



Técnicas de isolamento, cultivo, identificação e fermentação de hexoses e pentoses de *Sacharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis* e microrganismos da casca do limão

Guilherme Mendes Soares¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (guilhermemsoares@yahoo.com)

Resumo

Os microrganismos são seres microscópicos que ocupam uma miríade de ambientes e desempenham as mais variadas funções. Uma série de produtos desejáveis ao ser humano são fabricados a partir do metabolismo microbiano, como os produtos tradicionais fermentados, sendo essenciais na geração do etanol. Neste estudo foram utilizados microrganismos fermentadores de pentoses e hexoses onde foi verificado o potencial fermentativo destes micro-organismos em diferentes meios. Além disso, o estudo verificou as características morfológicas e bioquímicas de culturas de bactérias e leveduras oriundas de aparas da casca de limão e testou suas capacidades de fermentação. O uso de *Sacharomyces cerevisiae* na forma de leveduras imobilizadas mostrou ser uma boa alternativa por permitir alto rendimento, facilidade na condução de etapas e separação das células imobilizadas. O reaproveitamento das leveduras imobilizadas é interessante, por diminuir custos com inóculo. Conclui-se que dentre as fontes de carbono usadas para o crescimento do microrganismo, a preferencial é a glicose, por ser de fácil assimilação pelas vias metabólicas. Além disso, a diferença de disponibilidade de fontes pode causar alterações no crescimento e na morfologia da colônia, e a produção de etanol não está diretamente relacionada a assimilação de glicose. As técnicas utilizadas durante as etapas de isolamento, cultivo, identificação e fermentação para as aparas da casca de limão mostraram eficácia e aplicabilidade.

Palavras-chave: Micro-organismos fermentadores. Etanol. Pentoses e Hexoses.

Área Temática: Biocombustíveis

Technical isolation, cultivation, identification and fermentation of hexoses and pentoses of *Saccharomyces cerevisiae* and *stipitis* *Scheffersomyces* and lemon peel microorganisms

Abstract

*Microorganisms are microscopic beings that occupy a myriad of environments and perform the most varied functions. A number of desirable products the human being is made from microbial metabolism, such as traditional fermented products, are essential in the generation of ethanol. This study used microorganisms fermenting pentoses and hexoses, which found the fermentation potential of these micro-organisms in different ways. Furthermore, the study found the morphological and biochemical characteristics of bacterial and yeast cultures derived from lemon rind shavings and tested their fermentation capabilities. The use of *Saccharomyces cerevisiae* in the form of immobilized yeast was shown to be a good alternative for allowing high performance, ease of driving steps and separation of the immobilized cells. The reuse of the immobilized yeast is interesting, by reducing costs inoculum. It is concluded that among the carbon sources used for the microorganism growth, glucose is preferred because it is easily assimilated by metabolic pathways. Furthermore, the availability of sources of difference may cause changes in growth and colony morphology, and the production of ethanol is not directly related to the assimilation of glucose. The techniques used during the stages of isolation, cultivation, identification and fermentation to the shavings of lemon peel showed effectiveness and applicability.*



Keywords: *Fermenting microorganisms. Ethanol. Pentose and Hexoses.*

Theme area: *Biofuels.*

1 Introdução

Os microrganismos são seres microscópicos que ocupam uma miríade de ambientes e desempenham as mais variadas funções. Existe uma grande variedade de linhagens no ambiente, muitas das quais desconhecidas, linhagens estas que podem possuir grande aplicabilidade em diversas áreas (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Muito tem se falado na engenharia genética de microrganismos e suas aplicações, todavia deve-se lembrar do grande número de organismos ainda desconhecidos (GAVRILESCU, 2005).

Uma série de produtos desejáveis ao ser humano é produzido a partir do metabolismo microbiano, desde antibióticos, ácidos orgânicos, alcoóis, enzimas, até produtos tradicionais fermentados como iogurtes, pão, cerveja e vinho. Os produtos fermentados, são aqueles formados no processo da fermentação etanólica, que é a base bioquímica para sua obtenção. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma das mais utilizadas para a conversão de açúcares fermentescíveis a etanol e CO₂. Contribui diretamente para a eficiência e rendimento do processo, a espécie e a linhagem utilizada, suas características bioquímicas, genéticas e morfológicas, bem como a viabilidade e concentração de células. Têm grande importância na geração do etanol e outros biocombustíveis produzidos a partir da fermentação.

Para realizar o estudo de microrganismos é necessário manter linhagens cultiváveis no laboratório, para que possam ser cultivadas e estudadas. A primeira etapa para a utilização de um microrganismo de interesse industrial é a etapa de isolamento de uma colônia. A prática de isolamento consiste na obtenção de culturas puras, aquelas que são formadas apenas por um microrganismo de interesse (COVIZZI et. al. 2007) Nesta fase, ocorre a seleção de uma colônia através da observação da produção de produtos formados ou características morfológicas da célula.

