

## **ACOMPANHAMENTO DO COMPORTAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

**Thailys Campos Magalhães<sup>1</sup>; Ana Carolina de  
Santana Moura<sup>2</sup>, Miryam Torres dos Santos  
Cunha<sup>3</sup>; Tertuliano Ferreira Moreno<sup>4</sup>**

### **Resumo**

O emprego do etanol celulósico é uma potencial alternativa para um abastecimento contínuo de combustíveis renováveis. Pesquisas voltadas para a seleção de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas capazes de degradar a biomassa vegetal, constituem-se essenciais para a viabilização da produção e comercialização de etanol de segunda geração. O presente estudo teve por finalidade detectar a produção de enzimas celulolíticas, através da utilização de fungos filamentosos endofíticos para degradação da celulose e consequente produção de etanol celulósico. Três fungos filamentosos endofíticos foram avaliados quanto ao comportamento na degradação da celulose, para isto primeiramente foi realizado o preparo do meio de cultura e inoculação no meio de cultura tendo como substrato a celulose do papel e posteriormente foi realizado através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio a detecção de etanol celulósico. Constatou-se por indícios através da observação e da alteração na cor da mistura uma maior produção de etanol celulósico pelo Fungo 2. O papel foi parcialmente degradado, indicando a atividade celulolítica do fungo. A produção de etanol celulósico foi evidenciada, confirmando que é possível produzir etanol de segunda geração utilizando fungos filamentosos endofíticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** etanol celulósico; energias renováveis; biocombustíveis, bioenergia, biomassa.

1

---

1. Engenheira de Energia – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, thailys\_magalhaes@hotmail.com. 2. Graduanda em Engenharia de Energia – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, anacarolina.eng@gmail.com. 3. Graduanda em Engenharia de Energia – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, miryamscunha@gmail.com. 4. Graduando em Engenharia Química – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, tertuliano.f.m@gmail.com.

## Introdução

O crescimento contínuo da demanda mundial por energia aliada ao decorrente aumento no consumo de combustíveis fósseis impulsionam a procura por fontes renováveis para produção de energia, como os biocombustíveis, englobando os combustíveis de segunda geração derivados de biomassa lignocelulósica (NANDA et al., 2014).

Diante desse cenário, o emprego do etanol de segunda geração (2G) é uma potencial alternativa para um abastecimento contínuo de combustíveis renováveis (YUE et al., 2014), sem concorrência direta com cultivos alimentares e a possibilidade do aumento da produtividade em etanol sem a necessidade de aumento de área cultivada (BRETHAUER, STUDER, 2015; PEREIRA, 2012).

A geração de bioetanol celulósico, embora possua inúmeras vantagens ambientais, a degradação enzimática eficiente da celulose em glicose se apresenta como o principal gargalo a ser solucionado para a viabilização deste biocombustível (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2011).

No âmbito da produção de etanol 2G, as enzimas de degradação de material vegetal, a exemplo as celulases, são insumos que impactam significativamente no custo final do processo (LIU et al., 2016). Com o propósito de contornar este problema, um dos focos para a viabilidade da produção de etanol celulósico está na fabricação de enzimas lignocelulolíticas de baixo custo. Desta forma, faz-se necessário a seleção de microrganismos produtores de enzimas capazes de degradar a biomassa vegetal (FACHINNI et al., 2011).

A degradação da biomassa lignocelulósica advém de enzimas secretadas e produzidas por microrganismos, incluindo leveduras, bactérias e fungos filamentosos.

Dentre esses microrganismos, a fonte principal destas enzimas são os fungos filamentosos, pois são apropriados para a produção em concentrações altas (VALENCIA, CHAMBERGO, 2013; GUPTA et al., 2016). As celulases ou enzimas celulolíticas, são enzimas que atuam no polímero da celulose e são essenciais para o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica (FLORENCIO et al., 2017).

Dentre os fungos filamentosos, Os fungos endofíticos estão entre os mais relevantes para a produção de biocatalizadores enzimáticos. Configuram um conjunto de organismos muito variados e estão presentes na maior parte das plantas de ecossistemas, sem ocasionar sintomas externos (CORRÊA et al., 2014). São vistos como uma ótima fonte de compostos naturais bioativos novos (GUO et al., 2008) e, recentemente, tem provocado interesse devido ao fato de serem produtores de enzimas celulolíticas.

