

Romano, L.H.¹; Baptista Neto, A.²; Souza, C.P.³; Badino Júnior, A.C.⁴.

¹Centro Universitário Amparense.

²Universidade Estadual Paulista, Dep. Bioprocessos e Biotecnologia.

³Universidade Federal de São Carlos, Dep. Morfologia e Patologia

⁴Universidade Federal de São Carlos, Dep. De Engenharia Química.

REVIEW: APLICAÇÃO DE MICROORGANISMOS E BIOLOGIA MOLECULAR NA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA

Resumo

O modelo de sociedade atual é dependente do uso de combustíveis fósseis, sendo estes de fontes finitas e poluentes. As discussões políticas e econômicas relacionadas ao uso do petróleo mostram a extrema importância do estudo de fontes alternativas e renováveis. Essa energia sustentável pode ser proveniente de matérias-primas vegetais como soja, amendoim e, sobretudo, cana de açúcar. A presente revisão, tem como objetivo ressaltar a aplicação da biotecnologia na produção de organismos transgênicos e microrganismos geneticamente modificados com potencial de aplicação no aumento da disponibilidade e da qualidade da energia gerada. Ressalta-se que a microbiologia e as técnicas da biologia molecular, são ferramentas que podem otimizar processos existentes ou viabilizar o uso de fontes e materiais alternativos, diminuindo custos de produção e áreas de cultivos necessárias, como no caso da cana de açúcar, e ainda assim aumentem a disponibilidade energética.

Palavras Chave: Obtenção de Energia, Microrganismos, Biotecnologia, Biologia Molecular.

Introdução

A vida pós-motor à combustão é muito dependente da utilização de combustíveis fósseis, especialmente derivados do petróleo, sendo este o alicerce dos atuais sistemas de transporte, locomoção e a base de geração de energia térmica e termoelétrica em alguns países. Assim, o petróleo é uma fonte de energia vital, finita e altamente poluente (FERNIHOUGH e O'ROURKE, 2014).

Alternativamente, o etanol e o biodiesel não necessitam de grandes modificações no modo de vida e tecnologias atuais, sendo adequados aos motores já existentes e que utilizam os derivados do petróleo. Tanto o etanol (produzido a partir da cana de açúcar) e o biodiesel

(através de vários tipos de lipídeos de origem animal e vegetal) são produzidos de fontes renováveis.

Com a criação do Proálcool - Programa Brasileiro de Álcool em 1975, houve uma difusão do uso do etanol, porém sofrendo um período de estagnação por falta de investimento na tecnologia, mesmo com incentivos fiscais do governo.

Para a produção do etanol de 2ª e 3ª geração, ainda há a necessidade de pesquisas visando a obtenção de um processo de hidrólise enzimática viável economicamente, sendo também necessárias enzimas produzidas a baixo custo e em grande escala, sendo imperativo a aplicação de conhecimento de microbiologia e de biologia molecular.

O estudo da biodiversidade microbiológica, pode proporcionar a obtenção de microrganismos produtores de enzimas que podem ser empregadas em grande número de processos biotecnológicos, como a clivagem das cadeias de carbono da celulose, capacidade de gerar energia a partir de processos de óxido-redução de minérios, síntese de hidrogênio, produção de metano a partir de material orgânico e a conversão desse gás a metanol (CASTRO e PEREIRA, 2010). Porém, apesar das capacidades naturais de alguns microrganismos já serem notáveis, as ferramentas oferecidas pela biologia molecular, como por exemplo estudos do genoma de bactérias e fungos e a ativação gênica para melhoria das capacidades dos produtores, a replicação dos genótipos desejados em outros organismos, entre outras possibilidades envolvendo o DNA replicante, podem otimizar os resultados desejados, removendo a limitação do processo e aumentando o rendimento do produto.

Desta maneira o presente trabalho se propõem a discutir técnicas biotecnológicas de alterações do DNA, além de demonstrar a importância da aplicação da microbiologia e da biologia molecular na obtenção de bioenergia por fontes renováveis e ecologicamente corretas.

Análise Crítica

Objetivos Biotecnológicos das Mutações.

Além das mutações espontâneas que ocorrem nos microrganismos e das possibilidades que a biotecnologia oferece para induzir mutações aleatórias, os avanços da Biologia Molecular permitem a síntese e inserção de sequências definidas de segmentos do DNA. Mutações específicas promovem uma maneira mais eficiente de obtenção de mutantes com as características desejadas, inclusive termo-estabilidade, especificidade para determinadas fontes

de nutrientes, como por exemplo os compostos celulósicos (GRISOLIA, 2013).

