

Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospekção aos Bioprocessos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 15

Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospeção aos Bioprocessos

João Ricardo Moreira de Almeida
Editor Técnico

Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Secretária-Executiva: *Lorena Costa Garcia*

Membros: *Eduardo Fernandes Formighieri, João Ricardo Moreira de Almeida, Larissa Andreani, Leonardo Fonseca Valadares, Maria Iara Pereira Machado.*

Supervisão editorial: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Revisão de texto: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

Ilustração da capa: *Maria Goreti Braga dos Santos*

1ª edição

1ª impressão (2013): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

S 612 Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos (2012 : Brasília, DF).

Anais / Simpósio Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos ; editor, João Ricardo Moreira de Almeida. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

161 p. – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177- 4439 ; 15)

1. Microrganismos - engenharia genética – bioprocessos. 2. Coleções microbianas - fungos filamentosos - leveduras – bactérias. 3. Bioprocessos – fermentação – bioetanol. 4. Bioprocessos - fermentação – biocombustíveis. 5. Enzimas - enzimas hidrolíticas - engenharia de enzimas - regulação da expressão gênica. 6. Seleção de microrganismos - seleção de enzimas. I. Almeida, João Ricardo Moreira de.

Autores

Adriane Wendland

Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia –
Pesquisadora da Embrapa Arroz e Feijão.

Amanda de Souza

Bióloga, Doutora em Ciências (Botânica) – Pesquisadora,
DuPont do Brasil, S.A.

Bernard Henrissat

PhD, Research Scientist AFMB, CNRS, Marseille France.

Bernhard Seiboth

Doctor in Microbiology - Assistant Professor at Vienna
University of Technology, Austria.

Betania Ferraz Quirino

Bióloga, Ph.D. em Biologia Celular e Molecular -
Pesquisadora da Embrapa Agroenergia.

Betúlia de Moraes Souto

Bióloga, Mestrado em Biologia Molecular, Analista da
Embrapa-Agroenergia.

Bruce S. Dien

Biochemical Engineer Doctor in Engineer – Research Scientist at NCAUR-ARS-USDA.

Cristine Chaves Barreto

Bióloga, Ph.D. em Microbiologia/Biologia Evolutiva – Professor da Universidade Católica de Brasília (UCB).

Danuza N. Moysés

Bióloga, Doutoranda em Biologia Molecular- Pesquisadora do Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES).

David Navarro

Engineer, INRA Marseille France.

Elba Pinto da Silva Bom

Bióloga, M.Sc. e Ph.D. em Engenharia Bioquímica – Professora titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética Molecular – Professor titular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Gustavo Henrique Goldman

Biólogo, Doutor em Biologia Molecular – Pesquisador Associado do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE); Professor Titular da Universidade de São Paulo.

Henrique Vianna de Amorim

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia – Presidente da Fermentec.

Jean-Guy Berrin

PhD, Research Scientist INRA Marseille France.

Jessica Carvalho Bergmann

Bióloga, Doutoranda em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB).

João Ricardo Moreira de Almeida

Biólogo, Doutor em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br.

Laurence Lesage Meessen

PhD, Research Scientist INRA Marseille France.

Leandro Vieira dos Santos

Biólogo, Ms. Microbiologia Agrícola - Doutorando em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Leane Perim Rodrigues

Estagiária de Iniciação Científica em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB).

Leda Maria Fortes Gottschalk

Engenheira Química, Msc em Bioquímica, Doutora em Engenharia Química - Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Lidia Maria Melo Santa Anna

Arquiteta, Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da UFRJ- Consultora Sênior em Biotecnologia do Centro de Pesquisas da Petrobras (CENPES).

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito

Farmacêutica e Bioquímica, Doutora em Microbiologia e Imunologia Veterinárias – Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite.

Marie Couturier

PhD student, INRA Marseille France.

Mario Lucio Lopes

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Microbiologia Aplicada
– Diretor Científico da Fermentec.

Michael A. Cotta

Microbiologist Doctor in Dairy Science; - Research Leader
at NCAUR-ARS-USDA.

Mireille Haon

Engineer, INRA Marseille France.

Nei Pereira Junior

Engenheiro Químico, Doutor em Biotecnologia - Professor
Titular da Escola de Química da UFRJ.

Nídia Silva Pacheco Lopes Ramos

Bióloga, Mestranda em Ciências Genômicas e
Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB).

Ohana Yonara de Assis Costa

Bióloga, Mestranda em Ciências Genômicas e
Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB).

Orivaldo José Saggin Júnior

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia –
Pesquisador da Embrapa Agrobiologia.

Pedro M. Coutinho

PhD, Professor, AFMB, CNRS, Marseille France.

Ricardo Henrique Kruger

Biólogo, Ph.D. em Microbiologia – Professor da
Universidade de Brasília (UnB).

Richard J. Ward

Fisiologista, Doutor em Biofísica – Professor Associado da Universidade de São Paulo.

Roberto N. Maeda

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Pesquisador da UFRJ em Processos Biotecnológicos.

Rodrigo P. C. Ramirez

Biólogo, Mestrando em Microbiologia Aplicada – Representante de Pesquisa, DuPont do Brasil, S.A.

Rogério Biaggioni Lopes

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Entomologia – Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Ronald E. Hector

Yeast Microbiologist Doctor in Microbiology - Research Scientist at NCAUR-ARS-USDA.

Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Química Industrial, Doutora em Microbiologia - Professora associada da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Shelly de Fátima Paluan

Bióloga, Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Sueli Correa Marques de Mello

Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia – Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Thaila Fernanda dos Reis

Bióloga, Doutora em Ciências com ênfase em Biologia Celular e Molecular; Pós-doutoranda pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP.

Wilson A. Araujo

Químico, Doutor em. Engenharia Química, Gerente de Tecnologia – Biocombustíveis, DuPont do Brasil S.A.

Apresentação

O Centro Nacional de Pesquisa de Agroenergia (CNPAE) é um dos 42 centros de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). O CNPAE é conhecido pela assinatura síntese de Embrapa Agroenergia, e tem a missão de viabilizar soluções tecnológicas inovadoras para o desenvolvimento sustentável e equitativo do negócio da agroenergia do Brasil, em benefício da sociedade. Criada a partir do primeiro Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, de autoria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Embrapa Agroenergia tem entre as suas finalidades: apoiar as ações inerentes à pesquisa, desenvolvimento e inovação em agroenergia do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA); gerar e transferir conhecimento e tecnologias que contribuam para a sustentabilidade, a competitividade e maior equidade entre os agentes das cadeias de agroenergia, em conformidade com os anseios da sociedade; e promover o desenvolvimento sustentável do negócio da agroenergia do Brasil, para atender às demandas nacional e internacional de biocombustíveis e de biomateriais.

Buscando coordenar suas ações cada vez mais sob a lógica de biorrefinaria, a Embrapa Agroenergia concentra seus esforços em dois grandes grupos de produtos; são eles: os biocombustíveis (sejam líquidos, sólidos ou gasosos) e os chamados “bio-based chemicals” (químicos advindos da biomassa). Independente do grupo de produtos, está claro para a equipe da Embrapa Agroenergia que muito dos conhecimentos e tecnologias necessárias para fortalecer e ampliar o papel do Brasil como protagonista no setor

de biorrefinarias virão deste vasto universo de microrganismos da biodiversidade brasileira. É nesse universo que encontraremos as respostas para muitos dos grandes desafios técnicos de hoje e do futuro, onde a alta eficiência e a sustentabilidade dos bioprocessos serão fundamentais para garantir a competitividade no setor, tanto para o processamento das matérias-primas energéticas como também dos seus coprodutos e resíduos. Os microrganismos são empregados em diversos processos, seja diretamente (como é o caso da fermentação) ou como fornecedores de insumos, tais como enzimas para degradação da biomassa lignocelulósica.

Como instituição pública brasileira, a Embrapa Agroenergia tem uma função relevante e fundamental na coleta, caracterização, valoração e uso de microrganismos da biodiversidade brasileira, apoiando os setores de biocombustíveis e da química de biomassa. Foi neste contexto que a Embrapa Agroenergia organizou e coordenou o “I Simpósio Nacional de Microrganismos em Agroenergia: da prospecção aos bioprocessos” (SIMA), em 2012, com o objetivo de discutir esse tema e promover a interação de especialistas de diferentes áreas e diferentes instituições brasileiras e estrangeiras, tanto do setor público quanto privado, como também da academia e da indústria.

Os bioprocessos e, conseqüentemente, os microrganismos, serão uma das principais bandeiras de atuação da Embrapa Agroenergia nos próximos anos, e, por isso, continuaremos promovendo discussões, tanto com a academia quanto com o setor privado, visando à identificação e priorização de desafios, à proposição e execução de ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação para a solução dos principais gargalos do setor e também realizando a disseminação do conhecimento e tecnologias gerados.

Agradeço a todos que contribuíram para a organização do SIMA, e a todos os autores deste Documento, que agora apresento, pois eles entenderam a relevância do tema e não economizaram esforços para oferecer a você a oportunidade de uma boa leitura.

Manoel Teixeira Souza Júnior
Chefe-Geral

Sumário

Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade	15
Colocando a Biodiversidade Microbiana Brasileira a Serviço da Indústria de Biocombustíveis	23
Biocatalysts for production of lignocellulosic ethanol; an engineering perspective.....	31
Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol.....	42
Fungal biodiversity as a source of enzymes to supplement <i>Trichoderma reesei</i> for efficient conversion of lignocellulosic biomass	60
O papel dos fungos e dos actinomicetos na produção de etanol de biomassa lignocelulósica.....	67
Engineering nzymes for Lignocellulose Depolymerization.	80
Strategies to improve (hemi)cellulolytic enzyme production in <i>Trichoderma reesei</i>.....	88

Mecanismos de sensoriamento de glicose em <i>Aspergillus nidulans</i>	94
--	-----------

Aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de biocatalisadores para produção de biocombustíveis e bioprodutos	115
--	------------

Petroquímica verde	143
---------------------------------	------------

Desafios na produção de biocombustíveis e moléculas renováveis a partir de cana-de-açúcar empregando-se microrganismos recombinantes.....	151
--	------------

Conclusões.....	159
------------------------	------------

Coleções microbianas na Embrapa: conservação e agregação de valor à biodiversidade

Rogério Biaggioni Lopes

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito

Sueli Correa Marques de Mello

Orivaldo José Saggin

Adriane Wendland

As Coleções de Culturas de Microrganismos surgiram inicialmente como suporte básico para o avanço dos estudos em microbiologia, nas áreas de taxonomia e epidemiologia. Nas últimas décadas, com os avanços do conhecimento nas áreas de bioquímica, fisiologia celular e, principalmente, de genética molecular notou-se uma especialização das coleções, direcionadas aos microrganismos com potencial tecnológico e ambiental. O interesse na manutenção desses organismos ganhou mais força quando as coleções passaram a ser vistas também como uma base de oferta de genes, proporcionando infinitas possibilidades de aplicação em diferentes áreas do conhecimento.

As Coleções de Culturas de Microrganismos na Embrapa, depósitos importantes do recurso genético microbiano nacional, receberam maior atenção nas últimas décadas, devido principalmente ao aumento da importância desses organismos para a agricultura e o meio ambiente, seja na forma de produtos de uso direto pelo agricultor, seja na de processos na agroindústria e de biotecnologia. Esforços no sentido de organizar os bancos de germoplasma de forma conjunta ou

unificada estão sendo feitos pela Embrapa com a criação de projetos em rede. Atualmente, a Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa, parte integrante da Plataforma Nacional de Recursos Genéticos, agrega coleções institucionais de pesquisa e coleções de trabalho, estabelecidas em diferentes unidades da empresa.

Diversas atividades e responsabilidades estão associadas às Coleções de Culturas de Microrganismos e ao curador que não somente a manutenção de determinado material em local adequado. Certamente, o sucesso da preservação é fundamental em uma Coleção de Culturas e exige estrutura física, conhecimento sobre os microrganismos e familiaridade com técnicas modernas, que deverão causar o mínimo dano às células, assegurar a máxima viabilidade, estabilidade genética e manter as características morfológicas e fisiológicas do organismo. Porém, as ações ligadas à gestão de coleções iniciam-se bem antes do material estar conservado e vão muito além desse aspecto. Algumas atividades são características e exclusivas de Coleções de Culturas, como a purificação, a identificação e a conservação. Outras são realizadas dentro dos mais variados projetos de pesquisa, mas ligados, de alguma forma, às coleções.

Em muitos casos, os curadores estão envolvidos já na etapa de coleta ou prospecção do microrganismo em ambientes específicos, geralmente ligados a projetos de avaliação e estudo da biodiversidade. A coleta e o isolamento do microrganismo de interesse é a principal forma de enriquecimento do acervo. Para isso, tão importante quanto o microrganismo isolado e purificado é a informação associada, que alimenta o banco de dados da coleção e auxilia em futuras pesquisas. A garantia de pureza da cultura, da conservação e, geralmente, da identificação taxonômica do organismo e das informações a ele associadas são funções e obrigações do curador. As coleções devem seguir requisitos mínimos de qualidade, que incluem uma sistemática de controle da viabilidade e pureza do estoque e do registro das atividades de rotina, entre outras. Desta forma, as coleções podem garantir a qualidade dos materiais por meio da

adoção de boas práticas advindas da implantação de um Sistema da Qualidade (SQ), baseado em diversas Normas de Qualidade. No âmbito mundial, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), organismo internacional e intergovernamental que agrupa os países mais industrializados da economia do mercado, produziu um documento (Best Practice Guidelines for BRCs) que dispõe sobre a aquisição, conservação e cultivo de microrganismos.

Assim como é essencial a conservação da biodiversidade, a agregação de valor ao material mantido nas Coleções de Culturas tem grande importância para o desenvolvimento de novos processos e produtos tecnológicos. A caracterização dos acessos, feita frequentemente em parceria com diferentes grupos em projetos de pesquisa, também vem assumindo espaço na rotina dos bancos de germoplasma microbiano. Informações básicas sobre as características das linhagens conservadas auxiliam na seleção inicial ou divisão em grupos com funções desejadas. Estudos de atividade biológica, crescimento e reprodução, produção de compostos (enzimas, proteínas, toxinas, voláteis etc) e caracterizações genéticas estão entre os mais aplicados. Além disso, as Coleções de Culturas oficiais devem também estar preparadas para o recebimento de amostras de outras coleções ou instituições e para a remessa formal de seus acessos quando solicitada.

As atividades de intercâmbio e caracterização dos acessos são diretamente reguladas pela legislação vigente no país sobre as questões relacionadas ao patrimônio genético. O marco regulatório aplicável às atividades de coleta, acesso e/ou intercâmbio (remessa, transporte, importação e exportação) de amostra de patrimônio genético, bem como de acesso ao conhecimento tradicional associado é constituído pela Medida Provisória 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, seus Decretos regulamentadores e normas infralegais, expedidos pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Com a internalização

da Convenção sobre Diversidade Biológica pelo Brasil por meio dessa MP, as pesquisas que prevêem acesso e remessa de amostras de microrganismos para finalidades de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico requerem autorização prévia, sob pena da instituição a que pertence o pesquisador responsável e o próprio pesquisador sofrerem as sanções previstas na legislação.

A Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa está atualmente organizada em diferentes agrupamentos de microrganismos, divididos pela função que eles exercem. Cada agrupamento contém em geral, mais de uma coleção institucional de pesquisa e diversas coleções de trabalho associadas. Os agrupamentos são apresentados a seguir.

Microrganismos Multifuncionais - Existe demanda crescente por produtos agrícolas, florestais e pecuários resultante do aumento na população mundial e da elevação do Índice de Desenvolvimento Humano dos países. Entretanto, as terras disponíveis para o cultivo são limitadas e o quadro é agravado pela degradação dos solos pelo manejo inadequado, acompanhado de erosão, lixiviação, salinidade e redução da fertilidade. Há um alto custo em tornar um solo agricultável e mantê-lo produtivo sem degradação e poluição ambiental. Há um custo maior ainda para recuperar solos degradados pelas atividades humanas. Além do fator econômico, a preocupação com as mudanças climáticas e a necessidade de aumentar e perenizar a produtividade agrícola enfatizam a importância do uso biotecnológico de microrganismos benéficos ao crescimento de plantas e recuperação ambiental. Estes microrganismos vivem nos solos ou como endófitos e, devido às inúmeras funções que desempenham nos ecossistemas, são designados de “multifuncionais”. Destacam-se nesse grupo as bactérias diazotróficas (BDs), os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), os microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCPs) e os microrganismos biodegradadores e biorremediadores (MBBs). As BDs fixam N_2 atmosférico e o disponibilizam para as plantas; os FMAs auxiliam na absorção de nutrientes e protegem as plantas de estresses

químicos, físicos e biológicos; os MPCPs inibem patógenos radiculares, solubilizam nutrientes, produzem hormônios, entre outras ações, garantindo plantas mais vigorosas e resistentes a pragas e doenças e os MBBs são capazes de transformações bioquímicas de poluentes, principalmente de pesticidas, promovendo principalmente a ciclagem de nutrientes e a biorremediação dos solos. Os Microrganismos Multifuncionais são essenciais ao funcionamento dos ecossistemas, sendo que Coleções que preservem a diversidade genética e funcional dos mesmos aumentam a perspectiva de prospecção e aplicação em biotecnologias para conservação ambiental e sustentabilidade agrícola.

Microrganismos Agentes de Biocontrole - As estratégias de controle biológico de pragas e doenças agrícolas ganharam maior destaque com as exigências do mercado e da sociedade referentes à segurança alimentar e à necessidade de preservação do meio ambiente. Um aspecto fundamental no desenvolvimento de novos biopesticidas é a descoberta de linhagens com maior atividade ou mais adaptadas às condições ambientais onde esses produtos serão utilizados. Daí a necessidade de um fluxo contínuo de coleta, isolamento, caracterização e avaliação de agentes de biocontrole. Características desejáveis nos organismos de interesse podem ser introduzidas ou potencializadas, por meio de técnicas da biologia molecular, associadas à engenharia genética. Produtos à base de bactérias, vírus e fungos para o controle de insetos-pragas são comercializados há mais de trinta anos no Brasil. De modo semelhante, o biocontrole de plantas daninhas e de doenças de plantas pelo uso de microrganismos já faz parte de programas de pesquisa com resultados promissores no país. Prevê-se que a utilização dos biopesticidas vá aumentar na medida em que legislações de proteção ambiental mais rigorosas forem adotadas e produtos mais eficientes e baratos forem lançados no mercado nacional.

Microrganismos Fitopatogênicos - No caso dos microrganismos fitopatogênicos, a constante coleta, caracterização e conservação são importantes para atender às necessidades e demandas de diversas pesquisas agrícolas e florestais. O elevado número de patógenos

de importância econômica e a baixa produtividade das diferentes culturas no Brasil estão diretamente relacionados. As linhagens de fitopatógenos são importantes como referências para quarentena, para serem utilizadas no desenvolvimento de “kits” diagnósticos de doenças de plantas, nos estudos de variabilidade morfológica, patogênica e molecular com o objetivo de averiguar a co-evolução dos atuais patótipos ou raças presentes no campo e as novas introduções de fontes de resistência e posterior uso na seleção de plantas resistentes às doenças e no desenvolvimento de princípios ativos para seu controle químico. Adicionalmente, indutores de resistência e antagonistas a patógenos são selecionados para atuação no controle biológico de doenças. São mais de 25 espécies de fungos e bactérias identificadas e preservadas por criopreservação, método castellani ou em sílica gel. As trocas de culturas puras entre profissionais e instituições nacionais e internacionais são possíveis e facilitadas quando os materiais são catalogados, caracterizados e preservados em Coleções.

Microorganismos de Interesse para a Agroindústria e Produção Animal -

O fornecimento de alimentos seguros e de qualidade, e em quantidade adequada para garantir o bem estar e a saúde dos consumidores, e a produção e a conservação de alimentos estão intimamente relacionados com a presença, atividade, e ação benéfica ou deletéria dos microrganismos. São exemplos de ação benéfica a atividade das bactérias fermentadoras lácticas, amplamente empregadas na produção de alimentos como leites fermentados, iogurtes e queijos, bem como no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais; e as leveduras empregadas na elaboração de vinhos, cerveja e na panificação. As ações deletérias são causadas por microrganismos patogênicos para os animais de produção, ou aqueles que deterioram alimentos resultando em perdas econômicas significativas e prejuízos na qualidade dos alimentos e redução do valor nutritivo. Incluem-se ainda nesse grupo os microrganismos patogênicos para o homem que podem ser veiculados em alimentos de origem animal e causam infecções alimentares. As coleções de microrganismos de interesse da agroindústria e produção animal compreendem bactérias, vírus,

leveduras e fungos filamentosos com potencial de aplicação na indústria de alimentos e na produção de energia, agentes de doenças dos animais de produção, patógenos humanos transmissíveis pelos alimentos, microrganismos deterioradores de alimentos e comensais do rúmen. Os microrganismos preservados apresentam o potencial de uso para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico de doenças de animais, rastreabilidade de surtos de doenças, estudo de fatores de virulência de agentes de doenças que podem ser empregados para o controle de doenças de animais, produção de imunobiológicos ou vacinas. Para a agroindústria e agroenergia, os microrganismos exercem ação fundamental, pois as leveduras, bactérias ou fungos filamentosos produzem diversas substâncias ou enzimas com potencial de aplicação industrial. Os próprios microrganismos são empregados na produção e conservação de bebidas e alimentos em geral e também na produção de combustíveis.

Em última análise, as Coleções de Culturas de Microrganismos da Embrapa representam um dos mais importantes patrimônios da empresa, cujo valor e importância somente agora com a legislação sobre patrimônio genético começam a ser percebidos e valorados. A evolução da compreensão do papel dos microrganismos no meio ambiente tem fornecido subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial. O recurso genético microbiano bem conservado e caracterizado representa importante fonte de variabilidade genética, e proporciona estoques de material para uso em diversos programas de interesse da sociedade, como insumos baseados em microrganismos ou seus subprodutos, material biológico certificado, informações associadas e outros serviços que uma coleção pode prestar, como por exemplo, de taxonomia e identificação. Isso cria oportunidades para desenvolvimento de processos tecnológicos, de comercialização de serviços e de agregação de valor à biodiversidade brasileira. A Embrapa que sempre investiu no conhecimento científico como elemento propulsor da competitividade e geração de riqueza para

sociedade brasileira investe cada vez mais na ampliação e melhoria de suas coleções microbiológicas para garantir uma agricultura nacional soberana, autossustentável e sem degradação ambiental.

Informações adicionais: acesse o Portal da Plataforma Nacional de Recursos Genéticos <http://plataformarg.cenargen.embrapa.br>

Colocando a Biodiversidade Microbiana Brasileira a Serviço da Indústria de Biocombustíveis

Betania Ferraz Quirino

Jessica Carvalho Bergmann

Nidia Silva Pacheco Lopes Ramos

Shelly de Fátima Paluan

Betúlia de Moraes Souto

Leane Perim Rodrigues

Cristine Chaves Barreto

Ricardo Henrique Kruger

O Brasil tem sua indústria de bioetanol de primeira geração consolidada, sendo o segundo maior produtor mundial desse produto. Na primeira geração no Brasil, o bioetanol é obtido a partir da fermentação da sacarose do caldo de cana-de-açúcar. Os Estados Unidos são atualmente o primeiro produtor mundial de bioetanol com sua plataforma baseada na hidrólise do amido de milho e posterior fermentação. Entretanto, o bioetanol brasileiro é mais competitivo que o americano. Apesar de algumas crises momentâneas na produção, pode-se afirmar que o bioetanol brasileiro é um fator determinante para a segurança energética do País. Além disso, o bioetanol tem grande expressão na matriz energética brasileira. Essa matriz é tradicionalmente limpa devido às hidrelétricas, mas recentemente o País tem se destacado mundialmente pela alta proporção de energia renovável derivada diretamente da cana-de-açúcar. Assim, o Brasil é hoje considerado como um dos líderes mundiais em energias limpas e renováveis pelo seu esforço tecnológico e investimentos em pesquisa desde décadas passadas (revisado em SOCCOL et al., 2010).

O crescimento populacional e o aumento da demanda energética, aliados a preocupações com a sustentabilidade da vida no planeta têm sido tópicos constantes na agenda global de discussões. Assim, vários países, incluindo o Brasil, têm iniciado programas de pesquisa visando a desenvolver novas tecnologias para conversão de biomassa lignocelulósica em bioetanol, também chamado bioetanol de segunda geração. Para o Brasil essa possibilidade tecnológica é extremamente atraente em seu potencial comercial devido à sua tradição no negócio agrícola, grande extensão territorial e clima favorável à produção de biomassa lignocelulósica.

Neste contexto, a Embrapa é uma empresa que tem como missão gerar soluções para o negócio agrícola. Historicamente isto significou trazer soluções tecnológicas para a produção de alimentos. No novo contexto mundial, conforme mencionado anteriormente, a Embrapa vem se adaptando e agora assume mais um importante papel, o de gerar soluções tecnológicas para a produção de biomassa voltada à produção de biocombustíveis.

As rotas bioquímicas para produção de bioetanol de segunda geração que estão sendo desenvolvidas na Embrapa e em outras instituições resumidamente possuem as seguintes etapas: a) pré-tratamento, b) hidrólise enzimática, c) fermentação alcoólica e e) destilação do bioetanol. A etapa do pré-tratamento visa expor as fibras de celulose deixando-as mais acessíveis à hidrólise enzimática. Isto pode ser realizado de diversas maneiras como pelo pré-tratamento ácido, básico ou explosão a vapor, somente para citar os métodos mais comuns. Na etapa de hidrólise enzimática, coquetéis contendo as enzimas necessárias à desconstrução da celulose e outros componentes da parede celular atuam sobre a biomassa vegetal liberando os monossacarídeos que serão usados na etapa seguinte de fermentação. Desta maneira, na etapa de fermentação, o microrganismo escolhido, sendo este em muitos casos a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, converte esses açúcares em condições anaeróbicas em etanol pela via de fermentação

alcoólica. O processo é finalizado pela destilação do bioetanol pela qual este produto é separado de outros componentes da mistura.

Está claro que um dos gargalos tecnológicos da rota para produção de bioetanol de segunda geração é a produção de enzimas eficientes e a preço baixo, compatível com a obtenção de uma *commodity* (bioetanol) como produto final. Empresas privadas têm disponibilizado comercialmente coquetéis enzimáticos. Entretanto, estes não são otimizados para biomassas brasileiras, nem tampouco para o processo de produção de etanol de segunda geração sendo desenvolvido pela Embrapa. A Embrapa tem bancos de germoplasma de diversas espécies vegetais e possui em andamento projeto de avaliação de biomassas como a cana-de-açúcar, sorgo sacarino e sorgo energia, espécies gramíneas como do gênero *Panicum*, *Brachiaria* e o capim-elefante, bem como espécies florestais para a produção de bioetanol de segunda geração. Sabe-se que a composição da parede celular apresenta variações espécie-específicas e que cada tipo de pré-tratamento altera a biomassa de maneira diferente. Assim, há necessidade não somente de obtenção de enzimas mais eficientes e baratas, como também customizadas à biomassa e pré-tratamento escolhidos.

Neste contexto, em alguns de nossos projetos temos focado na exploração da biodiversidade microbiana brasileira para gerar insumos na forma de coquetéis enzimáticos para o processo de produção de bioetanol de segunda geração. As técnicas de microbiologia e biologia molecular permitem a obtenção de produtos de alto valor agregado a partir da biodiversidade microbiana de maneira sustentável. A viabilização comercial destes produtos pode vir a ser forte argumento para a preservação de ambientes naturais brasileiros.

Em nosso trabalho, contemplamos tanto a diversidade microbiana cultivada quanto a não cultivada. Entretanto, aqui serão mencionados apenas os principais avanços relacionados ao componente não cultivado, explorado por técnicas metagenômicas. A metagenômica começou com a proposta pioneira do Dr. Norman Pace, da Universidade

de Indiana (E.U.A.), de acessar diretamente os genomas coletivos de um ambiente. O termo metagenoma foi, entretanto, cunhado pela Dra. Jo Handelsman, na época professora da Universidade de Wisconsin em Madison (E.U.A.). Na abordagem metagenômica, as técnicas de biologia molecular são utilizadas para extrair o DNA da comunidade microbiana presente no ambiente, sem haver uma etapa de cultivo de microrganismos, o que poderia seriamente restringir o número de microrganismos acessados. Calcula-se, dependendo do ambiente, que apenas cerca de 1% dos microrganismos presentes são facilmente cultivados em laboratório pelas técnicas tradicionais da microbiologia. Assim, a metagenômica tem revolucionado a microbiologia trazendo ao conhecimento do homem e inclusive permitido a exploração biotecnológica destes outros 99% dos microrganismos do ambiente.

Desta maneira, a abordagem metagenômica pode contribuir com novas enzimas para coquetéis gerados a partir de microrganismos cultivados, melhorando desta forma o desempenho na hidrólise de biomassa vegetal. Os ambientes escolhidos para serem focados neste trabalho são o rúmen caprino e o solo de dois importantes biomas brasileiros: o Cerrado e a Amazônia.

O rúmen caprino é um órgão adaptado para degradação da biomassa vegetal e estudos de microbiota mostraram uma alta porcentagem de bactérias não classificadas (34.3%), bem como apresenta grupos de microrganismos previamente apenas conhecidos como presentes na água do mar (CUNHA et al., 2011). Por outro lado, a heterogeneidade do solo com seus vários microambientes é responsável por uma alta diversidade das comunidades microbianas existentes. Estudos pioneiros sobre a diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas dos solos do Cerrado (QUIRINO et al., 2009; CASTRO et al., 2008) foram realizados utilizando técnicas tradicionais de sequenciamento. Estudos mais recentes sobre a comunidade bacteriana usando técnica de sequenciamento paralelo em massa (pirosequenciamento) confirmaram os resultados anteriores de haver predominância de espécies do gênero *Acidobacteria* (ARAÚJO et al., 2012). Acidobactérias são um grupo

comum em solos de todo mundo, mas pouco conhecido do ponto de vista de suas funções ecológicas e com poucos membros cultivados. A Amazônia é um **hot spot** de biodiversidade e espera-se que as comunidades microbianas de solo também contenham enzimas com alto potencial biotecnológico para a produção de biocombustíveis.