Neste estudo foram utilizados microrganismos fermentadores de pentoses e hexoses, como a *Sacharomyces cerevisae* e *Scheffersomyces stipitis* e foi verificado o potencial fermentativo destes micro-organismos em diferentes meios. Dentre as diversas técnicas para aumentar a concentração do inóculo, promovendo sua resistência mecânica, destaca-se a imobilização de células por aglutinação em alginato de cálcio (BATISTA 2005). Para tal são necessários estudos de variáveis como diâmetro e quantidade de bioesferas para se determinar a viabilidade técnica. Além disso, o estudo verificou as características morfológicas e bioquímicas de culturas de bactérias e leveduras oriundas de aparas da casca de limão e testou suas respectivas capacidades de fermentação de hexoses.

2 Metodologia

Nos meses de junho a julho de 2014, foi realizado o isolamento de microrganismos a partir de aparas da casca de limão que foram inoculadas em meio líquido e sólido. Também foi verificado o potencial fermentativo de micro-organismos que fermentam hexoses e pentoses (*S. cerevisae* livres e imobilizada _ por aglutinação em alginato de cálcio _ , R131 e SSQ4).

Para os isolados da casca do limão, as técnicas aplicadas para leveduras foram, teste de fermentação, teste de assimilação de amido e urease e testes de fermentação de hexoses. Os testes possuem a finalidade de identificação de aspectos macroscópicos (colônias) e microscópica para leveduras. Para a caracterização de bactérias foram usados os métodos de



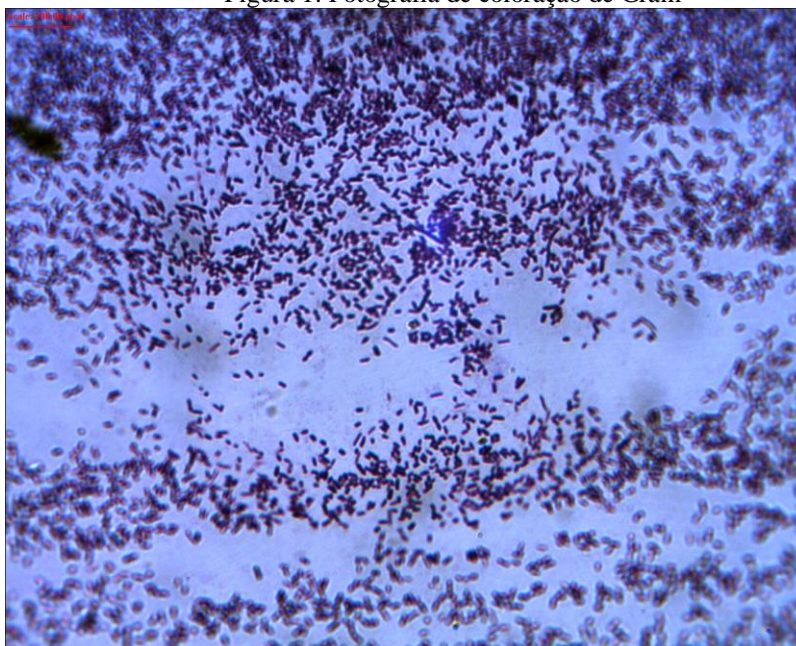
microcultivo, esporulação, motilidade, coloração de Gram e, igualmente, o teste de fermentação de hexoses, com o propósito de identificação dos microrganismos.

Para micro-organismos que fermentam hexoses e pentoses, foram usados meios que apresentavam xilose, glicose e xilose e glicose, e destes foi verificada a produção de etanol.

3 Resultados

Quanto aos microrganismos da casca do limão, nas leveduras encontradas, observou-se hifas verdadeiras e reprodução por divisão binária e fissão. Também, foram encontradas bactérias Gram negativas, de motilidade negativa. No teste de esporulação foi visualizado crescimento de ascósporos. Para o teste de assimilação de carbono e nitrogênio os microrganismos assimilaram grande parte das fontes de carbono. Quanto ao teste de fermentação para hexoses, houve desprendimento de gás e mudança da coloração do meio indicando que houve fermentação em ambos os microrganismos e consequentemente liberação de CO₂ nos meios estudados, no entanto, a produção de etanol e liberação de CO₂ foi quantitativamente diferente. Para o teste de hidrólise da ureia, como não houve uma alteração significativa de cor, o resultado foi considerado negativo, podendo concluir que os microrganismos não produzem a enzima urease. Igualmente, não foi detectada a secreção de amilase, o teste de amido foi negativo, pois não houve formação de halo no perímetro do inoculo.