As mutações sítio-específicas podem envolver mais que uma característica, a exemplo do trabalho de Hayashi, Kato e Furukawa (2012) com *Zymomonas mobilis*. A bactéria com genes que geraram deficiência na produção de NADH, expressou produção três vezes maior de etanol, além de maior termo estabilidade quando comparado com a linhagem normal.

Microrganismos geneticamente modificados podem ser utilizados de modo direto ou indireto visando aumentar a produção energética. A prospecção de microrganismos resistentes aos efeitos de inibição do etanol é desejável no processo de produção do mesmo. Stanley, et al (2010) obtiveram mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* que toleravam até 9% de etanol (v/v). Esse percentual já havia sido alcançado, porém com perda das características da levadura e da capacidade de produção e metabolização de substâncias, fato que não ocorreu com os mutantes chamados pelos autores de C1 e SM1.

Para a produção de enzimas os mutantes, com maior capacidade de expressão do produto, são utilizados, visando obter maiores quantidades de enzimas comparadas com as linhagens selvagens. A expressão heteróloga é uma opção que pode melhorar a produção de maneira geral. Um exemplo da aplicação dessa técnica é a produção de xilanase de *Thermomyces lanuginosus*, expressada na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (DAMASO et al, 2003), que pode ser utilizada na obtenção de etanol de 2ª geração.

Algumas características podem ser detectadas em alguns indivíduos de um grupo através de pressão seletiva e melhoramento genético, visando a obtenção de mutantes altamente produtivos. A produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* e produção de etanol por *Escherichia coli*, que recebeu um plasmídeo proveniente de *Clostridium* sp para a produção de etanol (CHANDEL et al, 2011) são exemplos de mutações como esse enfoque.

Por fim, destaca-se também a possibilidade de geração de biocombustíveis de 3ª geração, a partir de biomassa exclusivamente utilizada na produção de energia, como no caso de microalgas que podem ser alteradas geneticamente para alcançar produções cerca de 10 a 100 vezes maior que os obtidos de 1ª e 2ª (MOTA e MONTEIRO, 2013).

Conversão de Açúcares em Etanol: Fermentação alcoólica

A visibilidade do etanol aumentou devido ao protocolo de Kyoto (LIVERMAN, 2009), que tinha como meta a redução da emissão de CO₂ em 5%. O etanol é o primeiro biocombustível que possibilitou a substituição de um combustível fóssil e o seu desenvolvimento no Brasil foi

graças ao PRO-ALCOOL que foi um programa do governo brasileiro visando a diminuição da dependência nacional do barril de petróleo, que apresentou um forte aumento de preço no início da década de 70.

As plantas convertem os carboidratos gerados durante a fotossíntese em polissacarídeos como o amido e a sacarose, alvos principais da geração de bioetanol. A fermentação das pentoses é um processo amplamente reconhecido em *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*. No entanto, devido a condições de cultivo, dificuldade de adaptação de condições *in vitro* ou limitação da maquinaria celular, os genes responsáveis por essa produção são identificados, isolados e inseridos em outros microrganismos como o *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli*, possibilitando melhorias na produção (CHANDEL et al, 2011).

Celuloses e Enzimas Microbianas com Aplicação na Geração de Energia

As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, que são estruturas complexas muito resistentes. Esses três componentes correspondem a 97-99% de toda massa seca dos materiais. As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, e são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. As endoglucanases (EnG) clivam ligações internas da fibra celulósica. As exoglucanases (ExG) atuam na região externa da celulose e β -glicosidases (BG), hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO E PEREIRA, 2010).

A busca de microrganismos que produzam enzimas que degradam celuloses destaca os microrganismos endofíticos como possíveis produtores dessas enzimas, devido a sua interação com as plantas. Yaşınok, Şahin e Haberal (2009) ressaltam trabalhos com microrganismos endofíticos produtores de enzimas hidrolíticas, degradadoras de matérias orgânica, como *Bacillus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Scytalidium spp.* e *Rhizopus spp.* relatando a importância da otimização das condições de cultivo para o aumento da produção.

Segundo Nascimento et al, (2009) o Brasil produz 1,9 milhões de toneladas de grãos provenientes apenas das indústrias de cerveja por ano, dos quais 9 a 25% são matéria seca que podem ser aproveitados nas indústrias, por exemplo, de alimentos, bioetanol com a aplicação enzimática. *Streptomyces malaysiensis* AMT3, linhagem isolada de solo do cerrado brasileiro, produtor de CMCCase (carboximetilcelulases) se demonstrou um potencial produtor segundo

Nascimento et al, (2009), chegando a uma produção máxima de 719 U l⁻¹ em pH 4 e 50° C.