Para explorar o potencial biotecnológico de comunidades microbianas brasileiras para a produção de bioetanol de segunda geração, foram otimizados protocolos para extração de DNA e posteriormente foram construídas bibliotecas metagenômicas do rúmen caprino (CUNHA et al., 2009), do solo da Amazônia (Paluan e Quirino, artigo em preparo) e do solo do Cerrado (CASTRO et al., 2011). A otimização da extração de DNA é uma etapa de grande importância uma vez que cada amostra ambiental vem com contaminantes específicos que podem ser incompatíveis com o uso do DNA em aplicações de biologia molecular. Como exemplo, pode-se citar que o solo de Cerrado possui alto conteúdo de argila (>55% p/p), baixo pH (4,7) e alto nível de ferro (146 ppm), condições que dificultam a extração e purificação do DNA da microbiota associada a esse solo para aplicações moleculares (CASTRO et al., 2011)

Após a extração de DNA metagenômico em quantidade e qualidade suficientes para aplicações de biologia molecular, uma biblioteca de pequenos insertos (3-8 kb) com cerca de 50.000 clones (CUNHA et al., 2009) foi construída a partir do rúmen caprino. Em relação aos solos dos biomas Cerrado e Amazônia, foram construídas duas bibliotecas para cada um dos ambientes: uma de pequenos insertos (3-8 kb) e outra de grandes insertos (30-50 kb). A biblioteca de pequenos insertos do solo da Amazônia contém cerca de 70.000 clones (Paluan e Quirino, em preparo), enquanto que a de grandes insertos possui cerca de 200.000 clones (Bergmann e Quirino, em preparo). A biblioteca de solo de cerrado de pequenos insertos (~8 kb) possui 150.000 clones, enquanto que a de grandes insertos (~35 kb) possui 65.000 clones (CASTRO et al., 2011).

Tendo em vista a complexidade de composição e de estrutura da parede celular vegetal, os coquetéis utilizados para a desconstrução da mesma devem conter em sua formulação várias enzimas hidrolíticas, bem como enzimas acessórias, . Algumas enzimas imprescindíveis para a hidrólise da celulose são endoglicanases, exoglicanases (celobiohidrolases) e β -glicosidases. Também é comum em coquetéis a presença de xilanases que atuam sobre a hemicelulose.

Assim, visando à identificação de enzimas úteis para a desconstrução da parede celular por abordagem metagenômica, foram otimizados protocolos para ensaios funcionais para diversas atividades enzimáticas (Ramos e Quirino, em preparo). Até agora foram obtidos por meio desses bioensaios funcionais 368 clones positivos para endoglicanase, 2 para celobiohidrolase, 39 para β -glicosidase, 72 para xilanase, além de vários clones positivos para outras atividades não relacionadas à desconstrução da parede celular vegetal como lipases, amilases e quitinases. Os vetores desses clones estão sendo extraídos e re-transformados em novas células para confirmação do fenótipo, bem como determinação de estabilidade do mesmo. Além disto, o perfil em gel de agarose dos vetores após digestão com enzimas de restrição está sendo determinado para identificar quais clones são repetidos. Aqueles clones que possuem fenótipo estável e são diferentes dos demais estão sendo sequenciados por *primer walking*. Até agora foram determinadas as sequências completas de 18 clones, sendo a maioria destes provenientes da biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos. Apenas cerca de metade dos clones possui ORFs identificadas como enzimas da classe das glicosil hidrolases ou modificadoras de carboidratos. Este resultado confirma o alto potencial da abordagem metagenômica para a descoberta de novas enzimas. Mais clones estão sendo sequenciados, e algumas proteínas já foram escolhidas para superexpressão, purificação e caracterização das propriedades cinéticas. Após superexpressas, essas enzimas serão adicionadas a coquetéis provenientes de microrganismos cultivados e o desempenho contra biomassas naturais pré-tratadas como bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante será testado.

Parceiros: Embrapa Caprinos, Embrapa Amazônia Ocidental, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília (UCB), Universidade de Brasília (UnB)

Apoio Financeiro: CNPq, FAP-DF, FINEP, Embrapa

Referências

ARAÚJO, J. F.; CASTRO, A. P.; COSTA, M. M.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, G. J. ; QUIRINO, B. F.; BUSTAMANTE, M. M. C.; WILLIAMSON, L. L. ; HANDELSMAN, J. ; KRÜGER, R. H. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. **Microbial Ecology**, New York, 2012. e-pub - DOI 10.1007/s00248-012-0057-3.

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L. L.; HANDELSMAN, J.; KRUGER, R. H. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 11, p. 2169-2175, 2011.

CASTRO, A. P.; QUIRINO, B. F.; KUOKAWA, S.A.; LEONARDECZ-NETO, E.; KRUGER, R. H. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agricultural fields. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 190, p. 129-139, 2008.

CUNHA, I. S.; BARRETO, C. C.; COSTA, O. Y. A.; BOMFIM, M. A.; CASTRO, A. P.; KRUGER, R. H.; QUIRINO, B. F. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, London, n. 17, p. 118-124, 2011.

CUNHA, I. S.; KRÜGER, R. H.; QUIRINO, B. F. **Construção de uma biblioteca metagenômica de expressão da microbiota de rúmen de caprinos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 6 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 002). Disponível em: < www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/737044/1/cot021.pdf > . Acesso em: junho de 2012.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATI, R. G.; LEONARDECZ-NETO, E.; SILVA, M. R. S. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRUGER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 59-70, 2009.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.; MEDEIROS, A. B.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M.; FERRARA, M. A.; DA SILVA BON, E. P.; DE MORAES, L. M.; ARAÚJO, J. de A; TORRES; F. A. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

Biocatalysts for production of lignocellulosic ethanol; an engineering perspective

Bruce S. Dien

Ronald E. Hector

Michael A. Cotta

Much research has and continues to be pursued with the goal of commercializing processes for exploiting lignocelluloses as a feedstock for fuel ethanol production. This review attempts to discuss current research trends from the perspective of a process engineer. The most important criterion for determining commercialization potential is the return on investment (ROI), which is usually presented as the rate of return in the form of an interest rate. The ROI is calculated from the variable and fixed operating costs, capital depreciation, taxes, and selling price of the biofuels. An acceptable ROI depends upon many factors, one of which is technical risk. The technical risk describes the expected time for start up before achieving the designed production capacity. Technical risk can be minimized by employing standard unit operations and streamlining process designs. Some plants never reach their expected production capacity. Investors expect a higher ROI for projects requiring more capital and with higher technical risk. Finally, there is sensitivity to scaling, which describes the minimum sized plant required to produce a profit. Cellulosic biofuels plants are sensitive to scaling because the feedstock is a high bulk material that is not easily transported long distances. Larger plants also consume more water and

utilities, which further constrain site selection. Advances in biocatalyst technologies favorably impact all of these factors. In the words of a senior microbiologist working for a major corn ethanol engineering company: “*Microbes replace steel.*” This chapter will focus on the interaction between biocatalyst development and process design.

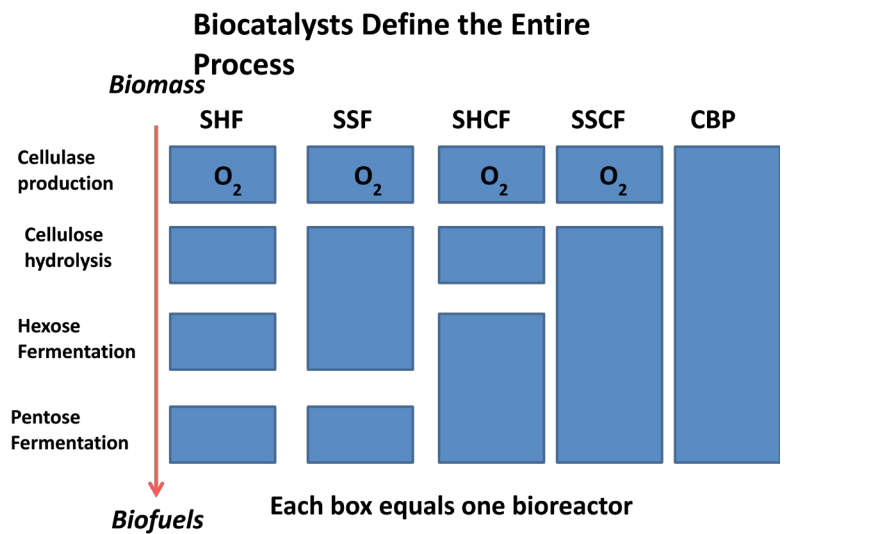


Figure 1. Expanding the properties of biocatalysts for biofuels production can lead to capital savings. In the ultimate case, where the microorganism produces all of its own hydrolysis enzymes and co-ferments hexose and pentose sugars, only one reactor would be needed.

As shown in Figure 1, the biocatalysts define the process. In the most conservative process design, separate microorganisms are used to produce cellulases, ferment hexoses, and pentoses and enzymatic hydrolysis is conducted in a fourth tank. The enzyme hydrolyzer can be eliminated when cellulase and the glucose fermenting microorganism are combined for simultaneous saccharification and fermentation (SSF). And, if hydrolysis, glucose and pentose fermentation are all combined, which requires a microorganism capable of co-fermenting these sugars, the process can be conducted in two bioreactors as a

Simultaneous Saccharification and co-Fermentation (SSCF). Finally, in the ideal case of consolidated bioprocessing (CBP), a single or consortium of microorganisms is used that produces its own enzymes as well as fermenting all the sugars to biofuels (LYND et al., 2005). In this last case, only a single bioreactor is needed, albeit size is dependent upon productivity. Therefore, expanding the role of the biocatalyst(s) is one strategy for streamlining the process.

Process and Pretreatment

The core unit operations for producing cellulosic biofuels are pretreatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation. At the Agricultural Research Service (ARS), we have developed a dilute ammonium hydroxide process that is effective for pretreating herbaceous biomass. Biomass is pretreated at 170-180° for 20 min with 4-8%w/v ammonium solution. The ammonium is subsequently removed by evaporation and biomass either converted to sugars by enzymes or to ethanol by SSF. Typical glucose fermentation yields are above 80% (Table 1) and 52.9 – 79.6% for glucose and xylose co-fermentation. Total sugar yields are lower than for glucose because we are using a 1st generation xylose-fermenting GMO *S. cerevisiae* for which xylitol is a significant co-product. We are also currently developing on a low-moisture ammonium pretreatment that uses 60% solids, milder temperature, and the same ammonium hydroxide loading. Early results are very promising for switchgrass. Increasing solids loading during pretreatment is advantageous for lowering overall water usage, decreasing steam requirements because less water is heated, and for achieving higher fermentation titers, which enhances product recovery.

Table 1. Ethanol conversion yield efficiencies for biomass pretreated with dilute ammonium

Plant Biomass	Glucose Fermentation	Total Sugars Fermentation
Alfalfa (stems) (8%, 170°C, 20 min)	86.4 - 94.7%	66.0 - 79.6%
Reed Canary Grass (4%, 170°C, 20 min)	90.4%	53.9 - 68.2%
Forage Sorghum (4%, 170°C, 20 min)	57.3 - 81.8%	Not Available
Switchgrass (8%, 180°C, 20 min)	67.8 - 82.9%	42.5 - 52.9%

Enzymes

While there has been continued improvement in enzyme efficiencies, their overall cost still remains a concern. Recently the U.S. Department of Energy (HUMBIRD et al., 2011) estimated that with onsite production of cellulases, enzymes would account for 16% of the production costs. The reason for this high cost is shown in Table 2, which contrasts the amount of granular starch amylase used for a corn to ethanol fermentation versus four pre-commercial cellulases used for fermentation of corn stover pretreated with dilute-acid and washed. The corn fermentation results are from ARS (DIEN et al., 2012) and the cellulase results from McMillan et al. (2011). The yield efficiencies using the cellulases were higher than those observed for starch fermentation. However, the enzyme loading was 22x higher and the productivities 10x lower. Slower conversion rates add to capital costs because it necessitates longer holding times and larger tanks. But the dominant reason that enzyme costs are so high is because of the higher loadings. However the reader is cautioned that a more thorough review would compare loadings

on a protein basis and that enzyme companies have and continue to make significant progress in reducing the costs of enzymes.

The choice of pretreatment also influences the selection and amount of needed enzymes. Strong acid pretreatments hydrolyze cellulose and hemicellulose to sugars and therefore dispense with the need for enzymes entirely. Pretreatments that eliminate cellulose’s crystal structure dramatically lower amount of required cellulases. These pretreatments include organosolv, concentrated phosphoric acid, and room temperature liquid ionic solutions. However, all of above use non-aqueous solvents as their reaction media and are, therefore, critically dependent upon efficient recycling loops. Dilute-acid will hydrolyze hemicellulose and therefore cellulases are primarily required for hydrolysis of cellulose. However in the advent of low-cost hemicellulases, lower severity pretreatment conditions would be favored that incur limited xylan hydrolysis. Complete acid hydrolysis of xylan leads to greater production of sugar degradation products that are inhibitors of fermentation. Hydrothermal and alkaline pretreatments do not saccharify hemicellulose and therefore depend upon a full suite of cellulases and hemicellulases for producing fermentable sugars.

Table 2. Comparison of amylase and cellulase

	Starch	Cellulose			
Biomass	Ground corn	Dilute-acid pretreated & washed corn stover			
Enzyme	Granular Starch Amylase	Pre-commercial Cellulases			
		A	B	C	D
Enzyme Loading (mg total wt/g glucan)	4.0	318	89	209	519

Continua...

Table 2. Continuation.

	Starch	Cellulose			
Ethanol Yield Eff.	83%	85%	85%	88%	92%
Productivity (g/l/h)	2.3	0.22	0.42	0.43	0.44
Cost (per gal ethanol)	1-5 cents	\$0.34 - \$1.47			

Numerous avenues are being pursued to lower the cost of enzymes (Table 3). Within the ARS, we are pursuing development of higher quality feedstocks. We have observed that lowering lignin contents within forage sorghum increases ethanol yields by 157% at similar enzyme loadings (sorghum paper). We have also been able to increase ethanol yields using alfalfa cultivars with altered lignin composition (DIEN et al., 2011).

Table 3. Strategies for Lowering Cost of Enzyme Production

Use Less Enzymes
Better biomass & pretreatments
More active enzymes & mixtures (per mg protein)
Produce Cheaper Enzymes
On-site Enzyme Production (e.g. Gulf Process)
Produce <i>in situ</i> within green plants
Consolidated Bioprocessing
Secreted enzymes (e.g. fungal enzymes expressed in yeast)
Cellulosomes (e.g. anaerobic bacteria)
Recycle Enzymes

Fermentation and Microorganisms

A list of traits important for commercial application of microorganism is shown in Table 4. The most important traits are yield and product selectivity, tolerance, and productivity as each of these directly

impacts production costs. The microorganisms should also be capable of fermenting sugar mixtures for co-fermentation of hexoses and pentoses, and if a SSF scheme is envisioned the fermentation and enzyme operative pHs need to coincide. For example, *T. reesei* and *S. cerevisiae* both operate well at pH 5. The final list of conditions is associated with minimizing technical risk. The strain needs to be hardy, stable for selected or molecular engineered traits, and resistant to various inhibitors commonly present in hydrolysates. Strains that grow at a low pH or high temperature are also preferred because these culture conditions tend to impede microbial contamination.

Table 4. Important traits for ethanol producers

High Ethanol Yield and Product Selectivity
High Ethanol Tolerance (> 50 g/l)
High Ethanol Productivity
Broad range of sugars fermented in sugar mixtures
Compatibility with <i>T. reesei</i> cellulases for SSF
Hardiness (in both glucose and xylose cultures)
Phenotypic stability
Inhibitor Tolerance (e.g. furfural, HMF, acetic acid, etc.)
Growth of low pH (< 5.0) or high temperature (>50°C)

The largest cost for producing cellulosic ethanol is the feedstock, which emphasizes the importance of obtaining a good yield. Product yield also affects biomass collection and capital costs. As yield declines more biomass is needed to maintain production, which means biomass needs to be transported from further way and greater quantities stored on location. Also, plant equipment needs to be larger because more biomass will need to be processed and equipment is sized based upon volume. However, the goal of achieving the highest possible yield is tempered by productivity (Figure 2). As ethanol yield increases, so does ethanol concentration and soon ethanol begins to slow the specific fermentation productivity. As productivity falls, so

does annual ethanol production, which is shown for 90% + yield. At some point, loss in potential production from the slowing fermentation rate exceeds losses from the lower yield and the fermentation is halted. In mixed sugars fermentations, this relationship can be more complex as often xylose is repressed while glucose is still present and only slowly fermented thereafter. The third most important fermentation parameter is ethanol concentration. The target value for ethanol titer is usually 5% w/v or greater because energy demands dramatically increases at lower concentrations (MADSON; LOCOCO, 2000). Increasing the final ethanol concentration beyond 5% will further lower distillation costs further and reduce water usage.

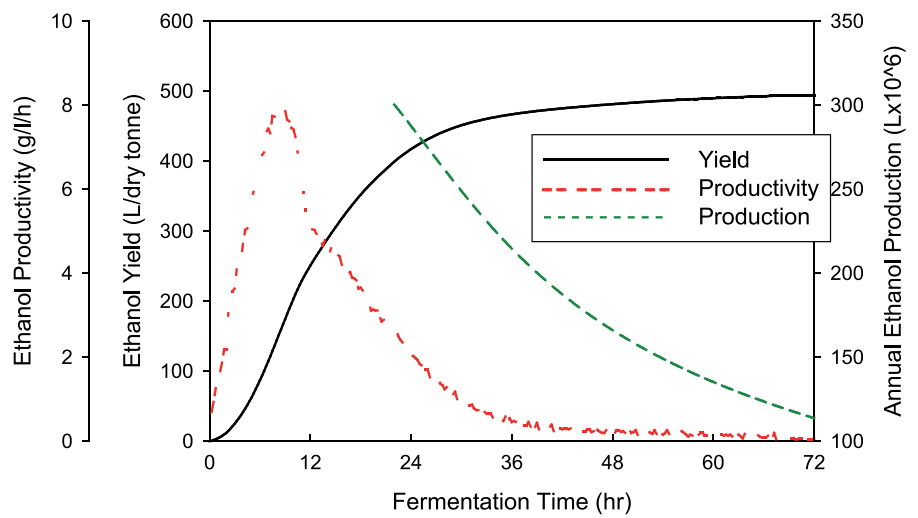


Figure 2. Ethanol yield and productivity are interdependent because as yield increases, the higher ethanol titer begins to inhibit ethanol production and productivity declines. The slower productivity leads to a decrease in production for a fixed plant size.

A trait closely linked with product yield, is the range of sugars fermented by the microbe. Depending upon the source of herbaceous biomass, pentosans represent from 20-40% of the available carbohydrates. Therefore, only fermenting hexoses, represents a corresponding decrease in yield. It is hard to imagine a commercially successful cellulosic biofuels plant that does not use pentoses. Some

have suggested channeling pentoses to co-products. While co-products can increase profitability and insure against market fluctuations, they can also add capital expenses and (if novel) technical risks.

The final tier of microbial traits insures smooth operation of the process and minimizes technical risk. Large fermentations are operated as open processes in which slow mixing times ensures only approximate control of culture conditions relative to those achieved at laboratory scale. These processes demand microorganisms that are robust and that recover speedily from any disruptions. Open systems, equipped with clean in place systems, are also prone to contamination. Therefore it is helpful if the microorganism grows at either a low pH or high temperature, which precludes the growth of most other microorganisms. As primary fermentation reactors are very large, the inoculum needs to go through many doublings. This microbial process traits need to be very stable or else population shifts may occur. For example, genetic traits need to be integrated into the genome or under *in situ* selection and if the microbe was adapted for enhanced growth (as strains often are for xylose growth) acquired traits need to be resilient.

The final trait of importance is inhibitor tolerance. Hydrolysates contain a mixture of aldehydes, phenolics, and organic acids that are released or synthesized during pretreatment. Conditioning hydrolysates with chemical methods is expensive and generate excess waste. It is much more desirable to the extent possible to adapt strains to withstand these inhibitors. Biological strategies include using large inoculum, directed evolution, and genetic engineering. An example of the later is overexpression of alcohol dehydrogenases involved in reducing furans into their less toxic alcohol counterparts. Acetic acid can be particularly troublesome as it is naturally released from xylan during hydrolysis and is often generated from bacterial contaminants. Therefore, particular attention should be paid to acetic acid tolerance, albeit the affect of acetate can be moderated by raising the culture pH. An alternate strategy is to use a pretreatment

that does not generate excess inhibitory compounds. We have found that treatment with ammonium hydroxide generates biomass that is readily fermented by yeast without a lag or adaptation phase. Ammonium hydroxide pretreatment does not generate furans and converts much of the acetic acid to a lesser inhibitory compound.

Summary

Advances in biotechnology have and continue to promote commercialization of cellulosic ethanol. Much progress has been made in developing cellulases and hemicellulases with increasing specific activities and strains that more readily ferment hexose and pentose streams faster and to higher yields. Future trends will likely include enhancing biomass quality without sacrificing biomass yield by genetically engineering plant cell walls, continued development of microorganisms that produce their own hydrolytic enzymes, and the application of synthetic biology for production of a broader range of fuels and co-products.

References

DIEN, B. S.; MILLER, D. J.; HECTOR, R. E.; DIXON, R. A. ; CHEN, F.; MCCASLIN, M.; REISEN, P.; SARATH, G.; COTTA, M. A. Enhancing alfalfa conversion efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering lignin composition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 6479–6486, 2011.

DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATTTLER, S. E.; CHEN, H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved Sugar Conversion and Ethanol Yield for Forage Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) Lines with Reduced Lignin Contents. **Bioenergy Research**, n. 2, p. 153-164, 2009.

DIEN, B. S.; WICKLOW, D. T.; SINGH, V.; MOREAU, R. A.; MOSER, J. K.; COTTA, M. A. Influence of *Stenocarpella maydis* infected corn on the dry grind ethanol process. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 89, n. 1, p. 15-23, 2012.

HUMBIRD, D. R.; DAVIS, L.; TAO, C.; KINCHIN, D.; HSU, A.; ADEN, P.; SCHOEN, J.; LUKAS, B.; OLTHOF, M.; WORLEY, D. S.; DUDGEON, D. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. [S.l]: Books LLC, 2011. NREL/TP-5100-47764.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, London, n. 16, p. 577-583, 2005.

MADSON, P. W.; LOCOCO, D. B. Recovery of volatile products from dilute high-fouling process streams. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 1049-1061, 2000.

MCMILLAN, J. D.; JENNINGS, E. W.; MOHAGHEGHI, A.; ZUCCARELLO, M. Comparative performance of precommercial cellulases hydrolyzing pretreated corn stover. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 4, p. 29, 2011.

Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol

Henrique V. Amorim

Mario L. Lopes

Introdução

Atualmente, as leveduras selecionadas são responsáveis pela produção de cerca de 70% de todo o álcool produzido no país, ou seja, 16 bilhões de litros por ano. Cinco linhagens de leveduras industriais tem se destacado até o momento: PE2, CAT1, FT858L, BG1 e SA1. Essas leveduras foram selecionadas por apresentarem características de dominância e persistência nas fermentações industriais com reciclo de células ao longo da safra de cana-de-açúcar. Além disso, em experimentos realizados em escala de laboratório, elas apresentaram uma combinação favorável de características importantes para as indústrias como, elevado rendimento fermentativo, manutenção de viabilidade elevada, baixa formação de glicerol, pouca produção de espumas, não são floculantes “per si” e toleram bem as condições estressantes impostas pelas fermentações. Atualmente, 170 destilarias em todo país (41% das unidades industriais) fazem uso dessas leveduras. O foco deste capítulo será voltado para a ciência e tecnologia na seleção de leveduras, a importância de conhecer os processos industriais, os avanços obtidos nos últimos 30 anos, as leveduras personalizadas, os contaminantes das fermentações industriais e

suas características, superioridade das leveduras selecionadas frente à contaminação bacteriana e toxidez por alumínio do mosto, assim como para o processo de fermentação com alto teor alcoólico.

Processos industriais de fermentação alcoólica no Brasil

Os processos industriais de fermentação alcoólica no Brasil para produção de álcool combustível se distinguem das demais fermentações por utilizar um grande volume de células de leveduras que são reaproveitadas em sucessivos ciclos durante a safra da cana-de-açúcar. O processo de fermentação foi originalmente desenvolvido por Firmino Boinot nas usinas na região de Melle, França, durante a década de 30 (AMORIM; LOPES, 2004). A partir da década de 70, com início do Proálcool, diversas melhorias neste processo foram introduzidas nas usinas. Estes avanços permitiram às destilarias brasileiras alcançar rendimentos fermentativos de 92-93% em relação ao rendimento teórico por Gay-Lussac (100% de rendimento corresponde a 1g de glicose transformada em 0,511g de etanol e 0,489g de CO₂). Dentre estas melhorias destacam-se a seleção de leveduras industriais, mudanças nas condições do processo de fermentação como o controle da contaminação bacteriana, o teor de levedo no vinho, a geometria das dornas, a condução do processo propriamente dito, assim como, os avanços na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar (Amorim, 2006). Além disso, as análises químicas e microbiológicas possibilitaram um melhor controle dos processos de produção de álcool, reduzindo as perdas e melhorando o desempenho do setor (AMORIM et al., 2008).

No Brasil, a produção de etanol é realizada por destilarias que possuem dornas com capacidade para 0,5 a 3 milhões de litros. Os vinhos contêm densidades elevadas de leveduras. Cerca de 10 a 15% do volume de vinho nas dornas é constituído pelo levedo. Isso

significa que uma destilaria com 7 dornas operando com um milhão de litros cada, necessita de 700 a 1.050 ton de levedo. Atualmente, muitas usinas compram fermento seco selecionado e multiplicam até atingir biomassa celular suficiente para iniciar o processo industrial. Ao término da fermentação é realizada a centrifugação do vinho bruto para separação e reutilização do levedo, enquanto o vinho delevedurado segue para destilação. Após a centrifugação, o levedo é tratado com ácido sulfúrico até atingir pH 2,0-2,5 com a finalidade de reduzir a contaminação bacteriana. Após 2 a 3 horas a temperatura ambiente, o levedo retorna para as dornas de fermentação e inicia-se a alimentação da dorna com mosto constituído por caldo de cana, caldo misturado ao melaço ou somente melaço diluído com água. A fermentação é conduzida em temperatura de 33 a 34 °C por 6 a 12 horas, dependendo da concentração de açúcares no mosto. Durante o período de safra (cerca de 200 dias) este procedimento é repetido aproximadamente 400 vezes, ou seja, são dois ciclos por dia como descrito por Amorim et al. (2011).

Basicamente existem dois processos: a fermentação em batelada alimentada e a fermentação contínua. A primeira é utilizada por cerca de 85% das destilarias brasileiras, enquanto que, a fermentação contínua está em 15% das unidades industriais (GODOY et al., 2008). Os dois processos apresentam características distintas, dentre outras, o número, disposição e geometria das dornas, automação, o sistema de alimentação, a periodicidade de limpeza das dornas, a contaminação bacteriana, o gasto com insumos, condições de estresse sobre a levedura, entre outras características. Porém, as fermentações em batelada têm proporcionado resultados melhores quanto ao rendimento da fermentação, controle da contaminação bacteriana e economia com insumos (GODOY et al., 2008).

A seleção de leveduras: antes e após a década de 80

Até o final da década de 80 não havia metodologias capazes de identificar com segurança diferentes linhagens de leveduras. As metodologias utilizadas permitiam distinguir espécies de *Saccharomyces* e outras leveduras pelas características morfológicas e fisiológicas. A habilidade de assimilar e fermentar diferentes fontes de carboidratos e nitrogênio ou mesmo o uso de mutantes *petit* (linhagens com deficiência respiratória) eram a base da classificação das leveduras. Além disso, havia uma grande confusão taxonômica uma vez que muitas dessas características eram governadas por genes de cópia única. Mutações pontuais, recombinações meióticas e mitóticas, deleções e duplicações cromossômicas originavam fenótipos diferentes levando a classificações completamente divergentes, dificultando a identificação e o monitoramento de linhagens de *Saccharomyces* em fermentações industriais.

As tentativas de monitorar leveduras em fermentações industriais estavam sujeitas a vários desafios como a contaminação por uma grande diversidade de leveduras. Isso ficou claro para leveduras como a linhagem TA (ou M300A) desenvolvida por cruzamentos em laboratório e para a levedura IZ1904. Informações contraditórias eram obtidas a partir das usinas onde essas leveduras tinham sido introduzidas no início da safra. Em alguns casos, as fermentações corriam bem, mas em outras unidades, as fermentações apresentavam características totalmente diferentes daquelas esperadas para as estirpes originais. Sem metodologias adequadas para se identificar as linhagens de leveduras, não fazia sentido tentar monitorar as populações ao longo das fermentações. Esta situação começou a mudar com o advento das técnicas moleculares baseadas na análise do DNA cromossômico. O desenvolvimento da cariotipagem permitiu a separação dos cromossomos da levedura *S. cerevisiae* de acordo com o tamanho dos mesmos por eletroforese em campos pulsados. Esta técnica foi originalmente desenvolvida por Shwartz e Cantor (1984)

na Universidade de Columbia, USA. Ao longo dos anos a separação e análise de cromossomos intactos foi melhorada com o desenvolvimento de diferentes sistemas de eletroforese como TAFE (transverse-alternating field gel electrophoresis) e CHEF (contour-clamped homogeneous electric fields) entre outros (BASIN; BASIN, 2001).

Com o advento da cariotipagem foi possível demonstrar a grande diversidade existente entre leveduras da mesma espécie. No final da década de 80, a cariotipagem passou a ser utilizada com sucesso para distinguir cepas de *S. cerevisiae* em regiões produtoras de vinho na França (VEZINHET et al., 1990). Num experimento realizado na França durante seis anos consecutivos, Vezinhet et al. (1992) demonstraram pela cariotipagem e análise dos perfis de DNA mitocondrial que algumas linhagens de leveduras, amplamente distribuídas entre os vinhedos, eram representantes de uma única região produtora de vinho. Esta técnica passou a ser utilizada no Brasil graças a trabalho de colaboração entre a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), a Fermentec e o “Institut Supérieur des Products de la Vigne et du Vin” localizado em Montpellier na França. Naquela época o diretor do instituto, Pierre Barre e a pesquisadora, Françoise Vezinhet receberam o Professor Luiz Carlos Basso (ESALQ-USP) o qual recebeu as orientações a respeito da metodologia e começou a aplicar a técnica de cariotipagem para monitoramento das leveduras em fermentações industriais no Brasil (AMORIM et al., 2004).

