

Avaliação do potencial de micro-organismos para a biodegradação de resíduo da farinha na produção de bioetanol

Evaluation of the potential of microorganisms for the biodegradation of flour residue in bioethanol production

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de degradação de biomassa de grãos de trigo para obtenção de açúcares fermentescíveis. Foram coletados swabs com amostras de microrganismos em dez pontos do Câmpus Ponta Grossa da UTFPR. As amostras foram repicadas em meio PCA para obtenção de colônias isoladas que foram repicadas e mantidas armazenadas no laboratório de fermentações. As amostras de grãos de trigo foram provenientes de descarte de moinho do município de Ponta Grossa. Os microrganismos não identificados foram inoculados no meio contendo como ingrediente principal os grãos de trigo. Para isso foram realizados três experimentos: grãos de trigos inteiros sem esterilização e sem pré- tratamento; grãos triturados e esterilizados e grãos triturados, pré-tratados e esterilizados. Para o acompanhamento da degradação das amostras foi realizada a medida do brix na fração líquida da amostra. As amostras com melhor desempenho tiveram um incremento de 14% no brix final.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção. Trigo. Açúcares fermentescíveis.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the the degradation potential I of wheat grain biomass for the production of fermentable sugars. Samples of microorganisms were collected at ten points of the UTFPR-Ponta Grossa. Samples were picked in PCA medium to obtain isolated colonies that were picked and kept stored in the laboratory. The samples of wheat grains were obtained from mill in the municipality of Ponta Grossa. The microorganisms were inoculated in the medium containing as main ingredient the wheat grains. For this, three experiments were performed: wheat grains without sterilization and without pretreatment; crushed and sterilized grains, and crushed, pretreated and sterilized grains. To monitor the degradation of the samples brix was measured in the liquid fraction of each sample. The best performing samples have a 14% increment in the final brix.

KEYWORDS: Bioprospecting. Weat. Fermentable Sugars.

Vanessa Vaz Leonel
nessa_leonel@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná – Campus Ponta Grossa, Paraná,
Brasil

Sabrina Ávila Rodrigues
sabrinaavila@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do
Paraná – Campus Ponta Grossa, Paraná,
Brasil

Recebido: 19ago.2020.

Aprovado: 01 out.2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis fontes não renováveis de energia e são responsáveis pelas emissões de CO₂ na atmosfera. Com isso tem sido cada vez mais freqüente os estudos do uso de biomassas alternativas para a geração de energia. Transformar compostos de alta massa molar, inicialmente sem potencial para uso nos processos fermentativos em sacarídeos de estrutura simples e baixa massa molar que possam ser convertidos via fermentativa em compostos passíveis de fornecer energia é um desafio atual.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o segundo cereal mais produzido no mundo, é cultivado em larga escala e em diversas regiões. No Brasil, o Paraná é o principal produtor e a estimativa para 2019 era de que houvesse um incremento na safra em relação ao ano anterior (ABITRIGO, 2019). Entre as principais aplicações do cereal está a moagem e produção de farinha. Neste processo, alguns grãos não apresentam qualidade adequada para moagem e são descartados, descascados e inteiros, destinados em sua maior parte para a alimentação animal. Estes grãos descartados apresentam-se como potencial biomassa para a fermentação, sendo necessário, para tanto, que as moléculas de alta massa molar presentes no grão sejam transformadas em açúcares fermentescíveis. Esta transformação pode ocorrer por hidrólise química, enzimática ou microbiana.

Este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial de micro-organismos para a biodegradação de resíduos da produção de farinha, com isso até a fermentação para a produção do bioetanol ou etanol de 2ª geração, que é apontado como alternativa de fornecimento de energia renovável, em que tem o grande desafio da sustentabilidade e da viabilidade econômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram coletados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Ponta Grossa. As atividades referentes à esta pesquisa estão cadastradas no SISGEN sob o número A76A0CD.

A coleta foi realizada com uso de *swab* estéril em uma área de aproximadamente 16 cm² de superfícies de dez pontos de coleta. Os *swabs* foram transportados até o Laboratório de Bioprocessos I e inoculados por estriamento em placade petri contendo meio PCA (Plate Count Agar). Para o preparo das placas foi pesado 3,525g do meio e 150mL de água destilada, após ser autoclavado foi transferido nas 4 placas de Petri descartáveis e esterilizadas, depois de transferidas foram armazenadas na geladeira por 3 dias. Este procedimento de preparo do meio foi repetido para cada amostracoletada.