O trabalho de El-Sersy et al (2010) relata a linhagem marinha de *Streptomyces ruber* como um promissor produtor de enzimas celulolíticas. Em testes de cultivo em meio sólido contendo substratos de celulose, esses microrganismos geraram um halo de clareamento indicativo da ação enzimática de 25 mm. Para *S. alanosinicus* e *S. gancidicus*, os autores observaram halos com até 15 cm. Essa capacidade de produção pode ser isolada e transferida a outros microrganismos ou mesmo melhoradas em seus produtores naturais.

Diferente da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, alguns fungos filamentosos e outras leveduras produzem etanol em condições aeróbicas, como exemplo a literatura ressalta os gêneros *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Neurospora* e *Paecilomyces*. Enquanto bactérias como *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Leuconostoc* spp e *Lactobacillus* spp produzem o etanol em condições anaeróbicas. Destacam-se entre as bactérias algumas linhagens com capacidade de resistir a temperaturas elevadas: as termófilas. As principais produtoras relatadas são: *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydrosulfurium*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. thermosulfurogenese* e *Thermoanaerobacter ethanolicus* (CHANDEL et al, 2011). Os microrganismos naturalmente produtores de etanol são alvos de estudos genéticos que visam o aumento da produção e melhorias de processo.

No Brasil o substrato mais comumente empregado para a produção de etanol é a cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e o microrganismo utilizado no processo é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Substratos contendo celulose também podem ser utilizados, desde que a produção seja combinada com diferentes microrganismos. A exemplo, fungo o *Trichoderma reesei* converte a celulose em hexose e *Saccharomyces cerevisiae* pode aproveitar o resultado da ação do *T. reesei* e converter as hexoses em etanol (MOTA e MONTEIRO, 2013).

Trabalhos como o de Zhang, Qian e Ma, (2013) com *Flavobacterium* spp. provam a possibilidade de aumento significativo de produção enzimática e possibilitam a produção em condições diferenciadas (CO₂ em condições críticas) com a utilização de mutantes, possibilidade que pode evitar contaminações em processo ou mesmo a garantia do crescimento apenas dos mutantes direcionados para as condições e características desejadas.

Trichoderma spp. é o produtor de enzimas aplicáveis na obtenção de biocombustíveis de segunda geração. Trabalhos (Derntl et al, 2013) que provocaram uma mutação no gene regulador da produção enzimática (Xyr1) dispensando o uso de indutores no processo,

tornando-o mais viável e econômico, são indispensáveis para o progresso dessa tecnologia.

Trichoderma reesei é um dos principais fungos utilizados nos estudos sobre etanol de segunda geração, possuindo linhagens altamente produtoras de enzimas aplicáveis no processo. Porém, a produção por esta linhagem é limitada, assim como a maioria dos produtores de celulases, sendo necessária a presença de um indutor. Alternativamente, Derntl et al, (2013) desenvolveram uma linhagem mutante de *Trichoderma* spp. com uma única mutação pontual no gene que codifica para o regulador de xilanase 1 (Xyr1), podendo dispensar o uso de indutores e manter uma elevada produção de celulase e endo-xilanase.

Estudos com genes aparentemente não ligados a produção de etanol também podem ser de grande valia para a indústria. Hayashi, Kato e Furukawa (2012), observaram que os mutantes de *Zymomonas mobilis* com deficiência na atividade de NADH são propensos a maior crescimento aeróbico, maior produção de etanol (3 vezes mais) e maior termo tolerância, quando comparados com as linhagens sem essa deficiência.

O trabalho de Nwachukwu et al, (2012) com cepas mutantes de *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, no qual foram obtidos mutantes produtores de etanol a partir de glicerol em concentrações de até 50 g/l de glicerol, gerando 20 g/l de etanol. Ressalta-se que a produtividade pode ser aumentada se no processo forem utilizados subprodutos (glicerol) provenientes do biodiesel. As microalgas mutantes obtidas por Anandarajah et al, (2012) tiveram a capacidade de aumentar a produtividade de lipídeos em 22% em comparação à linhagem selvagem das microalgas marinhas do gênero *Nannochloropsis*.

Produção de Biodiesel

A primeira patente sobre biodiesel foi depositada em 1980 pelo brasileiro Expedito Parente, relatando a produção de biodiesel por meio da trans-esterificação, a partir de plantas oleaginosas, através de rota química gerando que utiliza uma grande quantidade de hidróxido de potássio ou sódio e gera dois produtos: ésteres de ácidos graxos e glicerina (MOFIJUR et al, 2013). Nesse processo, as lipases oferecem uma alternativa para a produção de biodiesel por uma rota verde.

