



INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE PRÉ-TRATAMENTO FÚNGICO COM *Trichoderma* sp. EM SUBSTRATO ORGÂNICO PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Autores:

Thaysa M. R. Rodrigues Colégio Dom Feliciano

Camila de O. Gomes Colégio Dom Feliciano

Marlon C. M. Guimarães Colégio Dom Feliciano

Thaís de A. Alves Colégio Dom Feliciano

Fernanda Borges Colégio Dom Feliciano

Palavras-chave:

Etanol de 2^o geração. Biocombustível. Fermentação alcoólica.

Resumo:

A busca por novas fontes renováveis para produção de combustíveis é um tema que vem sendo largamente estudado na comunidade acadêmica. Por isso, a fermentação de substratos ricos em celulose, para produção de etanol de segunda geração, representa um grande avanço científico. Compostos orgânicos, como cascas de fruta, possuem uma grande reserva de monossacarídeos que estão presos em uma molécula, a celulose. Enquanto esses monossacarídeos estiverem conectados por ligações químicas não servem de alimento para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um processo de fermentação alcoólica. Por isso, são necessárias reações enzimáticas prévias para que possam ser separados e posteriormente transformados em álcool pela ação microbiana. Tendo em vista que, o fungo *Trichoderma* sp. é um organismo capaz de degradar a molécula de celulose, se executou análises com o objetivo de verificar se um tratamento fúngico do substrato escolhido seria capaz de liberar os açúcares simples para posterior fermentação por levedura *S. cerevisiae*, aumentando por consequência a quantidade de álcool produzido no processo. Porém,

é esperado que o fungo *Trichoderma* sp. realize a quebra da celulose para a sua sobrevivência, pois absorve as moléculas de glicose liberadas no meio de cultura. Esse fato justifica o tema da pesquisa, pois é necessário comparar a velocidade da absorção dos monossacarídeos com a velocidade da quebra da celulose pelo fungo para se verificar se haverá aumento da disponibilidade de açúcares fermentescíveis para as leveduras. Cascas de banana foram utilizadas como substrato, previamente trituradas, foram inseridas, em um biorreator de cultivo sólido, desenvolvido especialmente para presente pesquisa, juntamente com os esporos desidratados do fungo escolhido. Após o período de incubação o substrato foi transferido para um fermentador, confeccionado de garrafa PET, e acrescido de água e das leveduras, que realizaram a fermentação alcoólica. O mosto já fermentado, foi então destilado para que fosse possível separar o álcool produzido do restante do material orgânico. Foi possível obter um acréscimo no teor de álcool final obtido no mosto fermentado de 0,10% da amostra de referência, sem pré-tratamento fúngico, para 0,31% para amostra com pré-tratamento fúngico. Portanto, o objetivo principal de produção alcoólica por fermentação da levedura *S. cerevisiae* através da implantação de tratamento com o fungo do gênero *Trichoderma* sp. foi atingido. Apesar de pequeno ganho de rendimento, o resultado obtido demonstra o potencial do método desenvolvido. O biorreator de cultivo em estado sólido de escala laboratorial utilizado no estudo foi idealizado e fabricado pelo próprio grupo de pesquisa, utilizando materiais de baixo custo. Embora os resultados obtidos nessa pesquisa ainda não permitam a viabilidade da implementação do método em grande escala, acredita-se que em um futuro os compostos orgânicos se tornem uma nova fonte de biocombustíveis.

