

ESTUDO DA ATIVIDADE ENDOCELULOLÍTICA DE ISOLADOS FÚNGICOS DO CERRADO BRASILEIRO COM VISTAS À PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO.

Rodrigo Martins Moreira (1), Andreza de Mello Lopes, Thiago Vieira de Moraes

¹Mestrando em Ciências Agrárias – IF Goiano – Rio Verde – GO. Email: rodrigomartins.gestaoamb@gmail.com

RESUMO

As exigências cada vez maiores de produtos industrializados exigem que o mercado trabalhe incessantemente, não levando em conta o tempo que, um local que teve seus recursos utilizados para a produção, leva para repor toda aquela matéria, afetando assim toda a vida e ciclos de um ecossistema. Estima-se que ao se utilizar materiais lignocelulósicos provenientes de processos da agroindústria, é possível obter até 442 bilhões de litros por ano, de etanol de segunda geração, e que utilizando resíduos de culturas e colheitas, podemos obter uma produção equivalente a 439 bilhões de litros por ano de etanol de segunda geração, este valor é dezesseis vezes. Estes resíduos apresentam alto valor energético agregado e baixo custo de conversão. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos lignocelulósicos que atuem na hidrólise de açúcares fermentáveis para potencialização da produção de etanol de segunda geração. O screening dos microrganismos foi realizado conforme Ghose (1987). Os ensaios de atividade celulolítica foram executados de acordo com Mandels & Weber (1969), Ghose (1987) e Miller (1959). Dentre os cinco isolados fúngicos testados, os isolados 6 e 9 apresentaram maior atividade endocelulolítica. O isolado 6 mostrou uma atividade enzimática de endoglucanase (CMCase) igual a 0,001 UI/mL aos 7 dias de incubação, sua atividade também não alterou-se aos 14 dias, apresentando uma atividade de 0,001 UI/mL e, após com 21 dias, notou-se um aumento significativo na mesma, com um valor de 0,09 UI/mL. Porém o isolado 9, nos mostra uma atividade significativa desde os 7 primeiros dias de incubação, apresentando um decréscimo aos 14, continuando com uma progressão descendente aos 21 dias, apresentando valores de 0,06, 0,01 e 0,01 UI/mL, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos Celulolíticos; Etanol de Segunda Geração, Bioenergia.

INTRODUÇÃO

A sustentabilidade começou a ser discutida em meados da década de 60, com movimentações de diversos grupos ao redor do globo, a fim de questionar a aplicabilidade e eficiência dos processos de desenvolvimento aplicados até então (SILVA, 2001).

As exigências cada vez maiores de produtos industrializados exigem que o mercado trabalhe incessantemente, não levando em conta o tempo que, um local que teve seus recursos utilizados para a produção, leva para repor toda aquela matéria, afetando assim toda a vida e ciclos de um ecossistema. Grande parte da preocupação mundial é voltada a agricultura, principalmente no contexto socioeconômico onde estamos inseridos, no caso, o Sudoeste Goiano.

As preocupações que estão sendo discutidas neste aspecto são quanto a condições físico-químicas do solo, desmatamento, assoreamento de rios, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, entre outras. Todos estes aspectos são resultados de um manejo inadequado, onde o principal objetivo é o retorno econômico, não se importando com o meio ambiente. Porém, quando não há preocupação com estes aspectos, até mesmo os mais fortes dos intuítos capitalistas se rendem à vontade da natureza, pois, o solo já não é mais tão favorável, devido ao desmatamento, as condições hídricas, por exemplo, não são benéficas (TEIXEIRA, 2006).

De modo a mitigar toda a problemática do desenvolvimento agroindustrial, podemos citar a Revolução Verde, que ocorreu em meados de 1920, onde começaram a ser discutidas maneiras de conciliar a produção adequada, respeitando os limites da natureza, com um retorno econômico satisfatório. Desse modo surge o termo sustentabilidade (IBAMA, 2001).

O consumo de energia e as fontes que proverão essa energia tornam-se um problema latente visto que as matrizes energéticas utilizadas no presente momento, em sua grande maioria, são provenientes de fontes não renováveis. A diversificação das matrizes energéticas atuais mostra uma maneira efetiva para mitigar tal problema (VICENTE et al., 2009). O emprego de novas medidas biotecnológicas apresenta-se como um viés para a prospecção e posterior aprimoramento de alternativas para o estudo de novas metodologias quanto ao abastecimento energético populacional. Um exemplo pode ser os bicompostíveis provenientes, em sua maioria, milho e outras culturas de base que estão sendo utilizados como substitutos diretos dos combustíveis fósseis atuais (LADISLAO & GOMEZ, 2008).

