., tendo seu ótimo em pH igual a 7,0. Por sua vez, Saucedo-Castaneda et al. (1992) verificou que uma solução nutriente mais alcalina resultou em menor diminuição do pH final da fermentação garantindo atividade fúngica de *Scwanniomycetes castelii*.

Como verificado na **Figura 23**, um aumento ao pH da solução nutriente resultou em um pH na matriz sólida maior, embora de pequena grandeza, mas pelos resultados que serão expressos nas seções 5.7.1 e 5.7.2, de significativa importância.

**Figura 23:** Mudança no pH superficial da biomassa após a adição de solução nutriente com pHs diferentes.



Fonte: Autor, 2020.

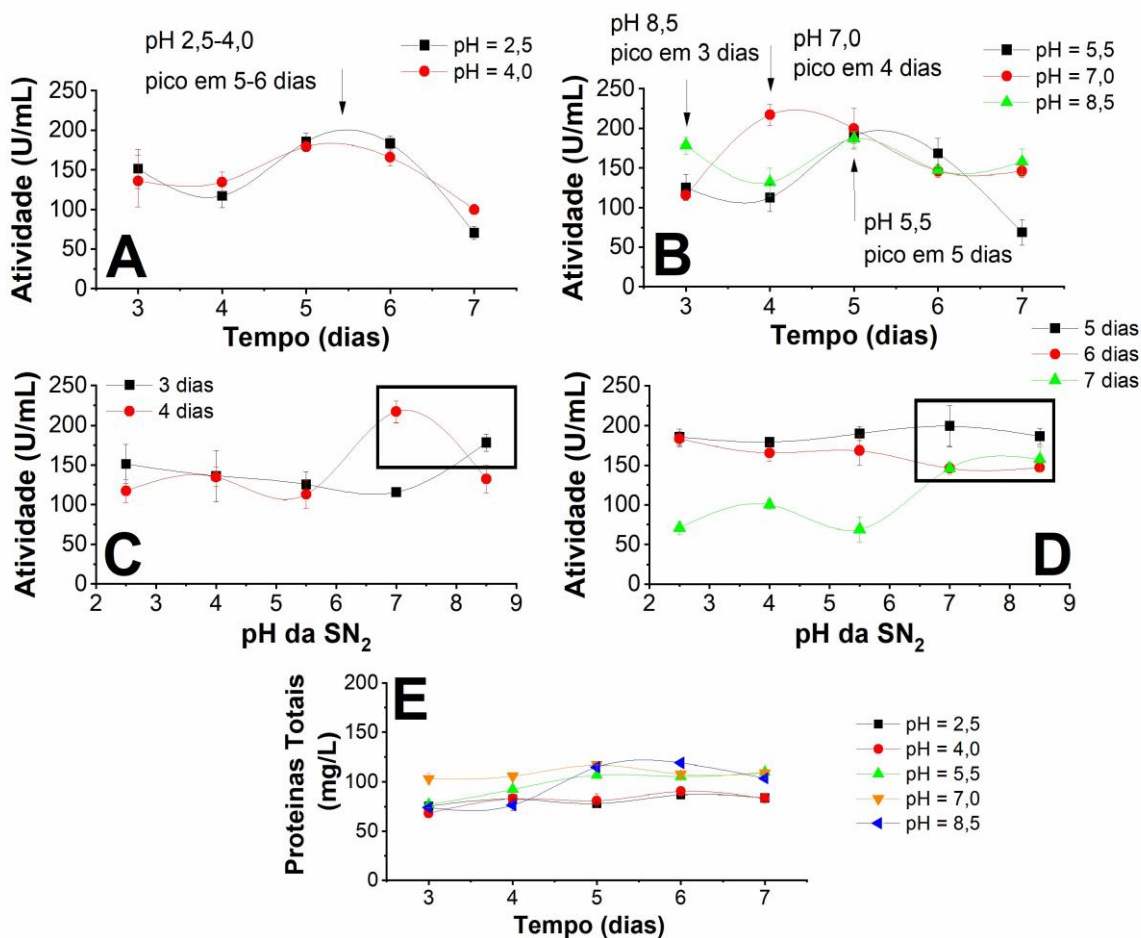
#### 5.7.1 Usando apenas a biomassa de *Sargassum* como substrato

Na primeira batelada fermentada, apenas com a biomassa macroalgal percebe-se o mesmo comportamento verificado nos experimentos anteriores, principalmente para o pH da SN igual a 5,5 (utilizado anteriormente) (**Figura 24B**), havendo picos de produção no 5º dia fermentação, com posterior decréscimo na atividade da alginase (6º e 7º dias de fermentação), mostrando também a reprodutibilidade das fermentações.

Em uma visão geral dos resultados obtidos (**Figura 24A-B**), considerando o tempo de fermentação, percebeu-se que aumentando-se o pH da SN, antecipou-se os picos de produção da alginase, sendo sequencialmente para 2,5-4,0, de 5-6 dias de fermentação; 5,5, de 5 dias de fermentação; 7, de 4 dias de fermentação e; para 8,5, de 3 dias de produção. A maior expressão enzimática ocorreu em pH da SN igual a 7,0, alcançando em torno de 210 U/mL.

Adicionalmente, considerando uma distribuição da atividade em função do pH da SN (**Figuras 24C-D**), percebeu-se que as maiores expressões das atividades em todos os dias de fermentação ocorreram em pHs 7,0-8,5. Em relação a concentração proteica nos extratos, embora sejam visualizadas diferenças, não se verificou uma tendência em função do pH da SN (**Figura 24E**).

**Figura 24:** Expressão da alginase em função do pH da solução umidificadora/solução nutriente (SN<sub>2</sub>) utilizando somente a biomassa de *Sargassum* como substrato.



Fonte: Autor, 2020.

É consolidado na literatura que a produção da enzima, assim como sua estabilidade e melhor expressão ocorra em pH neutro ou levemente alcalino. An et al. (2009) produzindo alginase por fermentação submersa com *Flavobacterium sp.* LXA verificou uma melhor atividade enzimática quando o pH da fermentação foi 7,0. Resultado similar foi verificado por Nagakawa et al. (1998) e Shankar et al. (2016), por fermentação submersa, utilizando *Bacillus sp.* ATB-1015 e *Bacillus sp.*, respectivamente; alcançando pico de atividade em pH 7,0, decrescendo entre 8,0-9,0 e Wang et al. (2017b), em pH igual a 7,0, decrescendo em pHs 6,0 e 8,0. Por outro lado, Koti et al. (2014) verificou uma atividade crescente em fermentação submersa com *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11, entre pHs 6-9, com pico de atividade em 9,0; e Sivakuamr et al. (2015) utilizando *Bacillus sp.*, até pH 8,0, decrescendo em 9,0.

5.7.2. Usando a mistura de biomassa de *Sargassum* com alginato de sódio (16,66%  $m_{\text{alginato}}/m_{\text{total}}$ ) como substrato

De forma similar a **seção 5.7.1**, realizou-se as fermentações com pH da SN diferentes. Como apresentado nos resultados da **seção 5.6**, a presença do alginato de sódio (indutor) aumentou a expressão enzimática, mesmo após o 5º dia, mostrando uma produção contínua até o 7º dia de fermentação, onde alcançou o maior pico de produção em todas as condições de pHs testadas, com máximo de 250 U/mL (**Figura 25A-B**), maior que o 210 U/mL obtido nos experimentos anteriores.

