

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS E MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS PARA OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Autor: Rodrigo Martins Moreira
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Rio Verde - GO
Fevereiro - 2014

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -
AGRONOMIA

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS E MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS PARA OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Autor: Rodrigo Martins Moreira
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Ciências Agrárias - Agronomia no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - *Câmpus* Rio Verde.

**Rio Verde - GO
Fevereiro - 2014**

631.8

M835s Moreira, Rodrigo Martins, 1991

Substratos do cerrado goiano com potencial bioenergético / Rodrigo Martins
Moreira – 2013

68 f.: il., gráf.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias -
Agronomia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano,
Câmpus de Rio Verde, 2013.

Biografia.

Inclui índice de tabelas, figuras e lista de símbolos, siglas, abreviações e
unidades.

1. Cerrado. 2. Materiais lignocelulósicos. 3. Bioenergia. I. Souchie, Edson
Luiz II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus
Rio Verde.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
- AGRONOMIA**

**PROSPECÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS E MATERIAIS
LIGNOCELULÓSICOS PARA OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS**

Autor: Rodrigo Martins Moreira
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias - Agronomia - Área de
concentração em Produção Sustentável no Cerrado

APROVADA em 06 de fevereiro de 2014.

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima R. da Silva
Avaliadora Externa
UniRV

Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy
Avaliador Interno
IF Goiano – *Câmpus* Rio Verde

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie
Presidente da Banca
IF Goiano – *Câmpus* Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Lusiney Martins Chaves Moreia e José Santos Moreira, pelo apoio e carinho, mesmo não entendendo o que eu faço.

Aos companheiros dos laboratórios de Química Tecnológica e Microbiologia Agrícola, pelo auxílio acadêmico e momentos de descontração.

A Thaís Deodato Cabral, por ser uma excelente bolsista PIBIC e companheira.

Aos meus orientadores Edson Luiz Souchie e Carlos Frederico de Souza Castro, pelo incentivo, conhecimentos agregados, por acreditarem em meu potencial e, principalmente, pela amizade.

“Passei por muita coisa na vida e agora penso que encontrei o que é necessário para a felicidade. Uma vida tranquila e isolada no campo, com a possibilidade de ser útil à pessoas para quem é fácil fazer o bem, e que não estão acostumadas que o façam; depois, trabalhar em algo que se espera que tenha alguma utilidade; então descanso, natureza, livros, música, amor pelo próximo - essa é a minha ideia de felicidade. E depois, no topo de tudo isso, você como companheira, e filhos talvez. - o que mais pode o coração de um homem desejar?”
Liev Tolstoi - Felicidade Familiar.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Rodrigo Martins Moreira, filho de Lusiney Martins Chaves e José Santos Moreira, nascido na cidade de Rio Verde, iniciou sua formação profissional no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, no ano de 2007, com o curso Técnico em Agropecuária, concluindo em 2008. Em 2011, concluiu sua graduação em Saneamento Ambiental e, neste ano, ingressa no Mestrado em Ciências Agrárias - Agronomia. Ao final de 2012, conclui sua segunda graduação, tornando-se Bacharel em Gestão Ambiental.

ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	x
RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
OBJETIVOS.....	15
1.1. Objetivo Geral	15
1.2. Objetivos específicos	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
CAPÍTULO I - DETERMINAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS COM POTENCIAL BIOENERGÉTICO.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Teor de extraíveis orgânicos.....	22
2.2 Teor de hemicelulose.....	22
2.3 Teor de lignina.....	22
2.4 Teor de celulose.....	22
2.5 Espectroscopia em infravermelho.....	22
3 RESULTADOS.....	23
4 DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÕES.....	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II - FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS ISOLADOS DE PROCESSOS AGROINDUSTRIAS DO CERRADO BRASILEIRO PARA POTENCIALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	33

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Coleta e acondicionamento dos substratos lignocelulósicos.....	35
2.2 Isolamento dos microrganismos.....	35
2.3 Seleção de microrganismos degradadores de celulose	36
2.4 Produção do extrato enzimático.....	36
2.5 Avaliação da atividade celulolítica total (FPase).....	37
2.6 Produção de Endo-1, 4- β -Glucanase (CMCase).....	37
2.7 Produção de etanol lignocelulósico.....	38
2.8 Taxonomia dos isolados fungicos.....	38
2.9 Interação entre fungos e substratos.....	39
3 RESULTADOS.....	40
3.1.1 Isolamento dos microrganismos.....	40
3.1.2 Seleção de microrganismos degradadores de celulose.....	40
3.1.3 Avaliação da atividade Celulolítica Total (FPase)	40
3.1.4 Avaliação da atividade de endo -1, 4 – β - glucanase.....	42
3.1.5. Produção de etanol lignocelulósico.....	43
3.1.6. Taxonomia dos isolados fúngicos.....	44
3.1.7. Interação entre fungos e substratos.....	45
4 DISCUSSÃO.....	47
4.1. Avaliação da atividade Celulolítica Total (FPase)	47
4.2. Avaliação da atividade de endo -1, 4 – β - glucanase.....	47
4.3. Produção de etanol lignocelulósico.....	50
4.4. Interação entre fungos e substratos.....	50
5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO III - PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE FUNGOS OLEAGINOSOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA AGROINDÚSTRIA NO CERRADO BRASILEIRO.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	59
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 Coleta e acondicionamento dos substratos utilizados para isolamento dos microrganismos.....	60
2.2 Isolamento dos microrganismos	61
2.6 Extração do óleo a partir da biomassa fúngica.....	61

2.7 Transesterificação do óleo obtido a partir dos isolados fúngicos.....	61
3 RESULTADOS.....	62
3.1. Isolamento dos microrganismos.....	62
3.2. Rendimento do óleo obtido dos isolados <i>Penicillium pinophilum</i> estirpe KUC1758 e <i>Aspergillus tubingensis</i> estirpe TFR 23.....	62
3.3. Transesterificação a biodiesel do óleo produzido por <i>Penicillium pinophilum</i> estirpe KUC1758 e <i>Aspergillus tubingensis</i> estirpe TFR 23.....	62
4 DISCUSSÃO.....	62
4.1. Rendimento do óleo obtido dos isolados <i>Penicillium pinophilum</i> estirpe KUC1758 e <i>Aspergillus tubingensis</i> estirpe TFR 23.....	63
4.2. Transesterificação a biodiesel do óleo produzido por <i>Penicillium pinophilum</i> estirpe KUC1758 e <i>Aspergillus tubingensis</i> estirpe TFR 23.....	63
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 - Composição físico-química de capim piatã, casca de arroz e torta de filtro de Rio Verde - GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada composto, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....	23
Figura 2 – Espectroscopia dos substratos lignocelulósicos capim piatã (CP), casca de arroz (PA) e torta de filtro (T) (4500-500 cm ⁻¹) em Rio Verde – GO.....	24
Figura 3 - Formação de halo em meio CMC (1%) inoculado com fungos isolados a partir de capim piatã, em Rio Verde, GO.....	41
Figura 4 - Atividade FPase de isolados fúngicos oleaginosos em capim piatã aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....	41
Figura 5 - Atividade CMCase de isolados fúngicos oleaginosos em capim piatã aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....	42
Figura 6 - Atividade CMCase de isolados fúngicos oleaginosos em casca de arroz aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....	43

- Figura 7** - Hidrólise de capim piatã. Hidrólise de casca de arroz. Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* YPO4.....43
- Figura 8** - Interação de endoglucanase entre fungos isolados de casca de arroz, aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), inoculados em meio Mandels e Weber (1967) com capim piatã, em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....45
- Figura 9** - Interação da atividade celulolítica total entre fungos isolados de casca de arroz, aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), e inoculados em meio Mandels e Weber (1969) com capim piatã, em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).....46
- Figura 10** - Interação da atividade celulolítica total entre fungos isolados de casca de arroz inoculados em meio Mandels e Weber (1969) com capim piatã, em Rio Verde, GO.....46

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$((C_5H_8O_4)_n)$	Hemicelulose
$((C_6H_{10}O_5)_n)$	Celulose
$(C_7H_4N_2O_7)$	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
$(CHOH)_2.COONa.COOK)$	Tartarato Duplo de Sódio e Potássio
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de Amônio
μL	Microlitro
ANAVA	Análise de Variância
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de Engo-1,4- β -Glucanase
CO_2	Dióxido de Carbono
$CoCl_2$	Cloreto de Cobre
cv.	Cultivar
DNS	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
$FeSO_4$	Sulfato de Ferro
FPU	Unidade de Papel Filtro
FPase	Atividade Celulolítica Total
g	Gramas
GO	Goiás
H_2O	Água
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilogramas
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio
M	Mol
mg	Miligrama
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
$MnSO_4$	Sulfato de Manganês
NaH_2PO_4	Fosfato Monossódico
$NaNO_3$	Nitrato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH_4NO_3	Nitrato de Amônio
N°	Número
°C	Graus Celsius
P.A	Para Análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
R\$	Reais
Rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade Internacional
$ZnSO_4$	Sulfato de Zinco

RESUMO GERAL

A busca por alternativas no campo de produção de energia se tem potencializado nas últimas décadas. O consumo de energia e as fontes para provê-las se tornam problema latente, visto que as matrizes energéticas utilizadas na atualidade, em sua maioria, são provenientes de fontes não renováveis. O consumo de energia primária, em nível mundial, dobrou de 1973 a 2007. Neste trabalho, foram utilizadas três fontes para o isolamento dos microrganismos: capim piatã, torta de filtro, do processo de produção sucroalcooleira e casca de arroz. A composição do substrato foi determinada conforme Lin et al. (2010) e Li et al. (2004), obtendo os teores de extraíveis, hemicelulose, celulose e lignina. Os microrganismos foram isolados por meio de diluição sucessiva até 10^{-3} e selecionados quanto a capacidade de degradação de celulose, através da coloração com Vermelho Congo 1%. Para o estudo das atividades enzimáticas, os protocolos de Ghose (1987), Miller (1959) e Mandels & Weber (1969) foram utilizados. No processo para obtenção de etanol de segunda geração, foi utilizada a metodologia de fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Para a obtenção de biodiesel a partir da biomassa fúngica, foi utilizado o protocolo adaptado de Vicente et al. (2009). A casca de arroz apresentou os maiores teores de lignina (40,3%) e o capim piatã apresentou os maiores de celulose (47,9%). A espectroscopia por infravermelho confirma a presença de picos de celulose cristalina (1098, 900, 750 e 710 cm^{-1}), celulose (2266, 2232, 1782 e 990 cm^{-1}), hemicelulose (1750 e 1730 cm^{-1}) e lignina (1745, 1270 e 1245 cm^{-1}). Dentre os fungos estudados, os que apresentaram maior capacidade de hidrólise enzimática fora os isolados C-6, C-25 (*Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758) e P-2 (*Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23). Estes fungos apresentaram altos teores de lipídeos em sua biomassa. Os isolados fúngicos apresentaram alta capacidade para produção de lipídeos. O isolado *P. pinophilum* teve o rendimento de 48% de óleo em sua biomassa fúngica seca. Já o isolado *A. tubingensis* teve o rendimento de 37% de óleo em sua biomassa fúngica seca. Ambas as transesterificações apresentaram valores acima de 90% de conversão do óleo bruto a biodiesel.

Palavras-chave: fungos lignocelulósicos, etanol de segunda geração, fungos oleaginosos, biodiesel.

GENERAL ABSTRACT

The search for alternatives in the field of energy production has been enhanced in recent decades. The energy consumption and the sources to provide this energy becomes a problem since the energy matrices used in the present moment, in their vast majority are from non-renewable sources. The worldwide consumption of primary energy doubled from 1973 to 2007. Three sources were used for the isolation of microorganisms, which were Piatã grass, filter cake from the sugar-ethanol production process, and rice husk. The substrate composition was determined as described by Lin et al. (2010) and Li et al. (2004), yielding the levels of extractable hemicellulose, cellulose and lignin and Microorganisms were isolated by successive dilution up to 10^{-3} . and selected according to their ability to degrade cellulose, by staining with 1 % Congo Red. The Ghose (1987), Miller (1959) and Mandels & Weber (1969) protocols were used to study the enzymatic activities. The methodology of fermentation were used with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* YPO4, in order to obtain the second-generation of ethanol. To obtain biodiesel from fungal biomass the protocol adapted from Vincent et al. (2009) was used. Rice husk showed the highest levels of lignin (40.25 %) and Piatã grass showed the best values of cellulose (47.90 %). Infrared spectroscopy confirmed the presence of peaks of crystalline cellulose (1098, 900, 750 and 710 cm^{-1}) cellulose (2266, 2232, 1782 and 990 cm^{-1}), hemicellulose (1750 and 1730 cm^{-1}) and lignin (1745, 1270 and 1245 cm^{-1}). Among the fungi studied, the isolates C-6, C-25 (*Penicillium pinophilum* strain KUC1758) and P - 2 (*Aspergillus tubingensis* strain TFR 23) exhibited the greatest ability to enzymatic hydrolysis. These fungi showed high levels of lipids in their biomass. The fungal isolates showed high capacity for lipids production. The isolated *P. pinophilum* showed a yield of 48% of oil in his dry fungal biomass. The isolate *A. tubingensis* presents a yield of 37% of oil in his dry fungal biomass. Both transesterifications had values above 90% of conversion of crude oil to biodiesel.

Key words: lignocellulosyc fungi, second generation ethanol, oleaginous fungi, biodiesel.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A partir da Revolução Industrial ocorrida na Europa, porém de proporções holísticas, no século XVIII, o homem potencializou sua capacidade de produção, refletindo na necessidade de modificação de seu meio em função do desenvolvimento econômico. Os processos de produção atualmente exigem elevado uso de matéria-prima e produzem consideráveis proporções de rejeitos. Além disso, quantidades exponenciais de energia são necessárias para movimentar todos os polos industriais. Tais processos de produção foram sendo, ao longo dos anos, aprimorados e exigiram cada vez mais do meio natural, não respeitando assim seu tempo de assimilação (ROCHA, 2004).