Existem muitos trabalhos na literatura envolvendo o uso de linhagens de *Streptomyces* na produção de lipases, entre elas *Streptomyces* spp. VITDDK3 (LAKSHMIPATHY et al, 2010) e *Streptomyces coelicolor* A3 (SOROR, RAO e CULLUM, 2009). O aumento de produção dessas linhagens foi associado à capacidade de resistência a metais pesados.

Outros trabalhos visam a produção de lipase em condições críticas (ZHANG, QIAN e MA, 2013), utilizando a técnica de engenharia genética, obtiveram um aumento de mais de 76% na produção de lipases produzida por espécie mutante de *Flavobacterium* spp.

Outra estratégia é a utilização de células programadas para a produção de biodiesel. Neste sentido, o trabalho de Steen et al, (2010) conseguiu um aumento de produção de 40 mg/L para 700 mg/L de produto, utilizando *Escherichia coli*.

Outra aplicação da biotecnologia é a obtenção de microalgas mutantes para aumentar a produção de lipídeos que serve como matéria prima para a produção de biodiesel, tal como descrito por Anandarajah et al, (2012) e por Zhang, Qian e Ma, (2013), aumentando o rendimento em termos de energia. Para a obtenção de mutantes, Radakovits et al, (2010) utilizou o Metano Sulfonato Etilico (EMS).

O aumento da concentração de substratos em cultivos de cianobactérias foi estudado por Radakovits et al, (2010). As microalgas acumulam quantidades significativas de triacilglicerol e amido de armazenamento (amilose e amilopectina) e possuem capacidade fotossintética de transporte de elétrons para a produção de H₂. Os estudos indicaram a possibilidade de aplicação industrial propondo a manipulação gênica de organismos já relevantes industrialmente (plantas superiores) e novas fontes como as microalgas, mostrando-se um promissor caminho da bioenergética atual.

Outros processos energéticos

O hidrogênio é o elemento mais abundante no universo, sendo sua combustão limpa e eficiente, liberando apenas água. O conceito da “pilha de H₂” é a produção de eletricidade através da reação do O₂ atmosférico com o H₂.

O trabalho de Radakovits et al, (2010) relata a alta capacidade fotossintética de uma microalga estudada que promove maior geração de H₂ aplicável em células combustíveis nas quais um catalisador quebra a molécula de hidrogênio em dois íons positivos e dois elétrons. O elétron circula por um circuito externo e o íon positivo (próton) atravessa uma membrana, recombinando com o elétron e mais a molécula de oxigênio (O₂) retirada do ar, formando vapor d'água e energia.

O uso de biogás é um processo já estabelecido que também pode ser utilizado para geração de energia, a matéria orgânica convertida em metano, é armazenado no gás a energia com potencial de utilização, sendo as *Archaeas* envolvidas na geração de metano conhecidas

como metanogênicas. Ressalta-se que o metanol (líquido) é de mais fácil transporte que o metano (gás), sendo produto intermediário na oxidação de metano ao gás carbônico. Um mutante pode ter seu genoma modificado para parar o processo na fase de produção de metanol.

Energia também pode ser obtida a partir de minérios, Bactérias que sequestram enxofre na produção de carvão, como *Thiobacillus ferrooxidans*, obtêm energia por oxidação de metais e pela liberação de compostos sulfúricos solúveis (H_2SO_4). Também há bactérias que pode realizar o processo com outros minérios, como o ferro.

Conclusões

É seguro afirmar a importância da busca por fontes de energia alternativas e renováveis. Os combustíveis fósseis são finitos, as hidrelétricas têm um impacto ambiental bastante relevante e a energia nuclear ainda oferece riscos de acidentes e gera resíduos de difícil descarte. Dessa maneira a Biotecnologia se apresenta como área ainda pouco explorada que pode colaborar de modo a atender o crescente aumento da demanda energética.

Conclui-se ainda que a biotecnologia aplicada para o avanço do setor energético possui amplas possibilidades tanto em aumento da disponibilidade de matéria prima quanto em produtores principalmente de enzimas capazes de converter essa matéria em energia. Sendo as pesquisas com microrganismos mutantes um campo cada vez mais promissor e as aplicações biotecnológicas uma realidade em uso, a bioenergia apresenta-se como uma alternativa viável para obter soluções cada vez mais eficientes frente à crescente demanda de energia.