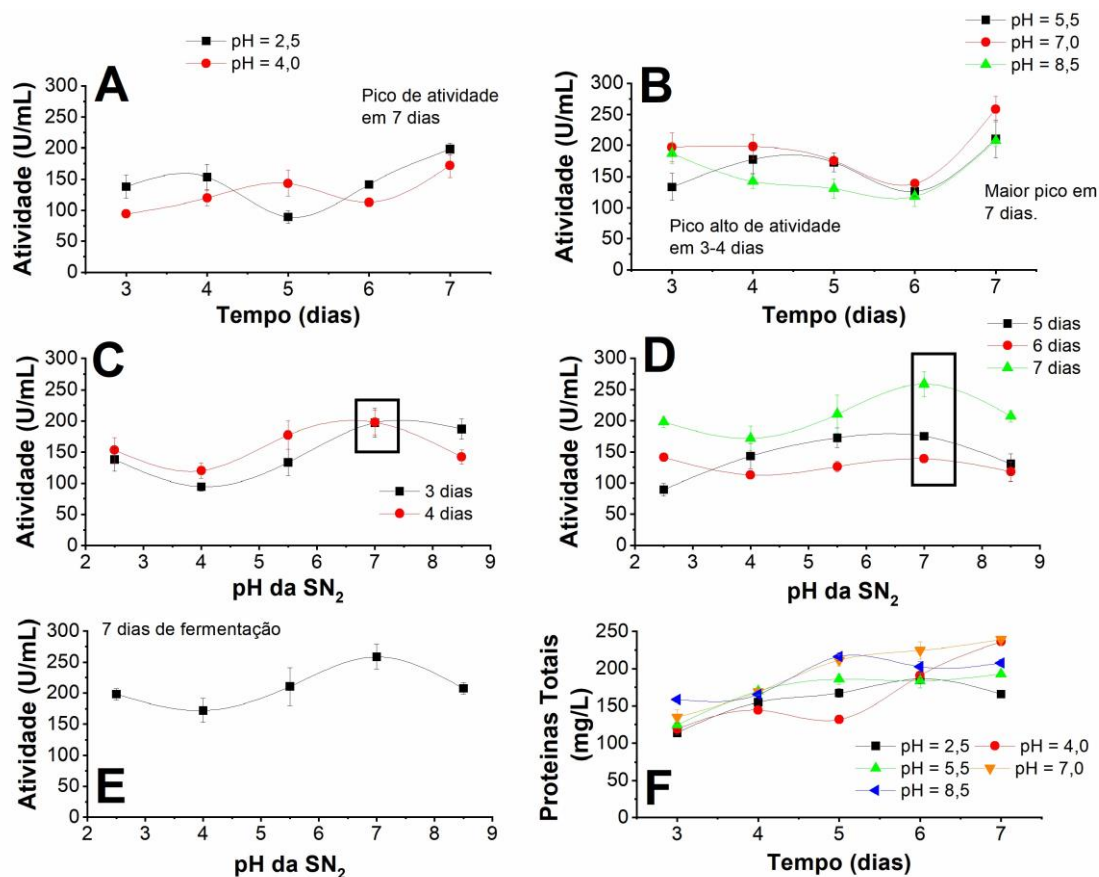
Também verificou-se que picos relativos de atividades foram antecipados na fermentação quando o pH da SN aumentava, confirmando os resultados obtidos apenas com a biomassa macroalgal. Picos em pHs da SN de 2,5-4,0 ocorreram em 7,0 dias, para 5,5, 4-5 dias, e; para 7,0-8,5, de 3-4 dias de fermentação (**Figura 25A-B**).

Quando observa-se a distribuição das fermentações em função do pH da SN (**Figura 25C-D**), se visualiza a mesma constatação feita quando se utilizou apenas a biomassa macroalgal, que a expressão enzimática em todos os dias de fermentação ocorreram quando o pH da SN esteve entre 7,0-8,5.

Por outro lado, a concentração proteica nos extratos aumentou em função do tempo de fermentação, diferentemente dos resultados obtidos na **seção 5.7.1**, o que indica que a presença do indutor além de aumentar a expressão enzimática até o 7º dia de fermentação, também aumentou a concentração de proteínas no extrato, havendo uma relação entre essas duas análises (**Figura 25E**).

Em relação a isso, é noto em literatura que a presença de alginato de sódio em meio aumenta a produção de alginase. Em fermentação submersa, Tavafi et al. (2017) utilizando *Bacillus sp.* TAG8, percebeu aumento da atividade da alginase em concentrações de alginato de sódio até 0,8%. Shankar et al. (2016) e Wang et al. (2017b), de forma similar, alcançaram uma produção crescente de alginase por *Bacillus halosaccharovorans* e *Bacillus sp.*, respectivamente; com concentrações de alginato de sódio até 1%.

**Figura 25:** Expressão da alginase em função do pH da solução umidificadora/solução nutriente (SN<sub>2</sub>) utilizando a biomassa de *Sargassum* como substrato adicionada de 16,66% de alginato de sódio (indutor) (% m<sub>alginato</sub>/m<sub>total</sub>).



Fonte: Autor, 2020.

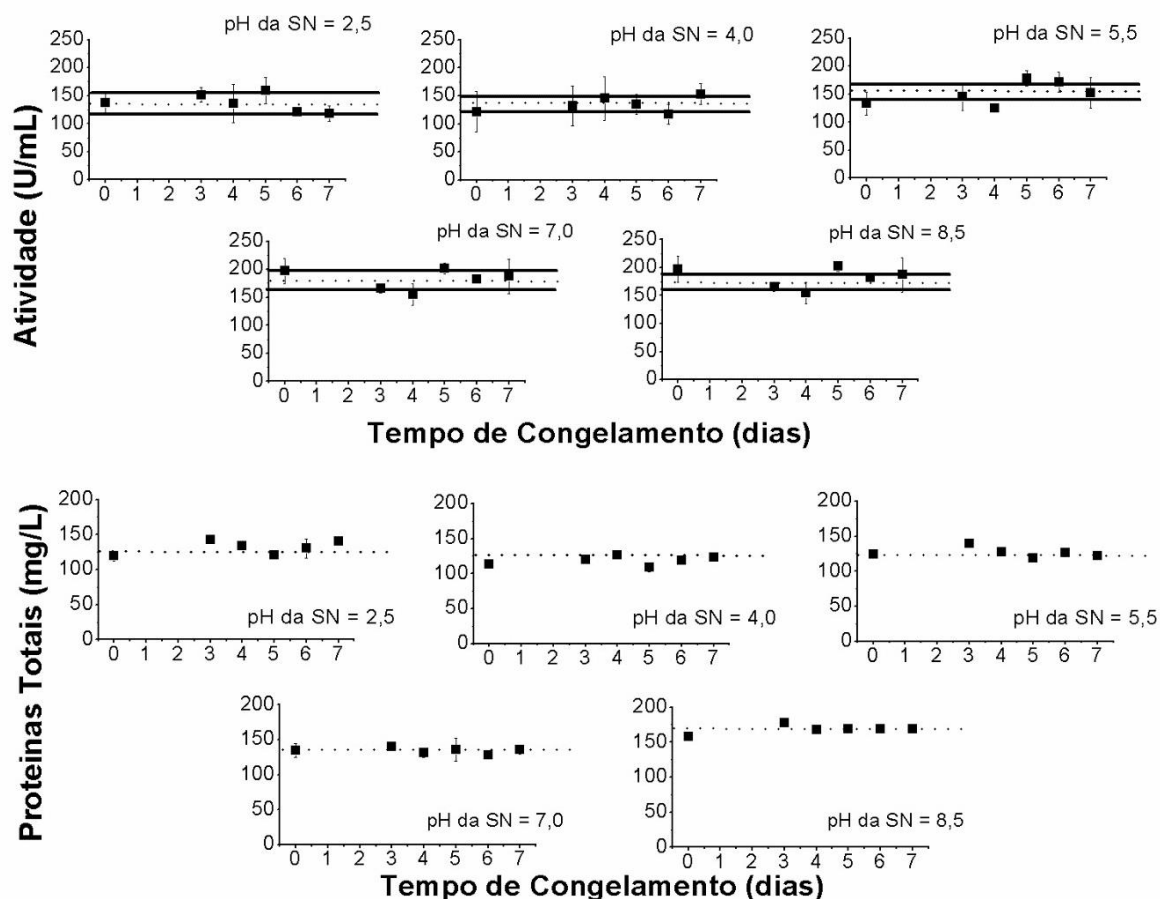
### 5.8 Estabilidade dos extratos enzimáticos ao congelamento ( $10^7$ esporos/g<sub>biomassa</sub>, 75% de umidade, SN<sub>2</sub>, 30°C, 16,66% de alginato de sódio e 3 dias de fermentação).

Ao se produzir um extrato enzimático por fermentação ou algum produto que contenha enzimas em sua formulação, é necessário estudar o mínimo de estabilidade da atividade das enzimas de interesse, e um dos métodos mais comuns, é a redução da temperatura com o resfriamento ou congelamento (MOURA et al., 2016).

Como se percebe pela **Figura 26**, houve estabilidade da atividade enzimática dos extratos nos mais diversos pHs da solução nutriente, em parte, isso pode ser devido ao pH da solução tampão tris-HCl que manteve sempre em pH próximo a 7-7,5; faixa de pH demonstrado em literatura como mais adequado para a alginase (SAWABE, EZURA e KIMURA, 1992;

NAGAKAWA et al., 1998; SIVAKUMAR et al., 2015; TAVAFI et al., 2017); que menor sensibilidade a compostos e/ou enzimas presentes nos extratos provenientes do processo fermentativo.