As crescentes exigências de produtos industrializados obriga que o mercado trabalhe incessantemente e não leve em conta o tempo que um local, que teve seus recursos utilizados para a produção, necessita para repor sua matéria. Isto afeta negativamente toda a vida e ciclos de um ecossistema. Grande parte da preocupação mundial é voltada para a agricultura, principalmente no contexto socioeconômico em que se está inserido, neste caso, o sudoeste goiano. As preocupações discutidas neste aspecto são quanto às condições físico-químicas do solo, desmatamento, assoreamento de rios, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, entre outras. Todos estes aspectos são resultado de um manejo inadequado, em que o principal objetivo é o retorno econômico, não se importando com a pressão de uso no ambiente. Porém, se não há preocupação com estes aspectos, até mesmo os mais fortes dos intuitos capitalistas se dobram à vontade da natureza, pois o solo, por exemplo, já não é mais tão favorável. A sustentabilidade começou a ser discutida em meados da década de 1960, com movimentações de diversos grupos no mundo, a fim de questionar a aplicabilidade e eficiência dos processos de desenvolvimento adotados até então (SILVA, 2001).

O emprego de novas medidas biotecnológicas justifica estudos de prospecção e posterior aprimoramento de alternativas, para adoção de novas metodologias quanto ao abastecimento energético populacional. Um exemplo pode ser os biocombustíveis provenientes, em sua maioria, de milho e outras culturas utilizadas como substitutas diretas dos combustíveis fósseis atuais (ANTIZAR-LADISLAO e TURRION-GOMEZ, 2010).

Os biocombustíveis são fontes de energia renováveis, derivados de produtos agrícolas como açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de

matéria orgânica. Em alguns casos, os biocombustíveis podem ser usados tanto isoladamente, como adicionados aos combustíveis convencionais. Como exemplos, podem citar o biodiesel, o etanol, o metanol, o gás metano e o carvão vegetal (ENERGY EFFICIENCY AND RENEWABLE ENERGY, 2012).

A produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel e o bioetanol, tornou-se uma das formas mais eficientes para diversificar a matriz energética, contribuindo para a conservação do ambiente. Entretanto, é necessário que sejam estabelecidos mecanismos de suporte à produção e comercialização desses biocombustíveis. Isso é possível pela otimização de recursos e interação entre instituições públicas, privadas e pequenos produtores rurais. Desta forma, tornam-se essenciais à produção de informações confiáveis, estudos que garantam a viabilidade jurídica, técnica, ambiental, social e comercial (LOFRANO, 2008).

O crescente interesse quanto à temática de fontes de energias alternativas tem sido também fomentado, pelas fáceis metodologias para sua obtenção, possibilidade de produção *in loco* e custo/benefício atrativo. A capacidade de produção pode ser potencializada, se utilizados os produtos lignocelulósicos como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. Ainda, no caso da cana-de-açúcar, se utilizados os resíduos de sua produção podendo aumentar o rendimento etanol/área e reduzir, conseqüentemente, o uso de áreas cultiváveis, que podem ser utilizadas na produção de alimentos (FURLAN et al., 2012).

O biodiesel constitui um combustível compatível com os atuais motores diesel utilizados comercialmente e apresenta diversas vantagens em relação ao combustível fóssil, que inclui biodegradação avançada, toxicidade reduzida e menor emissão ativa de CO₂. Diversas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e podem ser divididas nos seguintes grupos: óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais (BEVILAQUA, 2010).

As pesquisas focadas no uso de enzimas para otimizar processos remontam à década de 1970. O mundo pós-guerra necessitava de um amplo desenvolvimento, em um curto período, principalmente na área industrial. O principal combustível para essa ideologia era o princípio de acúmulo de capital. Desta forma, era necessário produzir mais, usando menos. Neste cenário, os processos enzimáticos ganham alto fomento, devido à sua capacidade de catalisar os processos industriais, produzindo mais, sem expandir custos (OKANO, 2005).

A maioria dos estudos de processos de otimização de obtenção de combustíveis a partir de biomassa lignocelulósica, envolve alguma forma de pré-tratamento físico ou químico que rompe as ligações de lignina-hemicelulose-celulose nas células da biomassa vegetal e modificam as fibras de celulose, tornando-as assim, mais acessíveis às enzimas, isto é, seguido pelo processo de hidrólise que liberará açúcares a serem fermentados em etanol (WILSON, 2011).

Atualmente, o Brasil é um dos principais geradores de resíduos agroindustriais, pela sua grande cadeia produtiva relacionada à indústria alimentícia mundial. Tais resíduos são a principal fonte de celulose em escala mundial, contendo também, alto potencial de liberação de açúcares fermentáveis que, conseqüentemente, serão fermentados a etanol de segunda geração.

O estado de Goiás é um dos maiores polos agroindustriais do país, além de ser um grande exportador de produtos agropecuários. Deste modo, Goiás se configura num patamar de alta produção com diversos centros industriais possuindo, conseqüentemente, alta disponibilidade de material lignocelulósico. Muitos destes processos de produção agroindustrial em todo o Estado geram resíduos que possuem alto potencial energético, devido sua alta concentração de celulose. Estes resíduos apresentam alto valor energético agregado e baixo custo de conversão. Uma maneira de potencializar tais processos de obtenção de etanol de segunda geração é a inoculação, nestes compostos lignocelulósicos, de fungos oleaginosos. Esses fungos metabolizam as camadas de celulose, hemicelulose e lignina, utilizando-as como fonte de substrato, liberando, através de processos de hidrólise enzimática, açúcares fermentáveis. Isso facilita e potencializa a obtenção de etanol de segunda geração dos compostos lignocelulósicos e, ao mesmo tempo, a obtenção de biodiesel do micélio fúngico (SUN e CHENG, 2002; BEVILAQUA, 2010; CONAB, 2011; FURLAN et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de isolados fúngicos em potencializar a produção de etanol de segunda geração, utilizando materiais lignocelulósicos como substrato e produzir óleo para geração de biodiesel a partir do micélio fúngico.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter isolados fúngicos capazes de metabolizar compostos lignocelulósicos;
- Selecionar 15 isolados fúngicos com potencial celulolítico, sendo cinco isolados de cada fonte de resíduo agroindustrial;
- Determinar a atividade enzimática destes microrganismos;
- Determinar a atividade celulolítica total;
- Determinar a produção de Endo-1, 4- β -Glucanase;
- Determinar a atividade celulolítica total e de Endo-1, 4- β -Glucanase alternando os substratos e os isolados fúngicos;
- Quantificar os teores de lignina, hemicelulose e celulose dos substratos lignocelulósicos;
- Quantificar o óleo produzido pelos isolados fúngicos selecionados;
- Avaliar a qualidade do óleo, visando à produção de biodiesel a partir do micélio fúngico, através de transesterificação;
- Realizar a taxonomia das linhagens dos fungos selecionados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTIZAR-LADISLAO, B.; TURRION-GOMEZ, J. L. Decentralized energy from waste systems. **Energies**, v. 3, p. 194-205, 2010.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, Santa Maria, fevereiro de 2010.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-Açúcar – 2ª Estimativa - Agosto/2011.

ENERGY EFFICIENCY AND RENEWABLE ENERGY. **Enzymatic hydrolysis technology background**. Disponível em: <<http://www1.eere.energy.gov/biomass/technologies.html>>. Acesso em: 11 junho de 2012.

FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHIC, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C. Assessing the production of first and second

generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**, v. 43, p. 1–9, 2012.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. Pensamento Plural: **Revista Científica do INIFAE**, v. 2, p. 83-89, 2008.

OKANO, K.; KITAGAW, M.; SASAKI, Y.; WATANABE, T. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. **Animal Feed Science Technology**, 120, 235–243, 2005.

ROCHA, J. M. **A sustentabilidade desfocada: as lógicas das políticas de desenvolvimento rural para Áreas de Proteção Ambiental (APAs) – o caso de Guaraqueçaba – PR**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento, UFPR, 2004.

SILVA; M; DINIZ, N. **O desafio da sustentabilidade – Um debate sócioambiental no Brasil**. São Paulo: Fundação Perseu Abramo, p. 75 – 96, 2001.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, 259–263, 2011.

CAPÍTULO I

DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COM POTENCIAL BIOENERGÉTICO

RESUMO

O consumo de energia e as fontes para provê-las se tornam um problema latente, visto que as matrizes energéticas utilizadas na atualidade, em sua maioria, são provenientes de fontes não renováveis. Com este trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de aplicação de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, obtidos da agroindústria, para produção de etanol de segunda geração baseado em seus teores de lignina, hemicelulose e celulose. A composição dos substratos foi determinada conforme Lin et al. (2010) e Li et al. (2004), obtendo os teores de extraíveis, hemicelulose, celulose e lignina. Capim piatã é a melhor matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, comparada a torta de filtro e casca de arroz, pelos seus altos teores de celulose, baixos teores de lignina, que proporcionam alta taxa de conversão a baixo custo. Casca de arroz pode se traduzir em estratégica matéria-prima para produção de etanol de segunda geração, pela facilidade de obtenção e abundância de produção no mundo.

Palavras-chave: celulose, capim piatã, torta de filtro, casca de arroz.

ABSTRACT

The energy consumption and the sources to provide it become a latent problem, since the most energy matrices used nowadays come from non-renewable sources. This work aimed to evaluate the potential to apply different types of lignocellulosic materials obtained from agriculture industries to produce the second-generation of ethanol based on its levels of lignin, hemicellulose and cellulose. The composition of the substrates was determined according to Lin et al. (2010) and Li et al. (2004), yielding the levels of extractable hemicellulose, cellulose and lignin. Piata grass is the best raw material for the production of the second generation of ethanol compared to the filter cake and rice husk, due to its high concentration of cellulose, low lignin, which provides a high conversion rate at low cost. Rice husk can translate into strategic raw material for production of the second generation of ethanol, by the ease of obtaining and plenty of production in the world.

Key words: cellulose, grass Piata, filter cake, rice husk.

1. INTRODUÇÃO

É crescente o interesse pelo uso racional de energia utilizada para atendimento das necessidades para movimentar indústrias, transportes, comércio e demais setores econômicos de um país (ANGERBAUER, 2008).

O consumo de energia e as fontes para provê-la tornam-se um problema latente, visto que as matrizes energéticas utilizadas na atualidade, em sua maioria, são provenientes de fontes não renováveis. A diversificação das matrizes energéticas atuais mostra uma maneira efetiva para mitigar tal problema (VICENTE et al., 2009).

Segundo projeção realizada pela Energy Information Administration (2008), o consumo de energia no mundo tende a aumentar cerca de 50% de 2005 a 2030, sobretudo nos países em desenvolvimento. Isto mostra a necessidade de expansão e diversificação das matrizes energéticas mundiais (GRISOLI, 2009).

A produção de bicompostíveis se torna a maneira efetiva para solucionar a problemática da escassez de combustíveis fósseis. Biocompostíveis provenientes de, em sua maioria milho e cana-de-açúcar, dentre outras culturas com potencial energético são utilizados como substitutos diretos dos combustíveis fósseis (ANTIZAR-LADISLAO e TURRION- GOMEZ, 2010).

Estima-se que ao se utilizar materiais lignocelulósicos provenientes de processos da agroindústria é possível obter até 442 bilhões de litros por ano de etanol de segunda geração. Se utilizados resíduos de culturas e colheitas, pode-se obter uma produção equivalente a 439 bilhões de litros por ano de etanol de segunda geração, valor 16 vezes maior que a atual produção mundial (KIM e DALE, 2004).

A metodologia de uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de biocompostíveis, aplicada em biorefinarias, deve seguir diversos critérios, tais como potencial de produção e rendimento por hectare, condições de adaptação e climatização, requerimento de insumos agrícolas, características físico-químicas da biomassa e também seu potencial de usos (FAHD, 2011).

O interesse no uso de biomassa como fonte de energia alternativa, visando minimizar a dependência do petróleo, é por essa matéria-prima possuir baixo valor agregado e abundância de produção. Não obstante, podem ser utilizados resíduos de diversos processos agrícolas, industriais e florestais como fonte de carbono, a fim de mitigar a problemática de descarte inadequado acarretando, portanto, potenciais danos

diversos ao ambiente (BORTOLAZZO, 2011; DELABONA, 2011). Segundo Furlan et al. (2012), esses resíduos de biomassa apresentam alto valor energético agregado e baixo custo de conversão.

A geração de resíduos cresce proporcionalmente à produção. A torta de filtro é um destes resíduos e seu uso, para maximização de produção de etanol, é altamente viável, pelo seu baixo valor econômico agregado e alto potencial energético.

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

É fato que a indústria é fundamental para o desenvolvimento econômico, como instrumento importante ao atendimento das necessidades da população, principalmente na promoção de serviços/produtos e na geração de empregos. No entanto, atividades industriais podem se constituir em fatores de interação negativa ao ambiente, caso não sejam manejadas de forma coerente com a realidade local (MALHEIROS, 2007). A utilização de resíduos agroindustriais se torna interessante já que possuem alto valor energético e baixo valor econômico agregado. Não obstante, a utilização destes compostos lignocelulósicos, como fontes de energia, indica uma cadeia mais sustentável de produção.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de aplicação de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, obtidos da agroindústria, para produção de etanol de segunda geração baseado em seus teores de lignina, hemicelulose e celulose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os substratos lignocelulósicos estudados neste trabalho foram: capim piatã (*Brachiaria brizantha* cv. piatã) coletado no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio

Verde, torta de filtro da produção de cana-de-açúcar, coletada na Usina de Açúcar e Alcool Serra do Caiapó, em Montividiu – GO e casca de arroz. A composição do substrato foi determinada conforme Lin et al. (2004) e Li et al. (2010), obtendo os teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose.