Atualmente, etanol é produzido de duas principais fontes, cana-de-açúcar no Brasil, e amido, proveniente de milho, nos Estados Unidos da América. Porém, este processo de obtenção de etanol, a partir destas fontes de açúcar, não é

interessante, desde que, estas competem com a indústria alimentícia por campos agricultáveis. Etanol é, hoje, a fonte líquida de combustível mais abundante no planeta. A importância da diversificação da matriz energética e utilização de bicompostíveis provenientes de biomassa, tais como o etanol, etanol de segunda geração e biodiesel, decorrem de uma perspectiva de redução de impactos ambientais negativos.

O crescente interesse quanto à temática de fontes de energias alternativas, vem, também, sendo fomentadas devido à suas fáceis metodologias para obtenção, possibilidade de produção in loco, e um custo/benefício positivo. A capacidade de produção pode ser potencializada se utilizados produtos lignocelulósicos como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. Ainda, no caso da cana-de-açúcar se utilizar os resíduos de sua produção, pode aumentar-se o rendimento etanol/área, além disso, reduzindo a utilização de campos cultiváveis, que poderiam ser utilizados para produção de alimento (FURLAN et al, 2012).

Estima-se que ao se utilizar materiais lignocelulósicos provenientes de processos da agroindústria, é possível obter até 442 bilhões de litros por ano, de etanol de segunda geração, e que utilizando resíduos de culturas e colheitas, podemos obter uma produção equivalente a 439 bilhões de litros por ano de etanol de segunda geração, este valor é dezesseis vezes maior do que a produção mundial atual. Estes resíduos apresentam alto valor energético agregado e baixo custo de conversão (KIM & DALE, 2004).

Essas biomassas vegetais são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques de fungos, bactérias e leveduras (LYND et al, 2002).

O princípio chave para a ciclagem de carbono global é a hidrólise da celulose nas paredes celulares vegetais. A celulose é a fonte de carbono mais abundante em toda a natureza. A meia vida da celulose é estimada em milhares de anos, devido à recalcitrância de seus constituintes, neste cenário, entram em foco os microrganismos, que atuam como catalisadores destas reações. Microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do material orgânico encontrado no solo, e, atuam neste processo bactérias, leveduras e, em sua grande maioria, fungos. A utilização de fungos filamentosos produtores de celulasas, em suas diversas composições e estruturas, inoculados em substratos da produção agrícola, em viés de obter a degradação das camadas lignocelulósicas, dessa forma, facilitam a obtenção de etanol a partir destas fontes de substrato (MALHI, 2002).

A parte de carboidratos da lignocelulose é composta principalmente por celulose ((C₆H₁₀O₅)_n) que é um homopolímero linear, constituído de compostos de D-glicose, com ligações β - 1, 4 de glicose em cadeias repetidas que formam, por sua vez, celobiose. A celulose é extremamente insolúvel em água. Hemiceluloses ((C₅H₈O₄)_n) são polímeros heteroglicanos ramificados compostos por polissacarídeos de baixa massa molecular, em grande abundância temos pentoses e hexoses. Apresentando curtas ramificações tais como D-xilose, D-glicose, L-arabinose e D-galactose. A lignina por sua vez, funciona como um cimento entre essas duas camadas de celulose e hemicelulose. A lignina é uma macromolécula polifenólica, constituída por unidades básicas de 3-5-dimetoxi-4-hidroxifenilpropano, 3 metoxi-4-hidroxifenilpropano e 4-hidroxifenilpropano (SUN & CHENG, 2002; FENGEL & WEGENER, 1989).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produz mais de 12 milhões de toneladas de arroz, anualmente, tornando-se assim uma importante fonte de biomassa residual advinda da cultura do arroz. O arroz é uma Monocotiledoneae, pertence à família Poaceae e ao gênero *Oryza*, de ampla utilização na alimentação humana. É um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. A composição química do arroz apresenta em média 32,1% de celulose, 24,7 de hemicelulose, 16,8% de lignina, 18,1% de cinza e 10,9% de extrativos (ISMAIL & WALLIYUDDIN, 1996; FAO, 2009).

A celulose é o componente que apresenta maior quantidade dentro do contexto estrutural químico da casca de arroz. Segundo levantamento da CONAB (2013) a área plantada no Brasil com cultura de arroz referente à safra de Março de 2013 foi da ordem de 2,42 milhões de ha.

O objetivo dos pesquisadores deste trabalho foi potencializar processos de obtenção de etanol de segunda geração através da inoculação, em compostos lignocelulósicos, com microrganismos (fungos) oleaginosos. Fungos que irão metabolizar as camadas de celulose, hemicelulose e lignina, utilizando-as como fonte de substrato, liberando, através de processos de hidrólise enzimática, açúcares fermentáveis, facilitando e potencializando a obtenção de etanol de segunda geração dos compostos lignocelulósicos, e ao mesmo tempo, obter biodiesel da biomassa dos fungos.