Os resultados começaram a surgir logo nas primeiras análises e mostraram a grande diversidade de leveduras que contaminavam os processos fermentativos. Também foi possível demonstrar que leveduras tradicionais como IZ1904 e de panificação não conseguiam sobreviver e se manter no processo industrial por mais de 30 dias. Estas leveduras eram logo substituídas por outras cepas de *Saccharomyces* contaminantes, mais adaptadas às condições estressantes das fermentações industriais (BASSO et al., 1994; BASSO et al., 2008). A cariotipagem também revelou que havia cepas de leveduras que dominavam e persistiam nas fermentações

industriais ao longo da safra. Graças à cariotipagem essas cepas foram isoladas e avaliadas em laboratório sob condições que imitavam as fermentações industriais. As melhores cepas foram então selecionadas para serem introduzidas nas destilarias no início de cada safra e reavaliadas quanto à persistência e dominância pela cariotipagem. Isso foi possível porque as variações no número e no tamanho dos cromossomos permitiram estabelecer uma impressão digital para as linhagens de leveduras que se mostrou estável e segura para monitoramento de fermentações industriais. No caso da *S. cerevisiae* as variações de tamanho dos cromossomos de uma linhagem para outra podiam chegar a 45% (BIDENNE et al., 1992).

Posteriormente, foram realizados trabalhos que demonstraram que as leveduras tendem a reorganizar seus cromossomos, ganhando ou perdendo determinadas características que podem ser importantes para os processos industriais de fermentação alcoólica (LOPES, 2000). Rearranjos cromossômicos podem ocorrer por meiose ou durante mitoses. As células que carregam modificações na sua bagagem genética disputam a sobrevivência pelo meio com outras leveduras, sejam elas selvagens ou variantes da linhagem original. Como estão sob constante pressão de seleção, imposta por diferentes fatores industriais, as linhagens que carregam combinações desvantajosas são rapidamente eliminadas ou substituídas pelas variantes mais resistentes. Esse processo se dá de forma contínua sendo muito dinâmico durante a safra porque as condições de fermentação dos processos industriais não são uniformes.

Leveduras selecionadas e personalizadas

Atualmente, as leveduras selecionadas são linhagens industriais que reúnem características de persistência e dominância nas fermentações com reciclo de células ao longo da safra assim como habilidades de importância industrial como elevado rendimento fermentativo,

pouca formação de espumas, não são floculantes e apresentam boa velocidade de fermentação. Estas leveduras, PE2, CAT1 e FT858L, selecionadas pela Fermentec e as linhagens BG1 e SA1 selecionadas pela Copersucar (atualmente CTC) têm sido introduzidas em diversas destilarias brasileiras a cada safra. As leveduras selecionadas quando avaliadas em laboratório sob condições que imitavam todas as etapas dos processos industriais apresentaram ganhos de rendimento de 3% sobre as leveduras de panificação (AMORIM et al., 2009). Em termos relativos pode parecer pouco, mas para uma unidade que produz um milhão de litros de álcool por dia significa 30.000 litros a mais. Muitas usinas passaram a iniciar a safra com leveduras selecionadas. Porém, muitas unidades continuaram a usar leveduras de panificação, de laboratório, cervejaria, e de outras origens.

As leveduras selecionadas produzem pouca espuma na fermentação e por persistirem e dominarem por mais tempo nas fermentações industriais em comparação com as leveduras de pão e de laboratório, os problemas com espuma, causados pelas leveduras contaminantes, também são menores. As destilarias com o menor consumo de dispersantes e antiespumantes (média de 0,224 g/L álcool absoluto) apresentaram persistência e dominância das leveduras selecionadas durante toda a safra, enquanto que, as unidades com maior consumo (média de 0,899 g/L álcool absoluto) haviam iniciado a safra apenas com levedo de panificação incapaz de persistir por mais de 30 dias em fermentações industriais com reciclo de células. Isso tinha um impacto direto no consumo de dispersantes e antiespumantes porque 72% das leveduras contaminantes (de um total de 250 linhagens avaliadas) produziam espumas em abundância, comprometendo a capacidade útil das dornas e em alguns casos levando às perdas de mosto e de levedo (AMORIM et al., 2004). Como a formação de espumas é uma característica facilmente visível e afeta diretamente os custos das usinas, a pouca formação de espuma tornou-se mais uma das vantagens associadas ao uso das leveduras selecionadas. Posteriormente, se demonstrou que o fator responsável pela espuma estava na levedura, assim como, diferentes linhagens de leveduras

apresentam padrões diferenciados na formação de espuma, volume e consistência ao longo da fermentação (FIGUEIREDO, 2008). Nos últimos anos, com o avanço da colheita mecanizada, a qualidade da cana utilizada pela indústria tem mudado consideravelmente. Esta mudança na colheita da cana tem sido associada com as mudanças nas taxas de permanência e dominância de algumas linhagens de leveduras.

As leveduras personalizadas se distinguem das selecionadas por serem específicas para um determinado processo industrial. Características como floculação, formação de espuma e velocidade de fermentação também podem mudar. De qualquer forma, são leveduras selecionadas, mas direcionadas para processos ou necessidades específicas porque não existe uma usina igual à outra. Cada indústria possui particularidades quanto à sua matéria-prima, instalações, características do mosto, contaminantes e condução do processo de fermentação e de tratamento do levedo que as distinguem das demais. É muito difícil uma levedura se adaptar a todas essas variações. As usinas também têm interesses e necessidades diferentes para atender às demandas de mercado que acabam exigindo leveduras com atributos diferenciados. Esta variabilidade nas condições de fermentação tem aberto a oportunidade para a seleção de leveduras personalizadas. Este procedimento passou a ser chamado de “Seleção Dirigida Pelo Processo” (Process Driven Selection), ou seja, possibilitando a obtenção de linhagens de leveduras mais adaptadas às condições e características de cada processo industrial. As leveduras personalizadas, obtidas por esse processo de seleção, têm se mostrado mais competitivas, reduzindo as chances e os impactos causados por leveduras contaminantes.

Leveduras contaminantes

Uma das questões que sempre acompanharam o trabalho da Fermentec foi por que as leveduras de panificação eram facilmente substituídas

durante a safra por leveduras selvagens contaminantes? Na maior parte dos casos, estas leveduras são do gênero *Saccharomyces*, mas em outras situações ocorreram substituições por leveduras dos gêneros *Brettanomyces* (Dekkera), *SchizoSaccharomyces* e *Candida* (AMORIM et al., 2009). Uma das suspeitas recaía sobre a atividade killer das leveduras como tem sido descrito para fermentações de vinho e cerveja. Essas leveduras produzem uma toxina capaz de matar outras leveduras, mas que é inócua ao ser humano.

A ocorrência da atividade killer em leveduras foi relatada pela primeira vez em 1963 por Bevan e Makower, a partir da observação de que alguns isolados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* eram capazes de produzir uma toxina letal para outras células, mas para a qual eram imunes. Posteriormente, diversas investigações foram realizadas demonstrando que a atividade killer não era restrita às leveduras do gênero *Saccharomyces* (MARQUINA et al., 2002). Restava saber se a atividade killer poderia afetar a sobrevivência das leveduras selecionadas quando introduzidas nas fermentações industriais. Estudos realizados no final da década de 90 com 139 leveduras contaminantes isoladas de 16 processos industriais em que havia ocorrido a substituição de leveduras de pão e cepas selecionadas (PE2, VR1), mostraram que a atividade killer não era o fator responsável pela substituição da população de leveduras. Nenhuma das leveduras contaminantes apresentou atividade contra as linhagens selecionadas e de panificação (AMORIM et al., 1998).

Posteriormente, outra investigação foi realizada com a finalidade de estabelecer quais os principais parâmetros relacionados à qualidade da cana-de-açúcar e fermentação que pudessem estar associados à substituição das leveduras em escala industrial. Análises estatísticas baseadas em dados industriais e no acompanhamento da permanência e dominância das leveduras em 19 usinas durante 8 safras consecutivas mostraram que os principais fatores foram o tempo de queima da cana-de-açúcar e o tratamento ácido do levedo. Quando o tempo de queima/corte da cana foi superior a 65 horas,

em 87,5% dos casos houve substituição do levedo durante a safra. Estes resultados mostraram a importância da qualidade da matéria-prima para redução da contaminação por leveduras selvagens. Com relação ao tratamento ácido do levedo, em 95% dos casos investigados ocorreu substituição quando foram utilizadas concentrações de ácido sulfúrico acima de 2,0 g/L na cuba durante a safra. Mais tarde, Stambuk et al. (2009) demonstraram que as leveduras selecionadas possuem cópias extras de genes para síntese de vitaminas B1 e B6, enquanto que, leveduras de panificação e laboratório (S288c, primeira levedura a ter seu genoma completamente seqüenciado) apresentam um número menor de cópias. Estas vitaminas são elementos chave para o metabolismo de açúcar, assim como, para a síntese de vários outros compostos de importância vital para as células. Em condições de cultivo sem vitaminas B1 e B6 a levedura industrial CAT1 apresentou uma fase de adaptação ao meio, muito menor em comparação com a linhagem S288c. Esses resultados demonstraram que as leveduras selecionadas são capazes de competir melhor pelo substrato em comparação com cepas de laboratório ou de panificação.

Características das leveduras selvagens

Três características principais têm sido relacionadas à contaminação por leveduras selvagens: a formação de espumas em excesso, floculação e sobra de açúcares residuais no vinho. Tais características prejudicam as fermentações industriais de diferentes formas. A formação de espumas acaba elevando o consumo de insumos como dispersantes e antiespumantes. Usinas que utilizam leveduras selecionadas consomem entre 0,2 a 0,4g de dispersantes mais antiespumantes por litro de álcool produzido enquanto que, destilarias com leveduras selvagens espumantes podem consumir 1 a 2 g/L álcool produzido. Considerando a produção de 27 bilhões de litros de álcool por ano, uma redução de 0,8 g/L de álcool representa uma economia da ordem de R\$ 170 milhões no consumo de um único insumo (antiespumantes). Quanto

à floculação, os problemas principais estão relacionados à dificuldade para centrifugar o levedo, recirculação de vinho, aumento do consumo de ácido sulfúrico para tratar o levedo, sobra de açúcares residuais no vinho. Em alguns casos, a destilaria é obrigada a descartar toneladas de levedo e reiniciar o processo. Devido à floculação, o levedo tende a decantar, principalmente em dornas antigas com serpentinas. Por essa razão, a floculação acaba prejudicando o contato do levedo com o açúcar do mosto, elevando o tempo de fermentação e a sobra de açúcar no vinho. A floculação pode ser causada por genes FLO ou pela formação de cadeia de células. Apesar da formação de cadeia de células ou pseudohifas não ser considerada uma floculação verdadeira, os efeitos no processo fermentativo são muito semelhantes ao de uma floculação comum. Porém, a maioria das floculações em fermentações industriais está relacionada com contaminações por bactérias do gênero *Lactobacillus* (AMORIM et al., 2009).

Superioridade das leveduras industriais frente à contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana causa um grande impacto no rendimento da fermentação e no desempenho geral da destilaria. Em termos gerais, para cada 1×10^7 bactérias / mL de vinho há um prejuízo de 0,6% no rendimento da fermentação. Isso pode parecer pouco, mas se considerarmos uma destilaria produzindo um milhão de litros de álcool por dia durante 200 dias de safra, a perda representa 1.200.000 litros de álcool em uma única unidade industrial. Na prática é comum encontrar fermentações com contaminações que atingem 10^8 bactérias/mL (AMORIM; LOPES, 2005).

Por serem capazes de manter a viabilidade celular mais elevada durante os ciclos fermentativos, as leveduras industriais dificultam o crescimento das bactérias quando comparadas com leveduras de panificação (CHERUBIN, 2003). À medida

que as células perdem a viabilidade liberam para o meio nutrientes e fatores de crescimento essenciais para as bactérias. Desta forma, como as leveduras de panificação perdem a viabilidade com maior rapidez, também acabam favorecendo a contaminação bacteriana ao liberar nutrientes para o meio.

Mais tarde, também foi demonstrado o antagonismo entre leveduras e bactérias, especialmente no que diz respeito à produção de manitol (GOMES, 2009). As leveduras selecionadas inibem a produção de manitol pelas bactérias heterofermentativas (AMORIM et al., 2009). Essas bactérias são capazes de reduzir a frutose para manitol. Por essa razão, leveduras de panificação com elevada atividade de invertase, acabam favorecendo a contaminação bacteriana. Após a inversão da sacarose, as leveduras consomem preferencialmente a glicose enquanto que a frutose acumula no meio sendo consumida em menor velocidade. Porém, as bactérias heterofermentativas se beneficiam desta condição ao utilizar a frutose como fonte de carbono e aceptor de elétrons. Além do manitol, as bactérias heterofermentativas também produzem ácidos acético e láctico e etanol, sendo contaminantes comuns de processos industriais (COSTA et al. 2008). Por essa razão, além do ácido láctico e da dextrana, o manitol também tem sido considerado um ótimo indicador da contaminação bacteriana (EGGLESTON et al., 2007).

Tolerância ao alumínio

O alumínio é um inibidor da fermentação capaz de causar a redução da viabilidade celular das leveduras aumentando o tempo de fermentação e a sobra de açúcares no vinho. Concentrações acima de 30 mg/L em mostos a base de caldo de cana-de-açúcar são capazes de prejudicar a fermentação. De acordo com Aranha (2002) a levedura PE2 se mostrou mais resistente ao alumínio em comparação com a levedura de panificação em experimentos com reciclo de células. Outras linhagens de leveduras selecionadas, como a CAT1, são

ainda mais tolerantes a toxidez do alumínio que a PE2, seja em fermentações conduzidas em bancada ou em escala industrial.

Seleção dirigida pelo processo: estudo de caso

A seleção dirigida pelo processo baseia-se na seleção das leveduras mais adaptadas às condições de fermentação de cada unidade industrial e às oscilações de processo ao longo da safra. Estas características e variações são muito particulares de uma usina para outra e estão sujeitas às ações do ser humano. Um caso que ilustra este conceito é o de uma usina no interior do Estado de São Paulo com moenda superdimensionada para sua capacidade de fermentação. Para atender a demanda de mercado por álcool e ajustar a sua fermentação à capacidade de moagem, a usina passou a trabalhar sob condições extremas de processo, elevando o teor alcoólico e impondo uma pressão de seleção durante as fermentações. As leveduras mais resistentes acabaram dominando a população e se estabelecendo no processo. Durante a safra, essas leveduras foram identificadas e sua população acompanhada pela técnica de cariotipagem. Houve a intervenção do ser humano ao monitorar as mudanças populacionais, identificando as leveduras persistentes e dominantes assim como, direcionando a seleção para aquelas linhagens que reuniam os atributos mais apropriados para atender às características da usina. Utilizando a levedura personalizada, esta usina elevou o teor alcoólico no vinho além de reduzir o tempo de fermentação adequando-se à sua capacidade de moagem. A usina conseguiu elevar em 3,4 milhões de litros de álcool, o que representou um ganho de aproximadamente 8% na produção em relação ao mesmo período de safra. Este é um exemplo real e demonstra como é promissor o campo da seleção de leveduras personalizadas. São 420 destilarias no país, cada uma com suas particularidades. Aqueles que compreenderem e dominarem a ciência e a tecnologia dos diferentes processos

fermentativos também serão capazes de selecionar novas leveduras personalizadas, verdadeiras pérolas num oceano de diversidade. Entre os diversos desafios da seleção de leveduras estão os processos de fermentação com alto teor alcoólico (acima de 16% etanol v/v).

Fermentando com Alto Teor Alcoólico

Atualmente, as fermentações industriais no país trabalham com teores alcoólicos de aproximadamente 8 a 8,5%. Em média, para cada litro de álcool produzido são gerados outros 12 litros de vinhaça o que representa cerca de 290 bilhões de litros de vinhaça por ano. Dobrar o teor alcoólico nas fermentações significa reduzir pela metade o volume de vinhaça (AMORIM et al., 2011). Apesar dos diversos avanços na fermentação industrial nos últimos 30 anos, o teor alcoólico das fermentações tem sofrido poucas mudanças. Diferentemente de outros processos fermentativos ao redor do mundo, como ocorre com a produção de álcool a partir do milho nos Estados Unidos e Canadá, as destilarias brasileiras reciclam centenas de toneladas de levedo a cada fermentação. Isso aumenta o rendimento industrial e diminui o tempo de fermentação por se iniciar cada ciclo fermentativo com concentrações elevadas de levedo nas dornas. Por outro lado, o levedo deve estar com viabilidade elevada para poder ser reciclado. Um dos fatores responsáveis pela perda da viabilidade da levedura é a elevação do teor alcoólico. Por essa razão, o desafio tem sido subir o teor alcoólico sem comprometer a viabilidade do levedo (AMORIM et al., 2011). Tal processo passou a ser denominado “Ecoferm” (AMORIM et al., 2010). Entre os principais benefícios dessa fermentação alcoólica estão: a redução do volume de vinhaça pela metade, economia com transporte da mesma até as áreas de ferti-irrigação, economia de energia (vapor) que pode ser empregada para co-geração de energia elétrica, economia de insumos (ácido sulfúrico e antibacterianos), economia de água circulando no processo e redução do número de centrífugas pela metade. Atualmente, os programas de seleção de

leveduras têm permitido obter cepas mais tolerantes e apropriadas para fermentações com alto teor alcoólico. Tal processo abre uma nova perspectiva de trabalho para as usinas brasileiras no sentido de reduzir custos, melhorar a eficiência energética e diminuir o impacto ambiental.

Referências

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDREW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Org.). **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. v. 1, p. 39-46.

AMORIM, H. V. Ethanol Production in Brazil: a Successful History. In: SUGAR PROCESSING RESEARCH INSTITUTE CONFERENCE, 2006, Águas de São Pedro, SP. **Proceedings...** Louisiana: SPRI, [2006?]. v. 1, p. 44-47.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 8, p. 34-37, 2008.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L.; FONSECA, A. J. The relative importance of killer activity for the industrial fuel ethanol fermentation process. **Yeast**, Chichester, v. 47, p. 9, 1998.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; GODOY, A.; CHERUBIN, A. R. ; LOPES, M. L. Identification and Selection of Yeast Strains from Alcoholic Fermentations in Brazil by Electrophoretic Karyotyping. In: Anais do INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS, 11, 2004, Rio de Janeiro, RJ. **Yeasts in science and technology**. v. 1. p. 51-51.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian Experience. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 67, n. 12, p. 11-14, 2005.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Os principais processos de fermentação para álcool combustível no mundo. **Guia Internacional do Alcool**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 74-77, 2004.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

AMORIM, H. V.; OLIVÉRIO, J. L.; BOSCARIOL, F. Ecoferm. Fermentação com até 16% de teor alcoólico: reduzindo a vinhaça pela metade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL E MOSTRA DE TECNOLOGIA E ENERGIA CANAVIEIRA - SIMTEC, 8., 2010, Piracicaba, SP. [Palestras]. [Sl.: sn, 2010].

ARANHA, D. A. D. **Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-06092002-171339/>>. Acesso em: 04 out. 2012.

BASIN, E.; BASIN, H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. **Turkey Journal of Biology**, Ankara, v. 25, p. 405-418, 2001.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, H. V. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. In: In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5., 1993, Águas de São Pedro. **Anais...** Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcoolheiros do Brasil, 1994. p. 246-250.

BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; VEZINHET F. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1992.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Disponível em: [HTTP://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10092003-144216/](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10092003-144216/). Acesso em 2012-04-10.

COSTA, V. M.; BASSO, T. O.; ANGELONI, L. H. P.; OETTERER, M.; BASSO, L. C. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 503-509, 2008.

EGGLESTON, G.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; PAULILLO, S. C. L.; BASSO, T. O. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Sugar Industrie**, Berlim, v. 132, n. 1, p. 33-39, 2007.

FIGUEIREDO, C. M. **Análise Molecular da Floculação e Formação de Espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Disponível em: < http://www.tede.ufsc.br/tedesimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=408 Acesso em 2012-04-10.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, kent, v. 110, n. 1311, p. 175-181, 2008.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-23022010-092650/>> . Acesso em: 04 out. 2012.

LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *S. cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol**. 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, n. 2, p. 65-71, 2002.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

STAMBUK, B. U.; DUNN, B.; ALVES JUNIOR, S. L.; DUVAL, E. H. ; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 12, p. 2271-2278, 2009.

VEZINHET, F.; HALLET, J. N.; VALADE, M.; POULARD, A. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 1, p. 83-86, 1992.

VEZINHET, F.; BLONDIN, B.; HALLET, J. N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 32, n. 5, p. 568-571, 1990.

Agradecimentos:

CNPq - Programa RHAE processo no. 552591/2009-2

FAPESP – Programa PIPE processo no. 2009/52427-2 (Fase 2)

Fungal biodiversity as a source of enzymes to supplement *Trichoderma reesei* for efficient conversion of lignocellulosic biomass

Jean-Guy Berrin

Marie Couturier

David Navarro

Mireille Haon

Laurence Lesage Meessen

Bernard Henrissat

Pedro M. Coutinho

Introduction

Lignocellulosic biomass conversion to simple sugars is widely studied for subsequent fermentation to bioethanol or industrial chemicals but biotechnological processes are both complex and costly. The three types of polymers, cellulose, hemicellulose and lignin are strongly intermeshed and chemically bonded by non-covalent forces and by covalent crosslinkages and their proportions are variable depending on plant species. Among lignocellulosic biomasses, wheat straw is a feedstock of particular interest in France and Europe since it represents a potentially large and readily available agricultural residue resource of low-value. In the biorefinery process, enzymatic hydrolysis (i.e. saccharification) is one of the major bottlenecks due to the recalcitrance of plant cell wall. Pretreatments using mechanical disruption, high temperature, acids, peroxides or ammonia are currently employed to make biomass more accessible to enzymes.

Indeed, pretreatment increases the accessible surface area, cellulose decrystallization, partial cellulose depolymerization, hemicellulose and/or lignin solubilization, and the modification of the lignin structure (SILVA et al., 2012). Current costs for enzymatic saccharification still remain the largest contributors to the overall cost of lignocellulosic ethanol production. A major challenge is the development of a suitable efficient and economically viable hydrolysis process step.

Filamentous fungi are potent biomass degraders due to their ability to thrive in ligno(hemi)cellulose-rich environments. The magnitude of fungal diversity is estimated at 1.5 million species, although only 5 % of fungi are described species. This fungal biodiversity is an invaluable source of enzymes, i.e. hydrolytic (Carbohydrate Active enZymes, CAZymes) and non-hydrolytic (oxido-reductases) that needs to be explored. The International Centre of Microbial Resources (CIRM) managed by the French National Institute for Agricultural Research (INRA) is dedicated to the preservation and exploration of microbial biodiversity (fungi, yeast and bacteria). CIRM-CF (filamentous fungi, <http://cirm.esil.univ-mrs.fr/>) is a collection of filamentous fungi maintained at INRA (Marseilles, France) that contains around 1,500 fungal strains taxonomically characterized with ITS molecular markers. Among them, 1,200 Polyporales strains have been collected from tree stumps in temperate (Europe, North America) and tropical regions (South America, Central America, Asia, Oceania, Africa). This collection is a unique resource for exploring fungal biodiversity and identifying enzymes with original properties for biomass conversion processes.

The degradation of lignocellulose by filamentous fungi has been studied in a range of basidiomycetes and ascomycetes. Many ascomycetes species have been identified as good candidates for the release of monosaccharides such as *Trichoderma reesei*, which is used extensively in industry due to its capacity to secrete high level of cellulases. *T. reesei* has undergone several rounds of mutation/selection starting from the QM6a strain. As a result, the engineered *T. reesei* industrial CL847 strain is able to secrete more than 100 g of proteins per litre of culture

and has been proposed as the most promising organism for production of enzymes for lignocellulose conversion to fermentable sugars. However, conversion is still not optimal due to the heterogeneous composition of plant biomass. More recently, the release of the *T. reesei* genome (QM6a strain) has shown that compared to other filamentous fungi, the *T. reesei* genome is poor in terms of number and diversity of enzymes that are likely to be involved in biomass degradation. With only 16 genes encoding putative hemicellulases, *T. reesei* has the smallest set of hemicellulases among all saprophytic fungi. The lack of key lignocellulosic enzymes in *T. reesei* opens opportunities to generate more competitive enzyme cocktails.

Results

Development of a high-throughput saccharification method

To improve the enzymatic degradation of lignocellulosic biomass, it is necessary to screen for new enzymes endowed with more efficient biomass degrading properties. Therefore, we worked to devise a screening automated method to quantify the release of sugars from biomass. We selected several critical parameters (amount of substrate, amount of enzyme, duration of incubation and temperature) to fit with our specific use. The ability of this automated small-scale assay to discriminate among different enzymatic activities was validated using a set of commercial enzyme cocktails. Using an automatic microplate sealer, we solved three main problems generally encountered during the set-up of methods for measuring the sugar-releasing activity of plant cell wall-degrading enzymes: throughput, automation, and evaporation losses. Our platform can autonomously process 120 triplicate wheat-straw samples per day. This method can potentially be used with any other insoluble substrates. A video illustrating the method can be seen at <http://www.youtube.com/watch?v=NFg6TxjuMWU> (NAVARRO et al., 2010). This automated method allowed us to

screen the fungal biodiversity (fungal secretomes and fungal purified enzymes) in order to supplement the *T. reesei* commercial cocktails.

Supplementation of *T. reesei* enzymatic cocktail with fungal secretomes

During the last decade, fungal genome sequencing initiatives have yielded abundant information on the genes that are putatively involved in lignocellulose degradation. At present, additional experimental studies are essential to provide insights into the fungal secreted enzymatic pools involved in lignocellulose degradation. Hydrolysis of plant biomass requires the production of many different enzymes, which is regulated by the type and complexity of the plant material used as an inducer for the fungal cultures. For instance, it is well known that *Aspergillus* secretomes are strongly tied to the culture conditions and the nutrient sources available. We have thus performed a wide analysis of 20 filamentous fungi for which genomic data are available to investigate their biomass-hydrolysis potential (COUTURIER et al., 2012). To assess the sugar-cleaving capabilities of all of the fungal secretomes, their main glycoside-hydrolase activities were quantified using a microplate assay that contained para-nitrophenyl (pNP)-sugars and complex polysaccharides as substrates. Each secretome, diafiltered and concentrated was also tested for its ability to release sugars from micronized wheat straw, taking advantage of the recently developed automated saccharification method (NAVARRO et al., 2010). At the saccharification plateau, each secretome was tested alone and in combination with *T. reesei* CL847 enzyme cocktail. Most of the fungal secretomes tested individually supplemented the industrial *T. reesei* enzymatic cocktail. Unexpectedly, the most striking effect was obtained with the phytopathogen *Ustilago maydis* that improved the release of total sugars by 57% and of glucose by 22%. Proteomic analyses of the best-performing secretomes indicated a specific enzymatic mechanism of *U. maydis* that is likely to involve oxido-reductases and hemicellulases (COUTURIER et al., 2012). Additional investigation of the phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides* also revealed a high number of hemicellulases and pectinases of interest in

its secretome (Ravalason et al., 2012). Using these approaches, we provided insights into the lignocellulose-degradation mechanisms of filamentous fungi and we identified a number of enzymes of interest to further improve the industrial lignocellulose bioconversion process.

Supplementation of *T. reesei* enzymatic cocktail with fungal enzymes identified using comparative genomics

To improve the enzymatic hydrolysis (saccharification) of lignocellulosic biomass by *T. reesei*, a set of genes encoding putative polysaccharide-degrading enzymes were selected from the coprophilic fungus *Podospira anserina* using comparative genomics. Among ascomycetes, the genome of *P. anserina* has revealed the potential of this coprophilic fungus to hydrolyze recalcitrant lignocellulosic residues. It contains a significantly higher number of putative cellulases and xylanases compared to *A. niger*, *A. nidulans* and *A. oryzae*, reflected by its growth profile that is better than *Aspergilli* species on cellulose and xylan. These observations fit well with the natural biotope of *P. anserina*, which is a late colonizer of herbivore dung where lignocellulose is the major organic component left. To our knowledge, none of the numerous putative glycoside hydrolases from different CAZy families encoded by the *P. anserina* genome have been characterized to date. Five hemicellulase-encoding genes, i.e., PaMan5A and PaMan26A mannanases, PaXyn11A xylanase, PaAbf51A and PaAbf62A arabinofuranosidases, were expressed as secreted functional proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Although PaMan5A and PaMan26A displayed similar specificities towards a range of mannan substrates, they differed in terms of end products suggesting differences in substrate binding. PaXyn11A harbouring a C-terminal CBM1 module efficiently degraded wheat arabinoxylan releasing mainly xylobiose as end product. PaAbf51A and PaAbf62A arabinose-debranching enzymes exhibited wide diversity in terms of substrate specificities. Further investigation of each *P. anserina* auxiliary enzyme contribution to the saccharification of wheat straw and spruce demonstrated that the endo-acting hemicellulases (PaXyn11A, PaMan5A and PaMan26A) efficiently individually

complemented the secretome of the industrial *T. reesei* CL847 strain and improved significantly the release of reducing sugars and glucose upon hydrolysis of micronized wheat straw and spruce.

Conclusion

The discovery of fungal enzymes through the exploration of microbial biodiversity is essential to efficiently breakdown lignocellulosic biomass for the production of biofuels and other high-value products. Tailor-made enzymatic cocktails need to be developed according to the lignocellulosic structure of each type of biomass for optimal hydrolysis. Future studies of the synergies between hydrolytic enzymes and oxido-reductases are necessary to give additional insights into the filamentous fungi enzymatic machineries.

Acknowledgements

This study was funded by the French National Research Agency (ANR, program E-TRICEL ANR-07-BIOE-006).

References

COUTURIER, M; HAON, M; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; LESAGE-MEESSEN, L.; BERRIN, J. G. *Podospira anserina* hemicellulases potentiate the *Trichoderma reesei* secretome for saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 1, p. 237-246, 2011.