**Figura 26:** Estabilidade dos extratos enzimáticos ao congelamento. As linhas representadas pelos símbolos (•) e (-) representam a média e o desvio padrão da média de todos os valores.



Fonte: Autor, 2020.

Não é incomum um extrato cru enzimático produzido por fungos em fermentação semi-sólida apresentarem estabilidade quando resfriados ou congelados. Moura et al. (2016) verificaram estabilidade a 25 e -18 °C de complexo enzimático contendo carboidrases, lipases e proteases produzido por *Schizochytrium sp.* Astolfi et al. (2019) também verificaram que complexo enzimático contendo celulasas produzido por *Trichoderma reesei* NRRL 3652 mantiveram estabilidade quando refrigerados ou congelados por cerca de 290 dias.

Essa constatação é importante, visando o desenvolvimento do processo para uma larga

escala, pois, se a enzima fosse muito sensível ou o processo de purificação tivesse que ocorrer rapidamente após o processo fermentativo e extrativo em tampão, implicaria em dificuldade de manipulação e, conseqüentemente, aplicação em processos industriais.

## 6. CONCLUSÕES

Se pôde verificar que a enzima alginase (*alginate lyase*) tem enorme potencial nas mais diversas áreas, desde a agricultura á área médica e que geralmente é produzida por bactérias marinhas utilizando fermentação submersa e alginato de sódio puro como substrato. Nessa tese, estudou-se a fermentação semissólida de alginase utilizando fungo filamentoso e macroalga marrom residual.

Durante a etapa de *screening*, as Phaeophytas foram mais abundantes durante a coleta das macroalgas na praia de Riacho Doce, sendo a do gênero *Sargassum* escolhida para o estudo de prospecção enzimática por fermentação semi-sólida, e a enzima alginase foi selecionada como alvo, tanto pela pouca quantidade de estudos quanto pela baixa disponibilidade no mercado. Foram testados três espécies fúngicas, no entanto, apenas a espécie de *Cunninghamella* foi capaz de crescer de modo satisfatório por toda a superfície da biomassa.

Otimizando-se a solução nutriente umidificadora em relação ao conteúdo de nitrogênio expresso tanto por formas orgânicas (peptona, extrato de levedura e uréia) como inorgânicas (sulfato de amônio) e percebeu-se a influência positiva da presença do extrato de levedura para o desenvolvimento fúngico sobre a biomassa macroalgal e produção de alginase.

Estudou-se a influência da % de umidade e verificou-se que a enzima é produzida de forma crescente entre 65-75% alcançando seu pico de produção e a partir de 80% não é efetivamente produzida, fato causado, provavelmente pelo excesso de água que dificulta a difusão de nutrientes e simultânea adesão do fungo filamentoso á biomassa e ao contato com a atmosfera para captação gasosa em sua respiração. Picos de produção alcançaram 175 U/mL.

Verificou-se que utilizar uma concentração de inóculo entre  $2.10^6$ - $1.10^7$  esporos/g<sub>biomassa</sub>, não altera significativamente a produção de alginase portanto sendo um intervalo de segurança para se trabalhar. Além disso, se verificou a influência da adição de um indutor (alginato de sódio) na expressão enzimática e verificou-se que foi possível auumentar em 43% a produção enzimática, saltando-se de um pico de atividade enzimática de 175 para 250 U/mL utilizando uma substituição mássica da biomassa de *Sargassum* entre 16,66-33,33%.

O pH é um importante fator a se considerar, seja na produção que na atividade efetiva da enzima. Nesse sentido, o controle do pH no processo em estado sólido (fermentação semissólida) costuma estar associado ao pH da solução nutriente (SN) umidificadora ou através da inserção de tampões na umidificação da biomassa. Nessa tese, utilizou-se soluções nutriente (SN<sub>2</sub>) com diferentes pHs e através do extrato aquoso inicial verificou-se que seu pH variava em função do pH



da SN<sub>2</sub>. Como conclusões dessas fermentações, percebeu-se que maiores pHs da SN<sub>2</sub> (7-8,5) anteciparam o pico de produção enzimática e que ele era maior que o daqueles realizados com pHs da SN<sub>2</sub> inferiores.

Quando o estudo da influência do pH da SN<sub>2</sub> foi feito em presença de indutor (alginato de sódio) as mesmas constatações foram obtidas, no entanto picos com até 250 U/mL foram obtidos. Além disso, menores flutuações da produção enzimática foram visualizadas mostrando que o indutor mantém o fungo em contínua atividade na produção de alginase.

Por fim, verificou-se que o extrato enzimático obtido por fermentação semissólida mostrou estabilidade ao congelamento, o que pode ser um ponto positivo, mostrando de forma qualitativa que é baixa a sensibilidade da enzima à perda de atividade e aos componentes presentes no extrato.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

São sugestões para etapas futuras:

- Testagem e seleção de novas cepas fúngicas;
- Verificar a influência da temperatura na fermentação;
- Realizar etapas de separação e purificação enzimática, visando a obtenção de um produto estável e com alta atividade;
- Por fim, a caracterização da estrutura e modo de ação da enzima fúngica produzida.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S., ARAÚJO, M. L., ALMEIDA, R. M. R. G. Uso de resíduo de laranja lima e de casca de coco verde na produção de enzimas. *Scientia Plena*, v. 11, n. 10, p.1-8, 2015.
- ADAMS, J. M., GALLAGHER, J. A., DANNISON, I. S. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pretreatments. *J. Appl. Phycol.*, v. 21, p. 569-574, 2009.
- AFDC. Ethanol production in the world. Disponível em: <<http://www.afdc.energy.gov/data/>>. Acessado em: Abril de 2020, 2016
- AGULHON, P., ROBITZER, M., DAVID, L., QUIGNARD, F. Structural regime identification in ionotropic alginate gels: influence of the cation nature and alginate structure. *Biomacromolecules*, v. 13, p. 215–220, 2012.
- AHMED, S. U., SINGH, S. K., PANDEY, A., KANJILAL, S., PRASAD, R. B. N. Effects of various process parameters on the production of  $\gamma$ -linolenic acid in submerged fermentation. *Food Technology Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 283-287, 2006.
- AITA, B. C., SPANNEMBERG, S. S., SCHMALTZ, S., ZABOT, G. L., TRES, M. V., KUHN, R. C., MAZUTTI, M. A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, p. 103-193, 2019.
- ALMEIDA, H. R. R. C., JUNIOR, J. B. L., QUEIROZ, W. W. C., PERDIGÃO, Y. M. P. Avaliação da morfodinâmica praial - estudo de caso: praia de Riacho Doce-AL. *Revista de Geografia (UFPE)*, v. 29, n. 3, 2012.
- ALMEIDA, H. R. R. De C., CRUZ, R. S., LIMA, A. H. De A., LUZ, V. T. Avaliação das taxas de variação da linha de costa através de imagens orbitais e levantamento GPS na praia de riacho doce Maceió – AL. *Anais do XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR*, p. 5389-5396,

2013.

ALVIRA, P., TOMAS-PEJO, E., BALLESTEROS, M., NEGRI, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMSLER, C. D. *Algal chemical ecology*. Vol. 1. Editora Springer, Birmingham, 2008.

AN, Q., ZHANG, G., WU, H., ZHANG, Z., GONG, W., LIU, Y., LI, X.; Murata, Y. Production and partial properties of alginase from newly isolated *Flavobacterium sp.* LXA. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 842-847, 2008.

AN, Q., ZHANG, G., ZHANG, Z., ZHENG, G., LIAN, L., MURATA, Y., LI, X. Alginate- deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium sp.* LXA and its potential application in protection against pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 161-170, 2009.

ANDRIAMANANTOANINA, H., RINAUDO, M. Characterization of the alginates from five madagascan brown algae. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 555– 560, 2010.

AQUARONE, E., LIMA, U.A., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotechnologia na produção de alimentos*. Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, p. 347-523, 2001.

ASTOLFI, V., ASTOLFI, A. L., MAZUTTI, M. A., RIGO, E., LUCCIO, M. D., CAMARGO, A. F., DALASTRA, C., KUBENECK, S. FONGARO, G., TREICHEL, H. Cellulolytic Enzyme Production From Agricultural Residues for Biofuel Purpose on Circular Economy Approach. *Bioprocess Biosyst EnG.*, v. 42, n. 5, p. 677-685, 2019.

AVAK, K., JORDI, M. F., ROBERT, D. J., TIFFANY, F. C., JOHN, R. Methods related to engineered erythroid cells comprising 4-1BBL. Depositante: Rubius Therapeutics Inc (US). US 10517897B1. Depósito: 31/12/2019.