Referências Bibliográficas

- ANANDARAJAH, K.; MAHENDRAPERUMAL, G.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. *Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels.* **Applied Energy**, v. 96, p. 371–377, 2012.
- CASTRO, A. M. e PEREIRA JR. N. *Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais.* **Química Nova**, v. 33, N. 1, p. 181-188, 2010.
- CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR1, G.; RADHIKA1, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. *Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions.* **Biotechnology and Molecular Biology**, V. 6, n. 1, p. 008–020, 2011.

- DAMASO, M.C.T. ; ALMEIDA, M.S. ; KURTENBACH, E. ; MARTINS, O.B. ; PEREIRA Jr., N. ; ANDRADE, C.M.M.C.; ALBANO, R.M. *Optimized expression of a thermostable xylanase from Thermomyceslanuginosus in Pichia pastoris*. **Applied Environmental Microbiology**, 69, p. 6064–6072, 2003.
- DERNTL, C.; SAVITCH, L. G.; SOPHIE, C.; WHITE, T.; MACH, R. L.; AIGNER, A. R. M. *Mutation of the Xylanase regulator 1 causes a glucose blind hydrolase expressing phenotype in industrially used Trichoderma strains*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 62, 2013.
- EL-SERSY, N. A.; ABD-ELNABY, H.; ABOU-ELELA, G. M.; IBRAHIM, H. A. H.; FERNIHOUGH, A and O'ROURKE, K., H.. *Coal and the European Industrial Revolution*. **NBER WorkingPaper**, N. 19802, 2014.
- GRISOLIA, C. K. *Bioterrorismo e a facilidade de acesso à biotecnologia e seus insumos*. **Revista Bioética**, v. 21, n. 2, p. 359-64, 2013.
- HAYASHI, T.; KATO, T; e FURUKAWA, K. *Respiratory chain analysis of high ethanol producing Zymomonasmobilis mutants*. **Applied Environmental Microbiology**, n. 78, p. 5622–5629, 2012.
- LAKSHMIPATHY, T. D.; PRASAD, A.S. A.; e KANNABIRAN, K. *Production of Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of Streptomyces Sp. VITDDK3-a Novel Halo Tolerant Actinomycetes Isolated from Saltpan Soil*. **Advances in Biological Research**, v.4, n. 2, p. 108-115, 2010.
- LIVERMAN, D. M. *Conventions of climate change: constructions of danger and the dispossession of the atmosphere*. **Journal of Historical Geography**, v. 35, p. 279–296, 2009.
- MOFIJUR, M.; MASJUKI, H.H.; KALAM, M.A.; ATABANI, A.E.; SHAHABUDDIN, M.; PALASH, S.M.; HAZRAT, M.A. *Effect of biodiesel from various feed stocks on combustion characteristics, engine durability and materials compatibility: A review*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 28, p. 441–455, 2013.
- MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S. *Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis*. **Química Nova**, V. 36, N. 10, p. 1483-1490, 2013.
- NASCIMENTO, R.P.; JUNIOR, N.A.; PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S. e Coelho, R.R.R.. *Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by Streptomyces malaysiensis*. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529-535, 2009.
- NWACHUKWU, R.; SHAHHBAZI, A.; WANG, L.; IBRAHI, S.; WORKU, M.; SCHIMMEL, K. *Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutante Enterobacteraerogenes*. **AMB Express**, v. 2, n.

20, 2012.

RADAKOVITS, R., JINKERSON, R. E., DARZINS, A., & POSEWITZ, M. C. *Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 4, p. 486-501, 2010.

SOROR, H.S; RAO, R; e CULLUM, J. *Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterisation of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of Streptomyces coelicolor A3(2)*. **Protein Engineering, Design & Selection**, v.22, n. 6, p. 333–339, 2009.

STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; ROGERS, P.; STANLEY, G. A. *Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, V. 37, p 139-149, 2010.

STEEN, E.J.; KANG, Y.; BOKINSKY, G.; HU, Z.; SCHIRMER, A.; McCLURE, A.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. *Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass*. **Nature**,v.463, n. 7280, 559-62, 2010.

YAŞINOK, A. E.; ŞAHİN, F. I. e HABERAL, M..*Isolation of Endopyhtic and Xylanolytic Bacillus pumilus Strains from Zea mays*. **TarimBilimleriDergisi**, v. 14, n. 4, p. 374-380, 2008.

ZHANG, Q.; QIAN, J.; MA, L. *Mutation breeding of lipase-producing strain Flavobacterium sp. by supercritical CO₂ with hydrazine hydrate*.**Brazillian Archives Biology and Technology**, v. 56, n. 4. 2013.