COUTURIER, M.; NAVARRO, D.; OLIVÉ, C.; CHEVRET, D.; HAON, M.; FAVEL, A.; LESAGE-MEESSEN, L.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 57, 2012.

NAVARRO, D.; COUTURIER, M.; DA SILVA, G. G.; BERRIN, J. G.; ROUAU, X.; ASTHER, M.; BIGNON, C. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, p. 58, 2010.

RAVALASON, H.; GRISEL, S.; CHEVRET, D.; FAVEL, A.; BERRIN, J. G.; SIGOILLOT, J. C.; HERPOËL-GIMBERT, I. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, 2012. In press.

SILVA, G. G.; COUTURIER, M.; BERRIN, J. G.; BULÉON, A.; ROUAU, X. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, n. 1, p. 192-200, 2012.

O papel dos fungos e dos actinomicetos na produção de etanol de biomassa lignocelulósica

Leda Maria Fortes Gottschalk

Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Elba Pinto da Silva Bon

A biomassa lignocelulósica, a maior fonte de energia renovável disponível no planeta, é o principal constituinte da parede vegetal das células vegetais. Os principais componentes desse material são as macromoléculas celulose (38-50%), que é um polissacarídeo linear, a hemicelulose (23-32%), um polissacarídeo ramificado, e a lignina (15-30%), uma macromolécula aromática com estrutura tridimensional. Estes três componentes, organizados em estruturas supramoleculares bem definidas conferem à parede celular as características de alta resistência à biodegradação (SIERRA et al., 2008). A complexidade e recalcitrância da estrutura da biomassa são aumentadas pela presença de derivados do ácido cinâmico, como os ácidos ferúlico e cumárico, que são covalentemente ligados aos polissacarídeos (THIBAUT et al., 1998). O ácido ferúlico também é responsável pelas ligações covalentes entre a hemicelulose e a lignina influenciando as propriedades de extensibilidade, plasticidade e digestibilidade da biomassa (LYND et al., 2002). A completa degradação da biomassa requer um conjunto de enzimas com diferentes atividades, tais como celulases, hemicelulases, ligninases,

esterases e outras (BEG et al., 2001). Portanto, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, que requer a desestruturação da mesma, depende de microrganismos capazes de produzir enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e acessórias com altos rendimentos.

As celulasas, conjunto de enzimas que degradam a celulose, são classificadas em três grupos: as endoglucanases (EG) (EC 3.2.1.4) que clivam internamente ligações glicosídicas β , 1-4 na fibra celulósica; as exoglucanases (CBH) (EC 3.2.1.91) que atuam progressivamente nas extremidades redutoras e não-redutoras da celulose liberando pequenos oligossacarídeos de celulose e principalmente celobiose; e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) que degradam a celobiose (dímero de glicose) até a glicose (LYND et al, 2002). Individualmente, uma única enzima do complexo celulolítico não é capaz de hidrolisar completamente a celulose a glicose, sendo necessária a ação sinérgica do complexo celulolítico (BÉGUIN & AUBERT, 1994). Na natureza os fungos desempenham papel central na degradação da biomassa vegetal (BRINK; DE VRIES, 2012).

Os fungos e a degradação da biomassa lignocelulósica

Os fungos filamentosos são considerados grandes degradadores de biomassa. Entre esses microrganismos destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* (MANDELS; STERNBERG, 1976; MARGEOT et al., 2009) que são os principais produtores comerciais das celulasas. O fungo *T. viride* (renomeado de *T. reesei*) foi isolado durante a Segunda Guerra Mundial (EVELEIGH et al., 1998), e a partir de então vários estudos de melhoramento genético resultaram na seleção de mutantes hipercelulolíticos. O mutante *Trichoderma reesei* RUT C30 é considerado um dos mais poderosos e melhor caracterizado, sendo referência entre os grandes produtores de celulase (LE CROM et al., 2009). Já foram identificadas dez celulasas no genoma do *T. reesei*,

sendo oito endoglucanases e duas celobiohidrolases (KUBICEK et al., 2009; FOREMAN et al., 2003), das quais as principais, CBHI, CBHII, EGI e EG II, são normalmente secretadas em quantidades notáveis por este fungo (FOREMAN et al., 2003; MARKOV et al., 2005). Quase todas as celulases têm uma estrutura de dois módulos, ou seja, consistem de um módulo catalítico e um módulo de ligação à celulose (CBM). As celulases que possuem CBM apresentam atividade muito maior em celulose cristalina do que aquelas que não possuem este módulo (GUSAKOV et al., 2007). Também já foram identificadas 12 β -glucosidases no genoma *T. reesei*, sendo a maioria intracelular (FOREMAN et al., 2003). As estirpes mutantes deste fungo têm sido geralmente caracterizadas por baixa secreção de β -glucosidase (NIEVES et al., 1998). Assim, as preparações enzimáticas de *T. reesei* devem ser complementadas com a adição de β -glucosidase para sacarificação mais eficiente dos substratos celulósicos (MERINO; CHERRY, 2007; NIEVES et al., 1998). Atualmente, preparações comerciais de celulase das principais empresas produtoras de enzimas, com estirpes geneticamente modificadas de *T. reesei*, têm apresentado elevada atividade de β -glucosidase, além de maior atividade específica e termoestabilidade (WILSON, 2009; NAKAMURA et al., 2008).

Além do *Trichoderma*, outros fungos têm demonstrado a capacidade de produzir complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades sendo considerados promissores para produção de biocombustíveis de segunda geração (GUSAKOV, 2011).

Outro fungo muito estudado para a produção industrial de enzimas pertence ao gênero *Aspergillus*. Apesar deste fungo apresentar no genoma uma grande variedade de genes que codificam para endoglucanases e celobiohidrolases, o mesmo não foi considerado um substituto para o *T. reesei*. A maioria das pesquisas com *Aspergillus* tem avaliado o potencial para a produção de enzimas hemicelulolíticas, pectinolíticas e também de β -glucosidase e outras enzimas acessórias, tais como xilanases, xiloglucanases, feruloil esterases e α -L-arabinofuranosidases importantes para a completa

degradação da biomassa (GODFREY; WEST, 1996; BERLIN et al., 2005; DE VRIES; VISSER, 2001; GOTTSCHALK et al., 2010).

Várias espécies de fungos do gênero *Penicillium* tem também merecido atenção, pelo bom desempenho de preparações de celulases por êle produzidas (SKOMAROVSKY et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SINGH et al., 2009; DE CASTRO et al., 2010), sendo a alta atividade de β -glicosidase uma das principais vantagens das espécies *Penicillium* em relação ao *T. reesei*. Além disso, outra razão para o desempenho superior desses fungos parece ser a elevada atividade específica das celobiohidrolases (CBHI). Adicionalmente, a CBHI de *Penicillium* é menos inibida pela celobiose quando comparada com a CBHI de *Trichoderma*. A razão para a insensibilidade relativa de CBHI ao produto de inibição parece dever-se à configuração mais aberta do seu sítio ativo (BHIRI et al., 2010).

A lignina é um dos constituintes majoritários da biomassa vegetal e desempenha papel negativo na hidrólise enzimática da madeira e resíduos agrícolas pela barreira natural que ela representa, encobrendo as fibras de celulose, e também à ligação das enzimas celulolíticas a essa macromolécula (BERLIN et al., 2005). Na hidrólise de materiais lignocelulósicos, as celulases de *Penicillium* têm a vantagem adicional de apresentarem afinidade reduzida pela lignina, sendo também menos suscetíveis à inibição por compostos derivados de lignina (BERLIN et al., 2006).

O fungo *Acremonium cellulolyticus* pode tornar-se uma alternativa potencial para o *T. reesei*. Estudos sugerem que o primeiro produz celulases com altos rendimentos e que as enzimas do *A. cellulolyticus* são também menos sensíveis a inibidores, tais como a lignina (IKEDA et al., 2007; FUJII et al., 2009).

Outro fungo, o *Chrysosporium lucknowense*, também vem demonstrado desempenho hidrolítico da celulose comparável com preparações de linhagens geneticamente modificadas de *T. reesei*. Aparentemente o genoma de *C. lucknowense* é mais rico em um

número total de celulasas e hemicelulasas do que é o genoma de *T. reesei* (GUSAKOV et al., 2007; HINZ et al., 2009).

O fungo *Humicola insolens* é também um produtor industrial de celulasas porém as suas enzimas celulolíticas têm sido utilizadas para outras aplicações, tais como na indústria têxtil, de detergentes e na fabricação de papel, com um rendimento de 50% na degradação da celulose cristalina (SCHÜLEIN, 1997; CAPARROS et al., 2012).

Os esforços para encontrar novos microrganismos produtores de celulasas e também de novas enzimas vêm resultando em misturas enzimáticas cada vez mais completas, mais ativas e com maior estabilidade para a produção de bioetanol. Muitos estudos tem foco na enzima chave para a degradação da celulose cristalina. Ao estimar o potencial do fungo produtor é necessário levar em conta não só a eficiência dos sistemas multienzimáticos secretados na sacarificação de substratos lignocelulósicos (por unidade de atividade de celulase ou por mg de proteína), mas também outros parâmetros importantes, tais como produtividade da cepa, concentração de proteína no final da fermentação e o custo de produção (GUSAKOV, 2011; BRINK; De VRIES, 2012).

Os actinomicetos e a degradação da biomassa lignocelulósica

Os actinomicetos, que são bactérias filamentosas Gram positivas, também são produtores de enzimas degradadoras de lignocelulose. Apesar de não serem tão eficientes quanto os fungos, podem ser promissores quando se pensa nas características das enzimas por eles produzidas, incluindo valores de pH e temperatura, na possibilidade de otimização de produção, na facilidade de produção em substratos de baixo custo, bem como, também, na possibilidade de clonagem dos genes de interesse.

Existem poucos trabalhos na literatura relatando a produção de celulasas e xilanases por actinomicetos, principalmente quando se trata do aproveitamento de resíduos agro-industriais. Assim sendo, surgiu o interesse de nosso grupo de pesquisa no isolamento de actinomicetos de solos e ambientes brasileiros, capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas a partir de resíduos de baixo custo, visando à produção de etanol de segunda geração. A utilização de solos tropicais brasileiros apresenta uma vantagem adicional, visto serem solos pouco explorados, com chances de descoberta de novas espécies, e com possibilidade de novas características.

As primeiras estirpes promissoras foram isoladas de um solo da mata atlântica, o *Streptomyces* sp M7A e o M23 (SEMÊDO et al., 2001). As atividades de endocelulase e exocelulase foram determinadas utilizando-se um meio de cultura contendo celulose microcristalina juntamente com outros nutrientes ricos tais como extrato de levedura e proteose-peptona (SEMÊDO et al., 2000). A estirpe M7A foi identificada como uma espécie nova, *Streptomyces drozdowiczii*, (SEMÊDO et al., 2004), e posteriormente a produção de celulase também foi testada utilizando-se diversas fontes de carbono (C) e nitrogênio (N). Carboximetilcelulose (CMC), um produto comercial barato, obtido de cana de açúcar, e outros resíduos de baixo custo tais como farelo de trigo e DDG, foram testados como fonte de C, enquanto o extrato de levedura e a milhocina foram testados como fonte de N (LIMA et al., 2005). A milhocina é um subproduto do processamento do milho, e corresponde a água de embebedimento e lavagem dos grãos durante o fracionamento para a obtenção de amido e óleo. O sobrenadante obtido com o meio contendo extrato de levedura e CMC resultou nas maiores atividades de CMCase, porém, os outros meios testados usando os resíduos mais baratos, especialmente aqueles com milhocina como principal fonte de N foram promissores. Esse resultado foi bastante interessante sob o ponto de vista econômico, já que a milhocina foi capaz de substituir o extrato de levedura eficientemente.

Em outro procedimento, foi isolada de um solo sob vegetação de cerrado a estirpe AMT-3, identificada como *Streptomyces malaysiensis*. Essa estirpe se mostrou promissora inicialmente para a produção de endoxilanase em meio contendo xilana larchwood, extrato de levedura e triptona (NASCIMENTO et al., 2003). Mais tarde essa mesma estirpe foi testada em meio mineral contendo farelo de trigo, germe de trigo, drecche cervejeiro e sabugo de milho. Neste caso a atividade de endoxilanase foi bem mais baixa, porém ainda assim expressiva, considerando-se a natureza dos substratos utilizados (NASCIMENTO et al., 2002). A mesma estirpe também se mostrou excelente produtora de celulase quando crescida em solução mineral contendo o drecche e a milhocina como únicos nutrientes orgânicos (NASCIMENTO et al., 2009).

Ainda visando à produção de celulasas utilizando substratos de baixo custo, foi feito um isolamento em solo de canavial, no nordeste brasileiro, com a seleção da estirpe *Streptomyces viridobrunneus SCPE-O* (DA VINHA et al., 2011). Por meio de um planejamento fatorial foi verificado que o meio contendo farelo de trigo 2% e milhocina 0,19% conduziu à melhor produção de CMCase, porém o uso de bagaço de cana como substrato também foi vantajoso. Quando se pensa em aplicações biotecnológicas para as celulasas, a caracterização das mesmas deve ser considerada, especialmente o perfil de pH e temperatura, a termoestabilidade e a influência de íons metálicos. Em geral, as celulasas e xilanasas produzidas pelas actinobactérias isoladas de solos brasileiros aqui descritas apresentam atividade máxima entre 40 e 60°C, porém ainda são parcialmente ativas mesmo a 70°C (NASCIMENTO et al., 2002; LIMA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2009; DA VINHA et al., 2011), podendo suportar estas temperaturas por um certo período de tempo. As endoglucanases de *S. drozdowiczii*, por exemplo, são 100% ativas por 1 hora a 50°C, mantendo 40% de atividade mesmo após 2 horas nessa temperatura (LIMA et al., 2005). Estas enzimas também são relativamente ativas numa ampla faixa de pH, que varia de 2 a 10, com ótimos na faixa ácida (pH de 4, 5 ou 6). Elas também toleram

vários íons metálicos, porém o Fe, o Mn e o Cu são geralmente inibitórios para a atividade celulolítica, assim como o são para várias outras enzimas produzidas por diferentes microrganismos. Porém alguns outros íons podem ser muito úteis, aumentando a atividade enzimática em até duas ou mais vezes, como é o caso do Ba^{+2} e Na^{+1} para a endoglucanases de *S. drozdowiczii* (LIMA et al., 2005).

Em conclusão, os solos tropicais brasileiros são um ambiente rico para a procura de novas estirpes de actinomicetos com atividade enzimática de importância biotecnológica. Em especial a produção de enzimas degradadoras de lignocelulose, que podem ser úteis na produção de bioetanol. Apesar dos fungos serem considerados melhores produtores de celulasas do que as bactérias, os resultados aqui obtidos com essas bactérias tropicais mostraram a importância das mesmas. As estirpes foram capazes de produzir enzimas degradadoras de lignocelulose quando crescidas em substratos de baixo custo, com características que atingem os requisitos necessários para aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de bioetanol de segunda geração.

Referências

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3-4, p. 326-38., 2001.

BÉGUIN, P. E; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 25-58., 1994.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, V.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 175-184, 2005.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 198-209, 2006.

BHIRI, F.; GARGOURI, A.; BEN ALI, M.; BELGHITH, H.; BLIBECH, M.; CHAABOUNI, S. E. Molecular cloning, gene expression analysis and structural modeling of the cellobiohydrolase I from *Penicillium occitanis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 2, p. 74–81, 2010.

BRINK, J. V. D.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 6, p. 1477-1492, 2011.

CAPARROS, C.; LANT, N.; SMETS, J.; CAVACO-PAULO, A. Effects of adsorption properties and mechanical agitation of two detergent cellulases towards cotton cellulose. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 2, p. 260-271, 2012.

DA VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; MACRAE, A.; BON, E. P. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 164, n. 3, p. 256-267, 2011.

DE CASTRO, A. M.; DE CARVALHO, M. L. D.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 37, n. 2, p. 151-158, 2010.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microb. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, p. 497–522, 2001.

EVELEIGH, D.; MANDELS, M.; REESE, E. T. Structure, biochemistry, genetics and applications. In: CLAEYSSSENS, M.; NERINCKX, W.; PIENS, K., (Ed.). **Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms**. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, 1998. p. xi–xiii.

FOREMAN, P. K.; BROWN, D.; DANKMEYER, L.; DEAN, R.; DIENER, S.; DUNN-COLEMAN, N. S.; GOEDEGEBUUR, F.; HOUFEK, T. D.; ENGLAND, G. J.; KELLEY, A. S.; MEERMAN, H. J.; MITCHELL, T.; MITCHINSON, C.; OLIVARES, H. A.; TEUNISSEN, P. J.; YAO, J.; WARD, M. Transcriptional regulation of biomassdegrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 34, p. 31988-31997, 2003.

FUJII, T.; FANG, X.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; SAWAYAMA, S. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, n. 1, p. 24, 2009.

GODFREY, T.; WEST, S. (Ed.) **Industrial enzymology**. 2nd ed. [London]: Macmillan Press, 1996.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GUSAKOV, A. V.; SALANOVICH, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A. P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 97, n. 5, p. 1028-1038, 2007.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in biotechnology**, London, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

HINZ, S. W. A.; POUVREAU, L.; JOOSTEN, R.; BARTELS, J.; JONATHAN, M. C.; WERY, J.; SCHOLS, H. A. Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1. **Journal of Cereal Science**, London, v. 50, n. 3, p. 318-323, 2009.

IKEDA, Y.; HAYASHI, H.; OKUDA, N.; PARK, E. Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 2, p. 333-338, 2007.

KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 1, n. 2, p. 19, 2009.

LE CROM, S.; SCHACKWITZ, W.; PENNACCHIO, L.; MAGNUSON, J. K.; CULLEY, D. E.; COLLETT, J. R.; MARTIN, J.; DRUZHININA, I. S.; MATHIS, H.; MONOT, F.; SEIBOTH, B.; CHERRY, B.; REY, M.; BERKA, R.; KUBICEK, C. P.; BAKER, S. E.; MARGEOT, A. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 106, n. 38, p. 16151-16156, 2009.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by-products and tests for biotechnological application. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 37, p. 272-277, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of fermentation technology**, Osaka, v. 54, n. 4, p. 267-286, 1976.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

MARKOV, A. V.; KONDRATYEVA, E. G.; OKUNEV, O. N.; BEKKAREVICH, A. O.; SINITSYN, A. P. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 6, p. 657-663, 2005.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 5, p. 1417-1424, 2007.

MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 95-120, 2007.

NAKAMURA, I.; MAKINO, A.; SUGIYAMA, J.; OHMAE, M.; KIMURA, S. Enzymatic activities of novel mutant endoglucanases carrying sequential active sites. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 226-231, 2008.

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA, J. R. N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 5, p. 529-535, 2009.

NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Production and partial characterization of xylanase from *Streptomyces* sp strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 4, p. 549-555, 2002.

NASCIMENTO, R. P.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GÍRIO, F. M.; BON, E. P. S.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SACRAMENTO, D. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. A novel strain of *Streptomyces malyaisiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-beta-1,4-xylanase tirtres. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 879-881, 2003.

NIEVES, R. A.; EHRMAN, C. I.; ADNEY, W. S.; ELANDER, R. T.; HIMMEL, M. E. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 14, n. 2, p. 301-304, 1998.

SCHÜLEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 57, n. 1-3, p. 71-81, 1997.

SEMÊDO, L. T. A. S.; LINHARES, A. A.; GOMES, R. C.; MANFIO, G. P.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, n. 4, p. 291-299, 2001.

SEMÊDO, L. T. A. S.; GOMES, R. C.; BON, E. P. S.; SOARES, R. M. A.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strain isolated from a forest soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 267-276, 2000.

SEMÊDO, L.T.; GOMES, R. C.; LINHARES, A. A.; DUARTE, G. F.; NASCIMENTO, R. P.; ROSADO, A. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.; SILVA, K. R.; ALVIANO, C. S.; MANFIO, G. P.; SOARES, R. M.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. *Streptomyces drozdowiczii* sp. nov., a novel cellulolytic streptomycete from soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, pt 4, p. 1323-1328, 2004.

SIERRA, R.; SMITH, A.; GRANDA, C.; HOLTZAPPLE, M. T. Producing fuels and chemicals from lignocellulosic biomass. **SBE Special Section - Biofuels**, p. S10-S18, 2008.

SINGH, R.; VARMA, A. J.; LAXMAN, R. S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium cellulases*: comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 24, p. 6679-6681, 2009.

SKOMAROVSKY, A. A.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SOLOV'EVA, I. V.; BUBNOVA, T. V.; KONDRAT'EVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n. 2, p. 182-184, 2005.

THIBAUT, T.; MICARD, V.; RENARD, C.; ASTHER, M.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; FAULDS, C.; KROON, P.; WILLIAMSON, G.; DUARTE, J.; DUARTE, J. C.; CECCALDI, B. C.; TUOHY, M.; COUTEAU, D.; VAN HULLE, S.; HELDT-HANSEN, H.-P. Fungal bioconversion of agricultural by products to vanillin. **LWT - Food Science and Technology**, Geneve, v. 31, p. 530-536, 1998.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current opinion in biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 295-299. 2009.

Engineering Enzymes for Lignocellulose Depolymerization

Richard J. Ward

Abstract

Specificity and stability are important properties for enzymes of biotechnological interest, and multiple structural factors contributed to determine their catalytic functions. A current focus is the study of the relationship between protein three-dimensional structure and function, and several strategies have been used successfully for the engineering of the catalytic properties of enzymes. 1) Rational design that combines analysis of three-dimensional structures of xylanases and molecular dynamics simulation methods with site-directed mutagenesis to modify the surface of the enzyme, 2) directed evolution in which thermostable enzymes are selected from libraries of random mutants, and 3) engineering enzymes to create polypeptide chimerae with multiple catalytic activities. Here we present these strategies, and briefly present results that demonstrate how they may be applied to improve enzymes of industrial interest.

Introduction

Biorefinary aims to substitute compounds currently obtained from the petrochemical industry by those derived from renewable resources. Lignocellulosic biomass derived from plants is a highly abundant, inexpensive and environmentally friendly resource that has significant potential for the sustainable production of biofuels such as ethanol. However, the plant cell wall is a stable composite material and the manufacture of ethanol and other products from this material is currently economically impractical. A promising option involves the enzymatic depolymerization of plant lignocellulose, which requires enzymes with novel catalytic properties.

The plant cell wall is a complex composite matrix constituted by cellulose, hemicellulose and lignin that is highly recalcitrant to depolymerization. The degradation of plant cell wall polymers is an essential prerequisite for the use of vegetal biomass in production of second generation ethanol and biorefinery, and enzyme mixtures that include hydrolases and ligninases show promise for applications in biomass decomposition. The increasing use of enzymes in industrial processes requires technological innovation to improve catalytic performance and thereby reduce costs, and here several strategies are presented that have proven useful to meet the challenge of enzyme engineering for improved catalytic performance.

Rational enzyme design

A cornerstone of modern structural biology is the appreciation that the biochemical function of a protein is determined by its three-dimensional structure. The position and orientation of amino acids side-chains in a protein can be experimentally determined by x-ray crystallography or nuclear magnetic resonance, and detailed analysis of these data can give fundamental insights such as the molecular bases for substrate

recognition, catalytic mechanism and molecular flexibility that are essential for enzyme function. More recently, *in silico* molecular dynamics simulations have provided further information, not only with respect to polypeptide motions but also to intra- and intermolecular binding energies and protein/solvent interactions (VIEIRA et al., 2012).

A combination of molecular dynamics simulations and site-directed mutagenesis can be used to design mutants with improved catalytic characteristics. For example, a comparative molecular dynamics study of mesostable and thermostable GH11 endo- β -1,4-xylanases from *Bacillus circulans* (mesostable) and *Thermomyces lanuginosus* (thermostable) revealed a consistently lower energy around charged surface residues in the thermostable enzyme (Vieira & Degreve (2009)). Substitutions of polar uncharged amino acid residues in a mesostable endo- β -1,4-xylanase by charged side-chains in a subset of these positions improved the thermostability of the mesostable enzyme (ALPONTI; WARD, 2010), confirming the molecular dynamics prediction.

Directed evolution for improved enzyme thermostability

A powerful addition to the techniques available for enzyme engineering is based on “*in vitro*” directed evolution, a technology which mimics the process of random mutation and natural selection that drives Darwinian evolution in nature. As shown in Figure 1A, the technique is based on the production of a variable population by the introduction of random mutations in the amino acids sequence of the enzymes using error prone PCR (epPCR). Subsequently, those variants in the population of mutants that display properties that are of interest are selected and submitted to repeated cycles of random mutagenesis and selection in order to accumulate mutations that enhance the function of the enzyme. After one or

more rounds of epPCR/selection, the accumulated mutations from individual variants can be recombined (so-called “DNA-shuffling”), and a further round of selection can be used to identify the most favourable combination of mutants. The directed evolution strategy has been successfully applied to a wide range of protein engineering projects, and several reviews provide excellent overviews of the area (ARNOLD, 1996; ARNOLD et al., 2001, BLOOM; ARNOLD, 2009).

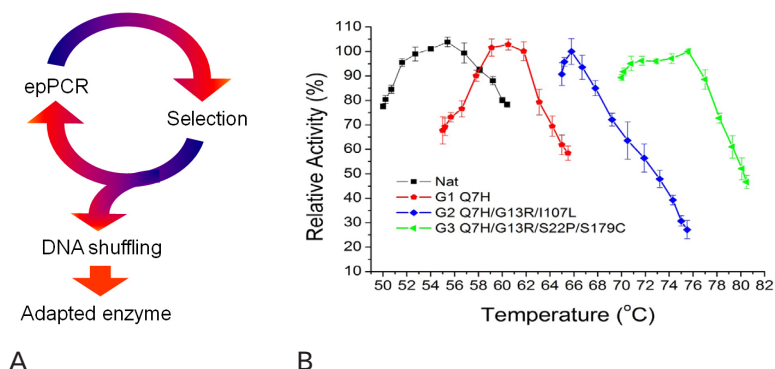


Figure 1. (A) Schematic diagram showing the key steps of a typical directed evolution experiment for protein engineering. See text for details. (B) Optimum temperature of catalysis of a series of mutants of the xylanase A from *Bacillus subtilis* created by two rounds of epPCR (G1 and G2) followed by DNA shuffling (G3). Figure 1B adapted from RULLER et al. (2008).

Directed evolution has been successfully applied to increase the catalytic temperature optimum. A high efficiency expression system for protein secretion in *E. coli* (RULLER et al., 2006) together with the techniques of error prone PCR (epPCR) and DNA shuffling have been used to generate and screen random mutant libraries of the xylanase A, a GH11 endo- α -1,4-xylanases from *Bacillus subtilis*. After two generations of epPCR and one generation of DNA shuffling, 23 mutants of the xylanase A were identified which present thermostable characteristics. Figure 1B presents the temperature-activity curves for the best mutant from each round during the directed evolution, and shows that successive generations

progressively increase the optimum catalytic temperature of the enzyme. The most thermostable xylanase from the third, or G3, generation accumulated four mutations and presented a catalytic temperature optimum of 75°C, an increase of 20°C in relation to the native enzyme (RULLER et al, 2008). These techniques of directed evolution should be widely applicable to selected hydrolytic enzymes to improve their catalytic properties in the production of bioethanol.

Multifunctional enzyme chimeras

The degradation of lignocellulosic material derived from plant biomass to fermentable sugars and other industrially important protomers is a crucial step in biorefinary, and achieving this requires the development of enzymes with novel catalytic properties. Bifunctional enzymes combining two separate parental enzymes to create a single polypeptide with both catalytic activities may be constructed either by simple “end-to-end” fusion of parental enzymes, or by “insertion” fusion where one enzyme is inserted within the surface loop of the other (NIXON et al., 1998). Analysis of structural models indicates that “insertion” constructs have advantages over “end-to-end” fusions in that that they avoid potential interference between the active sites of the fused enzymes, create separate and functional domains that mimic natural protein structures, and maintain the stability of the final chimera.

In order to test these ideas, a bifunctional enzyme combining a xylanase (EC 3.2.1.8) with a laccase (EC 1.10.3.2) has been created. A chimeric protein that fused the *Bacillus subtilis* laccase (CotA) with the *B. subtilis* α -1,4-xylanohydrolase obtained from directed evolution (XylA), were designed in such a manner that the XylA enzyme was inserted within the surface loop region of the laccase molecule (RIBEIRO et al., 2012).

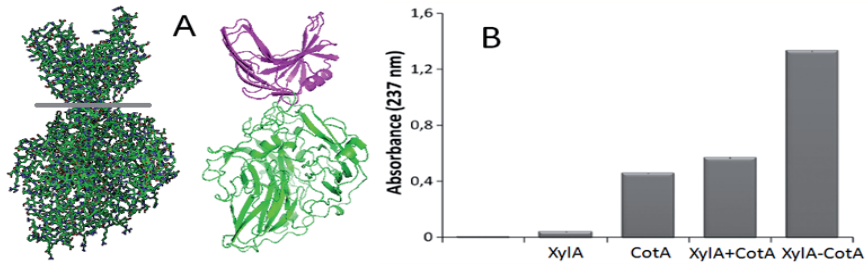


Figure 2. (A) Line and ribbon representations of a model of the three-dimensional structures of the XylA-CotA chimeric enzyme after molecular dynamics simulations. The grey line representation highlights the formation of inter-domain interface, and the ribbon diagram shows the catalytic domains where the CotA is coloured green, the XylA magenta. (B) Total reducing sugar released from sugar cane bagasse after 30 min incubation at 50°C with 20 mM of parental enzyme (XylA or CotA), an equimolar mix (10 mM total) Beg1 + CotA and 10 mM of the Beg1-CotA chimera. (Figure taken from RIBEIRO et al, 2011).

The DNA coding sequences of the parental enzymes (XylA and CotA) was fused to create the chimeric construct XylA-CotA (Figure 2A), and cloned into the pET28 vector to produce N-terminal polyhistidine fusions. All were expressed in *E. coli* BL21 and purified from cell lysates using Ni-affinity chromatography. Molecular dynamics simulations (MDS) of the chimeras indicated that at equilibrium, the catalytic domains of both fusion proteins show reduced flexibility. Furthermore, the secondary structures of the chimeric proteins present conformations similar to the individual parental enzymes. However, in the chimeric enzyme the two catalytic domains are in contact, forming an inter-domain interface (RIBEIRO et al., 2012).

