

## ANÁLISE ENZIMÁTICA A PARTIR DA *TRICHODERMA* SG2 COM BIOMASSA DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

CAROLINE SOARES SANTOS<sup>1</sup>; FERNANDA DIAS DE ÁVILA<sup>2</sup>; JOSIANE PINHEIRO FARIAS<sup>3</sup>; MARCELA DA SILVA AFONSO<sup>4</sup>; BENEDICT OKEKE<sup>5</sup>; ROBSON ANDREAZZA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – carol.soar20@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – fehavila@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jo.anetst@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - marcelamafonso@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Auburn University at Montgomery - bokeke@aum.edu

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas - robsonandrezza@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

As biomassas lignocelulósicas tais como resíduos municipais e industriais, madeira e resíduos agrícolas são demasiadamente atraentes como matéria-prima para síntese de biocombustíveis, pois são encontradas em abundância considerável na terra e sua aplicação não causa impactos na produção de alimentos tanto animal quanto humano. Ademais, não são restringidas pela disponibilidade de terras, como a produção de biocombustíveis provindos, por exemplo, de cana-de-açúcar e de milho (LIMAYEM; RICKE, 2012; CARPIO; SOUZA, 2019; FARIAS et al., 2019).

A decomposição completa da biomassa requer uma série de enzimas. As enzimas comerciais existentes foram desenvolvidas principalmente para as indústrias de celulose, papel e alimentos, e as altas concentrações necessárias aumentam os custos do processo (ŁUKAJTIS et al., 2018).

As cepas SG2 produzem uma gama promissora de células celulolíticas e xilanolíticas enzimas incluindo  $\beta$ -glucosidase, geralmente baixo em culturas de espécies de *Trichoderma*. Neste sentido, as espécies de *Trichoderma* produzem altos níveis de celulase e xilanase, porém eles não são conhecidos como grandes produtores de  $\beta$ -glucosidase (OKEKE, 2014).

Os resíduos de milho são matérias-primas lignocelulósicas fartas em todo o mundo, especialmente no Brasil, e detém de altos percentuais de celulose e hemicelulose, fazendo-se incitante para a produção de biocombustíveis (MEYER, 2013). A produção Brasileira na safra de 2017/2018 chegou a 80,8 milhões de toneladas de milho (CONAB, 2019).

Sendo assim, o propósito deste trabalho é apresentar brevemente os resultado obtidos no primeiro experimento de hidrólise enzimática da palha de milho através das enzimas celulases e xilanase produzida pela *Trichoderma* SG2, isolada de mosco de grama e resíduos de papel.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi um projeto em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Auburn University at Montgomery. Os ensaios foram feitos a partir da metodologia descrita por FARIAS et al. 2019, apresentada à seguir:

#### 2.1. Biomassas e Meio de Produção de Enzimas (EPM)

Para produção enzimática foi realizado um meio enriquecido com (OKEKE, 2014): 1,0g.L<sup>-1</sup> peptona, 0,5g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5g.L<sup>-1</sup> Tween 80,

2g.L-1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2g.L-1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5g.L-1 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1g.L-1 CaCl<sub>2</sub>, 0,003g.L-1 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2ml de solução de elemento mineral.

Aproximadamente 5 kg de biomassa de milho foram secos em temperatura ambiente e moído em moinho de facas (Marconi) até o tamanho de grão de 2 mm.

O papel de impressão foi desfiado e deixado imerso em água por dois dias, lavado 5 vezes com água da torneira, em seguida passado no liquidificador e seco a 30 ° C com circulação de vento.

Para todos os tratamentos as biomassas passaram por uma secagem ao ar e à temperatura ambiente por 24-48h.