BARBOSA, M., VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B. Bioactive Compounds from Macroalgae in the New Millennium: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Marine Drugs*, v. 12, n. 9, p. 4934-4972, 2014.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J., MIRANDA, R. U. Biotechnological production and applications of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 4, p. 869-883, 2010.

BARSANTI, L., GUALTIERI, P. Algae: anatomy, Biochemistry, and Biotcchnology. *J. Phycal.*, v. 43, p. 412-414, 2007.

BELTAGY, E.A., EL-BORAI, A., LEWIZ, M., ELASSAR, S.A. Purification and characterization of alginate lyase from locally isolated marine *Pseudomonas stutzeri* MSEA04. *Acta Biologica Hungarica*, v. 67, p. 305-317, 2016.

BERTAGNOLLI, C., ESPÍNDOLA, A. P. D. M., KLEINUBING, S. J., TASIC, L., DA SILVA, M. G. C. *Sargassum filipendula* alginate from Brazil: seasonal influence and characteristics. *Carbohydrate Polymers*, n. 111, p. 619-623, 2014.

BRANDL, J., ANDERSEN, M. R. *Aspergilli: Models for Systems Biology in Filamentous Fungi*. *Current Opinion in Systems Biology*, v. 6, p. 67-73, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BON, E. P. S., FERRAMA, M. A., CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 506 p., 2008.

BOGGIONE, J. M., ALLASIA, M. B., BASSANI, G., FARRUGGIA, B. Potential use of soybean

hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by *Aspergillus niger*. Bioprocess Engineering, v. 6, p. 1-8, 2016.

BORINES, M.G.; LEON, R.L. de; CUELLO, J.L. Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. Bioresource Technology, v. 138, p. 22-29, 2013.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. De A., AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 2.

BOYD, A., CHAKRABARTY, A. M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, v. 60, n. 7, p. 2355-2359, 1994.

CANTAREL, B. L., COUTINHO, P. M., RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD V., HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. Nucleic Acids Res, v. 37, p. 233–238. 2009.

CARDOSO, A. S., VIEIRA, G. E. G., MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. Revista Brasileira Biociências, v. 9, n.4, p. 542-549, 2011.

CASTRO A. M. de, JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010;

ČERTIK, M., BALTESZOVA, L., ŠAJBIDOR, J. Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. Letters in Applied Microbiology, v. 25, p. 101–105, 1997.

CHEN, P., MEN, Y., SUN, Y., YAN, J. J., ZENG, Y., ZHU, Y. Novel alginate lyase, preparation method and application thereof. Depósito: Tianjin inst of industrial Biotechnology chinese academy of sciences. CN109295043A. Depósito: 01/02/2019.

CHEN, P., ZHU, Y., HEN, Y., ZENG, Y., SUN, Y. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Bacillus* sp. Alg07. Marine Drugs, v. 16, n. 86, p. 2- 13,

2018.

CHEN, Y., MAO, W., WANG, B., ZHOU, L., GU, Q., CHEN, Y., ZHAO, C., LI, N., WANG, C., SHAN, J., YAN, M., LIN, C. Preparation and characterization of an extracellular polysaccharide produced by the deep-sea fungus *Penicillium griseofulvum*. *Bioresource technology*, v. 132, p. 178-181, 2013.

CIUBOTĂ-ROSIE, C., GAVRILESCU, M., MACOVEANU, M. Biomass- an Important Renewable Source of Energy in Romania. *Environ Eng Manag J*, v. 7, p. 559-568, 2008.

CLARK, D. E., GREEN, H. C. Alginic acid and process of making same. 2036922 US Patent. 1936

COELHO, M. A. Z., SALGADO, A. M., RIBEIRO, B. D. *Tecnologia Enzimática*. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ, Editora EPUB, edição 10, 2008.

COELHO, S. T., GOLDEMBERG, J., LUCON, O. S., GUARDABASSI, P. M. Brazilian Sugarcane Ethanol: Lessons Learned. *Energy for Sustainable Development*, v. 2, n. 2, p. 26 – 39, 2006.

COIMBRA, C. S. Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Tese (Doutorado em Biociência). Universidade de São Paulo. Instituto de Biociência, Departamento de Botânica, Agardh do Atlântico Sul, 2006.

CONG, Q., XIAO, F., LIAO, W., DONG, Q., DING, K. Structure and biological activities of na alginate from *Sargassum fusiforme*, and its sulfated derivative. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 5, p. 56-65, 2014.

CORREIA, M. D., SOVIERZOSKI, H. H. Gestão e Desenvolvimento Sustentável da Zona Costeira do Estado de Alagoas, Brasil. *Revista de Gerenciamento Costeiro Integrado*, v. 8, n. 2, p. 25-45, 2008.

CORREIA, M. D., SOVIERZOSKI, H. H. Ecossistemas marinhos: recifes, praias e manguezais. Série Conversando sobre Ciências em Alagoas. Maceió: EDUFAL, p. 59-70, 2015.

CUNHA, F. M., BACCHIN, A. L. G., HORTA, A. C. L., ZANGIROLAMI, T. C., BADINO, A. C., FARINAS, C. S. Indirect method for quantification of cellular biomass in a solidscontaining médium used as pre-culture for celulase production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n.1, p. 100-108, 1012.

DAROCH, M., GENG, S., WANG, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, v. 102, p. 1371-1381, 2013.

DASHTBAN, M., SCHARAFT, H., QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Int J. Biol Sci*, v. 5, n. 6, p. 578-595.

DAVIS, P. J. Microbial models of mammalian drug metabolism. *Dev Ind Microbiol*, v. 29, p. 197-291. 1988.

DEL RIO, P. G., DOMÍNGUEZ E., DOMÍNGUEZ, V. D., ROMANÍ, A., DOMINGUES, L., GARROTE, G. Third generation bioethanol from invasive macroalgae *Sargassum muticum* using autohydrolysis pretreatment as first step of a biorefinery. *Renewable Energy*, v. 141, p. 728-735, 2019.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress Energy Combust. Sci.* v. 31, p. 466– 487, 2005.

DERWENT [Base de dados – Internet]. Derwent Innovations Index. Disponível em: <[http://appswebofknowledge.ez9.periodicos.capes.gov.br/DIIDW\\_GeneralSearch\\_input.do?product=DIIDW&search\\_mode=GeneralSearch&SID=7AcaQ53pO99a4LY3mmz&preferencesSaved](http://appswebofknowledge.ez9.periodicos.capes.gov.br/DIIDW_GeneralSearch_input.do?product=DIIDW&search_mode=GeneralSearch&SID=7AcaQ53pO99a4LY3mmz&preferencesSaved)>. Acesso em: 18 de Junho de 2018.

DOMÍNGUEZ-SANTOS, R., KOSALKOVÁ, K., GÁRCIA-ESTRADA, C., BARREIRO, C., IBÁÑEZ, A., MORALES, A., MARTÍN, J. F. Casein phosphopeptides and CaCl<sub>2</sub> increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Proteomics*, v. 156, p. 52-62, 2017.

DONG, S., WEI, T. D., CHEN, X. L., LI, C. Y., WANG, P., XIE, B. B., QIN, Q. L., ZHANG, X. Y.,



PANG, X. H., ZHOU, B. C., ZHANG, Y. Z. Molecular insight into the role of the N- terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18. J Biol Chem, v. 289, n. 43, p. 29558-29569, 2014.

EFTEKHAR, F., SCHILLER, N. L. Partial purification and characterization of a mannuronan-specific alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. Current Microbiology, v. 29, p. 37-42, 1994.

ELAHWANY, A. M. D., ELBORAI, A. M. Optimization of médium composition for extracellular alginate lyases of a marine bacterium. African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 10, p. 2403-2409, 2012.

ENQUIST-NEWMAN, M. E., FAUST, A. M., BRAVO, D. D., SANTOS, C. N. S., RAISNER, R. M., HANEL, A., SARVABHOWMAN, P., LE, C., REGITSKY, D. D., COOPER, S. R., PEEREBOOM, P., CLARK, A., MARTINEZ, Y., GOLDSMITH, J., CHO, M. Y., DONOHUE, P. D., LUO, L., LAMBERSON, B., TAMRAKAR, P., KIM, E. J., VILLARI, J. L., GILL, A., TRIPATHI, S. A., KARAMCHEDU, P., PAREDES, C. J., RAJGARHIA, V., KOTLAR, H. K., BAILEY, R. B., MILLER, D. J., OHLER, N. L., SWIMMER, C., YOSHIKUNI, Y. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. Nature, v. 505, p. 239-243, 2014.