2.1. Teor de extraíveis orgânicos

Para o teor de extraíveis pesou-se 5 g do material lignocelulósico, sendo transferidos para um extrator Soxhlet. Deixando em extração por 8 h, usando 300 mL de hexano P.A. Após a extração, o material foi secado a 35-40 °C e pesado. A diferença das massas correspondeu ao teor de extraíveis, sendo expresso em porcentagem.

2.2. Teor de hemicelulose

Para o teor de hemicelulose, pesou-se 1 g do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e foram adicionados 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (0,5 M). Fervendo a mistura por 3,5 h e, posteriormente, foi filtrada e lavada com água destilada. O resíduo sólido foi secado a 35-40 °C e pesado. A diferença das massas correspondeu à hemicelulose, sendo expresso em porcentagem.

2.3. Teor de lignina

Para o teor de lignina pesou-se 1 g do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e se acrescentou 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (72%). Deixando a mistura em repouso por 24 h. Em seguida, diluiu-se com 300 mL de água destilada a mistura foi então levada a aquecimento, temperatura de ebulição por 1 h. O resíduo sólido foi filtrado e lavado com água destilada, e então secado a 35-40 °C e pesado. Essa massa correspondeu ao teor de lignina, sendo expresso em porcentagem.

2.4. Teor de celulose

A celulose foi determinada pela diferença entre a massa original e os teores de hemicelulose, lignina e extraíveis.

2.5. Espectroscopia em infravermelho

As amostras foram colocadas em espectrofotômetro modelo Perkin Elmer Frontier FT-IR/NIR, faixa de varredura ($4500-500\text{ cm}^{-1}$), abertura (4 cm^{-1}) e 64 varreduras, modo ATR na Central Analítica do IF Goiano – *Campus* Rio Verde. Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em triplicata, utilizando um delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variâncias e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando o programa ASSISTAT.

3. RESULTADOS

Quanto aos compostos extraíveis, foi observado que a torta de filtro (14,64%) possui mais que o dobro da quantidade detectada para o capim piatã (6,26%) e o triplo da casca de arroz (2,97%) (Figura 1).

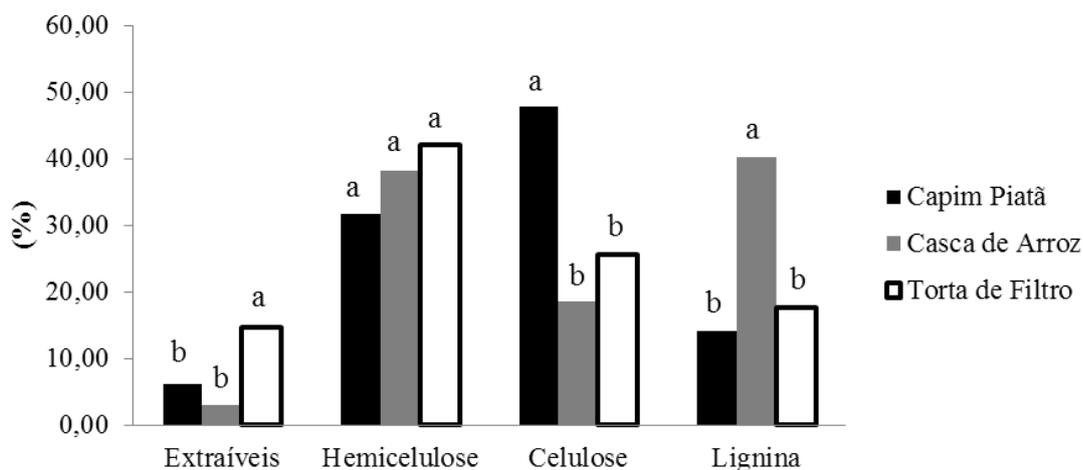


Figura 1 – Composição físico-química de capim piatã, casca de arroz e torta de filtro, em Rio Verde - GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada composto, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Na quantificação da hemicelulose, foram detectados valores similares nos três compostos, ou seja, torta de filtro (42,15%), casca de arroz (38,20%) e capim piatã (31,69%) (Figura 1).

Quanto aos teores de lignina, a casca de arroz se destacou com 40,25%, valor próximo ao triplo do capim piatã (14,15%) e mais que o dobro da torta de filtro

(17,66%). Já os valores de celulose se destacaram no capim piatã (47,90%), a torta de filtro teve valor intermediário (25,56%) e a casca de arroz o total de 18,58% (Figura 1).

A espectroscopia por infravermelho confirma a presença de picos de celulose cristalina (1098, 900, 750 e 710 cm^{-1}), celulose (2266, 2232, 1782 e 990 cm^{-1}), hemicelulose (1750 e 1730 cm^{-1}) e lignina (1745, 1270 e 1245 cm^{-1}) (Figura 2) (LAUREANO-PEREZ, 2005).

A partir da espectrofotometria, detectou-se a razão entre celulose amorfa e celulose cristalina da ordem de 1,02 para a torta de filtro, 1,06 para a casca de arroz, e 1,11 para o capim piatã.

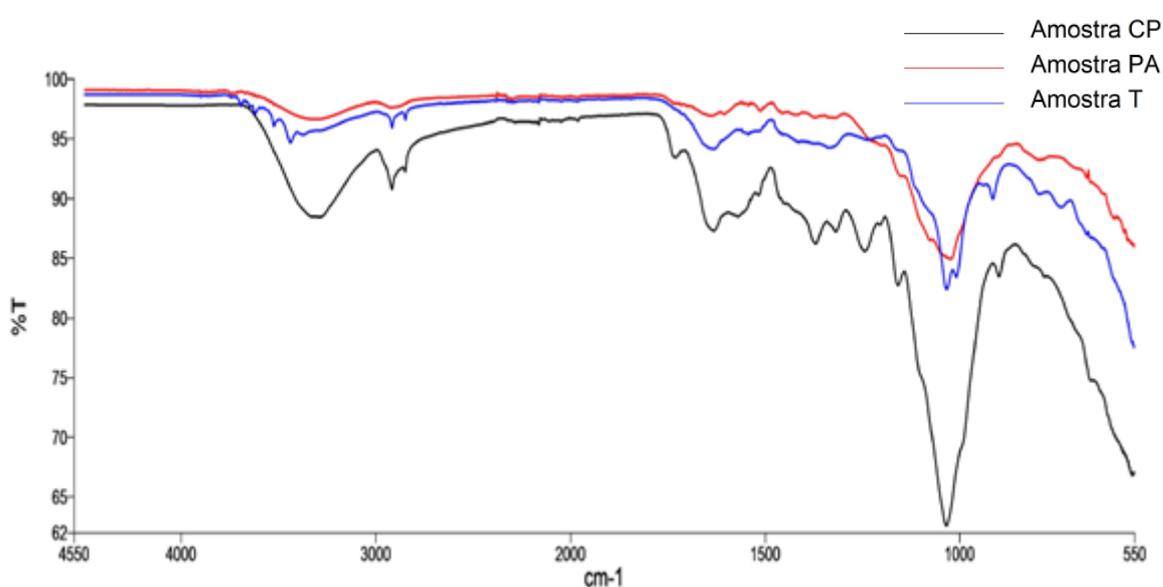


Figura 2 – Espectroscopia dos substratos lignocelulósicos em capim piatã (CP), casca de arroz (PA) e torta de filtro (T) (4500-500 cm^{-1}), em Rio Verde – GO.

4. DISCUSSÃO

Tendo em vista os teores de lignina, o capim piatã possui alto potencial para uso como fonte de substrato para geração de etanol lignocelulósico. Pode-se observar que o baixo valor de lignina e o alto teor de celulose permitem inferir que a hidrólise enzimática, induzida pelos microrganismos, seria mais eficiente, liberando assim, maiores teores de açúcares fermentáveis. Meschede (2011) constatou em trabalho semelhante um teor de 13,1% de lignina em forrageiras do mesmo gênero.

Já a casca de arroz, que possui altos teores de lignina e baixos teores de celulose, o que é esperado pela sua função de proteção no grão, resulta em um substrato de difícil

uso para produção de etanol lignocelulósico. Tais teores elevados de lignina exigem coquetéis enzimáticos com alta especificidade, bem como longos períodos para que ocorram os processos de hidrólise (KIM, 2004).

Vários fatores dificultam a hidrólise de materiais lignocelulósicos, sendo o principal os altos teores de lignina. A lignina é um composto fenólico e sua função é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e mecânicos aos tecidos vegetais. Sua característica mais problemática pode ser sua condição hidrofóbica, que impede diretamente o acesso à celulose (FAHD, 2012).

A lignina possui caráter recalcitrante, que influencia no rendimento do substrato ao ser utilizado como fonte de biomassa para produzir etanol de segunda geração. Isto porque um substrato mais lignificado exigirá maiores períodos de pré-tratamento, bem como quantidades mais elevadas de coquetel enzimático. Não obstante, o uso biotecnológico da lignina tem sido extensivamente estudado. Por apresentar características de recalcitrância, ela tem sido empregada em funções adesivas, na construção de biopolímeros, bem como em subprodutos obtidos a partir da quebra de sua estrutura, que podem ser aplicados na indústria química (GHAFAR e FAN, 2013).

A cada 1 g de casca de arroz seca, tem-se um potencial de produção de etanol referente a 0,21 g (DEMIRBAS, 2009). Watanabe et al. (2012) obtiveram 38 g L⁻¹ de etanol, utilizando casca de arroz. Singh et al. (2014), a partir de uma cocultura de leveduras fermentantes, conseguiram 0,42 g g⁻¹ de etanol a partir deste mesmo resíduo. Potumarthi (2013) obteve um total de 1000 mg mL⁻¹ de açúcares redutores totais fermentáveis obtidos a partir de hidrólise enzimática de casca de arroz.

Estima-se que a cada tonelada de arroz produzido, 240 kg são cascas. Esta casca é tida como resíduo, que a coloca em um patamar de baixo valor econômico agregado, porém, com alto potencial energético. Desta forma, o que contrapõe os altos teores de lignina, detectados em sua estrutura, na perspectiva de produção de etanol lignocelulósico, é a abundância de casca de arroz produzida mundialmente (HOSSEINNIA, 2007).

A casca de arroz é comercializada para diversos fins: aplicada como adubo, sendo fresca, ou carbonizada; formação de cama de frango ou ração para bovinos e suínos. A tonelada de casca de arroz é comercializada com o valor médio de R\$ 200,00 e pode ser encontrada em todos os estados brasileiros. Um valor baixo, o que torna interessante seu uso como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração (LAKSHMI, 2009).

Para o capim piatã, sua comercialização é feita através da venda de sementes. O saco com 20 kg de sementes custa aproximadamente R\$ 98,00. Esta forrageira é amplamente comercializada, por possuir boa produção de forragem, em média de 9,5 toneladas por hectare de matéria seca, com 57% de folhas, sendo 30% dessa produção obtida no período seco (SEMEATA, 2013).

De acordo com Vilela (2009), o custo final da tonelada de capim, incluindo custos operacionais variáveis e fixos, enfardadora e transporte, atinge em torno de R\$ 7,92 por tonelada de massa seca.

Para a torta de filtro, o leve decréscimo quanto aos teores de lignina e celulose, indica que a torta de filtro é um substrato de rendimento moderado. Seus valores de celulose não são tão abundantes, porém, o acesso a ela não é dificultado, pois os teores de lignina são baixos. A torta de filtro não é comercializada e seu uso se dá nas próprias imediações das usinas, ou por meio de contrato com produtores de hortaliças, para uso como fertilizante, devido pelos altos teores de micro e macronutrientes (FIRME, 2005).

Neste trabalho, a espectroscopia por infravermelho confirmou a presença de picos de celulose cristalina. Laureano-Perez (2005), em trabalhos similares, também relatou picos idênticos aos aqui encontrados.

A razão entre celulose amorfa e celulose cristalina indica que a quantidade de celulose amorfa é superior à cristalina, principalmente no capim piatã, facilitando a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis. O grau de polimerização e cristalinidade de celulose é considerado como fator importante na determinação das taxas de hidrólise de substratos celulósicos (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

5. CONCLUSÕES

1. Capim piatã é, potencialmente, a melhor matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, comparado à torta de filtro e casca de arroz, pelos seus altos teores de celulose, baixos teores de lignina, o que proporciona alta taxa de conversão a baixo custo.
2. Casca de arroz pode traduzir-se em estratégica matéria-prima para produção de etanol de segunda geração, pela facilidade de obtenção e abundância de produção no mundo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.

ANTIZAR-LADISLAO, B.; TURRION-GOMEZ, J. L. Decentralized energy from waste systems. **Energies**, v. 3, p. 194-205, 2010.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, Santa Maria, 2010.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011. 86p.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 5-37, 2000.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. **Applied Energy**, v. 86, p. 151–161, 2009.

FAHD, S.; FIOTENTINO, G.; MELLINO, S.; ULGIATI, S. Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: the added value of the biorefinery concept. **Energy**, v. 37, p. 79–93, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHIC, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and

process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**, v. 43, p. 1–9, 2012.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Lignin in straw and its applications as an adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 48, p. 92-101, 2014.

GRISOLI, R.; COELHO, S. T.; MATAI, P. H. L. S. Energia microbológica. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 4, p. 1-19, 2009.

HOSSEINNIA, A.; HASHTROUDI, M. S.; BANIFATEMI, M. Surfactant removal. **Water and Wastewater Asia**, p. 52–55, 2007.

KIM, S.; DALE, B. E.; Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.

LAKSHMI, U. R.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D.; LATAYE, D. H. Rice husk ash as an effective adsorbent: evaluation of adsorptive characteristics for indigo carmine dye. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 710–720, 2009.