Resumo Acadêmico:

INTRODUÇÃO

A busca por novas fontes renováveis para produção de combustíveis é um tema que vem sendo largamente estudado na comunidade acadêmica. Por isso, a fermentação de substratos ricos em celulose, para produção de etanol de segunda geração, representa um grande avanço científico. Compostos orgânicos, como cascas de fruta, possuem uma grande reserva de monossacarídeos que estão presos em uma molécula, a celulose. Enquanto esses monossacarídeos estiverem conectados por ligações químicas não servem de alimento para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um processo de fermentação alcoólica. Por isso, são necessárias reações enzimáticas prévias para que possam ser separados e posteriormente transformados em álcool pela ação microbiana. Tendo em vista que, o fungo *Trichoderma* sp. é um organismo capaz de degradar a molécula de celulose, se executou análises com o objetivo de verificar se um tratamento fúngico do substrato escolhido seria capaz de

liberar os açúcares simples para posterior fermentação por levedura *S. cerevisiae*, aumentando por consequência a quantidade de álcool produzido no processo. Porém, é esperado que o fungo *Trichoderma* sp. realize a quebra da celulose para a sua sobrevivência, pois absorve as moléculas de glicose liberadas no meio de cultura. Esse fato justifica o tema da pesquisa, pois é necessário comparar a velocidade da absorção dos monossacarídeos com a velocidade da quebra da celulose pelo fungo para se verificar se haverá aumento da disponibilidade de açúcares fermentescíveis para as leveduras.

A casca de banana faz parte dos resíduos orgânicos gerados diariamente nas cidades, mais da metade de todo lixo produzido no Brasil é composto por resíduos orgânicos, de 52 a 60%. Esses resíduos estão depositados, em sua maioria, em aterros sanitários, onde geram gás metano, um dos gases responsáveis pelo aquecimento global, durante o processo de decomposição microbiana.

A necessidade de explorar novas formas de produção do etanol nos levou também a cooperar e partilhar do incentivo as microdestilarias de pequenos produtores e associações rurais já que a Legislação Brasileira via Decreto 85.698/81, libera as microdestilarias de até 5000L/dia mediante registro sumário junto ao Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) a produção de álcool para consumo próprio. As microdestilarias instaladas no Brasil utilizam em sua maioria o caldo de cana, rico em açúcares fermentáveis como matéria-prima do processo. Porém, sabe-se que a celulose, quando quebrada pode gerar uma quantidade grande de monossacarídeos, que servem como fonte de alimento para leveduras na fermentação alcoólica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para as presentes análises foram utilizadas cascas de banana, previamente trituradas e acrescidas de água, formando um líquido pastoso, como pode ser visto na figura 1. Afim de evitar a contaminação por outros de outros fungos, foi autoclavada a 127°C e 1,5kgf/cm². Após a esterilização, amostra foi imersa em um banho de gelo, para baixar a temperatura, pois a adição do fungo *Trichoderma* sp. O fungo *Trichoderma* sp. foi adicionado no

substrato seguindo a orientação recomendada pelo fabricante, para cada quilograma de substrato deverão ser utilizadas cinco gramas do fungo.



Figura 1. Substrato a base de casca de banana triturada e autoclavada.

Parte do substrato preparado foi separado e fermentado por quatro dias com *S. cerevisiae* de alta fermentação, adicionada segundo especificações técnicas do fabricante, sem a presença do fungo *Trichoderma sp.* como agente a quebra celulósica. Essa análise gerou a amostra intitulada “amostra padrão”, que foi utilizada como comparativa para verificar se o pré-tratamento fúngico proposto contribui ou não para o aumento de álcool produzido na etapa de fermentação alcoólica.

Outra parte do substrato foi submetida ao pré-tratamento fúngico, conforme sequência de etapas da figura 2. Para isso, foi colocada dentro do biorreator, onde foi agitada quatro vezes ao dia por um período de até trinta minutos e oxigenada a cada duas horas. A amostra ficou sete dias em contato com o fungo, sendo recolhidas amostras para o teste de brix. A amostra presente no biorreator contaminada pelo fungo foi autoclavada para inativar o fungo *Trichoderma sp.* pois se acredita que sua presença pode inibir a atuação das leveduras. Após a autoclavagem, a amostra foi imersa em um banho de gelo, para baixar a temperatura até no máximo 35°C, pois a adição da levedura em temperaturas tão altas pode ocasionar a sua deterioração. A fermentação ocorreu em quatro dias. Após esse período, o substrato foi fermentado, gerando a amostra intitulada “1º amostra”, da mesma maneira que a amostra padrão já havia sido fermentada.