ESPECENET [Base de dados – Internet]. Patent Search. Disponível em: <<https://worldwide.espacenet.com/>>. Acesso em: Abril de 2020;

FEDOROV, A.S., S. KOSOUROV, M.L. GHIRARDI; M. SEIBERT. Continuous H<sub>2</sub> photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel twostage, sulfate-limited chemostat system. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 124, p. 403-412. 2006.

FENICE, M., SALBMANN, L. di, GIAMBATTISTA, R., FEDERICI, F. Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3) of *Verticillium lecanii*. Res. Microbiol, v. 149, p. 289-300, 1998.

FONTES, R., RIBEIRO, J. M., SILLERO, A. Inhibition and activation of enzymes. The effect of a modifier on the reaction rate and on kinetic parameters. Acta Biochim Pol., v. 47, p. 233- 57, 2012.

FREITAS, S. M. C., STAMFORD, T. C. M., FRANCO, L. O., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. *Asian Chitin J.*, v. 2, p. 29- 38, 2007.

FUKUDA, E. K., VASCONCELOS, A. F. D., MATIAS, A. C., DE MELO, A. B., DEKKER, R. F. H., DA SILVA, M. L. C. Polissacarídeos de parede celular fungica: purificação e caracterização. *Semina:Ciencias Agrarias*, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GALEMBECK, F., BARBOSA, C. A. S., SOUSA, R. A. Aproveitamento Sustentável de biomassa e de recursos naturais na inivação química. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.

GAN, Q., ALLEN, S. J., TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

GANZON-FORTES, E. T., CAMPOS, R. R., UDARBE, J. The use of Philippine seaweeds in agriculture. *Appl. Phycol. Forum*, v. 10, p. 6-7, 1993.

GAO, J., WENG, H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F., XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid- state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2/3, p. 85-101, 2003.

GOFFREDO, G. B., CITTERIO, B., BIAVASCO, F., STAZI, F., BARCELLI, S., MUNAFÒ, P. Nanotechnology on wood: The effect of photocatalytic nanocoatings against *Aspergillus niger*. *Journal of Cultural Heritage*, v. 27, p. 125-136, 2017.

GRANHAM, L. E., GRANHAM, J. M., WILCOX, L. W. *Algae*. Edição 2. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, pp. 1-616, 2009.

GRAMINHA, C. V., MARTINS, A. L. M., FAIÃO, C. A., BALSALOBRE, M. A. A. Aditivos na produção de Bovinos Confinados. SILO Inc., v.1, p. 23-34, 2007.

GROWTTHAMAN, M. K., KRISHNA, C., MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation – na overview. Agriculture and Food Production, v. 1, p. 305-353, 2001.

HANSEN, J. B., DOUBET, R. S., RAM, J. Alginase Enzyme Production by *Bacillus circulans*. Applied and Environmental Microbiology, v. 47, n. 4, p. 704-709, 1984.

HARUN, N. A. F., BAHARUDDIN, A. S., ZAINUDIN, M. H. M., BHRIN, E. K., NAIM, M. N., ZAKARIA, R. Cellulase Production from Treated Oil Palm Empty Fruit Bunch Degradation by Locally Isolated *Thermobifida fusca*. BioResources, v. 8, n. 1, p. 676-687, 2013.

HEHEMANN, J. H., BORASTON, A. B., CZJZEK, M. A sweet new wave: structures and mechanisms of enzymes that digest polysaccharides from marine algae. Current Opin in Structural Biol, v. 28, p. 77-86, 2014.

HIFNEY, A. F., FAWZY, M. A., ABDEL-GAWED, K. M., GOMAA, M. Upgrading the antioxidante properties of fucoidan and alginate from *Cystoseira trinodis* by funfgal fermentation or enzymatic pretreatment of the seaweed biomass. Food Chemistry, v. 269, p. 387-395, 2018.

HONG, I.K., JEON, H., LEE, S.B. Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 20, p. 2687-2691, 2014.

HU, T., ZHIU, Y., DAI, L., WANG, Y., LIU, D., ZHANG, J., LIU, H. Enhanced cellulose production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. Procedia Engineering, v. 18, p. 335-340, 2011.

HUANG, L., ZHOU, J., LI, X., PENG, Q., LU, H., DU, Y. Xharacterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium* sp. S20. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,

v. 40, pp. 113-122, 2013.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p, 2005.

INPI [Base de dados – Internet]. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br>>. Acesso em: Abril de 2020.

ISLAN, G. A., BOSIO, V. E., CASTRO, G. R. Alginate lyase and ciprofloxacin co- immobilization on biopolymeric microspheres for cystic fibrosis treatment. *Macromol Biosci*, v. 13, p. 1238-48, 2013.

JECU, L. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2000.

JIANG, Z., WANG, Y., JIANG, Y., XU, Y., MENG, B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. *Journal of International Medical Research*, v. 41, n. 2, p. 502–510, 2013.

JOHN, R. P., ANISHA, G. S., NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 186-193, 2011.

JONES, E. E.; WEBER, F. J.; OOSTRA, J.; RINZEMA, A.; MEAD, A.; WHIPPS, J. M. Conidial quality of the biocontrol agent *Coniothyrium minitans* produced by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, N 12, pag. 196-207, 2004;

JUTURU, V., WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, p. 188-203, 2014.

KIM, D., LEE, S., JEONG, G. Production of reducing sugars from *Enteromorpha intestinalis* by hydrothermal and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 348-353, 2014.

KIM, H. T., KO, H. J., KIM, N., KIM, D., LEE, D., CHOI, I. G., WOO, H. C., KIM, M. D. Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) from *Saccharophagus degradans*, v. 36, n. 6, p. 1087-1092, 2012.

KIM, H. S., LEE, C. G., LEE, E. Y. Alginate Lyase: Structure, Property, and Application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*; v.16, n. 5, p. 843-851, 2011.

KOBAYASHI, T., UCHIMURA, K., MIYAZAKI, M., NAGI, Y., MORIKOSHI, K. A new higher-alkaline alginate lyase from a deep-sea bacterium *Agarivorans sp.* *Extremophiles*, v. 13, n. 1, pp. 121-129, 2009.

KONNO, N., ISHIDA, T., IGARASHI, K., FUSHINOBU, S., HABU, N., SAMEJIMA, M., ISOGAI, A. Crystal structure of polysaccharide lyase Family 20 endo- $\beta$ -1,4-glucuronan lyase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters*, v. 583, pp. 1323-1326, 2009.

KOTI, B.A., MANOHAR S., LOLITHA, J. Media optimization for depolymerization of alginate by *Pseudomonas aeruginosa* AG LSL-11. *International Letters of Natural Sciences*, v. 19, pp. 30-39, 2014.

KRIJGSHELD, P., BLEICHRODT, R., VELUW, G. J. V., WANG, E., MÜLLER, W. H., DIJKSTERHUIS, J., WOSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, v. 74, p. 1-29, 2013.

KRIENITZ, L., HEGEWALD, E. H. LORA, E. E. S.; ANDRADE, R. V. Geração de energia e gaseificação de biomassa. *Biomassa & Energia*, v. 1, n. 3, p. 311-320, 2004.

KUMAR, S., GUPTA, R., KUMAR, G., SAHOO, D., KUHAD, R. C. Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 150-156, 2013.

LARTIGUE J. N., HAYDEN, L. B., PULPER J., CEBRIAN, J. The impact of salinity fluctuations

on net oxygen production and inorganic nitrogen uptake by *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). *Aquatic Botany*, v. 75, p. 339-350, 2003.

LAVIN, P., GALLARDO-CERDA, J., TORRES-DIAS, C., ASENCIO, G., GONZALEZ, M. Cepa antártica de *Bacillus sp.*, com actividad extracelular de tipo agarolítica y alginatoliasa. *Gayana*, v. 777, n. 2, pp. 1-9, 2013.

LEVER, M., HI, G., CORD-RUWISCH, R. Simplifying cellulase production by using environmental selection pressures and recycling substrate. *Environmental Technology*, v. 334, n. 4, p. 471-475, 2013.

LI, A., WANG, L. Method for utilizing high-density culture gene engineering bacteria to prepare alginate lyase. Depósito: Univ. Shanghai Ocean. CN102864136A. Depósito: 09/01/2013.

LI, J., DONG, S., SONG, J., LI, C., CHEN, X., XIE, B., ZHANG, Y. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudomonas sp.* SM0524. *Marine Drugs*, v. 9, pp. 109-123, 2011. (a)

LI, L., JIANG, X., GUAN, H., WANG, P. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas sp.* HZJ216. *Carbohydrate Research*, v. 346, pp. 794-800, 2011. (b)

LI, S., WANG, L., HAO, J., XING, M., SUN, J., SUN, M. Purification and characterization of a new alginate lyase from marine bacterium *Vibrio sp.* SY08. *Marine Drugs*, v. 15, n. 1, p. 1- 11, 2017.