LI, S.; XU, S.; LIU, S.; YANG, C.; LU, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Processing Technology**, v. 85, p.1201-1211, 2004.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass waste based on three major components: cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8271-8223, 2010

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 1081–1099, 2005.

MALHEIROS, T. F.; PHILLIPI Jr., A.; COUTINHO, S. M. V. Agenda 21 nacional e indicadores de desenvolvimento sustentável: contexto brasileiro. **Saúde e Sociedade**, v. 17, p. 07, 2008.

MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; TRINDADE, M. L. B.; GOMES, G. L. G. C. G. Efeitos do glyphosate nos teores de lignina, celulose e fibra em *Brachiaria decumbens*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, p. 57-63, 2011.

POTUMARTHI, R.; BAADHE, R. R.; NAYAK, P.; JETTY, A. Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 113-117, 2013.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, v. 116, p. 699-702, 2014.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.

VILELA, H.; CERIZE, D. Capim elefante paraíso na geração de energia. **Portal Agronomia**, 2009. Disponível em <http://www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/artigos_capim_elefante_paraíso_geracao_energia.htm> acessado em: 19/11/2013.

WATANABE, I.; MIYATA, N.; ANDO, A.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K.; NAKAMURA, T. Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 695-698, 2012.

CAPÍTULO II

FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS ISOLADOS DE PROCESSOS AGROINDUSTRIAIS PARA POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

RESUMO

Estima-se que ao se utilizar materiais lignocelulósicos, provenientes de processos da agroindústria, seja possível obter até 442 bilhões de litros por ano, de etanol de segunda geração, e que utilizando resíduos de culturas e colheitas, pode-se obter 439 bilhões de litros por ano de etanol de segunda geração, valor 16 vezes maior do que a produção mundial atual. Com este trabalho, objetivou-se obter isolados fúngicos que atuem na hidrólise das camadas lignocelulósicas, liberando açúcares fermentáveis, para obter etanol de segunda geração. Foram utilizadas três fontes para o isolamento dos microrganismos: capim piatã; torta de filtro, do processo de produção sucroalcooleira e casca de arroz. Os microrganismos foram isolados por meio de diluição sucessiva até 10^{-3} e selecionados quanto à capacidade de degradação de celulose, através da coloração com Vermelho Congo 1%. Para o estudo das atividades enzimáticas, os protocolos de Miller (1959), Mandels e Weber (1969) e Ghose (1987), foram utilizados. No processo para obtenção de etanol de segunda geração, foi utilizada a metodologia de fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Dos isolados selecionados do substrato capim piatã, C-6 e C-25 (*Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758) apresentaram maior atividade enzimática. Dos isolados selecionados a partir de casca de arroz, o isolado P-2 (*Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23) apresentou a maior atividade enzimática. Os complexos enzimáticos fúngicos possuem potencial biotecnológico para sua aplicação em biorefinarias. A fermentação de açúcares com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 foi eficaz. A hidrólise enzimática, com fungos isolados de compostos lignocelulósicos do Cerrado brasileiro, como pré-tratamento para produção de etanol de segunda geração se apresenta como via para mitigar as barreiras impostas pela lignina.

Palavras-chave: *P. pinophilum*, *A. tubingensis*, fungos lignocelulósicos, enzimas.

ABSTRACT

When using lignocellulosic materials from agro industrial processes up to 442 billion liters per year of second generation ethanol could be produced. Also using crop residues it is possible to obtain an output equivalent to 439 billion liters per year of second generation ethanol which is sixteen times larger than the current world production. This work aimed to obtain fungal isolates that act in the hydrolysis of lignocellulosic layers, releasing fermentable sugars for second generation of ethanol. Three sources were used to the microorganism isolation: piatã grass, filter cake from the sugar-ethanol production process and rice husk. Microorganisms were isolated by successive dilution to 10^{-3} and selected for the ability to degrade cellulose by staining with Congo Red 1%. To study the enzymatic activity, the Miller (1959), Mandels and Weber (1969) and Ghose (1987) protocols were used. In the process for obtaining the second-generation of ethanol, the methodology fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 was used. The fungi isolates from Piatã grass C-6 and C-25 (*Penicillium pinophilum* strain KUC1758) had the highest enzymatic activity. The fungi isolate from rice husk, P-2 (*Aspergillus tubingensis* strain TFR 23) had the highest enzymatic activity. The fungal enzyme complexes have biotechnological potential for use in bio refineries Fermentation of sugars with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 was effective. Enzymatic hydrolysis with fungal isolates of lignocellulostics compounds from Brazilian cerrado, as a pretreatment for production of the second generation of ethanol is presented as a way to mitigate the barriers imposed by lignin.

Key words: *P. pinophilum*, *A. tubingensis*, lignocellulosic fungi, enzyme.

1. INTRODUÇÃO

É crescente o interesse pelo uso racional de energia utilizada para atendimento das necessidades para movimentar indústrias, transportes, comércio e demais setores econômicos de um país (ANGERBAUER, 2008).

A insegurança quanto às matrizes energéticas provenientes de combustíveis fósseis é proveniente de uma instabilidade econômica previsível. Tais oscilações influenciam a economia mundial sem discernimento de classe social, país e posição econômica (DEMIRBAS, 2009).

O consumo de energia e as fontes para provê-la se tornam um problema latente, visto que as matrizes energéticas utilizadas na atualidade, em sua maioria, são provenientes de fontes não renováveis. A diversificação das matrizes energéticas atuais mostra uma maneira efetiva para mitigar tal problema (VICENTE et al., 2009).

Atualmente, etanol é produzido de duas principais fontes: cana-de-açúcar, no Brasil e amido, proveniente de milho, nos Estados Unidos da América. Etanol é, atualmente, a fonte líquida de combustível mais abundante no planeta. A importância da diversificação da matriz energética e utilização de biocombustíveis, provenientes de biomassa, tais como o etanol, etanol de segunda geração e biodiesel, decorrem de uma perspectiva de redução de impactos ambientais negativos (LIN, 2010).

A tendência no campo científico mundial quanto à utilização de biomassa como fonte de energia alternativa, visando substituir o petróleo, justifica-se por essa matéria-prima possuir baixo valor agregado e abundância em produção. Não obstante, podem ser utilizados resíduos de diversos processos agrícolas, industriais e florestais como fonte de carbono, a fim de mitigar a problemática de descarte inadequado acarretando, portanto, potenciais danos diversos ao ambiente (BORTOLAZZO, 2011; DELABONA, 2011).

O princípio chave para a ciclagem de carbono global é a hidrólise da celulose nas paredes celulares vegetais. A celulose é a fonte de carbono mais abundante na natureza. Neste cenário, entram em foco os microrganismos, que atuam como catalizadores destas reações. Microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do material orgânico encontrado no solo. Atuam neste processo, bactérias, leveduras e, em sua maioria, fungos. A utilização de fungos filamentosos produtores de celulases, inoculados em resíduos agroindustriais, como capins forrageiros, casca de arroz e resíduos da produção de cana-de-açúcar, como a torta de filtro, possibilita a

degradação das camadas lignocelulósicas e a obtenção de etanol (FURLAN et al., 2012).

Atualmente, celulasas industriais são produzidas, em sua maioria, a partir de fungos aeróbicos tais como *Hypocrea jecorina*, uma estirpe mutante de *Trichoderma reesei*. Isso se deve à capacidade que tal estirpe, modificada pela engenharia genética, tem de produzir altas quantidades de celulase, até 100 g de enzima por litro. Um método para reduzir custos, quanto à utilização de enzimas hidrolíticas nestes pré-tratamentos é a sua reciclagem (BECKHAM, 2010).

Apesar da biomassa lignocelulósica ser uma matéria-prima com potencial para biorrefinarias, sua estrutura e complexidade recalcitrantes prosseguem sendo grande obstáculo econômico e técnico para a produção de biocombustíveis celulósicos (RICKLEFS, 2003). A produção de biomassa fúngica, a partir de resíduos de processos agrícolas, como fonte de carbono para esses microrganismos, torna-se interessante por constituir uma alternativa para o pré-tratamento (hidrólise enzimática) ambientalmente correto de tais resíduos, além de propiciar matérias-primas para a produção de combustíveis renováveis (ZHANG e LYND, 2004).

A maioria dos pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica é composta por metodologias caras, que demandam altos valores energéticos. A utilização de tratamentos biológicos dessa biomassa, utilizando vários tipos de fungos, um método seguro e ambientalmente saudável, está sendo utilizado, por não demandar altos valores energéticos e ainda assim remover grande parte da lignina (OKANO et al., 2005).

Conforme o tipo de substrato lignocelulósico, sua composição, bem como de seu posterior hidrolisado, resulta em possíveis inibidores específicos de um material lignocelulósico para outro. Sua influência sobre os microrganismos e o desempenho de fermentação também poderá variar (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Uma maneira de potencializar os processos de obtenção de etanol de segunda geração é a inoculação, nestes compostos lignocelulósicos, de fungos oleaginosos. Tais fungos metabolizarão as camadas de celulose, hemicelulose e lignina, utilizando-as como fonte de substrato e liberando, através de processos de hidrólise enzimática, açúcares fermentáveis. Com isso, facilitam e potencializam a obtenção de etanol de segunda geração dos compostos lignocelulósicos (BEVILAQUA, 2010; CONAB, 2011; FURLAN et al., 2012).

Com este trabalho, objetivou-se obter isolados fúngicos que atuem na hidrólise das camadas lignocelulósicas, liberando açúcares fermentáveis, para obter etanol de segunda geração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e acondicionamento dos substratos lignocelulósicos

Amostras de capim piatã (*Brachiaria brizantha* cv. Piatã) foram coletadas no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, de casca de arroz (*Oryza sativa*), na Distribuidora de Arroz Rio Verde e de torta de filtro, na Usina de Açúcar e Álcool Serra do Caiapó, em Montividiu, GO. Estas amostras foram coletadas em recipientes esterilizados e posteriormente estocadas para facilitar o processo de isolamento dos microrganismos. Neste recipiente, contendo 250 g da amostra, foram adicionados 100 mL de água destilada esterilizada. Amostras de capim foram então alocadas em estufa de fluxo contínuo por 30 dias, a uma temperatura entre 36–40 °C. Esta etapa teve por finalidade a indução de desenvolvimento de microrganismos, visando à obtenção de fungos que atuem na degradação de matéria orgânica vegetal.

2.2. Isolamento dos microrganismos

Os testes foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia Agrícola e Química Tecnológica no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. O isolamento foi realizado utilizando amostras de capim piatã, de casca de arroz e de torta de filtro, provenientes de frascos hermeticamente fechados, durante 30 dias, a 36-40 °C em estufa.

Para isto, alíquotas de 10 mL dos substratos foram misturadas em 90 mL de solução salina (0,85%), seguindo o método das diluições sucessivas até 10^{-3} . De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 200 μ L para placas de Petri esterilizadas, acrescentando em seguida, o meio de cultura BDA (200 mL de infusão de batata, 15 g L^{-1} de extrato de levedura e 20 g L^{-1} de agar, completando com um litro de água destilada) e mantidos durante sete dias a 28 °C. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram utilizadas para isolamento e contagem dos isolados fúngicos.

2.3. Seleção de microrganismos degradadores de celulose

Os microrganismos obtidos foram então selecionados quanto à capacidade de metabolizar celulose. Nesta etapa, foram cultivados em dois meios de cultura: o primeiro, contendo apenas agar (15 g L^{-1}) e o segundo meio contendo carboximetilcelulose (1%) - CMC ($3,0 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 ; $0,5 \text{ g L}^{-1}$ MgSO_4 ; $0,5 \text{ g L}^{-1}$ KCl ; $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; $1,0 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de CMC; $30,0 \text{ g L}^{-1}$ de agar) em que a carboximetilcelulose foi a única fonte de carbono (NOGUEIRA e CAVALCANTI, 1996). Ambos os meios foram utilizados para testar se algum favorecia mais o crescimento dos isolados.

Após cinco dias de incubação, no meio com CMC, foi aplicada uma solução com corante Vermelho Congo (10 mL do corante - $2,5 \text{ g L}^{-1}$ em uma solução tampão de NaH_2PO_4 em pH 7,8). A placa foi então lavada com 5 mL de solução salina ($0,5 \text{ M}$) para verificar e mensurar com paquímetro, a formação de halo ao redor das colônias. A formação deste halo comprova a degradação de compostos celulósicos pelos microrganismos inoculados.

2.4. Produção de extrato enzimático

Nesta etapa foram utilizados apenas os cinco microrganismos com melhores desempenhos na degradação da celulose presente no meio CMC. Para isto, os substratos foram previamente moídos e peneirados com granulação máxima de 1 mm . Foi utilizada uma estufa à temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ para a secagem das amostras.

Foi utilizado 1 g das amostras dos substratos lignocelulósicos, estes foram alocados em erlenmeyers de 125 mL com meio basal de Mandels e Weber [(g L^{-1}) KH_2PO_4 , $2,0 \text{ g}$; CaCl_2 , $0,3 \text{ g}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g ; NH_4NO_3 , 2 g ; e (mg L^{-1}) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1,6 \text{ mg}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $3,45 \text{ mg}$; e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg^{-1}], autoclavado a 1 atm a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 minutos . Os isolados foram inoculados, utilizando discos de micélio com 1 cm de diâmetro, nos frascos, em triplicata. O micélio para inoculação foi obtido de placas BDA com sete dias de cultivo a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Então foi realizada a incubação, dos erlenmeyers, por um período de 21 dias a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 150 rpm em incubadora orbital. Em intervalos regulares de sete dias, amostras de 4 mL do extrato enzimático foram retiradas de cada frasco, e então centrifugadas a 3000

rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

2.5. Avaliação da atividade celulolítica total (FPase)

Para a determinação da atividade enzimática foram utilizados os protocolos de Ghose (1987) e Miller (1959), em que se utiliza uma fita de papel filtro Whatman N° 1 como substrato para a determinação da atividade celulolítica total, e também ácido 3,5-diinitrosalicílico para o ensaio utilizando espectrofotômetro.