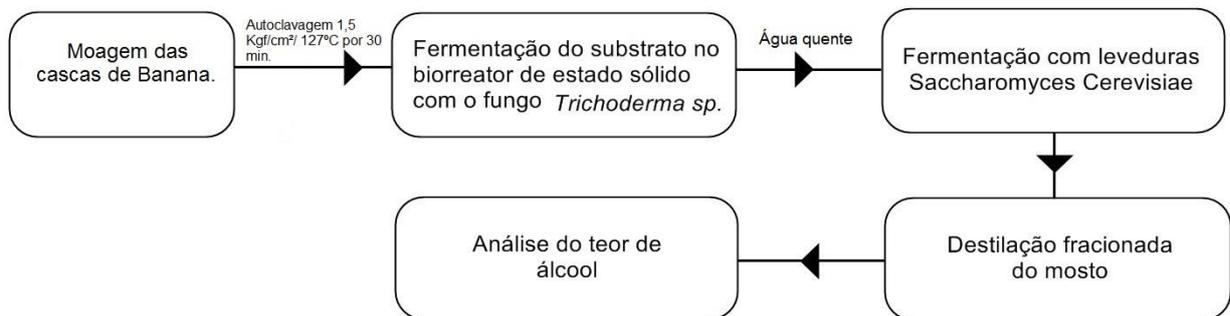


Figura 2. Diagrama de blocos das etapas de executadas para o substrato submetido ao pré-tratamento fúngico.

Um fermentador nada mais é do que o local onde as leveduras *S. cerevisiae* irão atuar sobre o mosto, formando álcool e liberando CO₂. Para isso, o sistema deve ser bem vedado para evitar a presença de oxigênio dentro do equipamento que pode tornar ineficiente o processo. Sendo assim, foi utilizada uma garrafa PET de dois litros com uma mangueira inserida dentro dela para a retirada de dióxido de carbono em um copo com água, como pode ser observado na figura 3.



Figura 3. Fermentador alcoólico utilizado nos experimentos.

Após a fermentação alcoólica ambos mostos foram filtrados e destilados, por destilação fracionada em laboratório. A fase sólida, retido na torta de filtração, rico em leveduras e nutrientes foi utilizado como adubo, onde foram

realizados dois testes de eficácia. No primeiro teste plantamos uma muda de folhagem de jardim com terra misturada ao excedente da fase e no segundo teste a muda plantada diretamente neste excedente. O excedente da fase não poderia ser simplesmente desperdiçado, por isso há um reaproveitamento da fase orgânica, originando uma interação energética.

Segundo alguns resultados prévios, que serão vistos no próximo tópico, o aperfeiçoamento do processo se fez necessário. Nesta segunda etapa de análise foram repetidos todos os passos descritos anteriormente para amostra submetida ao pré-tratamento fúngico, porém alterou-se o tempo de cultivo do substrato no biorreator de sete para quatro dias, e a temperatura de autoclavagem para degradação do fungo *Trichoderma* sp. de 127°C para abaixo de 100°C. Essa análise gerou a amostra intitulada “2º amostra”. Nesta etapa também foram realizados o teste de Brix utilizando um refratômetro para quantificar os açúcares simples presentes no sustrato.

DESENVOLVIMENTO DO BIORREATOR EM ESTADO SÓLIDO

Um biorreator é um dispositivo usado para realizar reações ou processos biológicos, sendo assim, a construção deste para o presente estudo é quebrar as moléculas de celulose a partir da adição do fungo *Trichoderma* sp. que em temperatura ambiente e alto nível de umidade produzirá açúcares fermentáveis. O biorreator foi construído a partir de cano de PVC de 150mm de diâmetro e 35cm de comprimento com um eixo móvel com pás soldadas a barra de ferro que se move a uma velocidade de 2,5 rotações por minuto, como pode ser observado nas figuras 4 e 5. Como o fungo é um organismo vivo, necessita além de calor e umidade, ventilação, sendo assim foi implementado ao sistema um aparelho de nebulização para impulsionar a entrada de ar no biorreator por um orifício em uma das extremidades.