As placas inoculadas foram incubadas na estufa em estufa à 28°C por 72 horas. Foi selecionado uma ou mais colônias isoladas em cada placa para repique em placa de petri contendo meio PCA incubada a 28°C por 72 horas.

Os microrganismos isolados foram utilizados para fazer as análises seguintes. Foram conservados em geladeira com repique mensal.

Testes fermentativos

Para a avaliação do potencial dos microrganismos isolados anteriormente para a degradação de açúcares de alto peso molecular em açúcares fermentescíveis, cada isolado foi inoculado em meio de cultivo composto de grãos de trigo quebrados, que são resíduos do processamento do trigo para a obtenção de farinha em um moinho do município de Ponta Grossa PR, recebidas na UTFPR-PG e armazenadas sob refrigeração.

Para acompanhar o processo fermentativo foi medido o Grau Brix de cada amostra diariamente por 10 dias em refratômetro, foi utilizado o laboratório de Laticínios para realizar os processos.

No primeiro experimento (Fermentação 1) Foi utilizado os grãos de trigo triturados, adição de água na proporção de 1:1 (m:m) e 0,2% na massa total de sacarose. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Este experimento foi realizado em tubos de ensaio com 25mL do meio e inoculados com uma alçada (0,1mL) da solução contendo os microrganismos. Foram elaborados 20 tubos, sendo 5 tubos para cada cepa, totalizando 4 cepas isoladas que apresentaram melhor desempenho na fermentação 1. As cepas utilizadas foram das placas 1,3,6 e 9. Os tubos inoculados foram incubados em estufa a 28°C. O Brix foi medido nos tempos de 24horas, o segundo foi medido com 48 horas, o terceiro com 72horas, o quarto foi medido após 30 dias e o quinto após 60 dias. Após cada medição os tubos eram descartados para evitar contaminação.

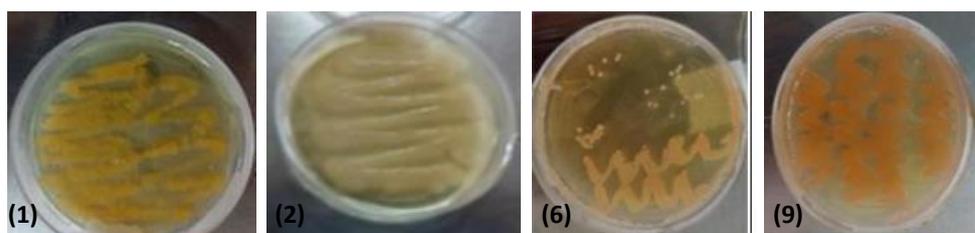
O teste com este meio foi realizado para analisar se houve alguma alteração no Brix. Após a análise, foi realizado um novo meio com algumas modificações, já que o intuito desse projeto é a produção de álcool a partir da fermentação com o amido.

O segundo experimento (Fermentação 2) consiste em 3 soluções diferentes. A primeira solução contém 50g de grão de trigo triturado e 1L de água. Já a segunda inclui 50g de grão de trigo triturado, 1L de água e 10mL de ácido clorídrico (HCl) 1mol. E a terceira consiste em 50g de grão triturado, 1L de água e 20mL de HCl. Com as 3 soluções já preparadas foi realizado o banho maria à 60°-70°C, essa pré-digestão é feita por 30 minutos. Após isso, utilizamos as 4 cepas onde foram distribuídas cada solução em 5 tubos de ensaio com tampa para cada cepa, totalizando 60 tubos de ensaio com tampa. Para o acompanhamento da degradação das amostras foi realizada a leitura do índice de refração das amostras, o °Brix utilizando o refratômetro analógico-RHB32. As medidas foram realizadas no tempo 0 dias, 3 dias, 6 dias, 30 dias e 60dias.

RESULTADO E DISCUÇÃO

Após coleta e isolamentos, foram selecionadas 4 amostras de microrganismos para serem aplicadas nos testes fermentativos (Figura 1). As amostras com melhores resultados seguirão para identificação molecular. Todas as amostras serão depositadas na CMIB (Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR-PG.