Deste modo, tais fungos representam uma excelente fonte de material biológico a ser pesquisada para a produção de enzimas lignocelulolíticas (CORRÊA et al., 2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo detectar a produção de enzimas celulolíticas através da utilização de fungos filamentosos endofíticos para degradação da celulose e consequente produção de etanol celulósico.

## Metodologia

### *A. Preparo do meio de cultura*

Para o preparo do meio de cultura foi necessário cozer 100 g de batata inglesa previamente descascados e cortados em rodela finas que foram colocadas em um 1L de água destilada por 20 minutos, procedimento esse realizado em uma autoclave, a 121 °C a 1 atm.



Posteriormente para servir como fonte de celulose, foram picados 400 g de papel. Foi distribuído 2 g de papel picado em 20 frascos de Erlenmeyer.

Após o cozimento da batata, foi realizado uma filtração do material, com papel filtro, para eliminação de possíveis resíduos sólidos, foi então completado com água destilada até chegar um total de 2 L. Com o auxílio de uma proveta, foi acrescentado 100 mL da mistura em cada Erlenmeyer e vedados com papel alumínio.

#### *B. Inoculação dos fungos no meio de cultura*

Após o cozimento da batata, foi realizado uma filtração do material, com papel filtro, para eliminação de possíveis resíduos sólidos, foi então completado com água destilada até chegar um total de 2 L. Com o auxílio de uma proveta, foi acrescentado 100 mL da mistura em cada Erlenmeyer e vedados com papel alumínio.

Foram utilizados no experimento três fungos filamentosos diferentes, denominados de Fungo 1, Fungo 2 e Fungo 3, por motivos de confidencialidades não será citado a espécie dos fungos. Estes foram individualmente pré-inoculados em placas de Petri contendo meio PDA e mantidos a 28 °C, por 7 dias, para a obtenção dos discos de inóculo de 8 mm de diâmetro.

Para a inoculação dos fungos no meio de cultura tendo como substrato a celulose encontrada no papel picado, foi acrescentado em uma câmara de fluxo laminar, com o fungo já inoculado, foi repicado em quatro partes e acrescentados em cada Erlenmeyer juntamente com o meio de cultura. Para motivos de comparação foi separado também um Erlenmeyer apenas com o meio de cultura, sem estar inoculado. As misturas inoculadas no meio de cultura foi mantidas sob agitação, em uma agitador orbital, durante duas semanas à 160 rpm.

#### *C. Detecção da presença de etanol*

Foi realizado a coleta do caldo da cultura para a verificação da presença de etanol através de RMN <sup>1</sup>H (Ressonância Magnética Nuclear

DIAS 02, 03, 04 DE DEZEMBRO DE 2020  
EDIÇÃO ESPECIAL ONLINE

de Hidrogênio). Para isto, transferido para o eppendorf a mistura de substrato com o microrganismo na centrífuga por 3 minutos para realizar a separação.

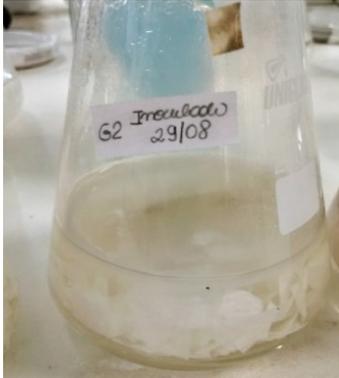
Após esse procedimento a mistura foi transportada para a câmara de fluxo laminar horizontal já anteriormente esterilizada, a pepeta, tubos de ressonância, ponteiras, filme de PVC e o eppendorf com o meio de cultura. Foi acrescentado no tubo de ressonância 60 µL de água deuterada (D<sub>2</sub>O) e 500 µL do filtrado da cultura.

Posteriormente o tubo com a mistura de água deuterada e filtrado da cultura foi levado ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, situado na Universidade Federal de Alagoas, onde foi colocado em um espectrômetro Bruker UltraShield 400 MHz, onde através de um software do equipamento gera curvas no computador, onde é possível determinar a quantidade de etanol na amostra, através de curvas específicas para essa substância.