Figura 4. Biorreator de cultivo em estado sólido desenvolvido.



Figura 5. Agitador do tambor do biorreator de cultivo em estado sólido desenvolvido.

RESULTADOS E DISCUSSAO

As amostras de pasta de banana removidas durante a etapa de cultivo sólido em biorreator foram submetidas análise de Brix. No primeiro cultivo, substrato autoclavado a 127°C, a pasta de banana apresentou uma concentração de açúcar fermentável de 2g em 100g de substrato antes e depois da batelada de 7 dias. Devido a constância da quantidade de açúcar foi decidido realizar três análises na segunda batelada, substrato autoclavado a 100°C, no início, no meio e no final. Em 100g de substrato obteve-se o valor inicial de 2,5g, valor que chegou a zero na análise realizada em 2 dias de cultivo e voltou a aumentar no final da batelada para 2g. Essa variação na quantidade de açúcar no substrato sugere que o fungo *Trichoderma* sp. consumiu os açúcares simples

do substrato quando foi posto em contato, porém, após o consumo total dos monossacarídeos o fungo iniciou a quebra enzimática da celulose. Esse fato, apesar de evidenciando em apenas uma batelada, é bastante promissor e motiva novas pesquisas que poderiam encontrar o ponto ideal de finalização do cultivo em meio sólido afim de atingir o maior índice de açúcares fermentescíveis.

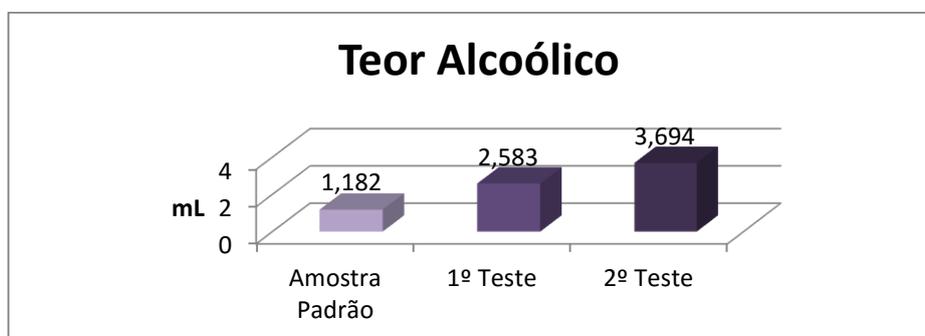
Aos valores alcoólicos obtidos de cada destilação tiveram baixa rentabilidade em função do baixo teor de açúcares, resultado já esperado na leitura do Brix, isso pode ser notado durante a destilação fracionada do mosto. Todas as amostras, inclusive na amostra padrão, ultrapassaram rapidamente o seu ponto de ebulição, não ficando mais do que um minuto estacionada em 78 a 85°C, que é ponto de ebulição do álcool etílico.

As amostras obtiveram os seguintes resultados:

Teor Alcoólico das Amostras		
Amostras (15mL)	mL	%
Amostra Padrão	1,182	0,10
1º Teste	2,583	0,22
2º Teste	3,694	0,31

Embora os valores sejam baixos, o segundo teste mostrou-se mais eficiente, a isso podemos atribuir algumas hipóteses positivas:

- Redução do tempo da amostra no biorreator.
- Autoclavagem abaixo de 100°C para degradação do fungo. A alta temperatura pode ocasionar a caramelização dos açúcares ali presentes, impedindo com que a levedura *S. cerevisiae* alimente-se e gere álcool.



O bagaço que sobra da filtragem do mosto mostrou-se um eficiente adubo, porém deve ser misturado a terra, pois as mudas de plantas que foram colocadas

neste excedente puro, não resistiram já que após duas semanas, nesta amostra proliferaram-se fungos, fato este que não ocorreu na primeira amostra, com o bagaço misturado com a terra.