LI, L., QUIN, S., NWU, M., LIU, Z., JIAO, X., CUI, Y. AAlginate- lyase-generating bacilli and preparation method and application thereof. Depósito: Yantai Inst Coastal Zone Res Cas. CN108277184A. Depósito: 31/07/2018.

LI, S., WANG, Z., WANG, L., PENG, J., WANG, Y., HAN, Y., ZHAO, S. Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Bioresource Technology*, v. 281, p. 84-89, 2019.

LIAO, H., FAN, X., MEI, X., WEI, Z., RAZA, W., SHEN, Q., XU, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass & Bioenergy*, v. 74, p. 122-134, 2015.

LIMA, C. de; MICHELS, M. F.; AMORIM, R. THE DIFFERENT TYPES OF SUBSTRATES USED IN ATHLETE'S HYDRATION FOR IMPROVEMENT OF THE PERFORMANCE. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v. 1, n. 1, p. 73-83, 2007;

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. Vol. 2, Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 412 p., 2011.

LÓPEZ-CERVANTES, J., SÁNCHEZ-MACHADO, D. I., ROCHIN, K. R. F. *Proceso de Biodegradación y composición*. Depositante: Juan Pedro Vallerejo Lopez. EP 2515674. Depósito: 02/06/2016.

MAFRA Jr, L. L., CUNHA, S. R. Bancos de *sargassum cymosum* (phaeophyceae) na enseada de armação do itapocoroy, penha, sc: biomassa e rendimento em alginato. *FACIMAR*, v. 6, p. 111-119, 2002.

MALISSARD, M., CHAVAGNAT, F., DUEZ, C., VACHERON, M., GUINAND, M., MICHEL, G., GHUYSEN, J. Overproduction of the mannuronate alginate lyase AlxMB. *FEMS Microbiology Letters*, v. 126, p. 105-112, 1995.

MANNS, D., NYFFENEGGER C., SAAKE B., MEYER, A. S. Impact of different alginate lyases on combined cellulase-lyase saccharification of brown seaweed. *RSC Adv.*, v. 6, p. 45392-45401. 2016.

MARQUES, C. T.; AZEVEDO, T. C. G.; NASCIMENTO, M. S.; MEDEIROS, V. P.; ALVES,

L. G.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 1, p. 115-122, 2012.

MARTINS, J. E. C., MELO, N. T. e HEINS-VACCARI, E. M. Atlas de Microbiologia Média, Copyright, Editora Manole Ltda, v. 4, p. 39-45, 2005.

MARRAIKI, N., VIJAYARAGHAVAN, P., ELGORBAN, A. M., DHAS, D. S. D., AL-RASHED, S., YASSIN, M. T. Low cost feedstock for the production of endoglucanase in solid state fermentation by *Trichoderma hamatum* NGL1 using response surface methodology and saccharification efficacy. Journal of King Saud University – Science, v. 12, p. 1718-1724, 2020.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. Bioresource Technology, v. 83, n. 1, p. 37–46, 2001.

MERINO, A., EIBES, G., HORMAZA, A. Effect of copper and different carbon and nitrogen sources on the decolorization of an industrial dye mixture under solid-state fermentation. Journal of cleaner Production, v. 237, p. 117-123, 2019.

MILLEDGE, J. J., NIELSEN, B. V., BAILEY, D. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, v. 15, n. 3, p. 67–88, 2015.

MILLER, J. G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MICHAUD, P., DA-COSTA, A., COURTOIS, B., COURTOIS, J. Polysaccharide Lyase Recent Development as Biotechnological Tool. Critical Reviews in Biotechnology, v. 23, n. 4, p. 233-266, 2003.

MOHAPATRA, B. R. Biocatalytic characteristics of chitosan nanoparticle-immobilized alginate lyase extracted from a novel *Arthrobacter* species AD-10. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 23, 101458, p. 1-8, 2020.

MONTEIRO, V. N., SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista Processos Químicos, v. 3, n. 5, p. 9-23. 2009.



MOURA, G. de S., LANNA, E. A. T., DONZELE, J. L., FALKOSKI, D. L., REZENDE, S. T. R., OLIVIEIRA, M. G. de A., ALBINO, L. F. T. Stability of enzyme complex solid-state fermentation subjected to the processing of pelleted diet and storage time at diferente temperatures, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 45, n. 12, p. 731-736, 2016.

MOREIRA, L., CABRERA, R., SUÁREZ, A. M. Evaluación de la biomasa de macroalgas marinas del género *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales). *Revista de investigaciones marinas*, v. 27, n. 2, p. 115-120, 2006.

MORETTI, A., SARROCCO, S. Fungi. In B. Caballero, P. Finglas & F. Toldrá (Eds.), *The Encyclopedia of Food and Health*, v. 3, n. 2, pp. 162–168, 2015.

MURRAY, P. R., ROSSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. *Microbiologia: Médica*. 5º edição, Elsevier Editora Ltda, v. 4, p. 770-773, 2006.

MURATA, K., KYOTO, U., HASHIMOTO, W., MARUHA, N. H., KAWAI, S., ODA, H., IOHANA, K., MIKAMI, B., TAKEDA, H., YONEYAMA, F., OCHIAI, A. Ethanol Production from ocean biomass. Depósito: Oldon, Spivak, McClelland, Maiar & Neutedt, L. L. P. . US 20120220004. Depósito: 30/08/2012.

NAGAKAWA, A., OZAKI, T., CHUBACHI, K., HOSOYAMA, T., OKUBO, T., TYOBE, S., SUZUKI, T. An effective method for isolating alginate lyase – producing *Bacillus* sp. ATB- 1015 strain and purification and characterization of the lyase. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, pp. 328-335, 1998.

NAMPOOTHIRI, K. M., TOMES, G. J., ROOPESH, K., SZAKACS, G., NAGY, V., SOCCOL, C. R., PANKEY, A. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, p. 205-214, 2004.

NARRAR, M., DIXIT, G., DIVECHA, J., MADAMWAR, D., SHAH, A. R. Production of cellulases by solid state fermentation wuith *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresource Technology*, v. 121, p. 355-361, 2012.

NIELSEN, J. C., GRIJSEELS, S., PRIGENT, S. JI, B., DAINAT, J., NIELSEN, K. F., FRISVAD, J. C., WORKAMN, M., NIELSEN, J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 6, p. 937-947, 2017.

NIGAM, D., ASTHANA, M., KUMAR, A. *Penicillium: A Fungus in the Wine and Beer Industries*. *Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 187-200, 2017.

NITAYAVARDHANA, S., SHRESTHA, P., RASMUSSEN, M. L., LAMSAL, B. P., LEEUWEN, J. V. H., KHANAL, S. K. Ultrasound Improved Ethanol Fermentation From Cassava Chips in Cassava-Based Ethanol Plants. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 8, p. 2741-2747, 2010.

OLIVEIRA, S. D., PADILHA, C. E. A., ASEVEDO, E. A., PIMENTEL, V. C., ARÁUJO, F. R., MACEDO, G. R. de, SANTOS, E. S. dos. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 6, p. 937-944, 2018.

PALMA, D. C. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos metanólicos de diferentes espécies de algas e plantas halófitas. 2011. Dissertação (Mestre em Engenharia Biológica) – Universidade do Algarve – Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A., NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology. *Nova Deli: Asiatech*, v. 3, p. 221-230, 2011.

PAPI, M., MAIORANA, A., BUGLI, F., TORELLI, R., POSTERANO, B., MAULUCCI, G., SPIRITO, M. De, SANGUINETTI, M. Detection of biofilm-grown *Aspergillus fumigatus* by Means of Atomic Force Spectroscopy: Ultrastructural Effects of Alginate Lyase. *Microscopy and Microanal*, v. 18,n. 5, p. 1088-1094, 2012.

PAULUSSEN, C., HALLSWORTH, J. E., PÉREZ- S. A., NIERMAN, W. C., HAMILL, P. G., BLAIN, D., REDIERS, H., LIEVENS, B. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic

potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microbial Biotechnology, v. 10, n. 2, p. 296-322, 2017.

PRAKASH, G. V. S. B.; PAHMAJA, V.; KIRAN, R. R. S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technology, V. 99, N. 6, Pag.1530-1537, 2008;

PI [Base de dados – Internet]. Patent Inspiration. Disponível em: <<https://app.patentinspiration.com>>. Acesso em: Abril de 2020.

