

## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA POR B-GLICOSIDASE PRODUZIDA POR TRICHODERMA SG2 PARA FERMENTAÇÃO DE BIOMASSA DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

JOSIANE PINHEIRO FARIAS<sup>1</sup>; CAROLINA FACCIO DEMARCO<sup>2</sup>; MARCELA da SILVA AFONSO<sup>3</sup>; THAYS FRANÇA AFONSO<sup>4</sup>; GUILHERME PEREIRA SCHOLER<sup>5</sup>; ROBSON ANDREAZZA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, CDTec – jo.anetst@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, CDTec – carol\_demarco@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, CDTec – marcelamafonso@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas, Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais, CDTec – thaysafonso@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas, Mestrado em Ciências Ambientais, CEng – guilherme.schoeler@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, CDTec – robsonandreazza@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas como resíduos municipais e industriais, madeira e resíduos agrícolas são muito atraentes como matéria-prima para produção de biocombustíveis, pois são encontradas em grande abundância na terra e sua utilização não causam impactos na produção de alimentos tanto animal quanto humano. Além disso, não são limitadas pela disponibilidade de terras, como a produção de biocombustíveis provenientes de cana-de açúcar e milho (BRANDENBURG et al., 2018; LIMAYEM; RICKE, 2012; TAPIA CARPIO; SIMONE DE SOUZA, 2019)

A constituição básica da biomassa lignocelulósica é de 40% a 50% de celulose, 25% a 30% de hemicelulose, 15% a 20% de lignina e outros extraíveis. O conjunto permanece coeso por ligações covalentes formando a matriz lignocelulósica. A lignina é a principal barreira para tornar mais acessível conversão biológica dos componentes celulose e hemicelulose em monômeros de glicose. Por isso, é necessária aplicação de um pré-tratamento, que tem como objetivo principal o rompimento da estrutura cristalina da celulose, fazendo com que os açúcares disponíveis se tornem passíveis à fermentação. O pré-tratamento pode ser térmico, químico, físico, biológico ou uma combinação desses, a escolha do processo dependerá do nível de separação desejado e de sua finalidade (ŁUKAJTIS et al., 2018; SANTOS-ROCHA et al., 2016).

A celulose obtida do pré-tratamento deve ser degradada em glicose (sacarificação) usando ácidos ou enzimas (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Dentre o processo de hidrólise enzimática, vários fungos e bactérias são as principais fontes de enzimas de hidrólise de lignocelulósicos.

Os fungos aeróbios, tais como o Hypocrea jecorina (*T. reesei*) ou *Humicola*, são atualmente utilizados para a produção industrial de enzima celulase. No entanto, muitas dessas enzimas apresentam alto custo de produção. Logo, as celulases rentáveis e de alta eficiência devem ser desenvolvidas. *Trichoderma* tem potencial para produzir enzimas xilanolítica de alta β-glucosidase com potencial para a produção comercial de misturas de enzimas completas para a sacarificação de biomassa (OKEKE, 2014; ZHAO et al., 2013).

Os resíduos de milho, são matérias-primas lignocelulósicas abundantes em todo o mundo, principalmente no Brasil e possuem altos percentuais de celulose e hemicelulose, tornando-se atrativos para a produção de biocombustíveis (SANTOS-ROCHA et al., 2016). A produção Brasileira foi de 80,8 milhões de toneladas de milho na safra 2017/2018 (CONAB, 2019).

Portanto, objetivo do trabalho é avaliar a hidrólise enzimática da palha de milho pré- tratada através das enzimas celulases e xilanase produzida pela *Trichoderma SG2*, isolada de mosco de grama e resíduos de papel.

## 2. METODOLOGIA

A palha de milho que será utilizada no estudo foi gentilmente cedida pelo professor Robson Andreazza, Laboratório de Análise de Águas e Efluentes & Laboratório de Química Ambiental, Pelotas, RS.

A biomassa foi seca a temperatura ambiente e posteriormente foi triturada em moinho de facas (Marconi) com granulometria menor que 2 mm, acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas à temperatura ambiente. Para os pré-tratamentos serão utilizadas soluções de hidróxido de sódio a 1 %, ácido sulfúrico 1% e combinado. Estes tratamentos utilizarão 10 g de substrato e 45 ml de solução. Posteriormente serão autoclavados a 121°C por 20 minutos. A biomassa com tratamento básico será lavada até a neutralidade, já o tratamento ácido será lavado até pH 5. Por fim, o tratamento combinado, iniciará pelo tratamento básico, prossegue-se com autolavagem 121°C por 20 minutos, lavagem até a neutralidade e imersão na solução ácida e novamente levado ao autoclave na mesma condição anterior, e lavado até pH 5. Para todos os tratamentos as biomassas passarão por uma secagem ao ar e à temperatura ambiente por 24-48h. Todos os três pré-tratamentos serão realizados em triplicata. As etapas a serem empregadas nesse trabalho são apresentadas no fluxograma da Figura 1.