Specific enzymatic assays demonstrated that the bifunctional enzyme demonstrate laccase/xylanase catalytic activities, in which the laccase activity of the chimera is significantly higher than in the parental enzyme. The increased laccase activity is likely to be a result of active site conformation changes due to the formation of the inter-domain interface. Using lignocellulosic substrates derived

from plant biomass, synergism was observed in the catalytic activities of the XylA-CotA chimera (Figure 2B), suggesting that rational design of chimeric enzymes is a promising strategy for the creation of enzymes for biorefinary applications (RIBEIRO et al., 2012).

Conclusions

The economically viable application of enzymes for the biorefinery of biomass requires suitable enzymes with high hydrolytic efficiency. Improvement in the catalytic performance of glycosyl hydrolases will greatly facilitate the industrial use of renewable lignocellulosic materials. The protein engineering strategies presented here will contribute to the development of high efficiency/ low-cost enzymes, which are suitable for inclusion in biocatalytic cocktails for application in a sustainable bioenergy and biorefinary economy.

References

- ALPONTI, J.S.; WARD, R. J. Estudo da termoestabilidade de uma endoxilanase da família G11 recombinante por meio de mutagenese sítio-dirigida. In: **ENZITEC 2010 - IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro, Anais, p. 55, 2010.
- ARNOLD, F. H. Directed evolution: creating biocatalysts for the future. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.
- ARNOLD, F. H.; WINTRODE, P. C.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 26, n. 2, p. 100-106, 2001.
- BLOOM, J. D.; ARNOLD, F. H. In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 1, p. 9995-10000, 2009.

NIXON, A. E.; OSTERMEIER, M.; BENKOVIC, S. J. Hybrid enzymes: manipulating enzyme design. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 6, p. 258-264, 1998.

RIBEIRO, L. F.; FURTADO, G. P.; LOURENZONI, M. R.; COSTA-FILHO, A. J.; SANTOS, C. R.; NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. A.; POLIZELI, M. DE L.; MURAKAMI, M.T.; WARD, R. J. Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 50, p. 43026-43038, 2011.

RULLER, R.; ROSA, J.C.; FAÇA, V.M.; GREENE, L.J.; WARD, R. J. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5 α under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 43, n. 1, p. 9-15, 2006.

RULLER, R.; DELIBERTO, L. A.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. Thermostable variants of the recombinant xylanase A from *Bacillus subtilis* 1A1 produced by directed evolution show reduced heat capacity changes. **Proteins**, New York, v. 70, n. 4, p. 1280-1293, 2008.

VIEIRA, D. S.; LOURENZONI, M. R.; FUZO, C. A.; WARD, RJ; DEGREVE, L. Structural Bioinformatics for Protein Engineering. In: EDDY C. A. (Org.). **Innovations in Biotechnology**. Rijeka: InTech - Open Access Publisher, 2012, p. 415-438.

VIEIRA, D. S.; DEGREVE, L. An insight into the thermostability of a pair of xylanases: the role of hydrogen bonds. **Molecular Physics**, Londres, v. 107, n. 1, p. 59-69, 2009.

Strategies to improve (hemi) cellulolytic enzyme production in *Trichoderma reesei*

Bernhard Seiboth

Summary

The ascomycete *Trichoderma reesei* is a paradigm for the commercial scale production of different cellulolytic and hemicellulolytic enzyme cocktails. Today, these enzyme mixtures are applied in the conversion of lignocellulosic plant biomass to simple sugars which can then be fermented to second generation biofuels or other biorefinery products. To make the saccharification process commercial viable various strategies are followed including the reduction of enzyme costs by increasing the catalytic activity, making enzymes thermotolerant or by eliminating enzyme deficiencies in the existing cocktails. A prerequisite is to design appropriate production hosts which are improved in enzyme expression and yield. In the following different genetic engineering strategies to modify regulatory and biochemical pathways controlling enzyme production are outlined.

Introduction

T. reesei and its different cellulolytic and hemicellulolytic enzymes are for a long time used in pulp, paper, food, feed or textile processing industries. Today, its improved enzyme cocktails are also applied to degrade different cellulosic and hemicellulosic plant materials to their monomers (mainly D-glucose, D-xylose and L-arabinose) which can then be fermented to different biofuels and other biorefinery products. Besides being an attractive source and producer for such enzymes, *T. reesei* is also used routinely as a host for recombinant protein production. The different strains are well adapted to fermenter cultivations and secrete vast amounts of enzymes not reached by other microorganisms. Although *T. reesei* is already the main industrial source for such enzymes and despite the fact that industrial strains produce more than 100 g/l of cellulases, additional efforts are needed to reduce costs and maximize yield and efficiency of the produced enzyme mixtures. Improvements in different fields will be necessary to make the process cost-effective. From a molecular biotechnologist view identification of novel enzymes, improvement of the physicochemical properties of the enzymes and the efficient production of these enzymes in appropriate host organisms are some of the main strategies. A key to the latter is to identify regulatory and metabolic networks which control the expression of the extracellular enzymes to design yield improved strains.

The availability of its genome sequence has boosted research on *T. reesei* (MARTINEZ et al., 2008). Surprisingly, the genome sequence of *T. reesei* QM6a revealed that the fungus possess only a rather small set of cellulases and hemicellulases in comparison to other plant biomass degrading fungi. This underscores our still poor understanding of the process of cellulose degradation. Today, high throughput tools are now available for systematic manipulation of *T. reesei* to produce a large set of regulatory or pathway mutants within a short time and systems biotechnological approaches including whole genome comparisons, transcriptomics or proteomics were

introduced to identify alterations that led to cellulase hyperproduction by classical mutagenesis (e.g. LE CROM et al., 2009).

Regulation of plant cell wall degradation and its engineering.

A key to improve the production of specific enzymes or a group of enzymes is to modulate their regulation on the transcriptional level by overexpression of activators or deactivation of repressors (reviewed in KUBICEK et al., 2009). Most of the enzymes for plant cell wall degradation including cellulases and hemicellulases are usually only formed adaptively in the presence of their substrates. Expression of genes encoding such CAZymes (Carbohydrate Active enZymes) is a tightly regulated process to minimize the energy loss for the fungus. The regulation of enzyme expression is controlled by two major control circuits i.e. general carbon catabolite repression (CCR) and specific induction. Most of the CAZymes necessary for the degradation of the different plant cell wall polymers are repressed by the presence of increased concentrations of fast metabolizable carbon sources including D-glucose, D-galactose, D-xylose or others that arise from the degradation of these polymers. These enzymes are usually also not expressed during growth on glucose even in the presence of an inducer. Consequently, one of the earliest attempts to improve cellulase production was to neutralize CCR. Classical mutagenesis combined with selection for 2-desoxyglucose resistance under inducing conditions has led to increased cellulase producers such as *T. reesei* RUT C30, RL-P37 and CL847, supporting the importance of CCR in cellulase formation. On the transcriptional level the key player is the carbon catabolite repressor CRE1. Numerous CAZymes are regulated by CRE1 in *T. reesei*. It is therefore not surprising that the analysis of RUT-C30 including its derivative CL847 identified a loss of a 2478-base pair fragment, which starts downstream of the region encoding the CRE1 zinc finger. Carbon catabolite derepression

by *cre1* deletion does not, however, lead to high cellulase production during cultivation on D-glucose or other carbon sources, indicating that cellulase hyperproduction is still inducer dependent. The obligatory presence of an inducer for high cellulase gene expression implies tight regulation of their promoters. Most of the cellulase genes are also regulated in a coordinated way, although the relative ratio of their expression may differ in mutants. At least three transcriptional activators including XYR1, ACE2 and the HAP2/3/5 complex, as well as the repressors ACE1 are involved in (hemi)cellulase regulation. XYR1 is clearly the major player in the transcriptional regulation of both cellulolytic and xylanolytic enzymes and its absence virtually eliminates their expression by all known inducers. Although necessary for both cellulase and xylanase induction it is not clear how XYR1 is able to selectively induce cellulases or xylanases. As a transcriptional activator XYR1 must receive respective signals from the different inducers but the exact mode of activation is not known today. Hypercellulolytic strains such as CL847 show an upregulation of *xyr1* transcription during growth on lactose compared to other improved cellulase producers. One of the highlights from the analysis of the genome sequence of *T. reesei* (MARTINEZ et al., 2008) was that its cellulase, hemicellulase and other CAZyme genes were to be located in several discrete clusters together with a number of genes for secondary metabolite. Some of these secondary metabolite clusters are regulated at the level of chromatin remodelling by the putative protein methyltransferase *LaeA* in *A. nidulans*. Because of the co-clustering of CAZymes with secondary metabolite synthesis genes in the *T. reesei* genome, we hypothesized that cellulase expression may be regulated by a *T. reesei* *LaeA* orthologue. Production of cellulases and other CAZymes is strongly reduced in the absence of *LAE1*, and dramatically increased when *LAE1* is overexpressed under a constitutive promoter. This shows that *LAE1* is essential for cellulase and hemicellulase formation and that it is a key to further improve their expression.

D-xylose and L-arabinose pathway engineering

In contrast to cellulose, many of the hemicellulose monomers can serve as inducers when applied at low concentrations. Within the last years we focused our research on the elucidation of pathways involved in the degradation of the two pentoses L-arabinose and D-xylose. The oxidoreductive catabolism of these two pentoses is unique for fungi and consists of NADPH dependent reductions followed by NAD⁺ dependent oxidations. The pathways for D-xylose and L-arabinose catabolism are interconnected and in *T. reesei* the first NADPH-dependent reduction of both L-arabinose and D-xylose is accomplished by the D-xylose reductase XYL1 because its absence results in significantly impaired growth on both pentoses. The xylitol dehydrogenase XDH1 is the second enzyme of D-xylose pathway and the first enzyme of the common part of the pathway with L-arabinose. L-arabinitol 4-dehydrogenase LAD1, the second enzyme in L-arabinose catabolism can partially compensate for its loss and only deletion of both *lad1* and *xdh1* in *T. reesei* fully impairs growth on D-xylose and xylitol. LAD1 is essential for L-arabinose and L-arabitol catabolism. Only recently, an NADPH-dependent L-xylulose reductase (LXR3) could be identified in *T. reesei*, whose deletion results in strongly reduced growth on L-arabinose and L-arabinitol. Phosphorylation of D-xylulose at C-5 is catalyzed by xylulokinase (SEIBOTH; METZ, 2011).

T. reesei contains five xylanases including 3 GH11 (XYN1, XYN2 and XYN5), one GH10 (XYN3) and at least one GH30 (XYN4). With the exception of XYN3 all are coordinately induced by D-xylose and L-arabinose. We have recently investigated the induction of expression of *xyn1*, *xyn2*, *xyn4* and *xyn5* by D-xylose and L-arabinose in mutants blocked in individual steps of the oxidoreductive pentose catabolic pathway and show that both D-xylose and L-arabinose induce xylanases but via different transmitters. Induction by both leads to a synergistic effect and increases xylanase expression. Mutants blocked in the steps after D-xylose and L-arabinitol lead to a massive

increase in expression of xyn1, xyn2, xyn4 and xyn5 (SEIBOTH; METZ, 2011). *T. reesei* also contains four α -L-arabinofuranosidase genes for the degradation of arabinan and arabinoxylans. All of these genes are expressed during growth on L-arabinose and L-arabinitol and strongly enhanced in a Δ lad1 strain lacking L-arabinitol dehydrogenase activity and severely impaired in an aldose reductase (Δ xyl1) strain.

References

KUBICEK, C. P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, p. 19, 2009.

LE CROM, S.; SCHACKWITZ, W.; PENNACCHIO, L.; MAGNUSON, J. K.; CULLEY, D. E.; COLLETT, J. R.; MARTIN, J.; DRUZHININA, I. S.; MATHIS, H.; MONOT, F.; SEIBOTH, B.; CHERRY, B.; REY, M.; BERKA, R.; KUBICEK, C. P.; BAKER, S. E.; MARGEOT, A. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 106, n. 38, p. 16151-16156, 2009.

MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; ARVAS, M.; BAKER, S. E.; CHAPMAN, J.; CHERTKOV, O.; COUTINHO, P. M.; CULLEN, D.; DANCHIN, E. G.; GRIGORIEV, I. V.; HARRIS, P.; JACKSON, M.; KUBICEK, C. P.; HAN, C. S.; HO, I.; LARRONDO, L. F.; DE LEON, A. L.; MAGNUSON, J. K.; MERINO, S.; MISRA, M.; NELSON, B.; PUTNAM, N.; ROBBERTSE, B.; SALAMOV, A. A.; SCHMOLL, M.; TERRY, A.; THAYER, N.; WESTERHOLM-PARVINEN, A.; SCHOCH, C. L.; YAO, J.; BARABOTE, R.; NELSON, M. A.; DETTER, C.; BRUCE, D.; KUSKE, C. R.; XIE, G.; RICHARDSON, P.; ROKHSAR, D. S.; LUCAS, S. M.; RUBIN, E. M.; DUNN-COLEMAN, N.; WARD, M.; BRETTIN, T. S. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature biotechnology**, New York, v. 26, n. 5, p. 553-560, 2008.

SEIBOTH, B.; METZ, B. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 89, n. 6, p. 1665-1673, 2011.

Mecanismos de sensoriamiento de glicose em *Aspergillus nidulans*

Thaila Fernanda dos Reis

Gustavo Henrique Goldman

Introdução

A degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular de plantas (celulose, hemicelulose e pectinas) e a utilização dos componentes liberados como fonte de carbono é um processo regulado em fungos filamentosos quando esses crescem como fitopatógenos ou na presença de determinados substratos (TAMAYO-RAMOS et al., 2012). A glicose representa a mais importante fonte de carbono e energia para a maioria das células. Além de ser o principal nutriente, este açúcar regula vários aspectos do crescimento celular, metabolismo e desenvolvimento (ÖZCAN et al., 1999). Na presença de glicose, uma variedade de vias metabólicas é afetada, alterando metabólitos intermediários, cofatores e produtos finais dessas vias (ROLLAND et al., 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo modelo para células eucarióticas e tem sido usada frequentemente em estudos que buscam compreender as vias de sinalização que envolvem sensoriamiento e metabolismo de fontes de carbono, incluindo a glicose. Nesse sentido, é descrito que em leveduras a glicose extracelular é sensoriada por proteínas de membrana específicas, as quais ativam

uma gama de transportadores de glicose de alta ou baixa afinidade dependendo da concentração de glicose disponível (para revisão ROLLAND et al., 2001). Logo, os efeitos regulatórios induzidos por glicose são frequentes e variados em fungos, fazendo com que a glicose possa atuar reprimindo ou induzindo genes envolvidos no metabolismo de diferentes fontes de carbono. Contrastantemente, o estudo do sensoriamento e metabolismo da glicose em fungos filamentosos ainda apresenta grandes desafios. Dentre as lacunas a serem preenchidas a respeito dos mecanismos de reconhecimento e internalização da glicose extracelular, eventos como o sensoriamento da glicose bem como detalhes da regulação da repressão catabólica são processos ainda bastante obscuros em *Aspergillus*, por exemplo. Apesar da escassez de dados, alguns transportadores de açúcar foram preditos em fungos filamentosos por meio de análise *in silico* usufruindo-se da acessibilidade a bancos de sequências genômicas de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa* e *Trichoderma harzianum* (<http://www.Aspergillusgenome.org>, <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html> e DELGADO-JARANA et al., 2003). Dentre os genes preditos como transportadores de glicose, apenas poucos deles foram analisados e caracterizados funcionalmente em fungos filamentosos, como é o caso de MstE em *A. nidulans*, MstA em *A. niger*, RCO-3 e HGT-1 em *N. crassa* (FORMENT et al., 2006; JØRGENSEN et al., 2007; MADL et al., 1997; XIE et al., 2004).

A repressão catabólica em fungos filamentosos

Muitos organismos podem utilizar diferentes fontes de carbono para a obtenção de energia, entretanto a glicose é a fonte preferida. Desta forma, ainda que fontes alternativas de carbono estejam presentes, a glicose é utilizada preferencialmente por um mecanismo de regulação denominado repressão catabólica (para revisão, GANCEDO, 1998).

A presença de glicose pode afetar níveis enzimáticos que levam ao decréscimo na concentração de mRNA, diminuição da razão de transcrição ou ainda aumento na taxa de degradação da proteína (GANCEDO, 1998). O gene MIG1 é um importante repressor transcricional com domínio zinc-finger C2H2 envolvido na repressão por glicose em *S. cerevisiae* (NEHLIN; RONNE, 1990). Na presença de glicose, a expressão da proteína quinase Snf1 é reprimida o que leva à defosforilação de MIG1. Uma vez defosforilado, MIG1 localiza-se no núcleo, se liga a sequências promotoras e reprime a expressão de genes alvo como SUC2 promovendo a repressão catabólica (SCHULLER, 2003). Em contraste, quando a glicose é escassa, Snf1 é altamente expressa, fosforila Mig1 o qual desliga-se das regiões promotoras e a repressão catabólica não ocorre. A ativação de Snf1 regula a expressão de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono por meio da modulação da atividade de diversos fatores de transcrição. A ativação transcricional promovida por Snf1 ocorre por meio da mobilização de fatores de transcrição e remodelamento da estrutura da cromatina na região promotora dos genes-alvo (para revisão ZAMAN et al., 2008). Em *A. nidulans*, o possível homólogo de MIG1 é representado pelo CreA (AN6195). A ORF AN6195 apresenta 43% de identidade em relação à sequência codificadora de MIG1 de leveduras. Em *A. nidulans*, CreA é uma proteína de ligação ao DNA codificada pelo gene CreA e medeia a repressão promovida pela glicose (BAILEY; ARST, 1975; DOWZER; KELLY, 1991). Alguns experimentos demonstraram que o transporte de alta afinidade é catabolicamente reprimido em cepas selvagens de *A. nidulans* na presença de glicose. Entretanto, na cepa mutante de *A. nidulans* com perda da cópia funcional do gene CreA o processo de repressão catabólica não ocorre e os mutantes nulos para CreA não apresentam indução do transporte de baixa afinidade na presença de glicose (MACCABE et al., 2003).

Em leveduras, a via de sinalização que envolve o complexo da proteína quinase Snf1 é ativada pelo crescimento da levedura em fontes de carbono pouco ou não fermentáveis como sacarose, glicerol, etanol, entre outras. Na ausência de glicose, o Snf1 é ativado por três

diferentes quinases codificadas por SAK1, ELM1 e TOS3 que fosforilam o complexo Snf1 tornando-o ativo (NATH et al., 2003; HONG et al., 2003). As três quinases ativadoras de Snf1 demonstram similaridade no que diz respeito ao domínio catalítico e diferenças na região C-terminal (RUBENSTEIN et al., 2008). Estruturalmente, o complexo Snf1 é um heterotrímero composto de uma subunidade catalítica (Snf1), uma subunidade regulatória (Snf4) e uma das três subunidades β (GAL83, SIP1, and SIP2). Na ausência de glicose, a subunidade Snf4 se liga à Snf1 e libera sua autoinibição. A deleção de SNF1 ou SNF4 impede o crescimento em quaisquer outras fontes de carbono que não glicose. Durante o crescimento na presença de glicose, todo o complexo Snf1 é localizado no citoplasma. Quando a célula cresce em meio com depleção de glicose, o complexo contendo a subunidade Gal83 se realocaliza no núcleo, o complexo contendo Sip1 se realocaliza em vacúolos e o complexo contendo Sip2 permanece no citoplasma. A localização do complexo Snf1 dependente da subunidade sugere que essas subunidades não possuem sobreposição de função (VINCENT et al., 2001). O homólogo de Snf1 em *A. nidulans* é denominado SnfA (AN7695) sendo que Sfn1 e SfnA compartilham 51% de identidade de sequência. Baseado nas sequências de *S. cerevisiae*, alguns homólogos putativos para as quinases Sak1 e TOS3 também podem ser identificados por similaridade no genoma de *A. nidulans* (<http://www.Aspergillusgenome.org>). Nesse sentido, a ORF AN5728 representa o homólogo putativo de Sak1 em *A. nidulans* com 43% de identidade e, similarmente, a ORF AN8827 parece ser o homólogo putativo de TOS3 apresentando 31% de identidade (Tabela 1).

Os homólogos de SNF1 também tem sido caracterizados em fungos filamentosos. Para o fungo *Cochliobolus carbonum*, um patógeno do milho, o mutante de SNF1 (ccsnf1) demonstra diminuição do crescimento de 95 a 50% em meio de cultura contendo fontes de carbono complexas. Adicionalmente, quando o organismo é submetido a fontes de carbono simples o crescimento varia de acordo com o açúcar (TONUKARI et al., 2000). Ainda, quando comparado à cepa selvagem, o mutante Ccsnf1 é menos virulento em relação à

capacidade de causar doença no milho (TONUKARI et al., 2000). A deleção do homólogo de SNF1 no fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* (Fosnf1) resulta em uma cepa com diminuição da expressão de genes que codificam enzimas que degradam a parede celular (exopoligalacturonase- PGX1, endopoligalacturonase- PGN1 e pectato liase- PL) em condições não repressoras de crescimento (OSPINA-GIRALDO et al., 2003). O mutante ainda demonstra crescimento reduzido em fontes de carbono como arabinose, frutose, galactose, trealose, xilana e xilose e apresentou retardo na progressão da doença em *Arabidopsis thaliana* e *Brassica oleracea* em comparação as mesmas espécies infectadas com a cepa selvagem (OSPINA-GIRALDO et al., 2003). Finalmente, para o fungo filamentoso *Ustilago maydis*, a deleção do gene SNF1 originou a cepa mutante Δ snf1 (NADAL et al., 2010). Interessantemente, para este fungo o gene SNF1 não se mostrou importante para a utilização de fontes alternativas de carbono e a deleção desse gene não interferiu de maneira significativa na virulência do fungo. Adicionalmente, a cepa mutante Δ snf1 demonstrou diminuição da expressão de uma endoglucanase (um02523) e uma pectinase (um02510) quando crescida em meio de cultura isento de glicose e aumento da expressão relativa de dois genes de xilanase (um06350 e um03411) quando foi crescida na presença de glicose (NADAL et al., 2010).

Outra via de sinalização importante no sensoramento de glicose em leveduras é a via de Rgt1 a qual também associa-se à expressão de genes transportadores de glicose de acordo com a concentração de glicose disponível (MOSLEY et al., 2003). Basicamente, Rgt1 reprime a expressão dos transportadores de hexose em células crescendo na ausência de glicose e é degradado na presença desse carboidrato (POLISH et al., 2005). Essa função é dependente de dois co-repressores, Mth1 e Std1, os quais desempenham função mediante ativação de Snf3 e Rgt2 (ver próxima seção). Os co-repressores Std1 e Mth1 desempenham funções parcialmente redundantes uma vez que se ligam a um sítio comum de Rgt1, suprimindo a ativação transcricional e promovendo a ligação ao DNA (para revisão, ZAMAN

et al., 2008). A expressão de STD1 é regulada pela via de Rgt1 e é induzida em altas concentrações de glicose. Adicionalmente, a expressão de MTH1 é reprimida em concentrações elevadas de glicose pelo repressor Mig1 (para revisão, ZAMAN et al., 2008). No fungo filamentoso *A. nidulans*, alguns homólogos dos genes envolvidos na via de sinalização de Rgt1 podem ser identificados por análise *in silico*. O possível homólogo de Rgt1 é representado pela ORF AN1927 a qual apresenta 63% de identidade de sequência em relação à Rgt1 de *S. cerevisiae*. Surpreendentemente, Std1 e Mth1 parecem não possuir homólogos em *A. nidulans* o que pode indicar outro mecanismo de regulação da via Rgt1 em condições de escassez de glicose (Tabela 1).

Tabela 1. Homólogos putativos de genes envolvidos no sensoriamento de glicose em *A. nidulans* identificados por homologia às sequências de *S. cerevisiae*.

Nome do gene em <i>S. cerevisiae</i> ^a	Número de acesso ^b	% identidade (aminoácidos) ^c	e-value
Rgt2	AN1797	~ 46%	1,0e-122
	AN8737	~ 42%	
	AN6669	~ 42%	6,0e-107
	AN10891	~ 43%	3,0e-106
			3,0e-109
Snf3	AN1797	~ 45%	7,0e-123
	AN8737	~ 43%	6,0e-102
	AN6669	~ 44%	4,0e-100
	AN10891	~ 41%	9,0e-102
Rgt1	AN1927	~ 63%	2,0e-18
Snf1	AN7695	~ 52%	8,0e-123
Yck1	AN5757	~ 73%	6,0e-138
Yck2	AN5757	~ 73%	2,0e-139

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Nome do gene em <i>S. cerevisiae</i> ^a	Número de acesso ^b	% identidade (aminoácidos) ^c	e-value
Sak1	AN5728	~ 43%	6,0e-43
TOS3	AN8827	~ 31%	7,0e-48
Elm1			
Std1			
Mth1			

^a banco de dados com acesso em <http://www.yeastgenome.org>
^b banco de dados com acesso em <http://www.aspergillusgenome.org>
^c alinhamento local utilizando a ferramenta BLASTP das sequências de aminoácidos que compõem a proteína de cada uma das duas espécies analisadas.

Mecanismos de sensoramento da glicose

Em leveduras, várias proteínas presentes na superfície celular são descritas e desempenham função de sensoramento de diferentes concentrações de glicose disponível no meio extracelular. Essas proteínas sensoras ativam transportadores de alta e baixa afinidade os quais, por sua vez, transportam glicose para o interior da célula. Uma vez internalizada, a glicose é fosforilada tanto pela hexoquinase (Hxk) como pela glucoquinase (Glk).

No sensoramento da glicose em leveduras, a via de indução de genes que ativam os transportadores de glicose é representada principalmente por duas proteínas de sensoramento: Snf3 e Rgt2 (para revisão, ROLLAND et al., 2001). Snf3 e Rgt2 são proteínas de membrana que apresentam domínios transmembrana e são muito similares aos transportadores de glicose pertencentes à família dos

Hxt (NEIGEBORN et al., 1986; ÖZCAN et al., 1996). Apesar da similaridade, Snf3 e Rgt2 são incapazes de transportar glicose (ÖZCAN et al., 1998) e portanto agem como sensores da glicose extracelular (para revisão, GANCEDO, 2008). A função dessas duas proteínas sensoras é mediada pela via de sinalização de Rgt1 a qual ativa ou reprime a transcrição de genes HXT de acordo com a concentração de glicose extracelular (ÖZCAN; JOHNSTON, 1999). Uma vez que as proteínas sensoras Rgt2 ou Snf3 estão ativas, ocorre o recrutamento dos co-repressores Mth1 e Std1 à membrana plasmática onde se ligam aos sensores e são fosforilados por Yck1 e Yck2 sendo, então, marcados pelo complexo de ubiquitinação SCFGrr1 E2/E3 ubiquitina e direcionados para degradação no proteassomo (FLICK et al., 2003; MORIYA; JOHNSTON, 2004; SPIELEWOY et al., 2004). A degradação desses co-repressores expõe Rgt1 à fosforilação e elimina a atividade repressora (PALOMINO et al., 2006).

O gene *SNF3* foi identificado em um “screening” para mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na utilização de rafinose (NEIGEBORN; CARLSON, 1984; NEIGEBORN, 1986). Os mutantes Snf3 são ainda deficientes no crescimento em baixas concentrações de glicose e frutose (BISSON et al., 1987). A transcrição de *SNF3* é reprimida em altas concentrações de glicose (HOHMANN et al., 1999) e é necessário para a indução em baixas concentrações de glicose de certos genes HXT (para revisão, ROLLAND et al., 2001). Quanto a Rgt2, essa é uma proteína de membrana que funciona como sensor de altos níveis de glicose já que é necessária para a indução da expressão máxima de HXT1 em altas concentrações de glicose (ÖZCAN et al., 1996; ÖZCAN; JOHNSTON, 1999). Alguns genes homólogos à Snf3 e Rgt2 são descritos em outras espécies. Como exemplo, o gene *rco-3* de *N. crassa* é predito codificar uma proteína de 594 aminoácidos com 37% de identidade a Snf3 na região homóloga de transportadores de açúcar (ALLEN et al., 1989; MADI et al., 1997). O mutante *rco-3* tem taxa de crescimento ligeiramente reduzida em meio contendo 2% de glicose como fonte de carbono. Esse mutante é parcialmente desreprimido na atividade de transporte de alta-afinidade a glicose e não é completamente

desreprimido em condições em que a glicose é limitada. Além disso, o mutante *rco-3* tem afinidade reduzida ao transporte de glicose (ALLEN et al., 1989; MADI et al., 1997), relacionando assim o gene *rco-3* às vias de sensoriamento de glicose em *N. crassa*. Na levedura *Kluyveromyces lactis* é descrito que a proteína de membrana Rag4 desempenha um papel similar à Snf3/Rgt2 de *S. cerevisiae* (BETINA et al., 2001). Esse organismo possui ainda outros componentes da via de sinalização desencadeada por Snf3/Rgt2 como, por exemplo, o ortólogo de Rgt1, um repressor transcricional de genes induzidos por glicose (FLICK et al., 2003; KIM et al., 2003; PALOMINO et al., 2005; BELINCHÓN; GANCEDO, 2007; ROLLAND et al., 2006). Em *Candida albicans*, Hgt4 é um ortólogo de Snf3/Rgt2. *C. albicans* também possui proteínas similares a Std1 (proteína regulatória) e Rgt1, as quais agem de forma semelhante aos homólogos em *S. cerevisiae* (BROWN et al., 2006). Para o fungo filamentosos *A. nidulans*, proteínas sensoras de glicose não são descritas funcionalmente, apenas a predição dos homólogos por análise *in silico* pode ser citada (Tabela 1).

Transportadores

Atualmente, pouco se conhece a respeito do transporte de glicose em fungos filamentosos. Nos fungos *N. crassa*, *A. nidulans* e *A. niger*, o transporte de glicose de alta e baixa afinidade foi descrito por meio de ensaios baseados no transporte de monossacarídeos (SCARBOROUGH, 1970a, 1970b; SCHNEIDER; WILEY, 1971; MARK; ROMANO, 1971; TORRES et al., 1996). Em geral, o sistema de difusão facilitada de baixa afinidade é observado em células que estão reprimidas por glicose. Opostamente, o sistema de alta afinidade é observado em células que crescem com quantidade limitada de glicose (SCARBOROUGH, 1970a, 1970b; SCHNEIDER; WILEY, 1971).