### **Resultados e Discussões**

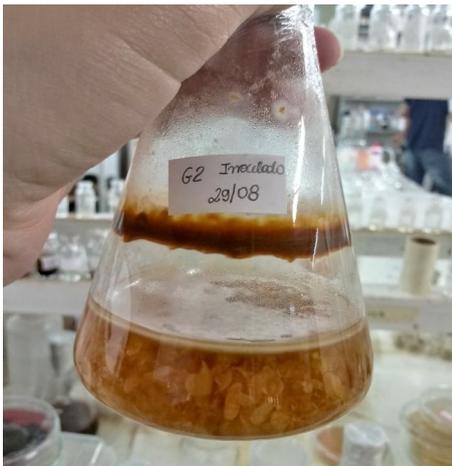
Os resultados obtidos comprovam através da observação, indícios de degradação de celulose, ou seja, esses microrganismos produzem enzimas celulolíticas que foram capazes de degradar a celulose presente no papel, além da hidrólise enzimática, esses fungos se mostraram capazes de realizar fermentação alcoólica, que fica evidenciado através do acompanhamento do comportamento destes microrganismos.

A Figura 1, apresenta o Fungo 2 após três dias inoculado no meio de cultura, percebe-se pela redução do tamanho do papel o início da produção enzimática dos fungos filamentosos com a celulose.



**Figura 1.**  
Caldo de cultura inoculado após 3 dias.  
Fonte: Autor, 2018.

Os indícios de degradação da celulose podem ser visualizados melhor quando observamos o papel após duas semanas em contato com os fungos endofíticos, como podemos observar na Figura 2, nota-se a degradação do papel pela ação das enzimas liberadas pelo fungo 2.



**Figura 2.** Caldo de cultura inoculado.  
Fonte: Autor, 2018.

O Fungo 2 quando comparado com os Fungos 1 e 3 apresenta maior degradação da celulose, como pode ser observado na Figura 3,. A celulose presente no meio de cultura do Fungo 2 está com a granulometria inferior quando comparado aos demais, já o Fungo 1 demonstra poucos indícios de fermentação



**Figura 3.** Comparação entre os três fungos.  
Fonte: Autor, 2018.

A produção de etanol foi verificada no espectrômetro Bruker UltraShield 400 MHz. Entretanto, devido a erros no equipamento não foi possível analisar a presença e a quantidade de etanol da amostra.

Entretanto, por indícios através da alteração na cor da mistura, nota-se uma maior produção de etanol celulósico pelo Fungo 2. O papel foi parcialmente degradado, indicando a atividade celulolítica do fungo.

## Conclusão

Considerando o exposto pelo presente trabalho, os resultados são satisfatórios. A produção de etanol celulósico foi evidenciada, confirmando que é possível produzir etanol de segunda geração utilizando fungos filamentosos endofíticos através da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

Portanto, a presente pesquisa evidencia a importância de estudos relacionados a exploração dos fungos endofíticos como fontes de enzimas celulolíticas para a produção de etanol celulósico, juntamente fermentação alcoólica.

## Referências

[1] BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. **Biochemical**



**conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals - a review.** *Chimia*, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015.

DIAS 02, 03, 04 DE DEZEMBRO DE 2020  
EDIÇÃO ESPECIAL ONLINE

**overview, key issues and challenges.** *Computers and Chemical Engineering*, v. 66, p. 36-56, 2014.

- [2] CORRÊA, R. C. G. et al. **Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.
- [3] FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; POLIZELI M. L. T. M. **Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis.** *Bioprocess Biosyst Eng*, 2011.
- [4] FLORENCIO, C.; BADINOB, A. C.; FARINAS, C. S. **Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Química Nova* vol. 40 no.9 São Paulo Sept. 2017.
- [5] GUO, B. et al. **Bioactive natural products from endophytes: a review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- [6] GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J.-G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X. F.; EZEJI, T.; **Trends Biochem. Sci.** 2016, 41, 633.
- [7] KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; POPIEL, P.O.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. 2011. **The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels.** *Biotechnology and Bioengineering*, 190, 1083-1087.
- [8] LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J.; **Bioprocess Biosyst. Eng.** 2016, 39, 133.
- [9] NANDA, S.; MOHAMMAD, J.; REEDY, S. N. **Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels.** *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 4, n. 2, p. 157-191, 2014.
- [10] PEREIRA, B. M. P. **Produção de enzimas por fungo filamentosos para hidrólise de material lignocelulósico.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química na Universidade Estadual de Campinas, 2012.
- [11] VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S.; **Fungal Genet. Biol.** 2013, 60, 9.
- [12] YUE, D.; YOU, F.; SNYDER, S. W. **Biomass-to-bioenergy and biofuel supply chain optimization:**