Figura 1: colonias de microrganismos coletadas na UTFPR- PG

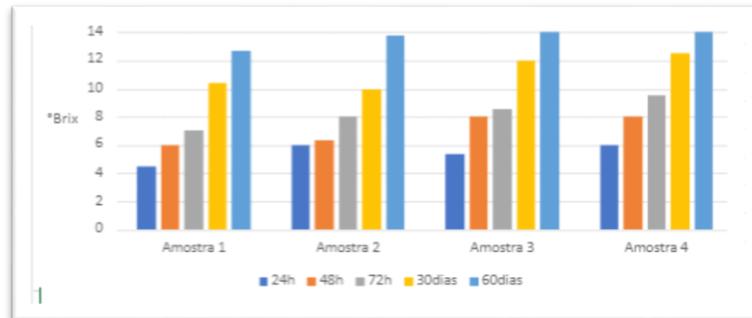


Fonte: autoriaprópria (2020)

Local de coleta das amostras (1) banco bloco H UTFPR-PG, (3) árvore bloco C UTFPR-PG, (6) arbustobloco K UTFPR-PG, (9) árvore bloco J UTFPR-PG

As quatro amostras de microrganismos foram aplicadas em processo fermentativo (Fermentação 1) apresentando incremento no teor de sólidos solúveis totais de até 10 unidades (Gráfico 1).

Gráfico 1: Teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em amostras de trigo ao longo de 60 dias de fermentação com 4 cepas de microrganismos coletados na UTFPR-PG.

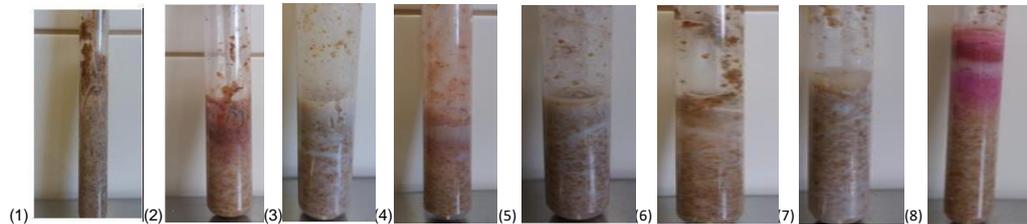


Fonte: Autoria própria (2020).

O incremento no Brix das amostras aponta que houve um aumento na fração de sólidos que se dissolve na água, composta principalmente por sacarose. O que indica que as amostras em estudo apresentam potencial para produção de enzimas capazes de converter os polissacarídeos presentes no trigo em açúcares fermentescíveis (AGUIAR FILHO, 2008). Outros estudos são necessários para avaliar o teor de açúcares redutores nas amostras analisadas.

Foi possível atingir níveis superiores a 10° brix com 30 dias de fermentação, 13,8 °Brix ao final de 60 dias, isso ocorreu devido ao aumento da superfície de contato do meio (grãos de trigo triturados) proporcionou aumento no brix das amostras.

Figura 2: Fotos dos tubos de reação para o processo de fermentação 1.

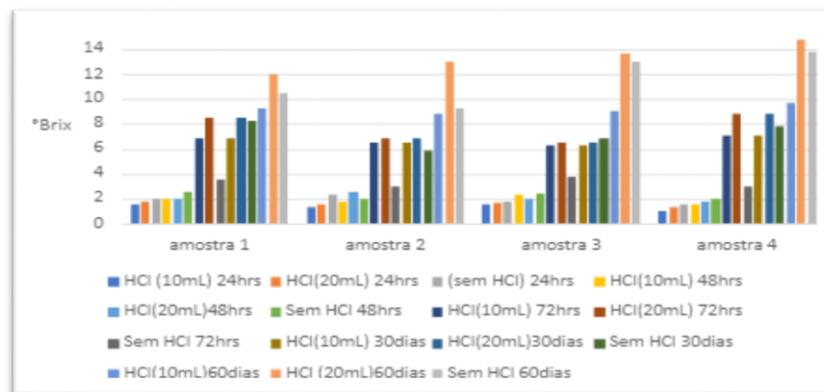


Fonte: própria autoria (2020)

Legenda: Tubo 1: Primeira medição com a cepa 3. Tubo 2: Última medição com a cepa 3. Tubo 3: Primeira medição com a cepa 6. Tubo 4: Última medição com a cepa 6. Tubo 5: Primeira medição com a cepa 9. Tubo 6: Última medição com a cepa 9. Tubo 7: Primeira medição com a cepa 1. Tubo 8: Última medição com a cepa 1.