## 2.2. Produção enzimática

No teste de produção de enzima (celulase e xilanase) foram utilizadas duas biomassas em três configurações diferentes e dois tamanhos diferentes de Erlenmeyer, 250 e 500ml, todas em duplicatas:

### 2.2.1. Erlenmeyer de 250ml:

a) 0,5g de biomassa de milho moído + 50ml de solução EPM (denominada CB1S e CB2S); b) 0,5g de papel picado + 50ml de solução de EPM (denominado PP1S e PP2S); c) 0,25 g de biomassa de milho picado + 0,25g de papel picado + 50ml de solução de EPM (denominado CB/PP1S e CB/PP2S).

### 2.2.2. Erlenmeyer de 500ml:

a) 1g de biomassa de milho moído + 100ml de solução EPM (denominada CB1L e CB2L); b) 1g de papel picado + 100ml de solução de EPM (denominado PP1L e PP2L); c) 0,5 g de biomassa de milho moído + 0,5g de papel picado + 100ml de solução EPM (denominado CB/PP1L e CB/PP2L).

O material foi autoclavado a 121 ° C por 20 minutos, resfriado à temperatura ambiente e logo após o resfriamento. Após o resfriamento, foi inoculado cada frasco com 2 tampões de ágar (1cm<sup>2</sup>) de *Trichoderma* SG2 cultivado em ágar batata dextrose. O experimento foi incubado (30 ° C; 200 rpm) por 5 dias.

As enzimas foram recuperadas por centrifugação (10 min; 5000 rpm). Após centrifugação, recolheu-se as enzimas e foram transferidas para outro recipiente, respeitando sempre a individualidade das amostras. Assim, foram preparados para os ensaios de atividades enzimáticas celulase e xilanase de papel de filtro.

## 2.3. Ensaio de açúcar

Para determinar a atividade enzimática da celulase e xilanase, foram preparados 12 tubos que serviram como branco, adicionado 0,5 ml de enzima e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5.

### 2.3.1. Celulase

Para este ensaio foram preparados 12 tubos contendo 0,033 a 0,035 gramas de papel de filtro cada. Após adicionou-se 0,5 ml de enzima e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5. Para controle foram preparados mais 3 tubos estes contendo 0,033 a 0,035 gramas de papel filtro, 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5.

### 2.3.2. Xilanase

Preparou-se 12 tubos para este ensaio, ambos contendo 0,01g de xilanase, 0,5 ml de enzima e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5. Neste foram

adicionados 0,01 gramas de xilanase, 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5.

Em ambos os ensaios, após a preparação dos tubos, estes foram incubados a 50 ° C por 30 minutos em banho-maria. Após os procedimentos, o espectrofotômetro foi zerado com água destilada e leu-se as amostras no comprimento de onda de 575 nm.

As enzimas foram recuperadas por centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio das atividades enzimáticas com filtro de papel e xilanase.

## 2.4. Cálculo

Para determinar a atividade enzimática, usou-se a seguinte fórmula:

Atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) = (A/mol) x Fd, onde:

A = concentração calculada a partir da curva;

Mol = massa molar de glicose (0,18 mg);

Fd = fator de diluição em relação ao meio de reação (0,5 mL de enzima + 0,5 mL de tampão, meio de reação total 1 mL). Fd = 2

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos à partir dos ensaios realizados estão expressos nas figuras à seguir.

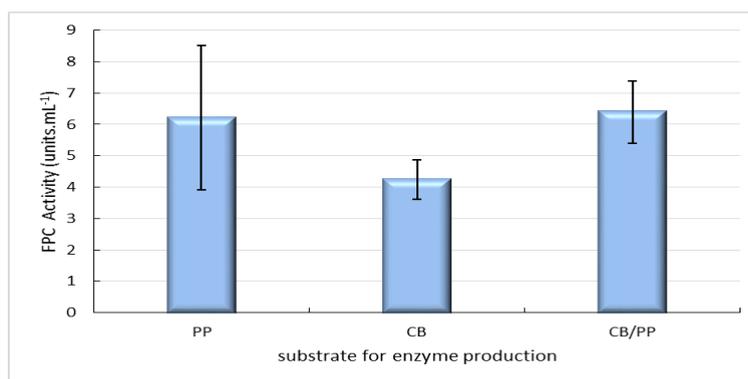


Figura 2. Atividade de celulase de papel de filtro (FPC)

O ensaio contendo biomassa de milho picado e papel picado (CB/PP) obteve o melhor resultado em relação aos demais ensaios CB e PP, no entanto, o ensaio com milho moído CB procedeu um menos relevante. Porém, o experimento com papel picado originou um resultado promissor, bem próximo ao melhor resultado em relação à todos os ensaios, com todas as biomassas.