Figura 1: Fotografia de coloração de Gram



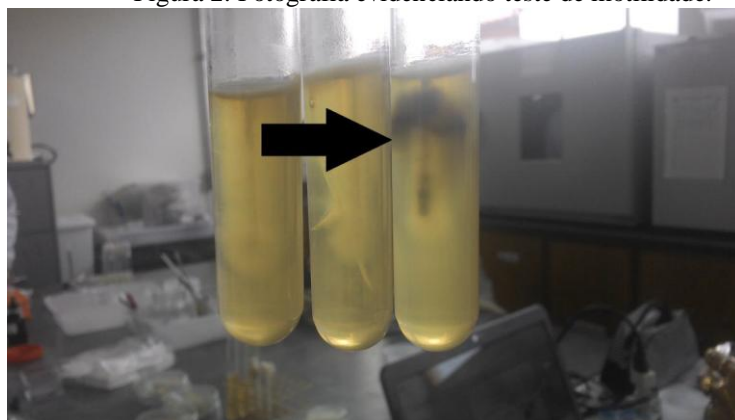
Fonte: Autor.

Nas análises do potencial fermentativo para microrganismos que fermentam pentoses e hexoses, houve um maior rendimento de etanol para *S. cerevisae* livres do que imobilizada, embora a diferença foi pequena. Quanto aos ensaios com os microrganismos 131 e SSQ4, o primeiro apresentou uma produção significativa de etanol, principalmente para a fermentação alcoólica das hexoses. A fermentação alcoólica da xilose é realizada por ambos os microrganismos, embora não haja produção considerável de etanol. A maior produção de etanol foi verificada para os meios glicose e xilose para o microorganismo 131, com um rendimento de 13,333 g/L e para o meio com apenas glicose, o microrganismo teve um rendimento de 13,295 g/L. Quanto ao consumo de açúcares, enquanto *S. cerevisae* consumiu 19,103 gramas e 15,035 gramas para leveduras livres e imobilizadas, respectivamente, o



microrganismo 131 consumiu 7,210 gramas do meio contendo xilose+glicose e o microrganismo SSQ4 consumiu 0,184 gramas, para o mesmo meio.

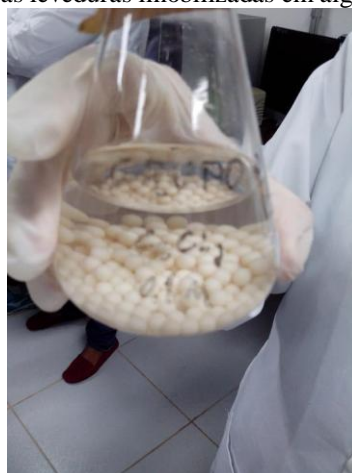
Figura 2: Fotografia evidenciando teste de motilidade.



Fonte: Autor.

Dentre as fontes de carbono disponibilizadas para o crescimento do microrganismo, a glicose foi consumida preferencialmente, por ser mais facilmente assimilável pelas vias metabólicas. A diferença de disponibilidade de fontes pode causar alterações no crescimento e na morfologia da colônia (tamanho, forma, textura e cor). Além disso, a produção de álcool etílico não está diretamente relacionada a assimilação de pentoses ou hexoses, já que muitas vezes o microrganismos utiliza a fonte apenas para o seu próprio crescimento.

Figura : Fotografia mostrando as leveduras imobilizadas em alginato de cálcio.



Fonte:Autor

4 Conclusão

As técnicas estudadas durante o trabalho são de fundamental importância para as aplicações microbiológicas aos biocombustíveis, uma vez que tratam-se de técnicas de identificação, isolamento, cultivo e testes bioquímicos, que permitem o entendimento do metabolismo e manipulação microbiana, o que é pertinente para a produção de produtos provenientes destes microrganismos utilizados na geração de biocombustíveis.

O uso de *Sacharomyces cerevisiae* na forma de leveduras imobilizadas mostrou ser uma boa alternativa, de grande atratividade por permitir alto rendimento, facilidade na condução de etapas e separação das células imobilizadas. O reaproveitamento das leveduras imobilizadas é uma característica interessante destas, por diminuir custos com inóculo.



Ainda foi possível concluir que dentre as fontes de carbono usadas para o crescimento do microrganismo, a preferencial é a glicose, por ser de fácil assimilação pelas vias metabólicas. Além disso, a diferença de disponibilidade de fontes pode causar alterações no crescimento e na morfologia da colônia, e a produção de etanol não está diretamente relacionada a assimilação de glicose, devido ao fato de que muitas vezes o microrganismo utiliza a fonte apenas para o seu próprio crescimento.

As técnicas utilizadas durante as etapas de isolamento, cultivo, identificação e fermentação mostraram eficácia e aplicabilidade, repercutindo positivamente no estudo e pesquisa das aplicações microbiológicas aos biocombustíveis.

Referências

BATISTA, M. A. **Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. DA. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology -a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471–499, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. Microbiologia. **Artmed**, Porto Alegre, 10 ed., 2012. 934 p.