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

Em tubos de ensaio de 25 mL, foi colocada uma tira de papel de filtro Whatman N° 1 de 1,0 x 6,0 cm pesando aproximadamente 50 mg. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M e 0,5 mL, pH de 4,8, da amostra centrifugada (enzima bruta). Para o branco da amostra, procedeu-se da mesma forma, porém sem o substrato. Já para o branco reagente foi colocado somente 1,5 mL do tampão citrato.

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

De acordo com Ghose (1987), foi necessário realizar diluições a fim de se obter amostras as quais liberem acima e abaixo de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL de enzima. Ao se detectar as diluições, e com o auxílio da reta padrão, identificou-se a concentração que liberasse 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL de solução. Foi elaborada uma curva padrão de liberação de açúcar utilizando glicose como substrato, dentre as concentrações de 2,5 a 0,25 mg/0,5 mL, obtendo-se a curva de calibração $Abs = 0,5819 * Glicose (mg/0,5 mL) + 0,0772$; $R2 = 0,9955$.

2.6. Produção de Endo-1, 4-β-Glucanase (CMCase)

A avaliação da produção de Endo-1, 4- β -Glucanase (CMCase) foi feita da mesma forma que o procedimento anterior, em que a metodologia proposta por Ghose (1987) e Miller (1959) foram utilizadas. A única diferença é que, para esta avaliação, foi utilizada a CMC como substrato.

2.7. Produção de etanol lignocelulósico

Os substratos originais, moídos e secados, foram inoculados com os isolados fúngicos mais promissores, selecionados nas etapas três, quatro e cinco. Tais isolados foram previamente inoculados em meio líquido BD (batata e dextrose), em que cinco discos de micélio com 1 cm de diâmetro foram inoculados em erlenmeyers de 1000 mL, contendo 500 mL de meio de cultura. A incubação foi realizada por sete dias a 28 °C em estufa com agitação, a 120 rpm. Esta etapa foi realizada para obter extratos enzimáticos a serem utilizados nas etapas seguintes.

Estes extratos enzimáticos contendo aproximadamente 10 FPU foram adicionados sobre 1 g de material lignocelulósico, no caso do isolado C-6 (capim piatã moído) e no caso do isolado P-2 (casca de arroz moída). O pH foi ajustado a um valor de 4,8 utilizando solução tampão de citrato de sódio. A incubação foi realizada a 50 °C, em incubadora com agitação a 120 rpm. Após sete dias, alíquotas deste meio BDA foram extraídas, centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) e estipuladas as concentrações de FPU, através do método que utiliza o reativo DNS.

A incubação foi realizada para favorecer a hidrólise de açúcares fermentáveis pelo extrato enzimático. Para este estudo, foi adotado o método de leitura de açúcares redutores totais, em que se utiliza o reativo DNS (MILLER, 1959; GHOSE, 1987). Diariamente, foram realizadas leituras para acompanhar a hidrólise de açúcares. Quando a hidrólise apresentou estabilidade, foi inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 (5×10^9 UFC mL⁻¹), padronizada através do método de densidade ótica (660 nm). As condições de inoculação foram mantidas a 30 °C por 72 h, em incubadora com agitação de 120 rpm. Novamente, foram realizadas leituras de açúcares redutores totais para acompanhar o consumo e conversão de glicose. Para avaliação do rendimento de etanol lignocelulósico produzido, foi utilizado um ebulliômetro.

2.8. Taxonomia dos isolados fúngicos

Foram realizados exames morfológicos e microcultivos em lâminas para identificação para taxonomia em nível de gênero. Em seguida, tais microcultivos foram enviados ao Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso para extração e amplificação do DNA dos mesmos. Já o sequenciamento do DNA foi realizado pelo Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas na Universidade Estadual Paulista (Unesp), nas seguintes etapas: 1) Extração de DNA - realizada com o kit AxyPrep DNA Total multi-origem (nome próprio) (Axygen Biosciences[®]), conforme as especificações do fabricante; 2) Obtenção de perfis de banda – foi utilizado o *primer* DH1 (F: CGCGTGGACTAACTCAGGA R: GATGAAAAGGAGCCTGGAGA) (Albani e Wilkinson, 1998). Composição do mix: 2,5 µL de tampão de amostra 10x, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL do *primer* (10 pmol), 0,25µL de Taq DNA Polimerase (Uniscience[®]), 2 µL de dNTP 100mM 25µM (Fermentas[®]) e 3 µL de DNA molde, com volume final de 25 µL; 3) Programação da amplificação - desnaturação inicial a 94 °C, por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1,6% (m/v), corado com brometo de etídeo e os perfis eletroforéticos comparados visualmente; 4) Amplificação das regiões espaçadoras internas (ITS) - *primer*: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Composição do mix: 2,5 µL de tampão de reação 10x, 0,75µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada *primer* (10pM), 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µL) (Uniscience[®]), 2 µL de dNTP (100mM 25µM) (Fermentas[®]) e 2 µL de DNA molde, com volume final de 25 µL; 5) Programação de amplificação - desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 45 s e 72 °C por 60 segundos e extensão final a 72 °C por 10 min.

2.9. Interação entre fungos e substratos

Os testes de potencial hidrolítico dos isolados fúngicos inoculados em substratos, foram conduzidos de acordo com Miller (1959), Mandels e Weber (1969) e Ghose (1987), descritos anteriormente.

Assim, os isolados obtidos em capim piatã foram incubados em erlenmeyers contendo meio e 1 g de torta de filtro e em outro erlenmeyer contendo 1 g de casca de

arroz. Já os fungos de torta de filtro foram inoculados em erlenmeyers contendo meio com 1 g de capim piatã, e em outro erlenmeyer contendo 1 g de casca de arroz. Por fim, os isolados procedentes de casca de arroz foram inoculados em erlenmeyers contendo meio com 1 g de capim piatã e, em outro, contendo 1 g de torta de filtro. A incubação durou 21 dias e as leituras de açúcares fermentáveis realizadas a cada sete dias. Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em triplicata, utilizando um delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variâncias e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando o programa ASSISTAT.

3.RESULTADOS

3.1. Isolamento dos microrganismos

Foram obtidos um total de 12, 13 e 32 isolados fúngicos a partir de torta de filtro, casca de arroz e capim piatã, respectivamente.

3.1.2. Seleção de microrganismos degradadores de celulose

No ensaio de *screening* do capim piatã, foram selecionados os cinco isolados fúngicos (C-5, C-6, C-14, C-25 e C-29) que apresentaram maior halo formado ao redor de suas colônias (Figura 3). Os isolados provenientes de casca de arroz selecionados foram: P-2, P-6, P-7, P-9 e P-13. Já os cinco isolados, provenientes de torta de filtro, que mostraram as maiores médias de halos foram os seguintes: T-7, T-8, T-10, T-11 e T-12. Os cinco fungos, de cada substrato, que tiveram as maiores médias de halos foram estudados nas etapas seguintes.

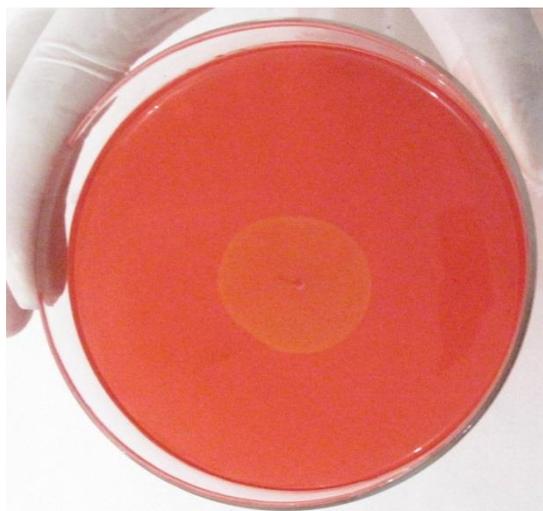


Figura 3 - Formação de halo em meio CMC (1%) inoculado com fungos isolados a partir de capim piatã, em Rio Verde, GO.

3.1.3. Avaliação da atividade celulolítica total (FPase)

Os fungos obtidos de capim piatã, torta de filtro e casca de arroz foram estudados para produção de enzimas que exibem atividades celulolíticas totais (FPase).

Dentre os cinco isolados fúngicos oleaginosos testados, provenientes de capim piatã, os isolados C-6 e C-25 apresentaram maior atividade enzimática. Os isolados 6 e 25 mostraram FPase igual a 0,02 e 0,02 FPU, respectivamente, aos 7 dias de incubação. Aos 14 dias, mostraram uma atividade de 0,06 e 0,07 FPU e, com 21 dias, apresentaram 0,03 e 0,03 FPU (Figura 4). Contrariamente, os isolados provenientes de torta de filtro e casca de arroz, não apresentaram FPase significativa (Figura 4).

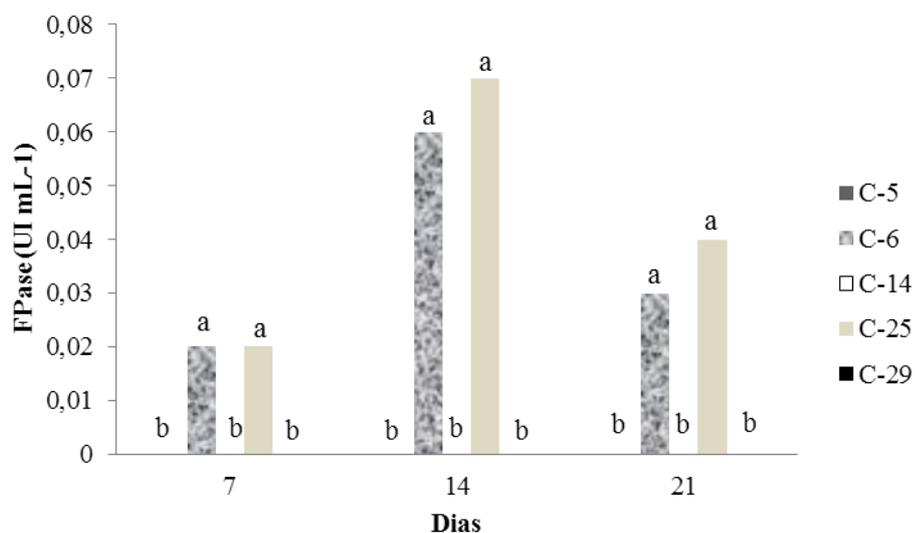


Figura 4 - Atividade FPase de isolados fúngicos oleaginosos em capim piatã aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

3.1.4. Avaliação da atividade de endo-1, 4- β -glucanase

Dentre os cinco fungos avaliados, C-6 e C-25 apresentaram os melhores complexos enzimáticos hidrolíticos. Estes isolados apresentaram atividades enzimáticas de endo 1, 4- β -glucanase (CMCase) igual a 0,73 e 0,66 UI/mL, respectivamente, aos sete dias. Aos 14 dias mostraram uma atividade de 0,76 e 0,81 UI/mL. Aos 21 dias, apresentaram 0,83 e 0,89 UI/mL (Figura 5).

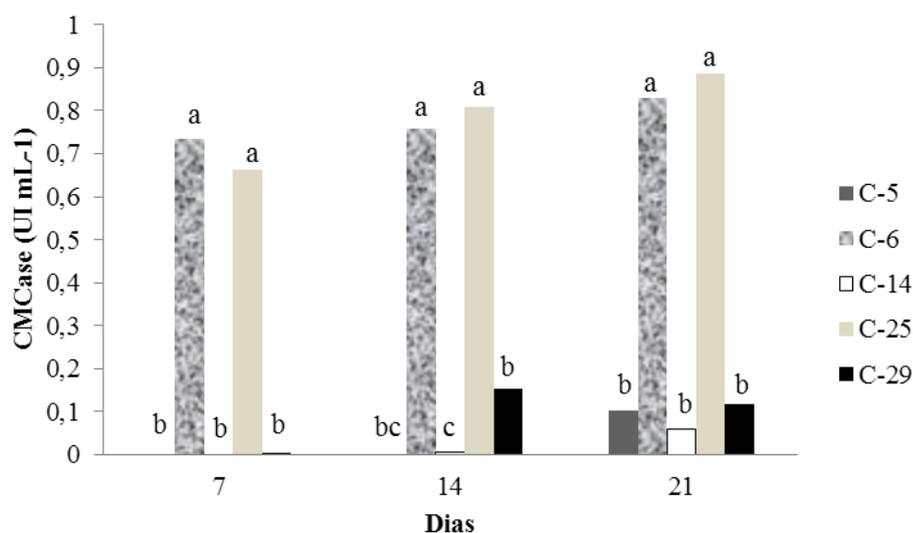


Figura 5 - Atividade CMCase de isolados fúngicos oleaginosos em capim piatã aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Dentre os cinco isolados fúngicos, provenientes de casca de arroz, os isolados P-2, P-6 e P-9 apresentaram maior atividade endocelulolítica, sendo que o isolado P-2, destaca-se como maior produtor de enzimas endoglucolíticas. Os valores apresentam oscilações, sendo aos sete dias iguais a 0,14 UI/mL, com um decréscimo aos 14 dias,

com um valor de 0,03 UI/mL. Aos 21 dias, apresenta um novo acréscimo, saltando para 0,11 UI/mL (Figura 6).