Dentre os fungos, a levedura *S. cerevisiae* representa o organismo cujo sistema de transporte de glicose tem sido estudado mais

detalhadamente. Para essa levedura são descritos 20 genes que codificam proteínas similares a transportadores de glicose (HXT1-HXT17, GAL2, SNF3 e RGT2) (BISSON et al., 1993; KRUCKEBERG, 1996; BOLES; HOLLENBERG, 1997) os quais podem ser classificados como transportadores de baixa ou de alta afinidade por glicose (BOLES; HOLLENBERG, 1997). Em fungos filamentosos alguns transportadores de glicose são descritos. Em *A. niger*, por exemplo, o gene MstA codifica um transportador de açúcar de alta afinidade e a superexpressão desse gene em uma cepa de *S. cerevisiae* deficiente no transporte de hexose restaura parcialmente o crescimento da cepa em 0,1 e 1 % de glicose, frutose, manose e galactose (VANKUYK et al., 2004). A cepa mutante de *A. niger* para MstA não apresenta alteração fenotípica quando crescida em meio de cultura pobre em fonte de carbono. Esses dados sugerem que esse fungo filamentoso possui outros transportadores que compensam a ausência do gene MstA (VANKUYK et al., 2004). Em *A. nidulans* o gene MstE codifica um transportador de baixa afinidade à glicose. Este gene é expresso durante a germinação do conídio em meio rico em glicose. A expressão também ocorre em hifas crescidas em meio contendo glicose adicionado de outras fontes de carbono repressoras de maneira dependente do repressor transcricional CreA (FORMENT et al., 2006). O mutante de *A. nidulans* deletado para MstE não apresenta alterações morfológicas evidentes mas apresenta ausência do transporte de glicose de baixa afinidade (FORMENT et al., 2006). Outro transportador de *A. nidulans*, HxtA, foi parcialmente caracterizado (WEI et al., 2004). A deleção do HxtA em *A. nidulans* não altera o crescimento do fungo em determinadas fontes de carbono (frutose, sorbose, manose, galactose, xilose, entre outras) e também não inibe o desenvolvimento sexual desse organismo sugerindo que há um sistema de aquisição de glicose redundante neste organismo (WEI et al., 2004). A superexpressão do gene HxtA na cepa mutante de *S. cerevisiae* com ausência de todos os transportadores de glicose foi insuficiente para restaurar o crescimento em glicose. Adicionalmente, a expressão deste gene foi reprimida em condições de crescimento contendo alta concentração de glicose e foi induzida em condições de escassez de glicose (WEI et al., 2004).

Glucoquinase e hexoquinase

Além dos transportadores de hexoses e proteínas sensoras, outros componentes participam ativamente dos mecanismos desencadeados por hexoses. A principal via de repressão por glicose envolve hexoquinases e requer a fosforilação do açúcar (PEGO et al., 1999). Os fungos contem várias hexoquinases as quais são envolvidas tanto na fosforilação de açúcar quanto no sensoriamento de fontes de carbono (FLECK; BROCK, 2010). Em leveduras a fosforilação de glicose é catalisada por três açúcar-quinases (hexoquinase/Hxk- 1 e 2 e glucoquinase/Glk-1) enquanto a repressão requer apenas a Hxk-2 (para revisão, ROLLAND et al., 2001). Da mesma forma, em fungos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. niger* e *A. nidulans*), é descrita a presença de uma glucoquinase e uma hexoquinase cataliticamente ativas (FLIPPHI et al., 2003; PANNEMAN et al., 1996, 1998; RUIJTER et al., 1996). Em *A. nidulans* especificamente, a glucoquinase é representada por AN8689 e apresenta 44% de identidade com a glucoquinase de *S. cerevisiae* Glk1 além de duas hexoquinases representadas por AN7459 e AN2638 as quais compartilham mais de 54,5 e 42,7% de identidade com as hexoquinases de *S. cerevisiae* (Hxk1 e Hxk2). A caracterização bioquímica de glucoquinase e hexoquinase de *A. niger* recombinantes foi realizada por super expressão e purificação dessas enzimas (PANNEMAN et al., 1996, 1998). A glucoquinase purificada demonstrou alta afinidade por glicose e a atividade da enzima não foi inibida pela adição do inibidor de hexoquinase trealose-6-fosfato (T6P) (PANNEMAN et al., 1996). A hexoquinase pura demonstrou atividade específica por frutose e foi também ativa na presença de glicose. A fosforilação da frutose foi inibida na presença de T6P de maneira dependente da concentração, o que permitiu a discriminação entre a atividade de glucoquinase e da hexoquinase em extrato celular (PANNEMAN et al., 1998). Esses estudos sugerem que a glucoquinase de *A. nidulans* pode estar envolvida no metabolismo de glicose enquanto a hexoquinase refere-se à ativação de frutose. Para estudos *in vivo*, cepas de *A. nidulans* mutantes para a hexoquinase (frA1) e para glucoquinase (glkA4) bem

como o duplo mutante foram construídas e analisadas (ROBERTS et al., 1963; FLIPPHI et al., 2003). O mutante Δ glkA não tem defeito de crescimento sugerindo que a falta do gene é compensada pela hexoquinase. Por outro lado o mutante da hexoquinase demonstra crescimento afetado em meio de cultivo contendo frutose como única fonte de carbono. Isso confirma o fato de que a glucoquinase é incapaz de promover a fosforilação da frutose *in vivo*. Esse mesmo mutante não apresentou alteração fenotípica quando crescido em glicose. Quanto ao duplo mutante, este apresentou dificuldade de crescimento tanto na presença de glicose como de frutose como fontes únicas de carbono (FLIPPHI et al., 2003).

Discussão e Conclusão

A repressão catabólica é um evento desencadeado e controlado pela disponibilidade de glicose. Nesse âmbito, por meio de mecanismos altamente regulados, a glicose é a fonte de carbono utilizada preferencialmente frente a quaisquer outras fontes de carbono disponíveis. Muitos genes relacionados ao controle da repressão catabólica têm sido identificados e caracterizados na levedura *S. cerevisiae*. Nesse organismo é descrito que o controle da repressão catabólica ocorre por meio de vias de sinalização reguladas como aquela que envolve a proteína quinase Snf1 bem como a via de sinalização por Rgt1. Enquanto em *S. cerevisiae* muito se sabe a respeito do controle da repressão catabólica, em fungos filamentosos poucos elementos relacionados ao controle deste evento são descritos, permanecendo assim, muitas questões sem respostas. Uma das principais vias responsáveis pelo sensoramento de glicose em *S. cerevisiae* envolve a proteína quinase Snf1, a qual apresenta-se como elemento regulatório central no controle da repressão catabólica (Para revisão, GANCEDO, 1998) e está envolvida com a utilização de fontes de carbono alternativas. A atividade de Snf1 é desempenhada mediante a fosforilação e a defosforilação do

repressor transcricional Mig1 (SCHULLER, 2003). O homólogo de Snf1 já foi caracterizado funcionalmente em fungos filamentosos como *C. carbonum*, *F. oxysporum*, *U. maydis* (TONUKARI et al., 2000; OSPINA-GIRALDO et al., 2003; NADAL et al., 2010, respectivamente). Além desses organismos, o homólogo putativo de Snf1 em *A. nidulans*, SnfA, também foi identificado (AN7965) e apresenta alto percentual de identidade de sequência ao Snf1 de *S. cerevisiae* (52%). Neste mesmo panorama, o homólogo de MIG1 no fungo filamentoso *A. nidulans*, o CreA, desempenha função similar a Mig1 em *S. cerevisiae*. Essa similaridade funcional pode ser exemplificada pelo fato de que em mutantes de *A. nidulans* com perda da cópia funcional do gene CreA a repressão catabólica e o transporte de baixa afinidade na presença de glicose não ocorrem (MACCABE et al., 2003). Outros elementos importantes envolvidos na via de sinalização por Snf1 são as quinases Sak1, Elm1 e Tos3 as quais fosforilam e ativam o complexo Snf1 (NATH et al., 2003; HONG et al., 2003). No genoma de *A. nidulans* (<http://www.Aspergillusgenome.org>) apenas os homólogos putativos de Sak1 e Tos3 podem ser identificados os quais demonstram alto percentual de homologia a sequência desses elementos em *S. cerevisiae*: AN5728- 43% e AN8827- 31% de identidade, respectivamente.

Adicionalmente, a via de sinalização de Rgt1 também se relaciona à expressão regulada de genes que são envolvidos no sensoriamento e transporte de glicose em leveduras (MOSLEY et al., 2003). Baseado na sequência de *S. cerevisiae*, em *A. nidulans* o homólogo putativo de Rgt1 é representado pela ORF AN1927 (63% de identidade). Entretanto os homólogos de Std1 e Mth1 parecem ausentes nesse fungo filamentoso. A atividade de Rgt1 leva à repressão de transportadores de hexose de acordo com a concentração de glicose extracelular (ÖZCAN; JOHNSTON, 1999; POLISH et al., 2005) e é dependente dos co-repressores Mth1 e Std1 (ZAMAN et al., 2008) os quais atuam mediante ativação das proteínas sensoras de glicose Snf3 e Rgt2. Essas proteínas dispõem-se superficialmente e sinalizam a ocorrência de glicose no meio extracelular ativando transportadores

de alta e baixa afinidade, dependendo da concentração de glicose disponível. Embora em *A. nidulans*, proteínas sensoras não tenham sido caracterizadas funcionalmente, análises *in silico* apontam para quatro homólogos putativos nesse organismo, as quais são representadas pelas ORF AN10891, AN8737, AN6669 e AN1797. Em resumo, a via de sinalização Rgt1 conjugada àquela de Snf1 garante a resposta adequada dos diferentes transportadores de glicose de acordo com a concentração variável de glicose disponível e promove a importação mais adequada do açúcar disponível (JOHNSTON; KIM, 2005).

Outro importante evento no metabolismo da glicose em *S. cerevisiae* é a fosforilação desse elemento, a qual ocorre mediante atividade de duas quinases conhecidas como hexo e glucoquinase. Estudos recentes demonstraram que em *A. nidulans* a fosforilação da glicose também é um pré-requisito para a sinalização deste açúcar (FLIPPHI et al., 2003). No genoma desse organismo podem ser identificados, por similaridade de sequência, dois homólogos putativos de hexoquinase (AN7459 e AN2638) e uma glucoquinase (AN8689). Para *A. niger* a caracterização da glucoquinase e da hexoquinase evidenciou que a primeira apresenta maior afinidade por glicose e a hexoquinase demonstrou atividade específica por frutose e foi ativa inclusive na presença de glicose (PANNEMAN et al., 1996).

Resumidamente, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de sensoriamento de glicose em fungos filamentosos e o caminho a ser percorrido no sentido de desvendar esses mecanismos tem se mostrado bastante complexo. Os principais dados disponíveis atualmente levam em consideração dados de homologia baseados na disponibilidade do genoma em comparação a sequências de *S. cerevisiae*. Estudos que visem à caracterização funcional de transportadores de glicose, proteínas sensoras em fungos filamentosos, bem como outros elementos envolvidos no sensoriamento e sinalização desencadeada por glicose foram iniciados e devem adicionar novos conhecimentos ao assunto.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Referências

- ALLEN, K. E.; MCNALLY, M. T.; LOWENDORF, H. S.; SLAYMAN, C. W.; FREE, S. J. Deoxyglucose resistant mutants of *Neurospora crassa* : isolation, mapping, and biochemical characterization. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 171, n. 1, p. 53-58, 1989.
- BAILEY, C.; ARST, H. N. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **European Journal of Biochemistry**, Cambridge, v. 51, n. 2, p. 573-577, 1975.
- BELINCHÓN, M. M.; GANCEDO, J. M. Different signaling pathways mediate glucose induction of SUC2, HXT1 and pyruvate decarboxylase in yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 40-47, 2007.
- BETINA, S.; GOFFRINI, P.; FERRERO, I.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, Baltimore, v. 158, n. 2, p. 541-548, 2001.
- BISSON, L. F.; NEIGEBORN, L.; CARLSON, M.; FRAENKEL, D. G. The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, n. 4, p. 1656-1662, 1987.
- BISSON, L. F.; COONS, D. M.; KRUCKEBERG, A. L.; LEWIS, D. A. Yeast sugar transporters. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, n. 28, n. 4, p. 259-308, 1993.
- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 85-111, 1997.

BROWN, V.; SEXTON, J.; JOHNSTON, M. A glucose sensor in *Candida albicans*.

Eukaryotic Cell, Washington, DC, v. 5, n. 10, p. 1726-1737, 2006.

DELGADO-JARANA, J.; MORENO-MATEOS, M. A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in

Trichoderma harzianum: role of gtt1. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 2, n. 4, p. 708-717, 2003.

DOWZER, C. E. A.; KELLY, J. M. Analysis of the creA gene, a regulator of carbon

catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 11, n. 11, p. 5701-5709, 1991.

FLECK, C. B.; BROCK, M. *Aspergillus fumigatus* catalytic glucokinase and hexokinase:

expression analysis and importance for germination, growth, and conidiation. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 9, n. 7, p. 1120-1135, 2010.

FLICK, K. M.; SPIELEWOY, N.; KALASHNIKOVA, T. I.; GUADERRAMA, M.; ZHU, Q.;

CHANG, H. C.; WITTENBERG, C. Grr1dependent inactivation of Mth1 mediates glucose induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 14, n. 8, p. 3230-3241, 2003.

FLIPPHI, M.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; RUIJTER, G. J.; VISSER, J.; ARST, H.

N.; FELENBOK, B. Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 14, p. 11849-11857, 2003.

FORMENT, J. V.; FLIPPHI, M.; RAMON, D.; VENTURA, L.; MACCABE, A. P. Identification

of the mstE gene encoding a glucose inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus nidulans*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 13, p. 8339-8346, 2006.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology**

Reviews: MMBR, Washington, DC, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signalling in yeast. **FEMS Microbiology**

Reviews, Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 673-704, 2008.

HOHMANN, S.; WINDERICKX, J.; DE WINDE, J. H.; VALCKX, D.; COBBAERT, P.;

LUYTEN, K.; DE MEIRSMAN, C.; RAMOS, J.; THEVELEIN, J. M. Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of SUC2. **Microbiology**, Reading, v. 145, pt. 3, p. 703-714, 1999.

HONG, S. P.; LEIPER, F. C.; WOODS, A.; CARLING, D.; CARLSON, M. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 100, n. 15, p. 8839-8843, 2003.

JOHNSTON, M.; KIM, J. H. Glucose as a hormone: receptor mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, pt. 1, p. 247-252, 2005.

JØRGENSEN, T. R.; VANKUYK, P. A.; POULSEN, B. R.; RUIJTER, G. J.; VISSER, J.; IVERSEN, J. J. Glucose uptake and growth of glucose limited chemostat cultures of *Aspergillus niger* and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter. **Microbiology**, Reading, v. 153, pt. 6, p. 1963-1973, 2007.

KIM, J. H.; POLISH, J. A.; JOHNSTON, M. Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, D.C., v. 23, n. 15, p. 5208-5216, 2003.

KRUCKEBERG, A. L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 166, p. 5, p. 283-292, 1996.

MACCABE, A. P.; MIRÓ, P.; VENTURA, L.; RAMÓN, D. Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the creA and sorA genes. **Microbiology**, Reading, p. 149, pt. 8, p. 2129-2136, 2003.

MADI, L.; MCBRIDE, S. A.; BAILEY, L. A.; EBBOLE, D. J. rco3, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, Austin, v. 146, n. 2, p. 499-508, 1997.

MARK, C. G.; ROMANO, A. H. Properties of the hexose transport systems of *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 249, n. 1, p. 216-226, 1971.

MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 101, n. 6, p. 1572-1577, 2004.

MOSLEY, A. L.; LAKSHMANAN, J.; ARYAL, B. K.; OZCAN, S. Glucose mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 12, p. 10322-10327, 2003.

NADAL, M.; GARCIA PEDRAJAS, M. D.; GOLD, S. E. The *snf1* gene of *Ustilago maydis* acts as a dual regulator of cell wall degrading enzymes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 100, n. 12, p. 1364-1372, 2010.

NATH, N.; MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C. Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 23, n. 11, p. 3909-3917, 2003.

NEHLIN, J. O.; RONNE, H. Yeast MIG1 repressor is related to the

mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **The EMBO Journal**, London, v. 9, n. 9, p. 2891-2898, 1990.

NEIGEBOERN, L.; CARLSON, M. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, v. 108, n. 4, p. 845-858, 1984.

NEIGEBOERN, L.; SCHWARTZBERG, P.; REID, R.; CARLSON, M. Null mutations in the *SNF3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 6, n. 11, p. 3569-3574, 1986.

OSPINA-GIRALDO, M. D.; MULLINS, E.; KANG, S. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. **Current Genetics**, New York, v. 44, n. 1, p. 49-57, 2003.

ÖZCAN, S.; DOVER, J.; ROSENWALD, A. G.; WOLF, S.; JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 93, p. 22, p. 12428-12432, 1996.

ÖZCAN, S.; DOVER, J.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 2566-2573, 1998.

ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 63, n. 3, p. 554-569, 1999.

PALOMINO, A.; HERRERO, P.; MORENO, F. Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the HXK2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, London, v. 388, pt. 2, p. 697-703, 2005.

PALOMINO, A.; HERRERO, P.; MORENO, F. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, n. 5, p. 1427-1438, 2006.

PANNEMAN, H.; RUIJTER, G. J.; VAN DEN BROECK, H. C.; DRIEVER, E. T. M.; VISSER, J. Cloning and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* glucokinase. Evidence for the presence of separate glucokinase and hexokinases enzymes. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 240, n. 3, p. 518-525, 1996.

PANNEMAN, H.; RUIJTER, G. J.; VAN DEN BROECK, H. C.; VISSER, J. Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinasethe enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6phosphate. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 258, n. 1, p. 223-232, 1998.

PEGO, J. V.; WEISBEEK, P. J.; SMEEKENS, S. C. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 119, n. 3, p. 1017-1023, 1999.

POLISH, J. A.; KIM, J. H.; JOHNSTON, M. How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. **Genetics**, Austin, v. 169, n. 2, p. 583-594, 2005.

ROBERTS, C. F. The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 31, p. 45-58, 1963.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 310-317, 2001.

ROLLAND, S.; HNATOVA, M.; LEMAIRE, M.; LEAL-SANCHEZ, J.; WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. Connection between the Rag4 glucose sensor and the KIRgt1 repressor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, Austin, v. 174, n. 2, p. 617-626, 2006.

RUBENSTEIN, E. M.; MCCARTNEY, R. R.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; SHIRRA, M. K.; ARNDT, K. M.; SCHMIDT, M. C. Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 1, p. 222-230, 2008.

RUIJTER, G. J.; PANNEMAN, H.; VAN DEN BROECK, H. C.; BENNETT, J. M.; VISSER, J. Characterisation of the *Aspergillus nidulans* frAJ mutant: hexose phosphorylation and apparent lack of involvement of hexokinase in glucose repression. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 139, n. 2-3, p. 223-228, 1996.

SCARBOROUGH, A. Sugar transport in *Neurospora crassa*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 245, n. 7, p. 1694-1698, 1970a.

SCARBOROUGH, A. Sugar transport in *Neurospora crassa*. II. A second glucose transport system. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 245, n. 15, p. 3985-3987, 1970b.

SCHNEIDER, P.; WILEY, W. R. Kinetic characterization of the two glucose transport systems in *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 106, n. 2, p. 479-486, 1971.

SCHULLER H. J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 43, n. 3, p. 139-160, 2003.

SPIELEWOY, N.; FLICK, K.; KALASHNIKOVA, T. I.; WALKER, J. R.; WITTENBERG, C. Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, D.C, v. 24, n. 20, p. 8994-9005, 2004.

TAMAYO-RAMOS, J. A.; FLIPPHI, M.; PARDO, E.; MANZANARES, P.; OREJAS, M. Lrhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α Lrhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA independent mechanism acting at the level of inducer uptake. **Microbial Cell Factories**, London, v. 11, p. 26, 2012.

TONUKARI, N. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 2, p. 237-248, 2000.

TORRES, N. V.; RIOL-CIMAS, J. M.; WOLSCHEK, M.; KUBICEK, C. P. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 6, p. 790-794, 1996.

VANKUYK, P. A.; DIDERICH, J. A.; MACCABE, A. P.; HERERRO, O.; RUIJTER, G. J.; VISSER, J. *Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. **The Biochemical Journal**, London, v. 379, pt. 2, p. 375-383, 2004.

VINCENT, O.; TOWNLEY, R.; KUCHIN, S.; CARLSON, M. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 9, p. 1104-1114, 2001.

ZAMAN, S.; LIPPMAN, S. I.; ZHAO, X.; BROACH, J. R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 27-81, 2008.

XIE, X.; WILKINSON, H. H.; CORREA, A.; LEWIS, Z. A.; BELL-PEDERSEN, D.; EBBOLE, D. J. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 12, p. 1104-1119, 2004.

WEI, H.; VIENKEN, K.; WEBER, R.; BUNTING, S.; REQUENA, N.; FISCHER, R. A putative high-affinity hexose transporter, hxtA, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 2, p. 148-56, 2004.

Aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de biocatalisadores para obtenção de biocombustíveis e bioprodutos

Lidia Maria Melo Santa Anna

Danuza N. Moysés

Roberto N. Maeda

Nei Pereira Junior

Introdução

A corrida para industrializar as tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica voltadas à obtenção de biocombustíveis tem sido intensa, com a grande expectativa de produção de cerca de 250 milhões de galões de etanol em 2011. Porém, a produção não ultrapassou 6,8 milhões de galões de biocombustíveis de segunda geração (STEPHEN et al., 2012). Os gargalos tecnológicos ainda existentes dificultam o escalonamento do processo, aumentando os riscos de implantação dessa tecnologia. Stephen et al. (2012) estimaram que o custo econômico envolvido na tecnologia de etanol de segunda geração pela rota bioquímica é ainda mais alto do que a produção tradicional de etanol a partir de milho.

O Brasil possui uma vasta e diversificada gama de substratos que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e bioprodutos. Em relação à biomassa residual de composição lignocelulósica, o país possui um grande potencial, tendo no bagaço de cana de açúcar

sua maior representatividade, não só pelas quantidades geradas, mas também, no que tange à facilidade logística. A disponibilidade desse resíduo nas usinas/destilarias, o coloca como uma excelente matéria-prima para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de segunda geração (PEREIRA JUNIOR et al., 2008). O processo de conversão dos componentes celulósicos dessas biomassas residuais a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas. Atualmente, está bem estabelecido que a eficiência de hidrólise de celulose deve-se a um sistema enzimático multicomponente, constituído de três principais grupos: endo- β -glicanases, exo- β -glicanases e β -glicosidases (LYND et al., 2002; ZHANG; LYND, 2004). O conceito de “engenharia de produto” pode ser aplicado em processos de produção de celulases, visando à formulação de preparados enzimáticos com proporções ideais entre as diversas enzimas do complexo celulolítico, e em particular as endoglicanases e β -glicosidases. O formulado ideal pode ser obtido pelo co-cultivo de linhagens superprodutoras dos principais tipos de celulases, pela produção em separado das celulases e posterior composição do formulado pela mistura dos extratos em proporções pré-estabelecidas (KADAR et al., 2004; XIAO et al., 2004) ou ainda pela introdução de genes que codificam para a expressão dessas enzimas em organismos hospedeiros, capazes de expressar e secretar as enzimas nas proporções ideais (SRISVASTAVA et al., 1999). Além dessas estratégias, existem microrganismos que secretam sistemas com atividades balanceadas. Jorgesen e Olsson (2006) relatam que diversas espécies do gênero *Penicillium* têm mostrado a habilidade de produzir sistemas enzimáticos completos e com melhor relação entre as atividades FPasica e β -glicosidásica do que *Trichoderma reesei*, que é o microrganismo mais utilizado e estudado visando à produção dessas enzimas. Em termos de escala industrial do processo produtivo, uma das alternativas propostas para viabilizar a produção dessas enzimas em larga escala é a sua produção dedicada (*in plant production*). Esta estratégia, além de apresentar a flexibilidade de utilização do bagaço como substrato local e a produção de enzimas específicas para o substrato, facilita o processo catalítico e evita o alto custo com a importação do

mesmo. O presente trabalho tem como objetivo discutir e apresentar avanços na temática de produção de celulases voltadas para a produção dedicada, de maneira a apresentar mais uma alternativa para facilitar a implantação da tecnologia de conversão de biomassas residuais a biocombustíveis e bioprodutos de segunda geração.

As celulases

Na natureza, a conversão enzimática da celulose em glicose por microrganismos é um desafio que exige a produção de um complexo sistema enzimático composto por celulases. As celulases pertencem ao grupo das hidrolases O-glicosídeos (EC 3.2.1), que é um grupo comum de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre carboidrato e um composto não carboidrato. Na Tabela 1 estão apresentados os códigos das celulases de acordo com a Enzyme Commission (E.C.), os nomes oficiais, alternativos e especificidade da reação (NC-IUBMB, 2008).

Tabela 1. Códigos e respectivas enzimas de acordo com Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology . Fonte: NC-IUBMB (2008).

Código E.C	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.4	Celulase	Beta-1,4-endoglican hidrolase; Beta-1,4 glicanase; CarboximetilCelulase; Celodextrinase; Endo-1,4-β-D-glicanase; Endo-1,4-β-D-glicanohidrolase; Endo-1,4-β-glicanase; Endoglicanase.	Endohidrólise de ligações β-1,4-D-glicosídicas da celulose e beta-glicanas.

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Código E.C	Nome oficial	Nomes alternativos	Reação catalisada
3.2.1.21	β -glicosidase	Amigdalase; β -D-glicoside glicohidrolase; Celobiase;Gentobiase.	Hidrólise do terminal, β -1-4-D-glicosídeo com liberação de glicose
3.2.1.74	Glican 1,4- β -glicosidase	1,4- β -D-glican glicohidrolase; Exo-1,4-beta-D-glicosidase;Exo-1,4-beta-glicanase;Exo-1,4-beta-glicosidase.	Hidrólise de ligações 1-4 em β -D-glicanas com remoção sucessiva de unidades de glicose.
3.2.1.91	Celulose 1,4- β -celobiosidase.	1,4- β -celobiohidrolase;1,4- β -D-glican celobiohidrolase; Avicelase;Exo-1,4- β -D-glicanase;Exocelobiohidrolase; Exoglicanase.	Hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas em celulose e cetotetraose, liberando celobiose

Atualmente, está bem estabelecido que a atividade celulolítica deve-se a um sistema enzimático multicomponente que consiste principalmente de três grupos: endo- β -glicanase, exo- β -glicanase e β -glicosidase. O mecanismo mais aceito de hidrólise enzimática da celulose envolve o efeito sinérgico principalmente entre estas três formas de celulase (HENRISSAT, 1994; KNOWLES et al., 1987; LYND et al., 2002; TEERI, 1997; WOOD; GARICA-CAMPAYO, 1990; ZHANG; LYND, 2004). As endoglicanases, ou 1,4- β -D-glicana-4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.4) são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam randomicamente regiões internas de estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não-redutor (BEGUIN; AUBERT, 1994; MIYAMOTO, 1997). O grupo das exoglicanases age nos terminais da

cadeia de celulose, produzindo celobiose como principal substância. Este grupo é constituído, majoritariamente, pelas enzimas 1,4- β -D-glicana-glicanohidrolases (EC 3.2.1.74), também conhecidas como celodextrinases e 1,4- β -D-glicana-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), mais comumente conhecidas como celobiohidrolases. As celobiohidrolases são distinguidas em dois tipos: as enzimas do tipo I (CBH I) as quais hidrolisam terminais redutores, e as do tipo II (CBH II) que hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (AWAFO et al., 1996). A estrutura das celobiohidrolases apresenta uma região na forma de “gancho”, cuja função é captar a fibra celulósica, facilitando seu acesso ao sítio catalítico (AWAFO et al., 1996). O terceiro e último grande grupo das enzimas do complexo celulolítico engloba as enzimas β -glicosidases, ou β -glicosídeo glicohidrolases (EC 3.2.1.21). As β -glicosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) à glicose. Assim como as celobiohidrolases, também sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (AWAFO et al., 1996). De acordo com Riou et al. (1998), as β -glicosidases podem ser divididas em três subgrupos baseados na especificidade pelo substrato: as celobiasas, as quais hidrolisam apenas oligossacarídeos; as broad-specificity- β -glicosidases, que exibem atividade tanto em dissacarídeos quanto oligossacarídeos (a β -glicosidase mais comumente encontrada); e as aril- β -glicosidases, que têm afinidade apenas por aril- β -glicosídeos. Quando atuam conjuntamente, as celulasas apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais (LYND et al., 2002). Estes três processos hidrolíticos ocorrem simultaneamente (Figura 1).

A hidrólise primária ocorre na superfície dos substratos sólidos liberando açúcares solúveis com grau de polimerização de 9, que se reduz a 6 na fase de liquefação pela hidrólise por endoglicanase e exoglicanase. A taxa de despolimerização enzimática realizada pelas endoglicanases e exoglicanases é o fator limitante para todo o processo de hidrólise (ZHANG et al., 2006). A hidrólise secundária, que ocorre na fase pós-liquefação, envolve primeiramente

a hidrólise da celobiose à glicose pelas β -glicosidases, embora algumas β -glicosidases também hidrolisem celodextrinas longas (ZHANG; LYND, 2004; ARANTES; SADDLER, 2010).