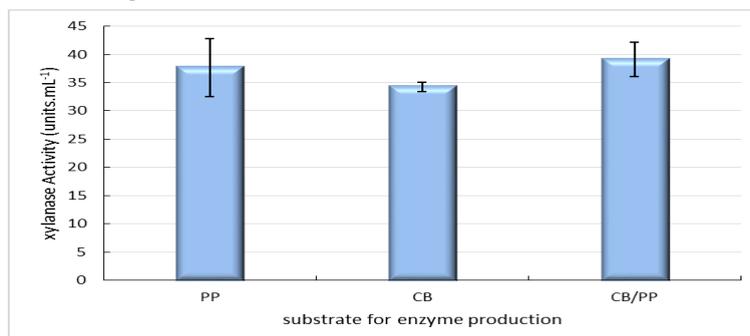


Figura 3. Atividade de xilanase

Na figura 3, podemos inferir que ainda sim o ensaio contendo biomassa de milho picado e papel picado (CB/PP) obtiveram o melhor resultado que os demais

ensaios. A sucessão de resultados equivale aos da figura 1, onde o resultado menos irrelevante continua sendo de biomassa de milho picado.

Com isso, podemos concluir que a combinação com milho picado e papel picado procederam interessantes, no entanto, uma maior efetividade era esperada em relação a essa combinação.

#### 4. CONCLUSÕES

Portanto, com este estudo podemos inferir que a utilização de *Trichoderma* SG2 com a combinação das biomassas de papel e milho é relevante para produção de açúcares.

A *Trichoderma* é um fungo estudado para a produção de celulases. Estudos anteriores mostraram que existem vários fatores que afetam a sacarificação enzimática da celulose, incluindo substratos, atividade de celulases e condições de reação (temperatura e pH) (MARIMUTHU et al., 2009).

Na composição básica da biomassa lignocelulósica a lignina é a barreira principal na conversão biológica dos componentes celulose e hemicelulose em monômeros de glicose. O resultado do experimento com milho picado e papel picado podem não ter obtido o esperado, por ser essencial a aplicabilidade de um pré-tratamento, que tem como propósito principal o rompimento da estrutura cristalina da celulose, tornando os açúcares disponíveis passíveis à fermentação, o qual não foi realizado, como sugerido por FARIAS et al. 2019 (ŁUKAJTIS et al., 2018)

Logo, sugere-se que para trabalhos posteriores, que um pré-tratamento seja aplicado para que resultados mais promissores sejam alcançados.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARPIO, L. G. T.; DE SOUZA, F. S. 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.
- CONAB. Volume 5 – Safra 2017 / 2018 Produtos de Verão Brasília. ISSN 2318-3241 **Perspectiva agropecuária**, v. 5, p. 1–111, 2017.
- FARIAS; J.P. et al. Hidrólise enzimática por  $\beta$ -glicosidade produzida por *Trichoderma* SG2 para fermentação de biomassa de milho para produção de biocombustíveis. **Anais XXI Encontro de Pós-Graduação**, IV Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão. Pelotas, RS: UFPel, 2019.
- 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.
- MEYER, P.A. et al. Techno-economic analysis of corn stover fungal fermentation to ethanol. **Applied Energy**, v.111, p. 657-668, 2013.
- 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.
- MARIMUTHU, J. et al. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresource technology**, v 100. p. 5155-61, 2009.