

Colocando a Biodiversidade Microbiana Brasileira a Serviço da Indústria de Biocombustíveis

Betania Ferraz Quirino

Jessica Carvalho Bergmann

Nídia Silva Pacheco Lopes Ramos

Shelly de Fátima Paluan

Betúlia de Moraes Souto

Leane Perim Rodrigues

Cristine Chaves Barreto

Ricardo Henrique Kruger

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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