PINTO, G. A. S., BRITO, E. S. de, ANDRADE A. M. R., FRAGA, S. L. P., TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, p. 102-108, 2005.

PRAKASH, R., JHA, S. N. Basics of the genus *Aspergillus*. International Journal of Research in Botany, v. 4, n. 2, p. 26-30, 2014.

PREISS, J., ASHWELL, G. Alginic acid metabolism in bacteria: I. enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-l-erythro-5-hexoseulose uronic acid. J. Biol.Chem, n. 237, p. 309–316, 1962.

QIAO, L., YANG, X., XIE, R., DU, C., CHI, Y., ZHANG, J., WANG, P. Efficient production of ulvan lyase from *Ulva prolifera* by *Catenovulum* sp. LP based on stage-controlled fermentation strategy. Algal Research, v. 46, p. 101-112, 2020.

RAIMBAULT, M. General and Microbiological aspects of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Biotechnology, v. 3, n. 3, p. 255-260, 1998.

RAGHUKUMAR, S. Fungi: Characteristics and Classification. In: Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems. Springer, v. 4, p. 1-15, 2017.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. Química

Nova, v. 26, p. 863-871, 2003.

RASHAD, M. M., SITOBY, M. Z., SHAROBEEM, S. F., MAHMOUD, A. E., NOOMAN, M. U., AL-KASHEF, A. S. Production, Purification and Characterization of Extracellular Protease from *Candida guilliermondii* using Okara as a Substrate. *Advance Journal of Food Science and Technology*, v. 32: p. 100-109, 2010.

RAVANAL, M. C., SHARMA, S., GIMPEL, J., REVECO-URZUA, F. E., OVERLAND, M., HORN, S. J., LIENQUEO, M. E. The role of alginate lyases in the enzymatic saccharification of brown macroalgae, *Macrocystis pyrifera* and *Saccharina latissima*. *Algal Research*, v. 26, p.287-293, 2017.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, p. 1-234, 2007.

RAVEN, J. A., ANDREWS, M., QUIGG, A. The evolution of oligotrophy: implications for the breeding of crop plants for low input agricultural systems. *Ann. Appl. Biol.*, v. 146, p. 261– 280, 2005.

RAWAT, I., KUMAR, R.R., MUTANDA, T., BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444-467, 2013.

REGALADO, E. L., LAGUNA, A., TORRES, M., SABATIER, J. D., HERNÁNDEZ, M., FERRER, A. E., NOGUEIRA, C. Bleaching of sodium alginate from the brown seaweeds *Sargassum* with hydrogen peroxide. *Quím. Nova*, v. 30, n. 1, 2007.

RICHARDSON, M. D., WARNOCK, D. W. *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd, 2003.

RIZZELLO, C. G., VERNI, M., BORDIGNON, S., GRAMAGLIA, V., GOBBETTI, M. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. *Food microbiology*, v. 64, p. 72-82, 2017.

ROSSI, M., AMARETTI, A., RAIMOND, S., LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Dr. Margarita Stoytcheva., v. 1, p. 72-82, 2011.

SAMSON, R. A., VISAGIE, C. M., HOUBRAKEN, J., HONG, S. B., HUBKA, V., KLAASSEN, C. H. W., PERRONE, G., SEIFERT, K. A., SUSCA, A., TANNEY, J. B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology, v. 78, p. 141- 173, 2014.

SANCHEZ, S. R., SANCHEZ, I. G., ARÉVALO-VILLENA, M., PÉREZ, A. B. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 38, n. 3, p. 587-593, 2015.

SANTIAGO, A. L. C. M. De A., SANTOS, P. J. P., MAIA, L. C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 1, p. 299-305, 2013.

SANTIAGO, A. L. C. M. De A, SOUZA-MOTTA, C. M. Isolation of Mucorales from processed maize (*Zea mays* L.) and screening for protease activity. Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, n. 4, p. 698-700, 2008.

SANDHYA, C., SUMANTHA, A., SZAKACS, G., PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova, v. 35, n. 5, 197-202, 2012;

SAUCEDO-CASTANÊDA, G., LONSANE, B. K., NAVARRO, J. M., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of

*Schwanniomyces castelli*. Lett Appl Microbiol., v. 15, n. 4, p. 164-167, 1992.

SAXENA, R., SINGH, R. Amylase Production by solid-state fermentation of Agro-industrial wastes using *Bacillus sp.* Journal of Microbiology, v, 42, p. 1334-1342, 2011.

SAWABE, T., EZURA, Y., KIMURA, T. Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Alteromonas sp.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, v. 58, n. 3, p. 521-527, 1992.

SCIENCE DIRECT [Base de dados – Internet]. Elsevier. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: Abril de 2020;

SCIELO [Base de dados – Internet]. SciELO Citation Index. Disponível em <<http://www.scielo.org/php/index.php>>. Acesso em: Abril de 2020;

SCHAUMANN, K., WEIDE, G. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. Hydrobiologia, 2041205, p. 589-596, 1990.

SCOPUS [Base de dados – Internet]. Elsevier. Disponível em: <<https://www-scopus-com.ez9.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: Abril de 2020;

SENA, A. R. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. Sitientibus, v. 35, p. 91-98, 2006.

SHANKAR, T., SIVAKUMAR, T., SATYA, C., PONMANICKAM, P. Purification, characterization and immobilization of alginase produced by *Bacillus sp.* associated with *Sargassum wightii*. Universal Journal of Microbiology Research, v. 4, n. 1, pp. 11-22, 2016.

SHARADA, R., VENKATESWARLU, G., VENKATESWAR, S., ANANDRAO, M. Application s of cellulases – Review. International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences, v. 4, n. 2, p. 424-437, 2014.

SILVA, F.L., CAMPOS, A.O., SANTOS, D.A., OLIVEIRA JUNIOR, S.D., PADILHA, C.E.A., SOUSA JUNIOR, F.C., MACEDO, G.R., SANTOS, E.S. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. *Renewable Energy*, v. 116, p. 299-308, 2018.

SILVA, C.E. F., BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: a review and technological outlook. *Process Biochemistry*, v. 51, p. 1833-1842, 2016.

SILVA, A. C. V., SILVA, M. J. F., NOVA L. L. M. V., OLIVEIRA, F. A., GUEDES, E. A. C. Biodiversidade de algas marinhas bentônicas do litoral do Estado de Alagoas: Praia de São Miguel dos Milagres. 2008. 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal, 2008.

SIM, Y. C., NAM, Y. S., SHIN, E., KIM, S., CHANG, I. S., RHEE, J. S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. *Pharmazie*, v. 58, n. 4, p. 252-256. 2003.

SIVAKUMAR, T., SATHYA, C., SHANKAR, T., PONMANICKAM, P. Screening and optimization of alginase producing *Bacillus sp.* From seaweed. *Journal Research article*, v. 14, n. 2, p. 421-429, 2015.

SINGH, R. P.; GUPTA, V., KUMARI, P., KUMAR, M., REDDY, C. R. K., PRASSAD, K., JHA, B. Purification and partial characterization of na extracelular alginate lyase from *Aspergillus oryzae* isolated from brown seaweed. *Journal of Applied Phycology.*, v. 23, p. 755- 76, 2011.

SMIDSRØD, O., SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trend Biotechnol*, v. 8, p. 71–78, 1990.

SPOLAORE, P., CASSAN, C.J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2016;

SUN, X., SHEN, W., GAO, Y., CAI, M., ZHOU, M., ZHANG, Y. Heterologous expression. And

purification of a marine alginate lyase in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, v. 153, p. 97-104, 2019.

STAHL, W., SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1740, p. 101-107, 2005.

STÜBIGER, S., WUCZKOWSKI, M., MANCERA, L., LOPANDIC, K. STERFLINGER, K., BELGACER, O. Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping. *Journal of Microbiological Methods*, v. 130, p. 27-37, 2016.

SUBARYONO, P., PERANGINANGIN, R., SUHARTONO, M. T., ZAKARIA, F. R. Alginate Lyases: Sources, Mechanism of Activity and Potential Application. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 105 - 116. 2013.

SUN, H. H., MAO, W. J., CHEN, Y., GUO, S. D., LI, H. Y., QI, X. H., YU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium sp.* F23-2. *Carbohydrate polymers*, v. 78, n. 1, p. 117-124, 2009.

SUN, L., HUANG, H. H., LIU, L., ZHONG, D. F. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.2722–2727, 2004.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v.83. n. 1. p.1-11, 2002.