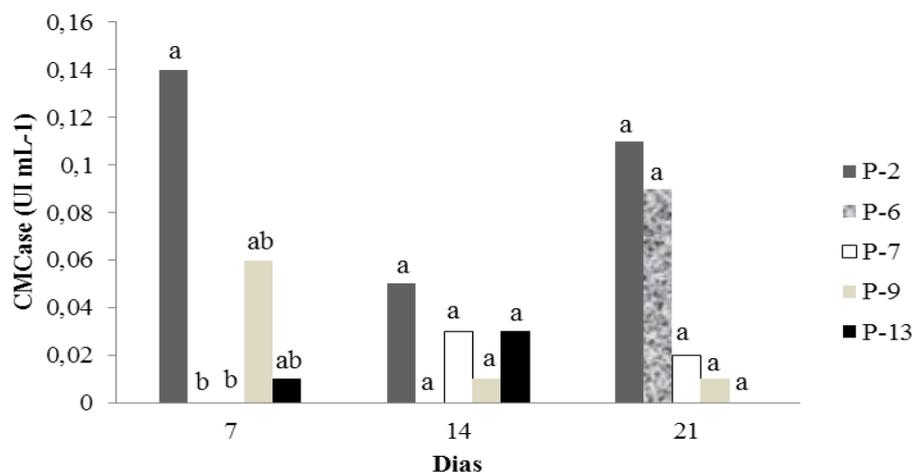


Figura 6 - Atividade CMCase de isolados fúngicos oleaginosos em casca de arroz aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Os isolados fúngicos provenientes de torta de filtro não se diferenciaram quanto aos valores de produção de enzimas endoglucosídicas (resultados não mostrados).

3.1.5. Produção de etanol lignocelulósico

As atividades de hidrólise e conseqüentemente tendo como produto a glicose, realizada durante sete dias, pelos isolados C-6 e P-2, aliada à inoculação com *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 podem ser observadas na Figura 7.

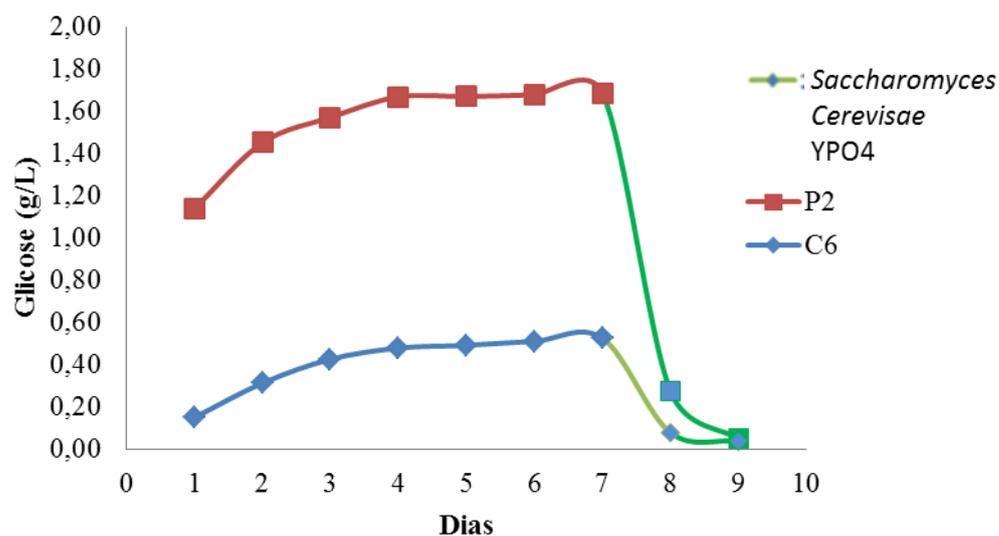


Figura 7 - Hidrólise de capim piatã com o fungo C-6 . Hidrólise de casca de arroz com o fungo P-2 . Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 .

As atividades de hidrólise de açúcares fermentáveis dos fungos foram semelhantes, pois apresentaram uma sincronia em sua curva de desenvolvimento. O fungo C-6, no primeiro dia, apresenta $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de açúcar liberado, enquanto o isolado P-2, apresenta $1,14 \text{ g L}^{-1}$. Já ao sétimo dia, observa-se o pico da hidrólise, com os valores $0,53$ para o isolado C-6 e $1,68 \text{ g L}^{-1}$ para o isolado P-2. Quando inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4, pode-se observar, já nas primeiras 24 h de inoculação, um decréscimo significativo nos teores de açúcar ($0,08 \text{ g L}^{-1}$ para o fungo C-6 e $0,28 \text{ g L}^{-1}$ para o fungo P-2). Com 48 h, os teores de açúcares residuais são de $0,04$ para o fungo C-6 e $0,05 \text{ g L}^{-1}$, para o fungo P-2.

3.1.6. Taxonomia dos isolados fúngicos

Os isolados obtidos de capim piatã que tiveram maior atividade celulolítica (C-6 e C-25) foram identificados como *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758. Dos isolados selecionados do substrato casca de arroz, o isolado P-2 foi identificado como *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23.

3.1.7. Interação entre fungos e substratos

A inoculação do fungo P-2 sobre o substrato de capim piatã teve liberação de açúcares fermentáveis igual a $0,09$ aos sete dias, $0,37$ aos 14 dias e $0,15 \text{ UI/mL}$ aos 21 dias (Figura 8).

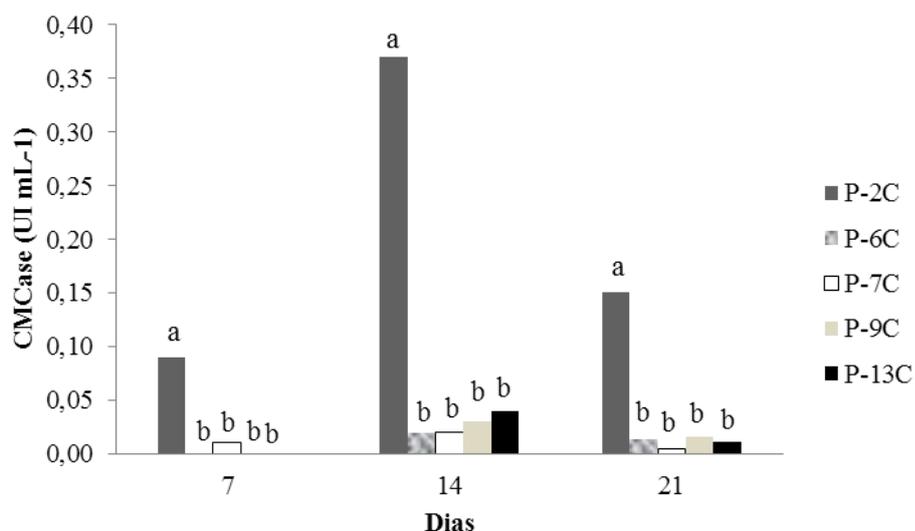


Figura 8 - Interação de endoglucanase entre fungos isolados de casca de arroz, aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), inoculados em meio Mandels e Weber (1967) com capim piatã, em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Quando estudados quanto à capacidade hidrolítica, voltada para a produção de enzimas celulolíticas totais, os isolados fúngicos P-2, P-6, P-7, P-9 e P-13, apresentaram valores aos sete dias relativamente baixos, com valores de aproximadamente 0,001 UI/mL. Aos 14 dias, o fungo P-2 destaca-se com 0,045, enquanto os outros isolados variam entre 0,02 e 0,01 UI/mL. Aos 21 dias, a liberação de açúcar pelo fungo P-2 teve um acréscimo de quatro vezes, saltando para 0,18 UI/mL (Figura 9).

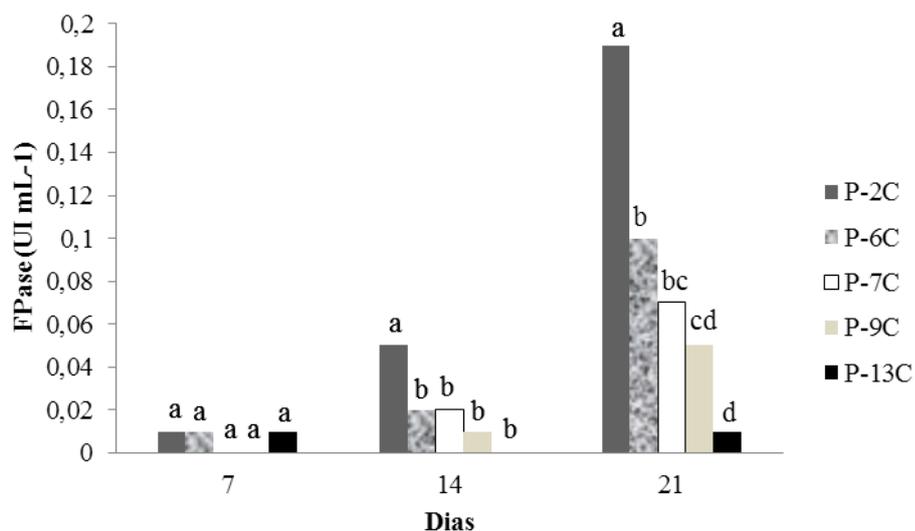


Figura 9 - Interação da atividade celulolítica total entre fungos isolados de casca de arroz, aos 7 (A), 14 (B) e 21 dias de incubação (C), e inoculados em meio Mandels e Weber (1969) com capim piatã, em Rio Verde, GO. Médias seguidas de mesma letra, em cada período de incubação, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Dentre os isolados estudados neste ensaio, apenas C-25 quando inoculado sobre a casca de arroz, mostrou atividade celulolítica relevante. Este isolado apresentou uma crescente atividade hidrolítica. Aos sete dias o teor de açúcares foi de 0,005, aos 14 dias, 0,01 e aos vinte e um dias 0,04 UI/mL, como observado no Figura 10.

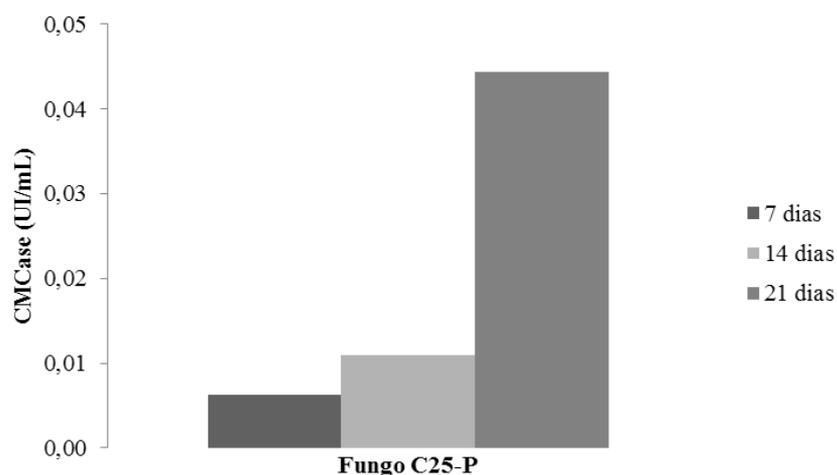


Figura 10 - Interação da atividade celulolítica total entre fungos isolados de casca de arroz inoculados em meio Mandels e Weber (1969) com capim piatã, em Rio Verde, GO

4. DISCUSSÃO

4.1. Atividade Celulolítica Total (FPase)

Os isolados provenientes de capim piatã (C-6 e C-25) apresentaram uma atividade enzimática bastante semelhante, que é justificado por estes pertencerem à mesma espécie.

Segundo Bortolazzo (2011), *Trichoderma Reesei* QM 9114 apresentou uma atividade enzimática celulolítica total (FPase) igual a 0,35 UI/mL (7 dias de cultivo), 0,39 UI/mL (14 dias) e 0,27 UI/mL (21 dias).

Sun et al. (2010) e Sukumaran et al. (2010) também obtiveram êxito ao estudar microrganismos fúngicos com potencial lignocelulolítico. Tais pesquisadores também encontraram fungos que produziam quantidades significativas de complexos enzimáticos de FPase em diferentes tipos de substratos lignocelulósicos, bem como, com diferentes períodos de inoculação. A razão de os valores referentes à CMCase serem maiores que os de FPase se deve a tendência do processo de hidrólise enzimática romper preferencialmente ligações β (1 \rightarrow 4) das moléculas de celulose. Saha (2004) relata a presença de um completo sistema celulolítico no fungo *Mucor circinelloides*, que compreende endoglucanases, exoglucanases e betaglucosidases. Um método para otimizar a utilização destas enzimas é a sua reciclagem. Botella et al. (2005), estudando o fungo *Aspergillus niger* SBS 47 também obtiveram resultados positivos quanto à produção de FPase.

Quando inoculados sobre o substrato de casca de arroz, estes fungos não apresentaram atividade celulolítica significativa, isso pela recalcitrância deste substrato. A casca de arroz possui função estrutural de proteção ao grão de arroz contra danos mecânicos e ataques microbianos. Isto confere alto teor de lignina a este substrato, sendo que a lignina é altamente tóxica à atividade fúngica. Assim, os isolados não têm acesso à celulose, de suma importância para o desenvolvimento dos fungos, pois é a principal fonte de carbono no meio. Isso justifica a baixa atividade lignocelulolítica destes isolados fúngicos sobre este substrato (ISMAIL e WALLUDIN, 1996; SINGH, 2014).

4.2. Avaliação da atividade de Endo 1, 4- β -Glucanase

O motivo para estes valores se destacarem no capim piatã, pode ser devido à composição deste substrato. Por ser uma gramínea, este substrato possui teores de lignina relativamente baixos, se comparados aos outros substratos utilizados, bem como, altos teores de celulose. Desta forma, o acesso das enzimas aos sítios de ligação da celulose presente no capim é facilitado. Os microrganismos atuam excretando enzimas para o meio, que hidrolisarão as estruturas de lignina, hemicelulose e celulose (WILSON, 2011).

Pode-se observar então, uma possível queda das quantidades de lignina no substrato lignocelulósico e, conseqüentemente, um incremento da quantidade de celulose no meio, ocasionando maior eficiência e eficácia da hidrólise pelas atividades metabólicas e enzimáticas dos isolados fúngicos. Com o incremento da celulose no meio, bem como, com o incremento das taxas de hidrólise, ocorre maior liberação de açúcares fermentáveis (XU, 2011; HORN, 2012).