Objetivos

O objetivo dos pesquisadores deste projeto foi isolar microrganismos fúngicos, os quais atuem sobre produtos ou resíduos de processos agroindustriais, de caráter lignocelulósico, com vistas à promoção da hidrólise enzimática, com a liberação de açúcares fermentáveis com vistas à produção de etanol de 2ª geração.

METODOLOGIA

A palha de arroz foi previamente moída e peneirada com granulção máxima de 1 mm. Foi utilizada uma estufa à temperatura de 60 °C para a secagem das amostras de parte aérea até obtenção de pesos constantes.

Foi utilizado 1g das amostras. Estas foram pesadas em erlenmeyers de 125 mL, contendo meio basal indicado por Mandels & Weber que possuía (g L⁻¹): KH₂PO₄, 2,0 g; CaCl₂, 0,3 g; MgSO₄.7H₂O, 1 g; NH₄NO₃, 2 g; e (mg L⁻¹) FeSO₄.7H₂O, 5 mg; MnSO₄.4H₂O, 1,6 mg; ZnSO₄.7H₂O, 3,45 mg; e CoCl₂.6H₂O, 2 mg), autoclavado a 1 atm à 121 °C, por 20 minutos. Cinco isolados fúngicos oleaginosos (teor de lipídios ≥ 20%), pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Agrícola da instituição, foram testados quanto à capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas, tendo palha de arroz como principal fonte de carbono.

Os isolados foram inoculados nos frascos, em triplicata. Em seguida, foi realizada a incubação por 21 dias, a 28 °C, sob agitação de 150 rpm. O micélio para inoculação foi obtido de placas BDA com 7 dias de cultivo, a 28 °C. Em intervalos regulares de 7 dias, amostras de 4 mL do extrato enzimático foram retiradas de cada frasco e então centrifugadas a 3000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

Foi utilizado o protocolo de Ghose (1987), utilizando-se Carboximetilcelulose como substrato, para a determinação da atuação de enzimas, de acordo com Miller (1959), utilizando ácido 3,5-diinitrosalicílico.

O preparo do reativo DNS foi realizado da seguinte forma: 300 g de ((CHOH)₂.COONa.COOK)), com 16 g de NaOH dissolvido em água destilada. Em seguida, adicionou-se 10 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇). Por fim, completou-se o volume para 1 L com água destilada.

Em tubos de ensaio, foram adicionadas tiras de papel filtro Whatman N° 1 com 1,0 por 6,0 cm, pesando aproximadamente 50 mg e adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M) e 0,5 mL da amostra centrifugada (enzima bruta). Para o branco amostra, procedeu-se da mesma forma, porém sem o substrato. Já para o branco reagente, colocou-se somente 1,5 mL do tampão citrato.

O material foi incubado em banho-maria a 50 °C, durante 1 hora. Após o período de incubação acrescentou-se 3,0 mL de reativo DNS, a fim de paralisar a reação. As amostras foram fervidas a 100 °C, durante 5 minutos para a produção de cor e, posteriormente, colocados em banho frio. Após a fervura, foram adicionados 20 mL de água. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm).

De acordo com Ghose (1987), foram realizadas diluições, em triplicata, para obter amostras que liberem acima e abaixo de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL. Ao detectar as diluições, e com o auxílio da reta padrão, foi identificada a concentração que liberava 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL de solução.

Foi elaborada uma curva padrão de liberação de açúcar, utilizando glicose como substrato, dentre as concentrações de 2,5 a 0,25 mg/0,5 mL, obtendo-se a curva de calibração $Abs = 0,5819 * Glicose (mg/0,5 mL) + 0,0772$; R² = 0,9955.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os cinco isolados fúngicos testados, os isolados 6 e 9 apresentaram maior atividade endocelulolítica. O isolado 6 mostrou uma atividade enzimática de endoglucanase (CMCase) igual a 0,001 UI/mL aos 7 dias de incubação, sua atividade também não alterou-se aos 14 dias, apresentando uma atividade de 0,001 UI/mL e, após com 21 dias, notou-se um aumento significativo na mesma, com um valor de 0,09 UI/mL. Um dos possíveis motivos para a atividade CMCase não apresentar valores significativos nos 14 primeiros dias de incubação pode ser atribuído à alta concentração de lignina na estrutura da palha de arroz. A lignina apresenta diversos compostos aromáticos em sua estrutura, o que confere caráter tóxico à atividade fúngica. Além disto, a mesma possui uma estrutura condensada e apolar, dificultando o acesso das enzimas. Porém, aos 21 dias, observamos um salto na produção de enzimas. Isso pode ser descrito por uma atividade tardia dos microrganismos, no caso do isolado 6, pois o mesmo necessitou de mais tempo para conseguir se consolidar no meio e degradar a lignina, plenamente, possibilitando, assim, acesso às estruturas da hemicelulose e celulose, com a consequente produção de açúcares (KIM & DALE, 2004; LYND et al, 2002; SUN & CHENG, 2002; ZANZI, 2001).