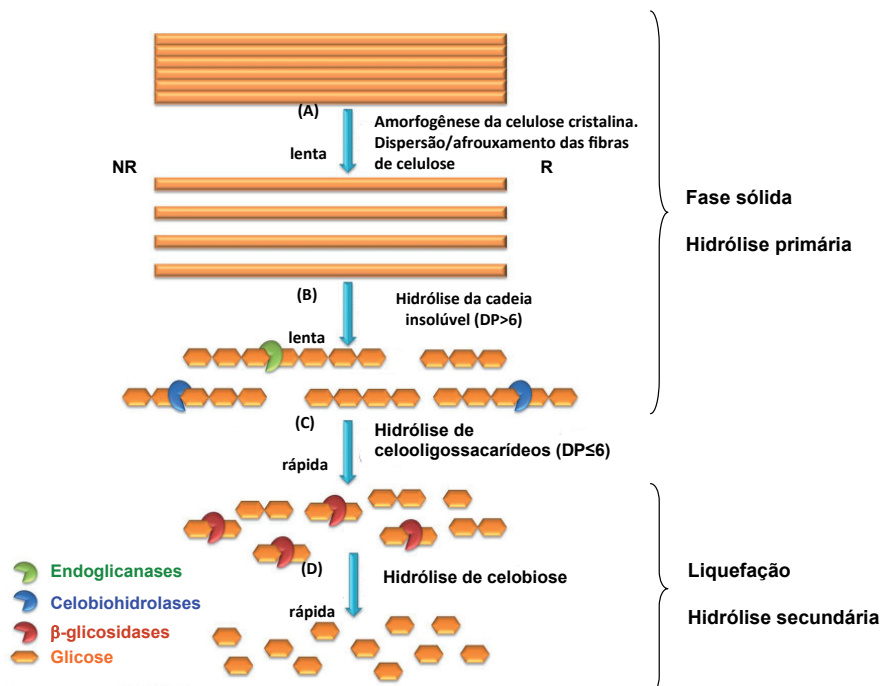


Figura 1. Esquema das etapas da hidrólise enzimática da celulose.

Fonte: Arantes e Saddler (2010). NR: terminal não redutor. R: terminal redutor

Microrganismos produtores de celulasas

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos (LJUNGDAHL; ERIKSON, 1985). Entretanto, relativamente poucos fungos e bactérias secretam altos níveis de celulasas extracelularmente capazes de solubilizar e hidrolisar a celulose cristalina extensivamente.

Dentre os fungos filamentosos, são reportados: *Trichoderma reesei* (HAYWARD et al., 2000; SHIN et al., 2000; BOLLÓK; RÈCZEY, 2000; LI et al., 2005; MIETTINEN-OINONEN, 2004; JUHÁSZ et al., 2005, 2004; ROSGAARD et al., 2006), *Aspergillus niger* (KIM et al., 1997), *Humicola grisea* (DE-PAULA et al., 1999), *Aspergillus terreus* (MASSADEH et al., 2001), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibacillus*, *Chaetomium elatum*, *Penicillium funiculosum* (BOLLÓK; RÈCZEY, 2000; ROSGAARD et al., 2006), *Thermoascus aurantiacus* (ROSGAARD et al., 2006). Há, no entanto, interesse por microrganismos que, além de apresentarem altos índices de produção de enzimas, apresentem, também, um equilíbrio entre os grupos de enzimas do complexo celulolítico, uma vez que cada grupo tem funções distintas. Castro (2006), Carvalho (2007) e Castro et al. (2010) verificaram que o fungo filamentoso *Penicillium funiculosum* apresenta bom balanceamento das atividades endoglicanásica e β -glicosidásica, como pode ser observado na Figura 2, razão pela qual este microrganismo foi selecionado por nosso grupo de pesquisa para posteriores estudos de otimização da produção de enzimas celulolíticas. Além disso, esta linhagem tem sido pouco explorada na literatura quando comparado com as linhagens de *Trichoderma reesei*.

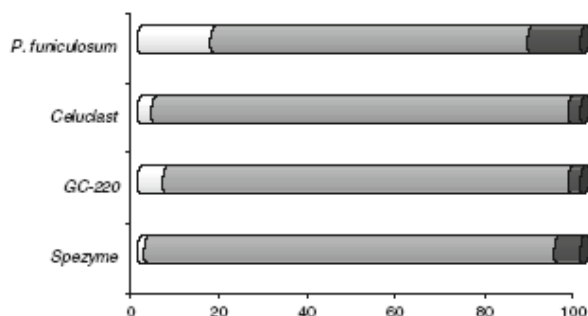


Figura 2. Distribuição das atividades de endoglicanase (cinza), exoglicanase (preto) e β -glicosidase (branco) no extrato enzimático bruto de *P. funiculosum* e em preparações comerciais.

Fonte: Castro et al. (2010).

Produção de celulasas por *P. funiculosum*

Maeda (2010) avaliou a produção de celulasas por *Penicillium funiculosum* em biorreator inoculado com 10% de pré-inóculo em meio de cultivo com bagaço de cana pré tratado em condições ácidas, como substrato. A Figura 3 apresenta os perfis cinéticos de produção de celulasas expressas em atividades FPásica, Avicelásica e CMCásica.

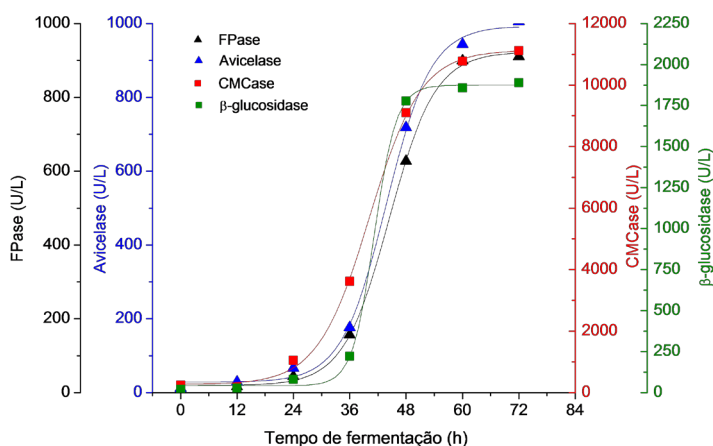


Figura 3. Perfil cinético da produção de celulasas em biorreator inoculado 10 % v/v de inóculo (Fonte: MAEDA, 2010)

A produção de celulasas em 60 h alcançou 900 U/L de atividade FPásica, 11000 U/L de atividade CMCásica, 1800 U/L de atividade β-glicosidásica e 1000 U/L de atividade avicelásica. O perfil cinético observado por Maeda (2010) apresentou uma fase lag inicial de produção de enzimas e após 24 horas a acentuada produção das mesmas se estendeu até às 60 horas. Essas diferenças nas proporções em que as celulasas são produzidas podem ser regidas por fatores como alterações químicas do meio de cultivo durante a

fermentação (aumento e/ou diminuição da substância indutora) e as necessidades fisiológicas associadas ao crescimento celular.

Na Tabela 2 estão sumarizadas as condições e a produção alcançada por diversos autores em comparação com a produção de celulases por *P. funiculosum* no presente estudo. A produção alcançada por nosso grupo de pesquisa foi menor do que aquela alcançada por linhagens *T. reesei* geneticamente modificadas ou que passaram por extensos programas de mutagenese e seleção, com o RUTC30 (PORTNOY et al., 2011). Entretanto, foi atingida uma alta produção em um tempo muito mais curto de processo.

Estratégia de aplicação do preparado enzimático de *P. funiculosum* para produção de etanol de segunda geração

Um preparado enzimático de *P. funiculosum* foi obtido, concentrado em membrana de fibra oca e, posteriormente, aplicado para produção de etanol por processo SSF (simultaneous saccharification and fermentation) alimentado (MAEDA, 2010). Estudos realizados já apontavam que em processos SSF, a concentração de etanol era limitada pela concentração de sólidos (VÁSQUEZ, 2007) devido a limitações difusionais relacionadas à transferência de massa. Essas limitações reduzem o rendimento de hidrólise enzimática da celulose e, em alguns casos, ocasionam o impedimento da mesma. A fim de se buscar uma solução para esse problema, incorporou-se uma inovação ao processo, alimentando o biorreator com bagaço pré-tratado (BETANCUR; PEREIRA JUNIOR, 2010), em momentos nos quais o meio se tornava liquefeito. Dessa forma, a relação sólido:líquido se manteve baixa o suficiente para minimizar os clássicos problemas de transferência de massa. Na Figura 4 estão apresentados os perfis de produção de etanol e consumo de glicose e celobiose obtidos durante o processo SSF em batelada alimentada, utilizando

o preparado enzimático de *P. funiculosus*. A faixa vertical em cinza indica a etapa de pré-hidrólise enzimática (12 h) e a partir do ponto zero (0), a fase de sacarificação e fermentação simultâneas. As setas indicam o ponto de perturbação do sistema com alimentação com carga de celulignina (massa seca). Ao final da fase de pré-hidrólise, a glicose atingiu valores de 65 g/L e o meio apresentava-se liquefeito, sendo possível a inoculação com uma linhagem industrial da levedura de *Saccharomyces cerevisiae* e a primeira alimentação com celulignina de bagaço de cana parcialmente deslignificada.

Ao longo do processo, pode ser observada a redução da produtividade volumétrica de etanol (QP). De acordo com Vásquez (2007), a hidrólise enzimática é a etapa limitante do processo SSF, particularmente quando o meio a ser fermentado é inoculado com altas concentrações celulares, levando a levedura a consumir a glicose em elevadas taxas. Se observarmos a produtividade nas primeiras 8 horas de fermentação, fase em que a glicose está prontamente disponível, o valor desse parâmetro variou de 5 a 9 g/L.h, ou seja, os mesmos verificados em fermentações de etanol a partir do caldo de cana no Brasil, 5–8 g/L.h. Logo, a produtividade volumétrica parece ser limitada pela taxa de hidrólise enzimática nessa concepção de processo, quando a partir de 8 horas, a concentração de glicose convertida no meio se encontra em níveis baixos.

Tabela 2. Produção de celulasas por diversos microrganismos.

Microrganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
<i>P. funiculosus</i>	Celulignina de bagaço de cana	FS; 30°C; 5,0	Avicelase 900 U/L; 950 FPU/L; 11000 UI EGU/L; 1900 UI BG/L	72 h	Maeda (2010)
<i>P. funiculosus</i>	Celulignina de bagaço de cana	FS; 30°C; 5,0	250 FPU/L; 1800 UI EG/L; 800 UI BG/L	120 h	Castro (2006)
<i>P. funiculosus</i>	Avicel ¹	FS	170 FPU/L; 5600 UI EG/L; 1300 UI BG/L	120 h	Carvalho (2007)
<i>P. funiculosus</i>	Avicel ²	FS	508 FPU/L; 9.204 UI EG/L; 2.395 UI BG/L	120 h	Carvalho (2007)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Salgueiro pré- tratado a vapor ¹	FS; 30; 5,5-6,0	1390 FPU/L; 1450 UI BG/L	4 dias	Bollók e Réczey (2000)

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Microorganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
<i>T. reesei</i> Rut C30	Carvalho pré-tratado a vapor ²	FS; 30; 5,0	4250 FPU/L; 45000 UI EG/L; 140UI BG/L	9 dias	Shin et al (2000)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Avicel ²	FS; 30; 4,8	163 FPU /L;	68 horas	Aiello et al. (1996)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Bagaço ²	FS; 30; 4,8	85 FPU /L;	68 horas	Aiello et al. (1996)
<i>T. reesei</i> QM 9414	Bagaço tratado com álcali ²	FS; 30; 4,8	90 FPU /L;	44 horas	Aiello et al. (1996)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Solka Floc ²	FS; 28; 4,8	4250 UI PF/L	7 dias	Veldhuisen et al. (1997)
<i>Penicillium pinophilum</i> IBT 4186	Solka Floc ²	FS; 30; 5,0	280 FPU/L	221 horas	Jørgensen et al. (2005)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> IMI 216529	Palha de Trigo ²	FES; 49; 4,0	5,5 FPU/g; 79 UI BG/g; 1709 UI EG/g; 4 UI CBH/g	-	Kalogeris et al. (2003)

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Microorganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
<i>Cultura mista T. reesei</i> Rut C30 e <i>Aspergillus phoenicis</i> QM 329	Esterco ¹	FS; 27; 5,5	1540 FPU/L; 640 UI BG/L	10 dias; 9 dias	Wen et al. (2005)
<i>P. persicinum</i> IBT 13226	Solka Floc ²	FS; 25; 5,0	800 FPU/L	236 horas	JØrgensen et al. (2005)
<i>P. brasilianum</i> IBT 20888	Solka Floc ²	FS; 30; 5,0	750 FPU/L	229 horas	JØrgensen et al. (2005)
<i>P. decumbens</i> 1	Palha e farelo de trigo ²	FES; 30; NR	15,2 FPU/g; 50,6 UI BG/g	4 dias; 4 dias	Mo et al. (2004)
<i>A. terreus</i>	Bagaço de cana ¹	FS; 35; 4,0	110 FPU/L; 1200 UI EG/L	7 dias; 7 dias	El-nawwi e El-Kader (1996)
<i>Chaetomium globosum</i>	Cacho de palmeira ²	FS; 30; 5,5	2500 FPU/L; 60000 UI EG/L; 16000 UI BG/L	96 horas; 120 horas; 192 horas	Umikalsom et al. (1998)

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Microorganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
<i>T. reesei</i> QM 9414	Fibra de milho pré-tratada ¹	FS; 28; 4,8	280 FPU/L; 9529 UI EG/L; 640 UI BG/L	8 dias	Li et al. (2005)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Fibra de milho pré-tratada ¹	FS; 28; 4,8	350 FPU/L; 9350 UI EG/L; 730 UI BG/L	8 dias	Li et al. (2005)
<i>Bacillus</i> sp. JCM 9156	CMC ¹	FS; 37; 10,5	46 UI EG/L	30 horas	Zhang et al. (2004)
Cultura mista de <i>B. pumilus</i> selvagem e mutante CRI 6	CMC ¹ Celobiose ¹	 FS; 37; 6,0	 2250 UI EG/L 1660 UI BG/L	 24 horas 24 horas	 Kotchoni et al. (2003)
<i>T. reesei</i> L27	Solka Floc ²	FS; 28; 4,8	13600 FPU/L	7 dias	Hayward et al. (2000)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Solka Floc ¹	FS; 28; 5,8	1200 FPU/L; 1350 UI BG/L	6 dias; 7 dias	Juhász et al. (2005)

Continua...

Tabela 2. Continuação.

Microorganismo	Fonte celulósica	Condições de cultivo forma de operação; temperatura (°C); pH	Máximas atividades	Tempo de processo	Referência
<i>Cultura mista T. reesei</i> QM 9414 e <i>A. terreus</i> SUK-1	Bagaço de cana ¹	FES; 30; 5,5	600 UI PF/L; 40 UI BG/L	7 dias; 6 dias	Massadeh et al. (2001)
<i>T. reesei</i> Rut C30	Solka Floc ²	FS; 30; 5,0	1300 FPU/L	50 horas	Jhuász et al. (2004)
<i>T. reesei</i> ZU-02	Sabugo de milho ²	FS; 30; 4,8	5000 UI PF/L; 240 UI BG/L	4 dias	Liming e Xueliang (2004)

¹ Experimentos conduzidos em frascos cônicos; ² Experimentos conduzidos em biorreator.

FS: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido

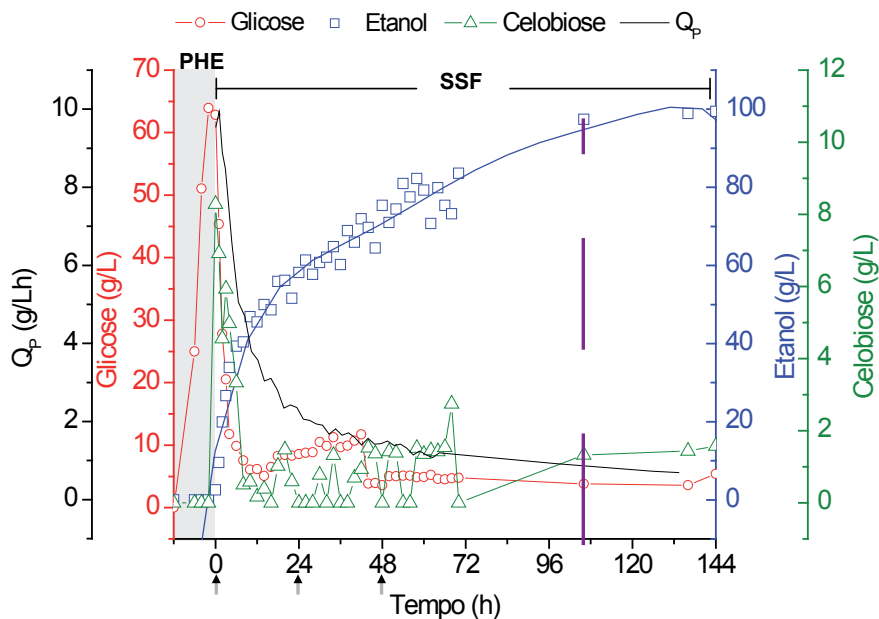


Figura 4. Cinética de produção de etanol por processo SSF utilizando celulasas de *P. funiculosum* em batelada alimentada. As setas indicam os tempos nos quais o sistema foi alimentado com celulignina parcialmente designificada. A faixa em cinza indica a fase de pré-hidrólise enzimática (PHE) de 12 h. A linha pontilhada indica o tempo de 106 h quando se atingiu a maior produção de etanol.

De acordo com Rudolf et al. (2005) e Sassner et al. (2006) a taxa de hidrólise enzimática, em muitos casos reportados, é a taxa que governa um processo SSF. Olofsson et al. (2008) reportaram que não há uma forte correlação positiva entre o tamanho do inóculo de leveduras e a produção de etanol, em processos com concentrações de células acima de 1 a 2 g/L para condições típicas de SSF (10 % de sólidos e 30 FPU/g). Sendo assim, o tamanho de inóculo poderia ser reduzido neste processo (Tabela 3). As elevadas concentrações de etanol atingidas na estratégia apresentada no presente estudo (100 g/L) aliadas à boa atuação do preparado celulásico de *P. funiculosum* sobre a celulignina de bagaço de cana, sinalizam uma

possível utilização deste produto enzimático para produção de etanol de segunda geração em escala produtiva. Os resultados mostrados neste estudo, utilizando processo SSF alimentado, são bastante promissores quando comparados aos estudos recentes reportados na literatura (Tabela 3). Nota-se que a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, com o processo SSF, utiliza baixas concentrações de sólidos iniciais (menor ou igual a 10%). Na estratégia adotada no presente trabalho, optou-se pela utilização de altas concentrações de sólidos que assegurassem altas concentrações de etanol, já que esta é uma condição *sine qua non* para a viabilidade técnico-econômica de processos químicos e bioquímicos, particularmente quando a tecnologia de produção envolve produtos de baixo valor agregado.

Tabela 3. Condições empregadas no SSF para produção de etanol encontradas na literatura

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	FPase (FPU/g)	β-glicosidase (U/g)	Teor de sólidos (%)	Microorganismo	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Qp (g/L.h)	Referência
Bagaco de cana	H ₂ SO ₄ e NaOH	12h	12,5	28,0	33	<i>S. cerevisiae</i> JP1	15,0	97,5	106	0,92	Maeda (2010)
Rejeito da indústria de cellulose	Não	16 h	17,5	—	20	<i>S. cerevisiae</i> JP1	8,0	74,6	48	1,55	Silva (2010)
Cavaco de <i>Pinus</i>	H ₂ SO ₄ e NaHSO ₄	12 h	15,0	22,5	8	<i>S. cerevisiae</i>	2,0	41,8	—	—	Zhu et al. (2010)
Palmiste	Não	48 h	6,0	—	30	<i>S. cerevisiae</i> panificação	7,0	70,0	216	0,32	Jorgensen et al. (2010)
Madeira de oliva	Explosão com vapor (SO ₂) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	<i>S. cerevisiae</i>	—	29,4	72	0,41	Ruiz et al. (2006)
Caule de girassol	Explosão com vapor (SO ₂) e deslignific. peróxido alcalino	Não	15,0	12,6	10	<i>S. cerevisiae</i>	—	20,9	72	0,29	Ruiz et al. (2006)
Bagaco de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	26,0	17	30	<i>S. cerevisiae</i> panificação	6,0	70,0	50	1,21	Vásquez (2007)

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Material	Pré-tratamento	Pré-HE	Fase (FPU/g)	β-glicosidase (UI/g)	Teor de sólidos (%)	Microorganismo	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Tempo (h)	Qp (g/L.h)	Referência
Bagaco de cana	Ácido e deslignific. com NaOH	12 h	25,0	—	23	<i>Z. mobilis</i>	4,0	60,0	36	1,66	Santos et al. (2010)
Sabugo de milho	Ácido (H ₂ SO ₄)	48 h	8,0	—	12,5	<i>K. marxianus</i>	10,0	5,68	48	0,12	Zhang et al. (2010)
Silagem de milho	Hidrotérmico	24 h	30,0	—	13	<i>S. cerevisiae</i> panificação	0,2	20,0	194	0,10	Xu et al. (2012)
Palha de milho	Explosão com vapor (SO ₂)	16 h	10,0	16,7	10	<i>S. cerevisiae</i> panificação	1,0	26,7	96	0,28	Ölğren et al. (2005)
Palha de trigo	Explosão com vapor (H ₂ SO ₄)	Não	15,0	12,6	10	<i>K. marxianus</i>	0,2	0,6	72	0,01	Ballesteros et al. (2006)

Uma vez que as primeiras horas de fermentação apresentaram a produtividade (Q_p) dentro do observado em fermentações industriais convencionais, e esta concepção o processo foi limitado exclusivamente pela hidrólise enzimática, esforços na melhora do processo devem focar nesta última etapa e não no processo fermentativo. Sabe-se que a cinética enzimática de reações *Michaelianas* é de primeira ordem até se atingir a velocidade máxima de reação, sendo a velocidade da reação influenciada pela concentração de substrato. Logo, com o consumo do substrato no decorrer do processo, seria de se esperar que a velocidade de hidrólise da celulignina se reduzisse ao longo do tempo, entretanto, o pulso de alimentação de celulignina não foi capaz de retomar a velocidade máxima. Outro fator que pode explicar a redução da velocidade de reação, a qual limita as taxas do processo SSF, é a liberação da lignina com o consumo de substrato, provocando ligações improdutivas entre essa macromolécula polifenólica e as enzimas celulolíticas (DUARTE et al., 2012).

Considerações finais

As questões ambientais têm trazido preocupações à sociedade moderna. A queima de combustíveis fósseis e o desmatamento florestal fazem com que grandes quantidades de gases permaneçam na atmosfera. Para minimizar este problema, em 1997, foi estabelecido um acordo para redução das emissões gasosas, denominado de protocolo de Kyoto. Com este tratado, medidas para redução desses gases foram criadas, dentre elas a utilização de biomassas como fonte de energia alternativa ao petróleo (PEREIRA JUNIOR et al., 2008).

Nesse contexto, têm-se intensificado Pesquisa e Desenvolvimento para a utilização, de forma mais diversificada, de matérias-primas renováveis em substituição às fontes fósseis, em particular os abundantes resíduos agrícolas e agro-industriais, denominados de biomassas residuais, como pode-se constatar na literatura especializada

por meio da publicação de diversos artigos nos últimos anos sobre o assunto. A utilização desses resíduos é de grande interesse e importância na medida em que não há demanda de aumento da extensão de áreas agricultáveis. O que se pretende é transferi-los da posição de poluentes sólidos para matérias-primas valiosas visando à produção de combustíveis e de outras substâncias químicas, com a implementação do conceito de Biorrefinaria. Os avanços nesta área sinalizam que, seguramente, o aproveitamento de matérias-primas renováveis, incluindo os resíduos, reverterá a dependência mundial pelas fontes fósseis. A busca por preparados enzimáticos eficientes para hidrólise de materiais lignocelulósicos, incluindo tanto as etapas de produção quanto de formulação, tem envolvido o uso de ferramentas estatísticas/matemáticas para a eficiente hidrólise das porções polissacarídeas desses materiais; modos de operação do processo de fermentação; busca por microrganismos naturalmente ocorrentes que produzam complexos enzimáticos equilibrados; e nos últimos anos, tem se intensificado estudos na área de Biologia Molecular focalizando a obtenção de linhagens hiperprodutoras de celulasas, exploração de novas enzimas e novas propriedades enzimáticas que, certamente continuarão a impulsionar o desenvolvimento desta importante área que se constitui em um dos gargalos para a produção de biocombustíveis e outras substâncias químicas no contexto de biorrefinaria de segunda geração.

Referências

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, Barking, v. 57, n. 1, p. 13-18, 1996.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, p. 4, 2010.

AWAFO, V. S.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K.; LÊ, G. B. B. Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, n. 57-58, n. 1, p. 461-470, 1996.

BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTORES, M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 129-132, p.496-508, 2006.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 3, 2010.

BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 29, n. 2, p. 154-168, 2000.

CARVALHO, M. L. A. **Otimização da produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M. L. A.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA JUNIOR, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 2, p. 151-158, 2010.

DE-PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 111-121, 1999.

DUARTE, G. C.; MOREIRA, L. R. S.; JARAMILLO, P. M. D.; FILHO, E. X. F. Biomass-derived inhibitors of Holocellulases. **BioEnergy Research**, New York, v. 5, n. 3, p. 768-777, 2012.

EL-NAWWI, S. A.; EL-KADER, A. A. Production of single cell protein and cellulase from sugarcane bagasse: effect of culture factors. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 361-364, 1996.

HAYWARD, T. K.; HAMILTON, J.; THOLUDUR, A.; MC MILLAN, J. D. Improvements in titre, productivity, and yield using solka-floc for cellulase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 859-874, 2000.

HENRISSAT, B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose**, London, v. 1, n. 3, p. 169-196, 1994.

JORGENSEN, H. A.; MORKEBERG, A.; KROGH, K. B. R.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 36, n. 1, p. 42-48, 2005.

JORGENSEN, H.; SANADI, A. R.; FELBY, C.; LANGE, N. E. K; FISCHER, M.; ERNST, S. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 161, n. 1-8, p. 318-332, 2010.

JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT20888-Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n. 3-4, p. 381-390, 2006.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; SZIJÁRTÓ, N.; RÉCZEY, K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 201-211, 2004.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÁCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 103-110, 2004.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 63-67, 1997.

KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 255-261, 1987.

KOTCHONI, O. S.; SHONUKAN, O. O.; GACHOMO, W. E. *Bacillus pumilus* BpPRI 6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 2, n. 6, p. 140-146, 2003.

LI, X. L.; LJUNGDAHL, L. G.; XIMENES, E. A.; CHEN, H.; FELIX, C. R.; COTTA, M. A.; DIEN, B. S. Properties a recombinat β -glucosidase from polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 113-116, p. 233-250, 2005.

LIMING, X.; XUELIANG, S. High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 corn cob residue. **Bioresource Technology**, Barking, v. 91, n. 3, p. 259-262, 2004.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, v. 5, p. 1100-1107, 2006.

LJUNGDAHL, L. G.; ERIKSSON, K. E. Ecology of microbial cellulose degradation. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 8, p. 239-299, 1985.

LYND, L. R.; WEMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAEDA, R. N. **Produção de celulases por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa de bagaço de cana pré-tratado e sua aplicação na produção de etanol de segunda geração.** 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

MASSADEH, M. I.; YUSOFF, W. M. W.; OMAR, O.; KADER, J. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 21, p. 1771-1774, 2001.

MIETTINEN-OINONEN, A. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry. Helsinki: University of Helsinki. 2004. 153 p.

MIYAMOTO, K. Cellulase production. In: MIYAMOTO, K. (Ed.). **Renewable biological systems for alternative sustainable energy production**. Rome: FAO, 1997. (FAO Agricultural Services Bulletin, 128). Chapter 3.

MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 39, n. 10, p. 1293-1297, 2004.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. **What is a biorefinery?** Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 05 ago. 2005.

NC-IUBMB. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 20 out. 2008.

OHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO₂-impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121-124, p. 1055-67, 2005.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.

PEREIRA JUNIOR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: UFRJ, Escola de Química, 2008. 47 p. (Series on Biotechnology, v. 2).

PORTNOY, T.; MARGEOT, A.; LINKE, R.; ATANASOVA, L.; FEKETE, E.; SÁNDOR, E.; HARTL, L.; KARAFFA, L.; DRUZHININA, I. S.; SEIBOTH, B.; CROM, S. L.; KUBICEK, C. P. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 269, 2011.

RIOU, C.; SALMON, J.; VALIER, M.; GÜNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryza*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

ROSGAARD, L.; PEDERSEN, S.; CHERRY, J. R.; HARRIS, P.; MEYER, A. S. Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. **Biotechnology Progress**, New York, v. 22, p. 2, p. 493-498, 2006.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 195-204, 2005.

RUIZ, E.; CARA, C.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; CASTRO, E. Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 129-132, p. 631-643, 2006.

SANTOS, D. S.; CAMELO, A. C.; RODRIGUES, K. C.; CARLOS, L. C.; PEREIRA JUNIOR, N. Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 161, n. 1-8, p. 93-105, 2010.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 4, p. 756-762, 2006.

SHIN, C. S.; LEE, J. P.; LEE, J. S.; PARK, S. C. Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, p. 237-245, 2000.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

SRIVASTAVA, K. K.; VERMA, P. K.; SRIVASTAVA, R. A recombinant cellulolytic *Escherichia coli*: cloning of the cellulase gene and characterization of a bifunctional cellulose. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 21, n. 4, p. 293-297, 1999.

STEPHEN, J. D.; MABEE, W. E.; SADDLE, J. N. Will second generation ethanol be able to compete with first generation? Opportunities for cost reduction. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 6, n. 2, p. 159–176, 2012.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 160–167, 1997.

UMIKALSOM, M. S.; ARIFF, A. B.; HASSAN, M. A.; KARIM, M. I. A. Kinetics of cellulase production by *Chaetomium globosum* at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 491-498, 1998.

VASQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de bioprocesso de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 190 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ.

VELDHUISEN, G.; SALOHEIMO, M.; FIER, M.; PUNT, P.; CONTRERAS, R.; PENTTILÄ, M.; VAN DEN HONDEL, C. Isolation and analysis of functional homologues of the secretion-related SARI gene of *Saccharomyces cerevisiae* from *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 256, n. 4, p. 446-455, 1997.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121-124, p. 93-104, 2005.

WOOD, T. M.; GARICA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 1, n. 2-3, p. 147–161, 1990.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulase and B-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 113-116, p. 1115–1126, 2004. Proceedings of the 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, May 2003.

XU, J.; THOMSEN, M. H.; THOMSEN, A. B. Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 1, p. 33-42, 2010.

ZHANG, C.; XING, X. H.; LIU, M. S. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 181-187, 2004.