Em trabalhos similares, Sukumaran et al. (2009) encontraram diferentes concentrações do complexo enzimático CMCase. Foram obtidos resultados divergentes com alterações de substratos de cultivo bem como, com alterações no tempo de ação dos microrganismos sobre os substratos. Os fungos utilizados por esses pesquisadores foram *Aspergillus niger* MTCC 7956 e *Trichoderma reesei* RUT C30.

De acordo com Botella et al. (2005), *Aspergillus niger* SBS 47 produziu resultados significativos quanto à produção de complexos enzimáticos de CMCase. Segundo Bortolazzo (2011), o fungo referência *Trichoderma Reesei* QM 9114 apresentou uma atividade enzimática de endo 1, 4-β-glucanase CMCase igual a 0,5 UI mL⁻¹, aos 7 dias de cultivo, com 14 apresentou 0,52 UI mL⁻¹ e aos 21 dias 0,3 UI mL⁻¹. Desta forma, os isolados fúngicos aqui testados apresentaram atividade mais efetiva quanto aos ensaios de endo, 1, 4-betaglucanase. Tais resultados obtidos neste trabalho indicam o grande potencial dos isolados fúngicos obtidos do Cerrado brasileiro, os quais apresentam atividades enzimáticas de endoglucanase superiores ao fungo de referência *Trichoderma reseei* QM 9414.

O gênero *Brachiaria*, em especial o cultivar Piatã, é conhecido por possuir um sistema radicular altamente fasciculado, que lhe permite obter nutrientes através de ampla gama de compilações de emaranhados de raízes que atingem grandes distâncias. Conforme a planta se consolida naquele ambiente inóspito, a mesma favorece as propriedades físico-químicas do solo, tanto em seu espaço de vazios, aumento de macroporos e capilaridade, quanto sua capacidade de agregação e teor de matéria

orgânica. Este aspecto torna o gênero interessante no âmbito científico, econômico e, principalmente, ambiental pela sua aplicabilidade em recuperação e manejo de áreas que possuem solo degradado (BUXTON e FALES, 1994). Isto favorece o fato de utilizar esta gramínea como fonte de energia, pois a mesma pode ser plantada em regiões inóspitas, como áreas degradadas.

Já para a casca de arroz, os isolados fúngicos testados neste trabalho, confirmaram sua capacidade para hidrolisar as estruturas lignificadas superficiais. Uma vez hidrolisadas ocorre à liberação de açúcares fermentáveis no meio. Ao conseguir metabolizar partes deste complexo lignina-hemicelulose, o isolado tem acesso às camadas de celulose, ocasionando sua hidrólise e, posteriormente, liberando açúcares fermentáveis ao meio (WILSON, 2011).

Um dos possíveis motivos para a atividade CMC_{Case} não apresentar valores significativos nos 14 primeiros dias de incubação pode ser atribuído a alta concentração de lignina na estrutura da casca de arroz. A lignina apresenta diversos compostos aromáticos em sua estrutura, que confere caráter tóxico à atividade fúngica. Além disto, a mesma possui estrutura condensada e apolar, que dificulta o acesso das enzimas. Outro fator de grande influência na liberação de açúcares fermentáveis no meio é a condição de cristalinidade da celulose (KLEIN-MARCUSCHAMER et al. 2012).

Devido a isso, foram observadas oscilações na hidrólise atribuída as enzimas, e as respectivas concentrações de açúcares no meio. Isso pode ser descrito por uma atividade tardia dos microrganismos, no caso do isolado P-6, pois o mesmo necessitou de mais tempo para se consolidar no meio e degradar a lignina plenamente, possibilitando, assim, acesso às estruturas da hemicelulose e celulose, com a consequente produção de açúcares (ZANZI, 2001; LYND et al., 2003; KIM e DALE, 2004; SUN e CHENG, 2002).

Já o isolado P-9 mostra uma atividade significativa, desde os sete primeiros dias de incubação, apresentando decréscimo aos 14, continuando o decréscimo aos 21 dias, apresentando valores de 0,06, 0,01 e 0,01 UI/mL, respectivamente. Isso pode ser pelas atividade enzimática fúngica apresentar boa descomplexação da lignina nos primeiros dias e, com a degradação, o microrganismo tem acesso às estruturas de hemicelulose e celulose, consumindo-as em ritmo acelerado (SUN e CHENG, 2002; LYND et al., 2003; BORTOLAZZO, 2011).

4.3. Produção de etanol lignocelulósico

No processo de hidrólise, cerca de 90,4% da celulose presente na casca de arroz foi hidrolisada e convertida em açúcares pelo fungo P-2. Já para o capim piatã, apenas 12% da celulose presente no mesmo foi convertida em açúcares pelo fungo C-6.

No caso do isolado C-6, este apresenta desenvolvimento mais ameno de hidrólise, se comparado ao isolado P-2. Isso pode ser justificado pelo fungo P-2 ter sido isolado de um substrato mais lignificado, com alto teor de recalcitrância e de alta complexidade para acesso às estruturas celulósicas. Tal fato o caracteriza como um microrganismo *R* estrategista. Tais microrganismos são considerados como bons pioneiros e conseguem explorar os recursos rapidamente, apresentando crescimento rápido e com maior elasticidade em relação às adversidades ambientais, tais como os altos teores de lignina. Já o isolado C-6, é proveniente de capim piatã, um substrato com altos teores de celulose e baixos teores de lignina, indicando maior facilidade de obtenção de nutrientes provenientes do substrato capim piatã. Isso o classifica como um microrganismo *K* estrategista que, por sua vez, se desenvolve de maneira mais retardada, utilizando a energia em favor de seu metabolismo no ambiente e de capacidade competitiva melhor (RICKLEFS, 2003).

Observam-se, no primeiro dia de inoculação dos fungos, teores interessantes de açúcares fermentáveis, que continuam em progressão, até o sexto dia, quando começam a decair. Esse incremento, durante os seis primeiros dias, torna-se interessante pelo fato que os fungos são de estirpes nativas do Cerrado, sem nenhum tipo de melhoramento genético. Além disso, os substratos capim piatã e casca de arroz não foram submetidos a nenhum tipo de pré-tratamento, sendo usados *in natura*. Outros aspectos também podem ter influenciado o processo de hidrólise, como oscilações de pH e temperatura. Ao sétimo dia, foi inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 e pode ser observado decréscimo de teores de açúcares. Isso indica que estes foram metabolizados pela levedura e fermentados a etanol com sucesso.

4.4. Interação entre fungos e substratos

Quando os fungos isolados a partir de casca de arroz foram inoculados sobre os substratos capim piatã e torta de filtro, observa-se um desenvolvimento pleno sobre este substrato, bem como atividades enzimáticas expressivas, em ambos os ensaios (CMCase e FPase). Novamente, o fungo P-2 se destaca. Isso ocorre porque o fungo é

proveniente da casca de arroz, um substrato altamente lignificado, em que o acesso à celulose é dificultado pelas características da lignina. Pelo fato do fungo ter sido isolado de um substrato recalcitrante, isto lhe confere caráter de maior agressividade, pelo seu complexo enzimático ser mais eficaz, facilitando seu acesso às estruturas celulolíticas (OLOFSSON, 2008).

O capim piatã é um substrato lignocelulósico de baixos teores de lignina e altos teores de celulose. Isso justifica os teores de açúcares liberados. Os outros isolados fúngicos também apresentaram boa capacidade hidrolítica quando inoculados sobre capim piatã (BUXTON e FALES, 1994).

Em suma, o fungo P-2 se destaca por ser um fungo com complexo enzimático voltado para substratos de alta recalcitrância e, quando inoculado em substrato de baixa recalcitrância, apresenta alto potencial hidrolítico.

Quanto aos isolados provenientes de capim piatã inoculados sobre casca de arroz, apenas o fungo C-25 apresentou atividade de CMC_{case} significativa. Esta atividade hidrolítica foi baixa, porém, confirma a eficiência do complexo enzimático deste isolado quanto à capacidade de hidrolisar materiais lignocelulósicos. A sua atividade apresentou eficácia, mesmo sobre um substrato altamente recalcitrante, o que comprova sua alta plasticidade.

5. CONCLUSÕES

- Dos isolados selecionados do substrato capim piatã, C-6 e C-25 (*Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758) apresentaram maior atividade enzimática.

- Dos isolados selecionados a partir de casca de arroz, o isolado P-2 (*Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23) apresentou a maior atividade enzimática.

- Os complexos enzimáticos dos fungos *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23 possuem potencial biotecnológico para sua aplicação em biorefinarias.

- A fermentação de açúcares redutores hidrolisados com os complexos enzimáticos dos fungos *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 foi eficaz.

- A hidrólise enzimática, com fungos isolados de compostos lignocelulósicos do Cerrado brasileiro, como pré-tratamento para produção de etanol de segunda geração, é uma alternativa para mitigar as barreiras impostas pela lignina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3051–3056, 2008.

BECKHAM, G. T.; BOMBLE, Y. J.; MATTHEWS, J. F.; TAYLOR, C. B. ; RESCH, M. G.; YARDBROUGH, J. M.; DECKER, S. R.; BU, L.; ZHAO, X.; MCCABE C; WOHLERT, J.; BERGENSTRAHLE, M.; BRADY, J. W.; ADNEY, W. S.; HIMMEL, M. E.; CROWLEY, M. F. The *O*-Glycosylated linker from the *Trichoderma reesei* family 7 cellulase is a flexible, disordered protein. **Biophysical Journal**, v. 99, p. 3773-3781, 2010.

BEVILAQUA, D. B. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2010.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011, 76 p.

BOTELLA, C.; ORVYA I-DE, C.; WEBB, D.; CANTANERO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100–106, 2005.

BUXTON, T. R.; FALES, S. L. Plant environment and quality. In: FAHEY JR.; G. C. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society. Agronomy. p. 155-199, 1994.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Avaliação da Safra Agrícola de Cana-de-Açúcar – 2ª Estimativa - agosto/2011**.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. **Applied Energy**, v. 86, p. 151–161, 2009.

FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHIC, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**, v. 43, p. 1–9, 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, p. 5-45, 2012.

KIM, S.; DALE, B. E.; Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS B. A.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1083–1087, 2012.

LIU, G.; QIN, Y.; HU, Y.; GAO, M.; PENG, S.; QU, Y. An endo-1,4- β -glucanase PdCel5C from cellulolytic fungus *Penicillium decumbens* with distinctive domain composition and hydrolysis product profile. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 190-195, 2013.

LYND, L. R.; WANG, M. Q. A product-nonspecific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. **Journal of Industrial Ecology**, v. 7, p. 17–32, 2003.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NOGUEIRA, E. B. S.; CAVALCANTI, M. A. Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.

OKANO, K.; KITAGAW, M.; SASAKI, Y.; WATANABE, T. Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. **Animal Feed Science Technology**, v. 120, p. 235–243, 2005.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1-9, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

RICKLEFS, R.; E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro, Ed: Guanabara Koogan. 2003, 503 p.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1871–1876, 2004.

SCHULZ, G.; HIRTE, W. F. Special submers screening of cellulolytic fungi and selection of *Penicillium* wild strains for cellulase production with high substrate concentration. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 144, p. 81-96, 1989.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, v. 116, p. 699-702, 2014.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SUN, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.

VICENTE G.; BAUTISTA, L.F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, 259-263, 2011.

XU, R.; TENG, F.; ZHANG, C.; LI, D. Cloning of a gene encoding beta-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* CT2 and its expression in *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 16-23, 2011.

ZANZI, R. **Pyrolysis of Biomass**. Dissertation (Master in Chemical Engineer) - Royal Institute of Technology, Stockholm, 2001.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; XIAO, P.; WANG, T.; QU, Y. Improved cellulase production via disruption of PDE01641 in cellulolytic fungus *Penicillium decumbens*. **Bioresour. Technol.**, v. 123, p. 733-737, 2012.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed celulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE FUNGOS OLEAGINOSOS ISOLADOS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA AGROINDUSTRIA DO CERRADO BRASILEIRO

RESUMO

O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras. Com este trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de produção e a qualidade do óleo extraído da biomassa fúngica de isolados obtidos a partir de substratos lignocelulósicos, visando à geração de biodiesel. Primeiramente foi feita a coleta e acondicionamento dos substratos lignocelulósicos (capim piatã, torta de filtro e casca de arroz) utilizados para isolamento dos microrganismos. Em seguida, foi feita a obtenção de isolados fúngicos com posterior extração do óleo a partir da biomassa fúngica e, por fim, a transesterificação do óleo obtido a partir desses isolados. O processo de extração de óleo a partir da biomassa fúngica seca dos isolados estudados teve rendimentos acima de 20%, caracterizando-os como microrganismos oleaginosos. A transesterificação se mostrou eficiente, apresentando, para os isolados *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23, valores acima de 90% de conversão. Os isolados fúngicos estudados apresentam alto potencial biotecnológico, visando à produção de biodiesel.

Palavras-chave: fungos oleaginosos, bioenergia, transesterificação.

ABSTRACT

Biodiesel is an ester of fatty acid, renewable and biodegradable, commonly obtained from the chemical reaction of oils or fats. This work aimed to evaluate the production potential and quality of oil extracted from fungal biomass of isolates obtained from lignocellulosic substrates, aiming to generate biodiesel. First was done the collect and packaging of lignocellulosic substrates (Piata grass, filter cake and rice husk) used for isolation of microorganisms. Then was got the fungal isolates with subsequent extraction of oil from fungal biomass, and finally was done the transesterification of the oil obtained from these isolates. The process of extracting oil from the dry fungal biomass of the isolates had yields above 20%, characterizing them as oleaginous microorganisms. The transesterification was efficient, presenting for the isolated *Penicillium pinophilum* strain KUC1758 and *Aspergillus tubingensis* strain TFR 23, values above 90% of conversion. The fungal isolates studied have a high biotechnological potential, aiming the biodiesel production.