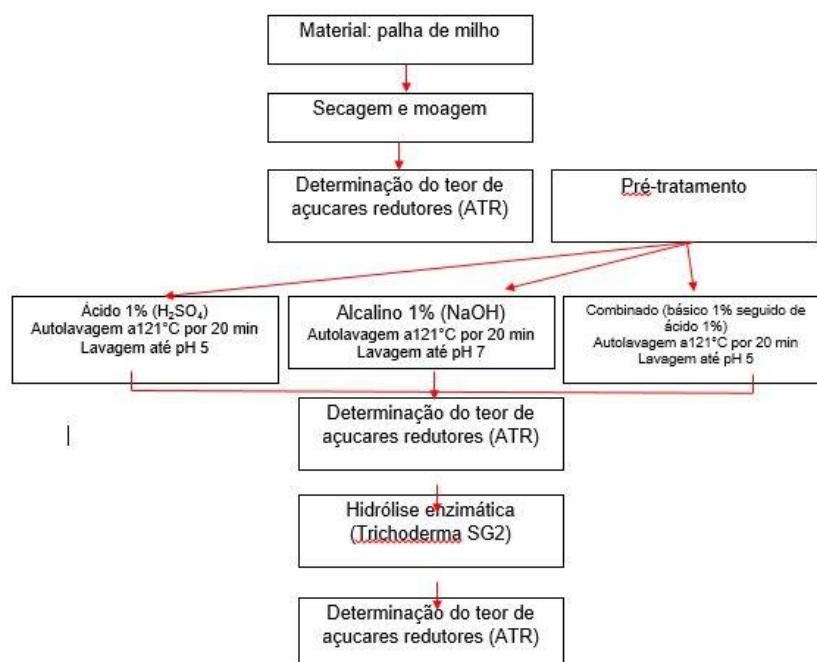


Figura 1 - Fluxograma das etapas envolvidas no estudo de conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis

## Produção de Trichoderma SG2 Cellulase e Xylanase.

Será preparada um meio de enriquecimento que é composto pelo seguinte (em g.L-1): 1,0 g de peptona, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de Tween 80, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,003 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,003 g de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (Okeke, 2014) e 2 mL de solução de elemento mineral. A solução mineral contém: 169mg MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O; 288 mg de ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 250 mg de CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 26 mg de NiSO<sub>4</sub> 6H<sub>2</sub>O; 28 mg de CoSO<sub>4</sub> e 24 mg de NaMoO<sub>4</sub>.

Em erlenmeyers de 250 mL, serão colocados 0,5 g de grama moída e 0,5 g de pó de papel de impresso. Adiciona-se 50 ml do meio enriquecido, depois será autoclavado em 21°C por 15-20 minutos. Arrefecer até à temperatura ambiente.

Depois disso, será inoculado em cada erlenmeyer uma porção de ágarbatata-dextrose de cultivo de Trichoderma SG2 com tamanho aproximado de 1cm<sup>2</sup>. Será incubado por 5 a 6 dias a temperatura de 30°C e agitação de 200rpm.

As enzimas serão recuperadas por centrifugação. O sobrenadante será testado para atividades enzimáticas para filtro de celulase de papel, células CM e xilanase, betaglucosidase e beta xilosidase.

## Hidrolise enzimática

A biomassa pré- tratada será hidrolisada com uma carga de sólidos de 5% (p/v), utilizando 1 ml do complexo enzimático Cellulase e Xylanase de Trichoderma SG2 em meio reacional de 50 mL. O pH será ajustado a 4,8, e o meio será incubado em um agitador a 50 °C, 150 rpm por 12 horas, com retiradas de alíquotas nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12 horas para quantificar os açúcares redutores.

## Análise de atividades enzimáticas

Para analisar beta-glucosidase, dever ser preparada uma mistura de reação, contendo: 100 µl de enzima, 800 µl de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 100µl de 40mM p-nitrofenol β-D-glucosídeo tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 5,0). A mistura de reação será incubada por 30 min a 50 °C em banho- maria e resfriado em um banho de gelo antes de medir a absorbância no comprimento de λ405.

A β-xilosidase a atividade será determinada usando o mesmo método, exceto que o substrato era 20 mM p-nitrofenol β-D-xilósido.

## Determinação de açúcares redutores (ARs)

Será adicionado 3 ml de reagente DNS a 3 ml de amostra de glicose em um tubo de ensaio levemente tampado. A mistura será aquecida a 90 °C por 5-15 minutos para desenvolver a cor vermelho-marrom. Será adicionado 1 ml de uma solução de tartarato de sódio e potássio a 40% (sal Rochelle) para estabilizar a cor. Após o resfriamento até a temperatura ambiente em banho-maria, realizar a leitura da absorbância com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 575 nm (Miller, 1959).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pretende-se determinar o melhor pré-tratamento para biomassa lignocelulósica, palha de milho, bem como otimizar o processo de hidrólise enzimática utilizando enzimas de alta taxa de atividade produzida por meio da Trichoderma SG2, isolada de mosco de grama e resíduos de papel.

## 4. CONCLUSÕES

Obter uma técnica de biotecnologia para a produção de um produto de suma importância para a sociedade, combustíveis, e a utilização de resíduos como fonte destes combustíveis.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDENBURG, J. et al. Bioethanol and lipid production from the enzymatic hydrolysate of wheat straw after furfural extraction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 6269–6277, 2018.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754–4766, 2010.

CONAB. Volume 5 – Safra 2017 / 2018 Produtos de Verão Brasília, 2017. ISSN 2318-3241 Perspec. agropec, v. 5, p. 1–111, 2017.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

ŁUKAJTIS, R. et al. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. **Energies**, v. 11, n. 4, 2018.

MILLER, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426, 1959

OKEKE, B. C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High  $\beta$ -Glucosidase-Producing Trichoderma from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581–1598, 2014.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. et al. Acid pretreatment of corn stover for production of second generation ethanol. **Engevista**, v. 18, n. 2, p. 412–423, 2016.

TAPIA CARPIO, L. G.; SIMONE DE SOUZA, F. Competition between Second-Generation Ethanol and Bioelectricity using the Residual Biomass of Sugarcane: Effects of Uncertainty on the Production Mix. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 2, 2019.

ZHAO, L. et al. Enzymatic saccharification of cornstalk by onsite cellulases produced by *Trichoderma viride* for enhanced biohydrogen production. **GCB Bioenergy**, v. 5, n. 5, p. 591–598, 2013.