SZEKALSKA, M., PUCIŁOWSKA, A., SZYMAŃSKA, E., CIOSEK, P., WINNICKA, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, v. 16, p. 1-17, 2016.

TAN, I. S., LEE, K. T. Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study. *Energy*, v. 78, p. 53-62, 2014.

TAVAFI, H., ABDI-ALI, A., GHADAM, P., GHARAVI, S. Screening and optimization of media



compositions for extracellular alginate lyase production. Iranian Biomedical Journal, v. 21, n. 1, p. 48-56, 2017.

TAKA AKI, I., YOSHIHISA, T., TOSHI AKI, K. Method for improving infection ratio of mycorrhizal fungi. Depositante: Meiji Seika Kaisha. JP H09241112A. Depósito: 16/08/1997.

TEDERSOO, L., BAHRAM, M., PÖLME, S., KÖLJALG, U., YOROU, N. S., WIJESUNDERA, R., RUIZ, L. V., VASCO-PALACIOS, A. M., THU, P. Q. Global diversity and geography of soil fungi. Science, v. 346, n. 6213, p. 125-688, 2014.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. Revista Virtual de Química, v. 5, n. 3, p. 343-362, 2012.

THOMAS, F.R. Algae for liquid fuel production Oakhaven Permaculture center. Permaculture Activist, v. 59, p. 1-2, 2006.

TORRES, E. M., SOKOLSKY, T., TUCKER, C. M., CHAN, L.Y. , BOSELLI, M., DUNHAM, M. J., AMON, A. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. Science, v. 317, n. 5840, p. 916-24, 2007.

TRIVEDI, N., GUPTA, V., REDDY, C. R. K., JHA, B. Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Deme. Bioresource Technology, v. 150, p. 106-112, 2013.

VELAYUTHAM, P., NITHYA, D. M. Biosiesel Production from Fungi. Indian Journal of Natural Sciences, v. 1, n. 5, p. 976-997, 2011.

VALASQUES, G. L. J., BOFFO, E. F., SANTOS, J. D. G., BRANDÃO, H. N., MASCARENHAS, A. J., CRUZ, F. T., ASSIS, S. A. The extraction and characterisation of a polysaccharide from *Moniliophthora perniciosa* CCMB 0257. Natural Product Research, v. 31, n. 14, p. 1647-1654, 2017.

VICENTE, G., BAUTISTA, L. F., RODRIGUEZ, R., GUTIERREZ, F. J., S\_ADABA, I., RUIZ-

VAZQUEZ, R. M., TORRES-MARTINEZ, S., GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy Fuels*, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010.

VIDOTTI, E. C., ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

WAITES, M. J., MORGAN, N. L., ROCKEY, J. S., HIGTON, G. *Industrial microbiology: an introduction*. John Wiley & Sons, 2001.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. de. Aspectos da produção industrial de enzimas. *Citino*, v. 1, n. 1, 2011;

WANG, Z. J., XIE, J. H., NIE, S. P., XIE, M. J. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. *Food & function*, v. 8, n. 3, p. 915-926, 2017. (a)

WANG, M., CHEN, L., ZHANG, Z., WANG, X., QIN, S., YAN, P. Screening of alginate lyase – excreting microorganisms from the surface of brown algae. *AMB Express*, v. 7, n. 74, p. 1- 9, 2017. (b)

WANG, L., HAO, J., XING M., SUN, J. Purification and Characterization of a New Alginate Lyase from Marine Bacterium *Vibrio* sp. SY08. *Mar. Drugs*, v. 15, n. 1, p. 1. 2016.

WHANG, L. M., LIU, P. W. G., MA, C. C., CHENG, S. S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater*, v. 151, p. 155–163, 2008.

WEI, N., QUARTERMAN, J., JIN Y. Marine macroalgae. An untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 2, p. 70-77, 2013.

WIPO [Base de dados – Internet]. PATENTSCOPE World Intellectual Property Organization. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int>>. Acesso em: Abril de 2020;

WONG, T. Y., PRESTON, L. A., SCHILLER, N. L. ALGINATE LYASE: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review Microbiol*, v. 54, p. 289-340, 2000.

WU, F., WU, J., LIAO, Y., WANG, M., SHIH, I. Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from *Gracilaria* biomass. *Bioresource Technology*, v. 156, p. 123-131, 2014.

XIAO, A., CAI, H., NI, H., YANG, F., PING, L., ZHU, Y., HUANG, G., LI, L., YANG, Y., WU, L. Culture medium and fermentation method for producing alginate lyase by fermentation of microvesicle bacterial genus. Depósito: . CN 104651339°. Depósito: 27/06/2015.

YADAV, Ajar N., VERMA, P., KUMAR, V., SAXENA, A.. Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, p. 3-18, 2017.

YANAGISAWA, M.; NAKAMURA, K.; ARIGA, O.; NAKASAKI, K. Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolysable polysaccharides. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2111-2116, 2011.

ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P., MACED, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, v.10, n. 14, p. 123, 2009.

ZHANG, X., BAI, C., CHI, F. ZHENG, G. WU, M., MIN, W. Bacterial strain capable of generating alginate lyase and fermentation method thereof. Depósito: Oceaon res CT of Zhoussshan. CN102586150A. Depósito: 18/07/2012.

ZHANG, X. A method for producing alginate lyase through fermentatiton by using marine bacteria. Depósito: Zhang Xuehua. CN 110195051A. Depósito: 03/09/2019.

ZHANG, R., ZHANG, X., TANG, Y., MAO, J.

Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 228, p. 115-381, 2020.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R., JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 6, p. 1558-1569, 2009.

ZHAO, G., DING, L. L., PAN, Z. H., KONG, D. H., HADIATULLAH, H., FAN, Z. C. Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. *Food chemistry*, v. 271, p. 606-613, 2019.

ZHU, B., YIN, H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered*, v. 6, n. 3, p. 125-131, 2015.

ZHU, Y., WU, L., CHEN, Y., NI, H., XIAO, A., CAI, H. Characterization of a novel extracellular biofunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Microbiological Research*, v. 182, p. 49-58, 2016.

**ANEXO – PATENTE DEPOSITADA**

02/12/2020 870200151599  
10:55  
29409161922894450

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**Número do Processo: BR 10 2020 024620 8**

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/12/2020 às 10:55, Petição 870200151599

## Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ENZIMA ALGINASE POR FERMENTAÇÃO FÚNGICA EM ESTADO SEMISSÓLIDO USANDO MACROALGA E/OU ALGINATO E COMPOSIÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TAL

**Resumo:** Nessa patente é relatado o processo de produção de enzima alginase por fermentação semi-sólida utilizando fungos filamentosos e utilizando macroalgas marrons do gênero *Sargassum*, além do uso de uma composição inédita de solução nutriente. Das cepas fúngicas testadas, o fungo *Cunninghamella echinulata*, entre outros, mostrou-se apto para a otimização da fermentação. A otimização da solução nutriente, em relação aos teores de nitrogênio, levou ao desenvolvimento satisfatório do fungo com aumento da expressão enzimática de 100 para 225 U/mL. Ainda, foi possível verificar que para um teor de umidade entre 65-85% a enzima é produzida de forma crescente alcançando seu pico de produção em até 175 U/mL. Além disso, se verificou a influência da adição de um indutor (alginato de sódio) na expressão enzimática aumentando em 43% a produção enzimática, saltando-se de um pico de atividade enzimática de 175 para 250U/mL, utilizando uma substituição mássica da biomassa de *Sargassum* entre 16,66-33,33% (malgianto/mtotal). Por fim, verificou-se que o extrato enzimático obtido por fermentação semissólida mostrou estabilidade ao congelamento, o que pode ser um ponto positivo, mostrando de forma qualitativa que é baixa a sensibilidade da enzima à perda de atividade e aos componentes presentes no extrato. O processo de obtenção da enzima pelo método aqui apresentando, bem como a composição da solução nutriente utilizada para o crescimento fúngico são inéditos e apresentaram valiosos resultados, amparando o pedido de invenção de processo e de composição.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 02/12/2020 às 10:55, Petição 870200151599

**Dados do Inventor (72)**

---

Inventor 1 de 9

Nome: MARGARETE CABRAL DOS SANTOS SILVA

CPF: 40530809400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Conjunto Senador Rui Palmeira 12 C

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57045-340

País: BRASIL

Telefone: (82) 881 89945

Fax:

Email: Margecabral@hotmail.com

Inventor 2 de 9

Nome: CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA

CPF: 07162996400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua C11 Quadra C13 Número: 134

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57084-660

País: BRASIL

Telefone: (82) 987 617765

Fax:

Email: eduardo.farias.ufal@gmail.com