Key words: oleaginous fungi, bioenergy, transesterification.

1. INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis tem favorecido o aprimoramento e a descentralização de investimentos, por meio da geração de emprego e renda no campo. Entretanto, é necessário que sejam estabelecidos mecanismos de suporte à produção e comercialização desses biocombustíveis. Isso é possível pela otimização de recursos e a interação das instituições públicas, privadas e dos pequenos produtores rurais. Desta forma, tornam-se essenciais para a geração de informações confiáveis, estudos que demonstrem a viabilidade jurídica, técnica, ambiental, social e comercial dos biocombustíveis (LOFRANO, 2008).

O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool, na presença de um catalisador (reação conhecida como transesterificação). Nessa reação é utilizado um catalisador alcalino que converte óleos vegetais ou gorduras animais e metanol em ésteres metílicos de ácidos graxos. Como catalisadores alcalinos, são utilizados principalmente o hidróxido de sódio e potássio, devido ao seu baixo custo (LIN, 2010).

O biodiesel constitui um combustível compatível com os atuais motores diesel, utilizados comercialmente e apresenta diversas vantagens em relação ao combustível fóssil, que inclui biodegradação avançada, toxicidade reduzida e menor emissão ativa de CO₂ (MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2005). Diversas matérias-primas podem ser utilizadas na produção de biodiesel e podem ser divididas nos seguintes grupos: óleos vegetais, gordura animal, óleos e gorduras residuais.

O uso de isolados fúngicos para a extração de óleo e geração de biodiesel tem despertado crescente interesse da comunidade científica mundial. Tais microrganismos podem acumular elevado teor de lipídios e não necessitam de terras aráveis para serem multiplicados, ao contrário de culturas oleaginosas, como a soja. Desta forma, a produção desses microrganismos não compete com a produção de alimentos e estes superam consideravelmente o potencial de produção de óleo de espécies vegetais oleaginosas. Além disso, o processo de extração de óleo é relativamente simples e estes organismos podem ser cultivados em ambientes inóspitos para a maioria das espécies vegetais, como áreas degradadas, desérticas, áreas de mineração etc. Entretanto, seu uso, de forma comercial, requer ainda mais estudos para comprovar a sua real eficácia, comparada a das plantas (ANGERBAUER et al., 2008)

Primeiramente, o processo de obtenção de energia a partir de biomassa fúngica se baseia na capacidade que os microrganismos têm de converter a energia química da biomassa em energia útil. Além disso, esse tipo de energia não provoca impactos ambientais negativos e nem envolve a produção de materiais perigosos. Também, sua produção pode ser realizada localmente, próximo da região em que há demanda, minimizando os custos relacionados ao sistema de distribuição (KOSA, 2011).

A utilização de substratos lignocelulósicos, que possuem como principal componente em sua estrutura a celulose, torna-se uma das maneiras para garantir a nutrição destes microrganismos. Isto porque, um dos fatores limitantes para o uso de fungos oleaginosos, visando à geração de biodiesel a partir de sua estrutura lipídica é o alto custo do fornecimento de nutrientes, como a glicose, bem como sua baixa produtividade (GRISOLI, 2009; HORN, 2012).

Pela sua excepcional riqueza na fauna e flora, o domínio Cerrado é considerado um *hotspot*. Com a ocupação antrópica, se tornou um domínio fragmentado, que induziu a grandes perdas de sua biodiversidade. Do ponto de vista da diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas já catalogadas, com alto nível de endemismo. Existe grande diversidade de *habitat* que determinam notável alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias (KLING, 2005; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Com este trabalho, objetivou-se avaliar o potencial de produção e a qualidade do óleo extraído da biomassa fúngica de isolados obtidos a partir de substratos lignocelulósicos, visando à geração de biodiesel.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e acondicionamento dos substratos utilizados para isolamento dos microrganismos

Amostras de capim piatã (*Brachiaria brizantha* cv. Piatã) foram coletadas no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde, de casca de arroz (*Oryza sativa*), na Distribuidora de Arroz Rio Verde e de torta de filtro, na Usina de Açúcar e Álcool Serra do Caiapó, em Montividiu, GO. Estas amostras foram coletadas em recipientes esterilizados e posteriormente estocadas para facilitar o processo de isolamento dos

microrganismos. Neste recipiente, contendo 250 g da amostra, foram adicionados 100 mL de água destilada esterilizada. Amostras de capim foram então alocadas em estufa de fluxo contínuo por 30 dias, a temperatura entre 36–40 °C. Esta etapa teve por finalidade a indução de desenvolvimento de microrganismos, visando à obtenção de fungos que atuem na degradação de matéria orgânica vegetal.

2.2. Isolamento dos microrganismos

Os testes foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia Agrícola e Química Tecnológica no Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde. O isolamento foi realizado utilizando amostras de capim piatã, de casca de arroz e de torta de filtro, provenientes de frascos hermeticamente fechados, durante 30 dias, a 50 °C em estufa.

Para isto, alíquotas de 10 mL dos substratos foram misturadas em 90 mL de solução salina (0,85%), seguindo o método das diluições sucessivas até 10^{-3} . De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 200 μ L para placas de Petri esterilizadas, acrescentando, em seguida, o meio de cultura BDA (200 mL de infusão de batata, 15 g L^{-1} de extrato de levedura, e 20 g L^{-1} de agar, completando com um litro de água destilada), e mantidos durante sete dias a 28 °C. As diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram utilizadas para isolamento e contagem dos isolados fúngicos.

2.3. Extração do óleo a partir da biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi cultivada em meio BDA (batata, dextrose e ágar), durante sete dias, em incubadora de fluxo ascendente, a 30 °C. Em seguida, a biomassa foi coletada e alocada em estufa para secagem, a 50 °C, por aproximadamente 2 h.

Na sequência, 0,5 g da biomassa seca foi alocada em um balão de 250 mL, acrescentado metanol:clorofórmio, como solução extratora do óleo, na razão (1:2, v/v). Em seguida, as amostras foram agitadas por 10 minutos com 20 mL da mistura extratora e centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante de hexano, em que o biodiesel estava solubilizado e se levou ao rotoevaporador.

2.4. Transesterificação do óleo obtido a partir dos isolados fúngicos

Os lipídeos foram dissolvidos em hexano, misturados em metanol e ácido sulfúrico (8%), de acordo com a sua quantidade. Esta mistura foi mantida em chapa aquecedora, com banho-maria a 60 °C, e uma agitação constante por cinco dias. Após a separação da mistura em duas fases, coletou-se o sobrenadante. Todos os experimentos deste trabalho foram realizados em triplicata, utilizando um delineamento inteiramente ao acaso. Os dados foram submetidos à análise de variâncias e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando o programa ASSISTAT.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento dos microrganismos

Foi obtido um total de 12, 13 e 32 isolados fúngicos a partir de torta de filtro, casca de arroz e capim piatã, respectivamente. Porém, apenas os isolados C-6 e P-2 foram estudados quanto a sua capacidade para produção de biodiesel.

3.2. Rendimento do óleo produzido por *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23

De modo geral, os isolados fúngicos apresentaram alta capacidade de produção de lipídeos. Especificamente, o isolado *P. pinophilum* mostrou um rendimento de 48% de óleo em sua biomassa fúngica seca. Já o isolado *A. tubingensis* teve um rendimento de 37% de óleo em sua biomassa fúngica seca.

3.3. Transesterificação a biodiesel do óleo produzido por *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23

No processo de transesterificação do óleo obtido a partir da biomassa fúngica seca, obtiveram-se altos teores de biodiesel. Os rendimentos foram expressivos, demonstrando a eficácia do processo, bem como, o potencial destes microrganismos como fonte para produção de biodiesel. Ambas as transesterificações apresentaram valores acima de 90% de conversão do óleo bruto a biodiesel.

4. DISCUSSÃO

4.1. Rendimento do óleo produzido por *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23

Li et al. (2006), relatam rendimento lipídico de 76,1% em isolados de *R. toruloides*. De acordo com Kosa e Ragauskas (2011), o gênero *Aspergillus* apresentou teor lipídico de 18,15% e taxa de crescimento em torno de seis dias de cultivo. Também, Lin et al. (2010) detectaram teor de óleo (18,16%), após seis dias de cultivo deste gênero.

Kong et al. (2007) relatam total de 52,6% de rendimento de lipídeos para o fungo *L. starkeyi*. Han et al. (2006) obtiveram rendimentos de 46,13% de lipídeos com *C. potothecoides*. Similaremente, Takeno et al. (2005) relatam que o fungo *Mortierella alliacea* estirpe YN-15, apresentou rendimento de ácidos graxos de 19,5%. Meng et al. (2009), obtiveram 57% de lipídeos estudando o fungo *Aspergillus* sp. Vicente et al. (2009), relatam sucesso ao extrair lipídeos a partir do fungo *Murccor circinelloides*.

Neste trabalho, *P. pinophilum* e *A. tubingensis* apresentaram rendimento lipídico acima de 20%, o que os configura como fungos oleaginosos com potencial para produção de biodiesel (VICENTE et al., 2009).

4.2. Transesterificação a biodiesel do óleo produzido por *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23

Subhash e Mohan (2011) converteram com êxito os lipídeos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* sp. a biodiesel. Zheng et al. (2012), em trabalho similar a este, confirmam a aplicabilidade e viabilidade de produção de biodiesel a partir de microrganismos. Subramaniam et al. (2010) relatam a viabilidade de se produzir biomassa fúngica, a fim de se obter seus lipídeos, utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato.

Estes fungos possuem alto potencial biotecnológico. Sua aplicação é destinada à biorefinarias, para serem inoculados sobre materiais lignocelulósicos. Este potencial de uso também foi estudado por Subhash e Mohan (2011), que constataram a capacidade de produção de biodiesel, a partir da inoculação de *Aspergillus* sp. sobre sabugo de milho.

Subhash e Mohan (2014) relatam que diversos fatores influenciam na transesterificação de óleo microbiano para geração de biodiesel. Dentre estes, pH e quantidade de glicose no meio de cultivo são os mais importantes. Yan et al. (2014) ressaltam a importância da produção de biodiesel microbiano e também do potencial que este tipo de biodiesel possui para competir e reduzir custos de combustíveis fósseis.

YOUSUF et al. (2012) relatam que o potencial de produção de óleo e conversão do mesmo a biodiesel, do isolado fúngico *Humicola lanuginosa*, é de 75%. Vicente et al. (2010) obtiveram 98% de ácidos graxos livres do total de lipídeos extraídos do isolado fúngico *M. circinelloide*. Ainda neste trabalho, os pesquisadores realizaram a transesterificação e obtiveram um rendimento de 18,9% de biodiesel.

5. CONCLUSÕES

- O processo de extração de óleo a partir da biomassa fúngica seca dos isolados estudados teve rendimentos acima de 20%, caracterizando-os como microrganismos oleaginosos.

- A transesterificação se mostrou eficiente, apresentando, para os isolados *Penicillium pinophilum* estirpe KUC1758 e *Aspergillus tubingensis* estirpe TFR 23, valores acima de 90% de conversão.

- Os isolados fúngicos estudados apresentam alto potencial biotecnológico, visando à produção de biodiesel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRISOLI, R.; COELHO, S. T.; MATAI, P. H. L. S. Energia microbológica. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 4, p. 1-19, 2009.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-12, 2012.

LIN, H.; CHENG, W.; DING, H.T.; CHEN, X.J.; ZHOU, Q.F.; ZAO, Y.H. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus*

oryzae A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7556–7562, 2010.

KLING, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

KONG, X. L.; LIU, B.; ZHAO, Z. B.; FENG, B. Microbial production of lipids by cofermentation of Glucose and xylose with *Lipomyces starkeyi*. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, v. 5, p. 36–41, 2007.

KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 53-61, 2011.

LI, Y. H.; LIU, B.; ZHAO, Z. B.; BAI, F. W. Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 650–656, 2006.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. Pensamento Plural: **Revista Científica do INIFAE**, v. 2, p. 83-89, 2008.

LYND, L. R.; WANG, M. Q. A product-nonspecific framework for evaluating the potential of biomass-based products to displace fossil fuels. **Journal of Industrial Ecology**, v. 7, p. 17–32, 2003.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1–5, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 23/10/2013.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Disponível em:
<<https://www.biodiesel.gov.br>> Acesso em: 12/01/2013.

SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9286-9290, 2011.

SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: influence of critical factors. **Fuel**, v. 116, p. 509-515, 2014.

SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S.; ZAPPI, M.; BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1271-1287, 2010.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SUA, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

TAKENO, S.; SAKURADANI, E.; TOMI, A.; INOARA-OCHIAI, M.; KAWASHIMA, H.; SHIMIZU, S. Transformation of oil-production fungus, *Mortierella alpine* 1s-4, using zeocin, and application to arachidonic acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 617-22, 2005.

VICENTE G.; BAUTISTA, L. F.; RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ, F. J.; SÁDABA, I.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 22-27, 2009.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 297-305, 2004.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; GUTIÉRREZ, F. J.; RODRIGUEZ, R.; MARTÍNEZ, V.; RODRÍGUEZ-FRÓMETA, R. A.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. **Energy Fuels**, v. 28, p. 3173-3178, 2010.

ZHENG, Y.; YU, X.; ZENG, J.; CHEN, S. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 50, 2012.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T.; Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

YOUSUF, A.; HOQUE, M.; JAHAN, M. A. J.; PIROZZI, D. Technology and engineering of biodiesel production: a comparative study between microalgae and other non-photosynthetic oleaginous microbes. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, p. 624-628, 2012.