CONCLUSÕES

Foi possível obter um acréscimo no teor de álcool final obtido no mosto fermentado de 0,10% da amostra de referência, sem pré-tratamento fúngico, para 0,31% para amostra com pré-tratamento fúngico. Portanto, o objetivo principal de produção alcoólica por fermentação da levedura *S. cerevisiae* através da implantação de tratamento com o fungo do gênero *Trichoderma* sp. foi atingido.

Apesar de pequeno ganho de rendimento, o resultado obtido demonstra o potencial do método desenvolvido. O biorreator de cultivo em estado sólido de escala laboratorial utilizado no estudo foi idealizado e fabricado pelo próprio grupo de pesquisa, utilizando materiais de baixo custo. Embora os resultados obtidos nessa pesquisa ainda não permitam a viabilidade da implementação do método em grande escala, acredita-se que em um futuro os compostos orgânicos se tornem uma nova fonte de biocombustíveis. Além disso, a otimização dessa metodologia permitiria a implementação deste sistema primeiramente em microdestilarias de produtores e associações rurais, visto que a Legislação Brasileira via Decreto 85.698/81, permite que produtores rurais produzam combustível para consumo interno de sua propriedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RODRIGUES D. C.; AGUIAR C. M.; LUCENA S. L. Hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar: produção de Celulases por *Arpergillus Níger* e avaliação das cinéticas da fermentação e da desativação enzimática, 2009. Disponível em: http://cac.php.unioeste.br/eventos/senama/anais/PDF/ARTIGOS/85_1269966411_ARTIGO.pdf. Acesso em: 16 de jan. 2015.

SENSATO, V. Projeto de microdestilaria de álcool é alternativa para pequeno produtor rural. *Jornal da Unicamp*, Campinas, p. 07, 1º a 14 de dez. 2008. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/dezembro2008/ju418_pag07.php. Acesso em: 16 de jan. 2015.

SOUZA O.; SCHULZ A. M.; FISHER A. A. G.; WAGNER M. T.;SELLIN N. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 16, n. 8, p. 915-921,

2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-43662012000800015&script=sci_arttext. Acesso em: 16 de jan. 2015.

MOVIMENTO NACIONAL DE PRODUTORES. O etanol da fazenda. Disponível em: http://www.mnp.org.br/?pag=ver_noticia&id=397385. Acesso em: 16 de jan. 2015.

FURBINO Z. Pequenos agricultores mineiros fabricam etanol para abastecer veículos próprios. Disponível em: http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2013/10/27/internas_economia,464219/pequenos-agricultores-mineiros-fabricam-etanol-para-abastecer-veiculos-proprios.shtml. Acesso em: 16 de jan. 2015.

FERREIRA L. Maior parte do lixo produzido no Brasil é orgânico e poderia ser aproveitada. Disponível em: <http://www.brasildefato.com.br/audio/maior-parte-do-lixo-produzido-no-brasil-%C3%A9-org%C3%A2nico-e-poderia-ser-aproveitada>. Acesso em: 26 de jan. 2015.

NOVA CANA. Sobre o etanol. Disponível em: <http://www.novacana.com/etanol/sobre-etanol/>. Acesso em: 26 de jan. 2015.

FERREIRA L. Maior parte do lixo produzido no Brasil é orgânico e poderia ser aproveitada. Disponível em: <http://www.brasildefato.com.br/audio/maior-parte-do-lixo-produzido-no-brasil-%C3%A9-org%C3%A2nico-e-poderia-ser-aproveitada>. Acesso em: 26 de jan. 2015.

FREITAS M. M. Aspectos gerais e morfológicos de *Trichoderma sp.* Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/descricao-micologica-aspectos-gerais-e_2802.html. Acesso em: 1º de mar. de 2015.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. International Journal of Biological Sciences. v.5, p. 578595, 2009. Disponível em: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748470/. Acesso em: 27 de jun. 2015.