ZHANG, M.; SHUKLA, P.; AYYACHAMY, M.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Improved bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 1041-1046, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; CUI, J. B.; LYND, L. R.; KUANG, L. R. A transition from cellulose swelling to cellulose dissolution by o-phosphoric acid: evidences from enzymatic hydrolysis and supramolecular structure. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v.7, n. 2, p. 644-648, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHU, J. Y.; ZHU, W.; BRYAN, O. P.; DIEN, B. S.; TIAN, S.; GLEISNER, R.; PAN, X. J. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 5, p. 1355-1365, 2010.

Petroquímica verde

Leandro Vieira dos Santos

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

A sociedade moderna é dependente do uso do petróleo e derivados para a sua manutenção e desenvolvimento. A principal aplicação é na forma de combustíveis líquidos, embora uma enorme variedade de outros produtos possa ser obtida a partir de fracionamento do mesmo como plásticos, asfalto, parafinas, cosméticos, detergentes, entre outros. Entretanto, tornou-se um consenso mundial a necessidade de substituição do petróleo por fontes alternativas de energia, especialmente as provenientes de fontes renováveis. Os motivos são de ordem econômica, como a progressiva diminuição das reservas naturais de petróleo e o custo cada vez mais elevado para a extração de novas reservas (e.g. o pré-sal), associados a preocupações envolvendo os prejuízos causados ao meio ambiente. Neste contexto, um substituto com características promissoras, renovável e com potencial para ser utilizado em larga escala pela indústria, é a biomassa.

Análoga ao petróleo, a biomassa vegetal também é um conjunto de compostos quimicamente distintos que podem ser fracionados gerando componentes com destinações específicas. Do mesmo

modo que uma refinaria petroquímica produz uma grande variedade de produtos a partir do petróleo bruto, os mesmos princípios podem ser aplicados a uma refinaria baseada em biomassa. O termo "Biorrefinaria" tem sido utilizado para descrever tal processo e pode ser definido como "uma facility para atingir grande escala de produção integrada de combustíveis, energia elétrica e químicos a partir de biomassa". Uma biorrefinaria tem a capacidade de utilizar diferentes matérias-primas, dependendo da disponibilidade das mesmas e preço de mercado, podendo substituir de forma eficiente todos os derivados de origem fóssil (MADSEN, 2007). Dentro do conceito de biorrefinarias, microrganismos podem ser utilizados como plataformas eficientes na conversão da biomassa vegetal em produtos de alto valor agregado. Como exemplo dessa aplicação, recentes avanços no campo da biologia molecular possibilitaram a modificação de microrganismos para utilizar novas rotas biossintéticas para produção de monômeros a partir de fontes renováveis (RINCONES et al., 2009).

Substituir o uso das reservas fósseis por fontes renováveis é um enorme desafio, que só pode ser superado por países com características competitivas relacionadas à disponibilidade de terras, qualidade de solo e clima. Nesse ponto, a liderança mundial brasileira na produção e uso economicamente viável de combustíveis renováveis foi assegurada por desenvolvimentos tecnológicos e investimentos realizados persistentemente durante as últimas décadas (GOLDEMBERG et al., 2008). O biocombustível mais utilizado no mundo é o etanol obtido a partir da extração e fermentação de açúcares presentes em diferentes matérias primas, o chamado etanol de primeira geração. Apesar de diversas matérias-primas poderem ser utilizadas no processo, o etanol produzido no Brasil é essencialmente advindo da cana-de-açúcar, considerada uma cultura de alta produtividade de biomassa e de extrema eficiência fotossintética, acumulando grandes reservas de sacarose que são extraídas e utilizadas no processo fermentativo. Em 2009, o Brasil alcançou a produção de 27 bilhões de litros, só ficando atrás dos EUA com 40 bilhões de litros, os dois maiores produtores mundiais (PERRONE et al., 2011).

O etanol de segunda geração ou etanol celulósico consiste na conversão dos polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal em etanol. Considerada uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento, o etanol celulósico pode ser produzido a partir de matérias-primas renováveis e de resíduos lignocelulósicos, que são gerados em grande quantidade pela agroindústria (BASTOS, 2007). As etapas para conversão de biomassa lignocelulósica vegetal em etanol se iniciam com o pré-tratamento da biomassa, cuja finalidade é aumentar a acessibilidade das fibras que compõem a parede celular vegetal à ação enzimática. Diversos processos estão sendo desenvolvidos a fim de minimizar a perda de açúcares e geração de inibidores que possam comprometer o processo fermentativo. Em seguida, um pool de celulasas e hemicelulasas são responsáveis pela liberação dos açúcares poliméricos que compõem as frações de celulose e hemicelulose da biomassa, podendo ser subsequentemente fermentados a etanol.

A enorme diversidade de biomassa lignocelulósica oferece grande variedade de matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção alcoólica além da cana, como: palha de trigo e de milho, *switchgrass*, madeiras, resíduos florestais, entre muitos outros. Com um mercado interno e externo com demanda cada vez maior para o etanol, torna-se necessário não somente a ampliação da produção tradicional pelo aumento da área agrícola, mas também o desenvolvimento de variedades geneticamente melhoradas que agreguem características promissoras ao desenvolvimento do processo de produção de etanol. Sendo a cana-de-açúcar uma cultura de elevada expressão socioeconômica, a obtenção de cultivares melhoradas possibilitaria o aumento do rendimento nacional, sem necessariamente aumentar a área plantada, não competindo com culturas destinadas a produção de alimentos. Com base em estudos de melhoramento, surge então um novo conceito: a cana-energia. A proposta, já existente há muitos anos, seria o do desenvolvimento de variedades geneticamente modificadas para produzir biomassa ao invés de apenas sacarose, ou seja, uma cana com maior fonte de fibras, mais celulose e mais produtividade (KIM; DAY, 2011). Dessa forma, se aumenta significativamente a quantidade

disponível de polissacarídeos por hectare de área plantada, e consequentemente se aumenta a energia conversível em etanol a partir da sua hidrólise. O desenvolvimento de variedades de cana-energia apresenta grandes perspectivas para o futuro da produção de bioetanol. Porém, o verdadeiro potencial é ainda desconhecido. É necessário o desenvolvimento de estudos que visem otimizar esse processo, combinando fatores como um eficiente pré-tratamento, enzimas e microrganismos utilizados, com um baixo custo de produção de etanol.

A fermentação de açúcar a etanol é realizada industrialmente pelas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em um processo já bem conhecido e estabelecido. O mosto oriundo da cana é misturado com as leveduras em dornas industriais para a conversão da sacarose a etanol. As condições estressantes impostas nas dornas durante a fermentação industrial; como pressões osmóticas devido às altas concentrações de açúcares, alta concentração de etanol, contaminação bacteriana, entre outras, leva à completa substituição da cultura iniciadora por linhagens dominantes endofíticas, melhor adaptadas ao processo (SILVA-FILHO et al., 2005). Basso et al. (2008) analisou, durante um estudo de 12 anos, o comportamento de 350 linhagens de *S. cerevisiae* em relação a características de interesse industrial desejáveis como floculação, rendimento, velocidade de fermentação, taxa de crescimento, capacidade de reciclo, produção de espuma e capacidade de implantação nas destilarias. Dentre as linhagens selecionadas, destacaram-se PE-2, CAT-1 e BG-1 por apresentarem desempenho eficiente e a habilidade de competir com as leveduras nativas, sobrevivendo e dominando o processo de fermentação industrial. Em 2008, PE-2 e CAT-1 foram usadas em aproximadamente 150 destilarias, representando 60% do etanol produzido no Brasil. Uma vez implantadas nas destilarias, as linhagens selecionadas reduzem os custos de produção de etanol não somente pelo aumento do rendimento, mas também por meio da redução do consumo de antiespumante. Tendo em vista o alto desempenho fermentativo, as linhagens PE-2 e CAT-1 estão sendo estudadas mais profundamente a fim de se compreender as características que as diferenciam em relação

às demais em escala industrial. Argueso et al. (2009), ao observarem que os estoques comercialmente disponíveis da PE-2 apresentavam grande variedade de cariótipos, selecionaram e caracterizaram uma colônia única, denominada JAY270. Análises moleculares mostraram que o genoma de PE-2 é altamente heterozigoto (2 SNPs/kb), tanto estruturalmente quanto a nível de nucleotídeos, apresentando polimorfismos estruturais entre cromossomos homólogos. A alta capacidade de adaptação de PE-2 às condições estressantes impostas em uma dorna de fermentação está diretamente ligada à arquitetura genômica heterogênea, tornando tais cepas ideais para a criação de uma nova geração de organismos industriais, idealizados para as novas tecnologias de produção de etanol e outros processos biotecnológicos.

Durante o processo de produção do etanol de segunda geração, a hidrólise da biomassa libera os açúcares constituintes das frações celulósicas e hemicelulósicas, representados por hexoses e pentoses. Embora alguns microrganismos sejam naturalmente capazes de fermentar pentoses a etanol, a levedura *S. cerevisiae* continua sendo o organismo de escolha para produção industrial em larga escala de etanol. Fatores que contribuem para a escolha de *S. cerevisiae* como organismo modelo, são a alta tolerância a etanol, alta capacidade fermentativa, crescimento em condições estritamente anaeróbicas e resistência a compostos inibitórios presentes no hidrolisado da biomassa (MATSUSHIKA et al., 2009). Enquanto *S. cerevisiae* pode rapidamente fermentar hexoses como glicose, frutose, manose e galactose, ela não consegue crescer ou fermentar as pentoses D-xilose e L-arabinose. E considerando a parcela significativa da biomassa lignocelulósica (20-35%) e a importância da fermentação da xilose para a eficiente produção de etanol celulósico, a modificação genética de linhagens de *S. cerevisiae* para inclusão das vias metabólicas para utilização de pentoses tem sido um foco de grande atenção em engenharia metabólica de leveduras (MAMMAN et al., 2008; VAN MARIS et al., 2007). Outro grande desafio é o de obter linhagens resistentes aos compostos tóxicos comumente liberados durante o processo e que inibem o microrganismo utilizado na fermentação.

Sob condições de alta temperatura e pressão, a xilose é convertida a furfural e similarmente, 5-hidroximetil furfural (HMF) é formado pela degradação de hexoses (BALAT, 2011). Cepas mais resistentes a esses compostos tóxicos já foram eficientemente produzidas por meio de engenharia evolutiva, associando, por exemplo, cultivos em série na presença dos inibidores, com um *screening* eficiente de leveduras mais resistentes a tais compostos (CAKAR et al., 2012). Visto que as mutações que tornam essas cepas mais resistentes ocorrem ao acaso, o sucesso desse método depende do desenvolvimento de um sistema eficiente de seleção dos mutantes obtidos.

Muitas são as barreiras e desafios a serem superados na produção de um sistema eficiente e economicamente viável na produção de bioetanol a partir da biomassa, especialmente abrangendo as principais etapas da produção. Para atingir esse objetivo é necessário lançar mão de novas estratégias, como o uso de biologia sintética para modificação de microrganismos e inclusão de novas rotas metabólicas, desenvolvendo biorrefinarias de alta eficiência não somente na produção de biocombustíveis, mas também na dos demais derivados de interesse industrial.

Referências

- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; CARVALHO-NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G. L.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. G. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 2, p. 2258-2270, 2009.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de; OLIVEIRA, A. J. de; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

CAKAR, Z. P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMAZ, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 171-182, 2012.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no Estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. São Paulo: Imprensa

Oficial do Estado de São Paulo, 2008. 152 p.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 7, p. 803-807, 2011.

MADSEN, M. The role of biomass in the future global energy supply. In: WORLD ENERGY CONGRESS, 20., 2007, Rome. **Energy trade in the WTO**. [S.l.]: World Energy Council, 2007. Disponível em:

<http://vbn.aau.dk/files/14071392/MichaelMadsen_WEC_Youth_Programme_paper.pdf>. Acesso em: 01 maio 2012.

MAMMAN, A. S.; LEE, J.-M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J.-S.; HWANG, J.-S. Furfural: hemicellulose/xylose derived biochemical. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 2, n. 5, p. 438-454, 2008.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, n. 1, p. 37-53, 2009.

PERRONE, C. C.; APPEL, L. G.; LELLIS, V. L. M.; FERREIRA, F. M.; SOUSA, A. M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Ethanol: an evaluation of its scientific and technological development and network of players during the period of 1995 to 2009. **Waste and Biomass Valorization**, New York, Heidelberg, v. 2, n. 1, p. 17-32, 2011.

RINCONES, J.; ZEIDLER, A. F.; GRASSI, M. C. B.; CARAZZOLLE, M. F. PEREIRA, G. A. G. The golden bridge for nature: the new biology applied to bioplastics. **Polymer Reviews**, London, v. 49, n. 2, p. 85-106, 2009.

SILVA FILHO, E. A. DA; MELO, H. F. DE; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B. DOS; MONTE RESENDE, A. DO; SIMÕES, D. A.; MORAIS JUNIOR, M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005.

VAN MARIS, A. J. A.; WINKLER, A. A.; KUYPER, M.; LAAT, W. T. A. M.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose Isomerase as a key component. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 179-204, 2007.

Desafios na produção de biocombustíveis e moléculas renováveis a partir de cana-de-açúcar empregando microrganismos recombinantes

Amanda de Souza

Rodrigo P. C. Ramirez

Wilson A. Araujo

Introdução

A cana-de-açúcar é cultivada há quase cinco séculos no Brasil. Atualmente, 50% da sacarose de cana-de-açúcar produzida no país é destinada à produção de açúcar e a outra metade, à produção de etanol. Em 2007, a área plantada com cana-de-açúcar para a produção de etanol era de 3,4Mha, correspondente a 1% da terra arável do país. O Estado de São Paulo é responsável por 63% do etanol produzido no Brasil, enquanto a maior expansão do setor vem acontecendo na região Centro-Oeste, em áreas degradadas de pasto (CRUZ, 2010).

A cana-de-açúcar apresenta grande potencial como matéria-prima para produção de moléculas renováveis e, nos últimos anos, diversas empresas internacionais tem investido no setor sucroalcooleiro. A utilização da cana-de-açúcar para produção de moléculas renováveis demandará ajustes nas etapas do processo atual ou mesmo implicará em arranjos de processos integralmente diferentes dos empregados atualmente nas usinas. Apresenta-se na Figura 1 o fluxograma típico

de produção de açúcar e etanol, onde se destacam as principais etapas de processos que potencialmente demandarão nova configuração.

Neste trabalho apresentam-se alguns pontos fundamentais a serem considerados desde as etapas iniciais de desenvolvimento de um novo bioprocessos, considerando-se o atual contexto das usinas brasileiras, de forma a garantir um scale-up bem sucedido e viabilidade econômica.

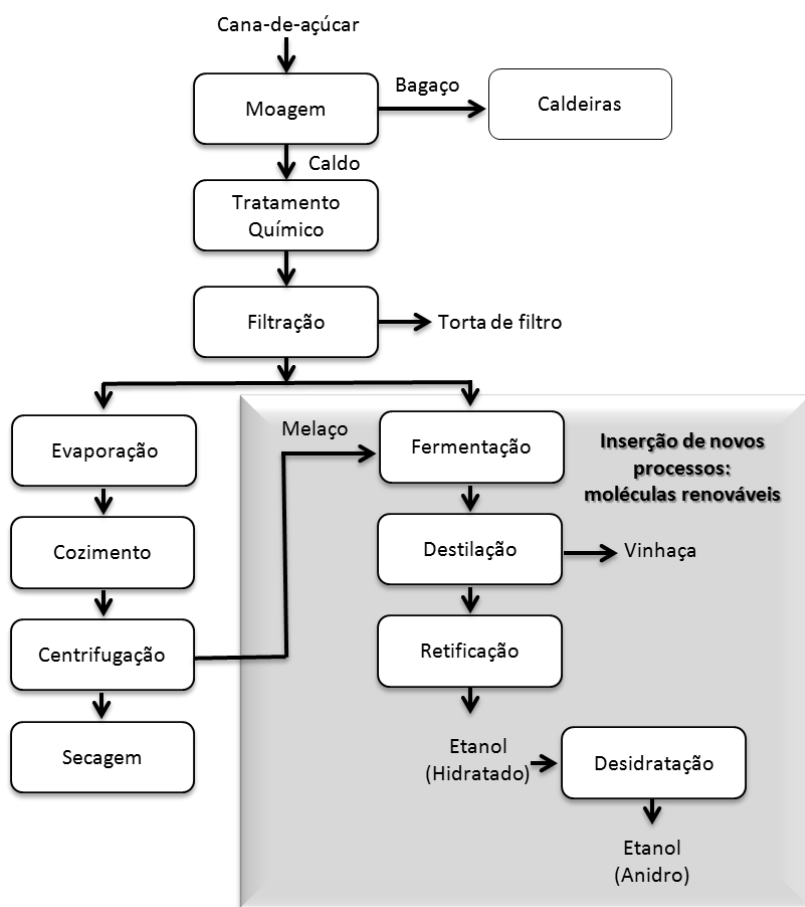


Figura 1. Fluxograma da produção de açúcar e etanol. Adaptado de Seabra (2008).

Desafios na produção de moléculas renováveis a partir de cana-de-açúcar

Um dos grandes desafios presentes na fermentação de caldo e melaço de cana-de-açúcar é a competição entre o microrganismo utilizado no processo e os diferentes tipos de microrganismos presentes nessas duas matérias-primas (AMORIM et al., 2011).

De acordo com Nolasco Junior (2005), de todas as perdas determinadas do setor sucroalcooleiro, 30 a 60% estão relacionadas à produção de etanol. Grande parte deste valor é devido à presença de contaminantes no processo de fermentação, já que as unidades de produção no Brasil não trabalham em condições assépticas.

As leveduras presentes no processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar podem ser classificadas em 3 grupos (TOSETTO, 2002):

- Seleccionadas: compradas ou cultivadas para serem utilizadas nos inóculos do início da safra.
- Nativas: leveduras encontradas no processo. Apresentam desempenho de fermentação adequado, porém, são diferentes das cepas seleccionadas.
- Selvagens: não apresentam desempenho fermentativo adequado. Comumente não são *Saccharomyces*. Oportunistas, normalmente dominam o processo em situações anormais.

Gallo (1989) realizou um levantamento das bactérias contaminantes de fermentação de etanol presentes no creme de levedura diluído, antes da adição de ácido sulfúrico. Foi encontrado que 98,25% são bactérias Gram positivas, 87,76% são bastonetes e 73,95% são não-esporulados. O gênero *Lactobacillus* foi o mais frequente (59,75%), seguido de *Bacillus* (26,58%) e *Staphylococcus* (8,76%).

Muitos levantamentos foram realizados anteriormente para identificar os microrganismos contaminantes presentes no mosto de cana-de-açúcar. Entre as leveduras encontradas, foram identificadas cepas *Saccharomyces* spp., *Picchia* sp., *Zygo Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Candida* spp., *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Debaryomyces hansenii* (CABRINI; GALLO, 1999; BASÍLIO et al. 2008).

Na Tabela 1 apresenta-se uma visão geral sobre contaminação nas usinas produtoras de etanol, com dados obtidos da literatura e a partir de monitoramento de rotina de três unidades industriais da região Centro-Sul (ANDRIETTA et al., 1997; SOUZA-LIBERAL et al., 2005; DUNCAR; COLMER, 1964; OLIVIA-NETO; YOKOYA, 1991; CABRINI; GALLO, 1999).

Tabela 1. Resumo de dados sobre contaminação nas usinas de fermentação alcoólica obtidos a partir de literatura e de monitoramento de rotina de três unidades industriais da região Centro-Sul.

Etapas do Processo	Cana-de-açúcar	Caldo Primário	Caldo secundário	Caldo Clarificado (Saída do Decantador)	Água	Melaço	Tanque de Melaço	Entrada do Trocador de Calor	Saída do Trocador de Calor	Fermentador
Dados de contagem bacteriana em usinas	Usina A - 10 ⁵	Usina A - 10 ⁶	Usina A - 10 ⁶	Usina A - 10 ³	Usina A < 10	Usina A - 10 ³	Usina A - 10 ⁴	Usina A - 10 ²	Usina A - 10 ³	Usina A - 10 ⁷
	Usina B - 10 ⁶	Usina B - 10 ⁶	Usina B - 10 ⁶	Usina B - 10 ⁴	Usina B - 10 ⁴	Usina B - 10 ²	Usina B - 10 ³	Usina B - 10 ⁵	Usina B - 10 ⁵	Usina B - 10 ⁶
	Usina C - 10 ⁶	Usina C - 10 ²	Usina C - 10 ²	Usina C - 10 ²	Usina C - 10 ²	Usina C - 10 ²	Usina C - NA	Usina C - NA	Usina C - 10 ²	Usina C - 10 ⁷
Bactérias mais encontradas de acordo com a literatura	<i>Lactobacillus</i> 59,75%, <i>Bacillus</i> 26,58%, Gram + 98,52%, Gram - 1,48%, Esporuladas 26,05%, Não-esporuladas 73,95%									
Dados de contagem de leveduras de acordo com a literatura	<10 ¹ , 10 ³ - 10 ⁴									
Leveduras mais encontradas de acordo com a literatura	<i>Candida entomophila</i>									
	<i>C. rugosa</i>									
	<i>Pichia guilliermondii</i>									
	<i>S. cerevisiae</i>									
	<i>S. uvarum</i>									
	<i>S. bayanus</i>									
	<i>S. coreanus</i>									
Leveduras mais encontradas de acordo com a literatura	<i>S. cerevisiae</i>									
	<i>S. uvarum</i>									
	<i>S. bayanus</i>									
	<i>S. coreanus</i>									
	<i>S. chevallieri</i>									
	<i>S. chevallieri</i>									

*Métodos para contagem de leveduras não são específicos para selecionadas, nativas ou selvagens.

Embora muitos contaminantes, incluindo leveduras selvagens, possam produzir etanol, a contaminação é um obstáculo no setor, pois pode reduzir o rendimento fermentativo. Porém, esse obstáculo torna-se muito mais crítico em um processo de produção de novas moléculas baseado na utilização de microrganismos recombinantes, uma vez que o sucesso deste depende da permanência dos microrganismos geneticamente modificados ao longo da produção. Consequentemente, melhores práticas de limpeza e sanitização de equipamentos serão requeridas como parte da estratégia operacional.

A complexidade observada na área de fermentação das usinas exige que pesquisadores adotem, ainda nas bancadas, uma abordagem multidisciplinar no intuito de desenvolver pacote tecnológico economicamente viável. É fundamental que no plano de pesquisa sejam incluídos cenários críticos de desvios de processo conhecidos pela indústria de etanol, no intuito de se mitigar potenciais desvios operacionais (causados por contaminação) durante o *scale-up*.

É preciso assegurar que a propriedade intelectual seja protegida de forma integral: microrganismo recombinante e tópicos de engenharia. A proteção da propriedade intelectual facilitará a concretização de parcerias entre iniciativa pública e privada com potencial para gerar patentes estratégicas que auxiliarão a consolidação do Brasil como país chave em uma economia sustentável.

A análise dos resíduos é também um ponto fundamental a ser considerado nos projetos de pesquisa de novas tecnologias. Atualmente, a vinhaça gerada no processo de destilação do vinho é utilizada como fertilizante, prática conhecida como fertirrigação. Entre os benefícios de tal prática, destacam-se a redução nos gastos com fertilizantes comerciais (a vinhaça supre a demanda de potássio e parte da demanda de nitrogênio e fósforo), a eliminação de alternativas de descarte sem impacto ambiental e a existência de uma fonte de irrigação de fácil acesso nos períodos de seca. Em uma tecnologia em que o resíduo não possa ser aplicado com esta finalidade, a

unidade industrial teria impactos com investimento para destinação alternativa, além dos gastos com fertilizantes comerciais. Portanto, as características do resíduo podem impactar diretamente na viabilidade econômica de uma nova tecnologia. Assegurar a conformidade com a Legislação Ambiental e regulamentações estabelecidas para organismos geneticamente modificados é mandatório.

Considerações Finais

O presente trabalho não teve a pretensão de esgotar o assunto contaminação e desafios de introdução de novos bioprocessos no setor sucroalcooleiro para produção de moléculas renováveis. Mas sim, incentivar a reflexão e discussão por parte de cientistas, engenheiros e executivos, acerca de alguns pontos críticos importantes no processo de inserção de novas tecnologias nesta indústria. É crucial que líderes de projetos desta natureza e seus pesquisadores procurem conhecer especificidades do cenário onde o futuro pacote tecnológico será inserido. Recomenda-se abordagem multidisciplinar, na qual cientistas e engenheiros, em conjunto com executivos, realizem frequentes avaliações econômicas, legais e regulatórias, durante a rotina de pesquisa.

Referências

- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Métodos de caracterização de leveduras de processos utilizando parâmetros cinéticos e produção específica, **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 32-35, 1997.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L.; MORAIS, J. O. F.; SILVA FILHO, E. A.; MORAIS JUNIOR, M. O.; SIMÕES, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel and ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 4, p. 322-326. 2008.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, 1999.

CRUZ, C. H. de B. Bioenergia da cana-de-açúcar no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. Prefácio.

DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R.; Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Applied Microbiology**, Washington, v. 12, p. 173-177, 1964.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. 1989. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas . Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

NOLASCO JUNIOR, J. **Desenvolvimento de processo térmico otimizado para mosto de caldo de cana-de-açúcar na fermentação alcoólica**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, Campinas, SP.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht v. 10, n. 6, p. 697-699, 1994.

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas, SP.

SOUZA-LIBERAL, A.; SILVA-FILHO, E.; MORAIS, J.; SIMOES, D.; MORAIS, M. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2005.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

Conclusões

João Ricardo M. de Almeida

O “I Simpósio Nacional de Microrganismos em Agroenergia: da prospecção aos bioprocessos” (SiMA) teve por objetivo acompanhar e discutir o estado da arte e as principais oportunidades e desafios técnico-científicos para o desenvolvimento de bioprocessos por rota microbiana. Especialistas de Universidades, Institutos de Pesquisa e Empresas nacionais e estrangeiras discutiram tópicos dentro de três grandes temas: acesso ao patrimônio genético microbiano, novas tecnologias para a produção de biocombustíveis e microrganismos para a produção de químicos renováveis. Abaixo, seguem as principais conclusões dos tópicos discutidos durante o SiMA:

- Nota-se que o desenvolvimento de bioprocessos baseados em microrganismos tem ganhado destaque pela necessidade de estabelecer processos industriais mais favoráveis ao meio ambiente que sejam economicamente viáveis. No campo da Agroenergia, os microrganismos já têm sido empregados largamente em processos fermentativos para a produção de biocombustíveis de primeira geração. Além disso, tem o potencial de ser empregados na produção

de biocombustíveis e químicos com alto valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica.

- O uso da biodiversidade microbiana brasileira para a fabricação de biocombustíveis, produtos químicos e outros insumos, tais como enzimas, crescerá nos próximos anos. A legislação vigente, a qual estabelece normas específicas para a coleta, acesso e uso do Patrimônio Genético Brasileiro, precisa ser seguida. Porém, tem-se claro que as normas de coleta, acesso e uso do Patrimônio Genético Brasileiro tem dificultado atividades de Pesquisa e Desenvolvimento. Sugere-se que tais normas sejam mais flexíveis para facilitar atividades de Pesquisa em Instituições Públicas Brasileiras.
- Os bancos de germoplasma microbiano, tais como as coleções de microrganismos da Embrapa, além de serem de grande importância para a manutenção da biodiversidade, representam um acervo de elevado valor para atividades de desenvolvimento científico e tecnológico.
- Estratégias de seleção de bibliotecas metagenômicas são importantes ferramentas para a obtenção de novas enzimas hidrolíticas. De fato, várias glicosil hidrolases têm sido identificadas a partir do *screening* de uma biblioteca metagenômica de rúmen de caprinos.
- Leveduras selecionadas por apresentarem características de dominância e persistência nas fermentações industriais com reciclo de células ao longo da safra de cana-de-açúcar são responsáveis pela produção de cerca de 70% de todo o álcool fabricado no país. O processo de seleção de leveduras personalizadas para processos de produção de etanol deve considerar os contaminantes das fermentações industriais e suas características, a superioridade das leveduras selecionadas frente à contaminação bacteriana e a toxicidade por alumínio do mosto, assim como o processo de fermentação com alto teor alcoólico.
- A descoberta de enzimas fúngicas por meio da exploração da biodiversidade microbiana é essencial para a desconstrução eficiente da biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis e outros produtos de alto valor. A utilização de sistemas robotizados

facilita o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados para cada tipo de biomassa lignocelulósica, o que é essencial para a hidrólise enzimática.

- Melhorias no desempenho catalítico de enzimas hidrolíticas têm sido obtidas com o emprego de diferentes estratégias de engenharia de proteínas, tais como desenho racional (*rational design*) que combina simulações de dinâmica molecular e análise de estrutura tridimensional com mutações sítio dirigidas, evolução dirigida e engenharia de enzimas para criação de peptídeos quiméricos. Essas estratégias contribuem para o desenvolvimento de enzimas com alta eficiência / baixo custo, que são adequadas para inclusão em coquetéis destinados à hidrólise da lignocelulose.
- Muito progresso tem sido feito no desenvolvimento de celulasas e hemicelulasas com atividades específicas aumentadas e linhagens que fermentem hexoses e pentoses mais rapidamente e com rendimentos mais elevados. De qualquer forma, o melhoramento contínuo de microrganismos para produção de enzimas hidrolíticas e a aplicação de biologia sintética para a produção de vasta gama de biocombustíveis e coprodutos a partir de hexoses e pentoses deve continuar nos próximos anos.
- Um pré-requisito para tornar o processo de sacarificação da biomassa economicamente viável é o melhoramento do microrganismo produtor para obtenção de enzimas em altas concentrações e com elevado rendimento. Nesse sentido, diferentes estratégias de engenharia genética têm sido empregadas para compreender e modificar vias bioquímicas e regulatórias de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus nidulans*.
- A introdução de novos bioprocessos no setor sucroalcooleiro para produção de moléculas renováveis enfrenta vários desafios técnicos, econômicos e regulatórios. Portanto, as especificidades do setor exigem abordagem multidisciplinar para que haja sucesso na implantação de novas rotas de produção industrial de biocombustíveis e químicos sob o conceito de biorrefinarias.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