Porém o isolado 9, nos mostra uma atividade significativa desde os 7 primeiros dias de incubação, apresentando um decréscimo aos 14, continuando com uma progressão descendente aos 21 dias, apresentando valores de 0,06, 0,01 e 0,01 UI/mL, respectivamente. Isso pode ser descrito, devido à atividade fúngica apresentar uma boa descomplexação da lignina aos primeiros dias, e, de acordo com que essa substância vai sendo degradado, o microrganismo tem acesso às estruturas de hemicelulose e celulose, consumindo-as em um ritmo acelerado. (BORTOLAZZO, 2011; LYND et al, 2002; SUN & CHENG, 2002; ZHENG, 2004).

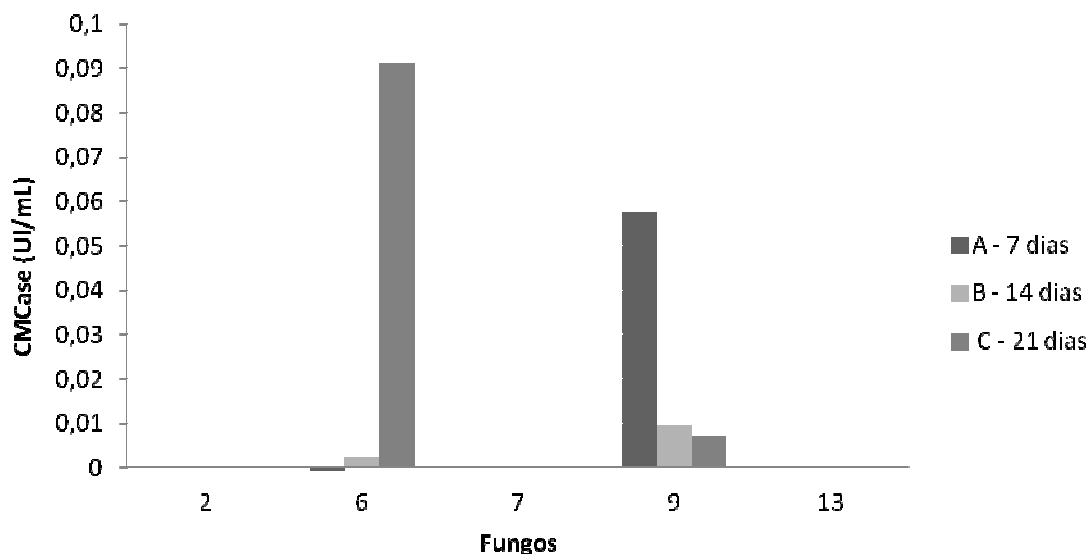


Figura 1. Atividade CMCCase de isolados fúngicos oleaginosos em palha de arroz aos 7, 14 e 21 dias de incubação.

CONCLUSÃO

Foram obtidos isolados fúngicos originários de palha de arroz (*O. sativa* spp), com atividade endoglucolítica (CMCase) significativa, o que evidencia o uso de produtos/resíduos de processos agroindustriais enquanto fonte abundante e de baixo custo de microorganismos celulolíticos; bem como ilustra as possíveis aplicações da microfauna do Cerrado Brasileiro na produção de etanol de 2ª geração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.polobio.esalq.usp.br/biocomustiveis.html>>. Acesso em 22 de maio de 2007.
2. BORTOLAZZO, N.G.; Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências com área de concentração em Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p. 76; 2011.
3. FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHIC, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C.; Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling; Computers and Chemical Engineering; v. 43, p. 1–9, 2012.
4. GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. Pure and Applied Chemistry, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.
5. LYND, L. R.; Wang, M. Q.; A product-nonspecific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. Journal of Industrial Ecology; v. 7; p. 17–32; 2003.
6. MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. Advances in Chemistry Series. Washington, v. 95, p. 391-414, 1969.
7. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, v. 83, p. 1-11, 2002.
8. ZANZI, R. Pyrolysis of Biomass. Dissertation (Master in Chemical Engineer)- Royal Institute of Technology, Stockholm, 2001.
9. ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 88, p. 797-824, 2004.