Na segunda fermentação foi aplicado tratamento prévio com hidrólise ácida, segundo Ribeiro, et al (2009) é recomendada para realizar a quebra do amido em partículas de menor massa molar. Este processo adiciona etapas ao processo o que o torna mais caro, por isso só é recomendada somente quando a presença de resultados expressivos. Para este experimento (Gráfico 2) o uso da hidrólise ácida nas condições em que foi aplicada apresentou resultados semelhantes aos das amostras da fermentação 1, não tratada, por isso não recomendamos o uso desta técnica para o pré-tratamento da amostra.

Gráfico 2: Resultados do teor de sólidos solúveis totais (° Brix) fermentação 2



Fonte: Autoria própria (2020)

O processo de hidrólise ácida é um tratamento prévio com ácido que encarece o processo, uma vez que temos o acréscimo do uso de aditivos (ácido clorídrico) e também de etapas ao processo (aquecimento e resfriamento) tendo em vista que o aumento no brix não foi expressivo (6,5%) não aconselhamos o uso da hidrólise, já que o não houve muita diferença do meio com a hidrolisa ácida e o meio sem hidrolise.

Outras análises são requeridas para confirmar a presença de açúcares redutores nas amostras, assim como a otimização do processo fermentativo visando a redução no tempo de fermentação e o aumento da eficiência do processo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram feitos vários testes em diferentes meios para a fermentação, até encontrarmos o meio onde houve maior variação do °Brix. Observou-se que o melhor meio, era com o grão de trigo triturado, água com 20mL ácido clorídrico com o microrganismo inoculado a 60 dias na hidrólise ácida. Foi onde obteve melhor o resultado, o °Brix final foi 14,7, se compararmos esse resultado com as da indústria, o

°Brix está próximo, já que algumas indústrias trabalham com no mínimo °Brix 16. Apesar de está próximo, a fermentação na hidrolise ácida não é recomendada, já que gera mais custos e o meio sem a hidrolise ácido o °Brix foi de 13,8 na fermentação 1, dando uma diferença de 6,5%. Os microrganismos isolados estão em fase de identificação.

Devido ao Covid-19 as atividades do laboratório foram canceladas, os próximos passos a caracterização completa do meio de cultivo, as análises e otimização de temperatura, agitação e tempo de fermentação e também a conclusão do processo de identificação das leveduras e bactérias.

AGRADECIMENTOS

Na oportunidade em que o campus Ponta Grossa da UTFPR, juntamente com o curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a professora responsável pelo projeto de pesquisa por me dar essa oportunidade e a minha família e amigos que sempre me apoiaram.

REFERÊNCIAS

- ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria de Trigo.
<<http://www.abitrigo.com.br/>Acesso em 01/08/2019.
- AGUIAR FILHO, J.M.M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar. Dissertação, USP 80p. Disponível em
https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10032009-095639/publico/Jose_Aguiar_Filho.pdf Acesso em 26/08/2020
- HARGREAVES; IIBOSHI. PAULO. **BIOPROSPECÇÃO DE NOVAS CELULASES DE FUNGOS PROVENIENTES DA FLORESTA AMAZÔNICA E OTIMIZAÇÃO DE SUA PRODUÇÃO SOBRE CELULIGNINA DE BAGAÇO DE CANA**, engenharia química 2007). Acesso em: 01/07/2019
<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/bioprospeccao-de-novas-celulases-de-fungosfilamentosos.pdf>
- HOUGHTON J.S.; WEATHERWAX,J.; FERRELL,J. **Breaking The Biological Barriers To Cellulosic Ethanol**:Ajoint ResearchAgenda,In Research Roadmap Resulting F Rom The Biomass To Biofuels Workshop Sponsored By The U.S. Department Of Energy., UsDepartmentOfEnergy,2006).Acesso em:01/08/2019.
<https://www.osti.gov/biblio/1218382ELLULOSIC.PDF>
- PEREIRAJR.,N.;COUTO,M.A.P.;SANTAANNA,L.M.M. **Biomass of lignocellulosic compositionforfuel ethanolproductionwithinthethecontextofbiorefinery**.Series on biotechnology,ed.1,v.2,2008).Acesso em 01/07/2019. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v47s1/1517-8382-bjm-47-s1-0064.pdf>
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Editora ARTMED 6ª edição cap 27, p 714-731, 2003).
(Awafo, V. A.; Chahal, D. S.; Simpson, B. K. **Optimization of ethanol production by Saccharomyces cerevisiae (ATCC 60868) and Pichia stipitis Y-7124: A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of whet straw 2009**). Acesso em: 01/07/2019.<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4514.1998.tb00258.x>