



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO ECOSISTEMA DE PRODUÇÃO DO SORGO SACARINO EM JABOTICABAL – SP

Lidyane Aline de Freitas⁽¹⁾, Miguel Angelo Mutton⁽¹⁾, Nathieli Tomires Hollupi⁽¹⁾, Juliana Pelegrini Roviero⁽¹⁾, Márcia Justino Rossini Mutton⁽¹⁾

RESUMO

Considerada uma importante alternativa em relação a produção de combustíveis, o etanol de segunda geração é obtido a partir de biomassa lignocelulósica, (celulose, hemicelulose e lignina). As pentoses resultantes da hidrólise da hemicelulose, não são metabolizadas de maneira eficaz pelas estirpes de leveduras conhecidas, fazendo-se necessário o isolamento de novas estirpes. A presente pesquisa foi desenvolvida em ambiente de produção do sorgo sacarino com o intuito de identificar leveduras capazes de metabolizar pentoses, caracterizando as linhagens através de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. O experimento foi realizado a partir de amostras de solo, com duas variedades distintas de sorgo sacarino, cultivado em área experimental. Foram isoladas sete estirpes de leveduras. Destas, seis estirpes apresentaram capacidade de assimilar xilose.

Palavras-chave: Sorghum bicolor L. Moench, pentose, etanol

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEAST PRODUCTION ECOSYSTEM SWEET SORGHUM IN JABOTICABAL – SP

Lidyane Aline de Freitas⁽¹⁾, Miguel Angelo Mutton⁽¹⁾, Nathieli Tomires Hollupi⁽¹⁾, Juliana Pelegrini Roviero⁽¹⁾, Márcia Justino Rossini Mutton⁽¹⁾

SUMMARY

Considered an important alternative to the fuel's production, second generation ethanol is obtained from lignocellulosic biomass (cellulose, hemicellulose and lignin). The pentoses resulting from the hydrolysis of hemicellulose are not effectively metabolized by yeast strains available in market. So, it is necessary to research new strains. The aim of this study was to isolate new yeast's strain from the sweet sorghum production soil, evaluating the ability in metabolizing pentose. The experiment was conducted in Jaboticabal-SP, at area of sweet sorghum production.

⁽¹⁾Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista. Departamento de Tecnologia. Via de Acesso Professor Paulo Donatto Castellane s/n. E-mail: lidyane.freita@gmail.com

The yeasts were isolated in medium WLN, and the metabolize test were done in Duran tube. It was isolated 7 yeasts, but only 6 metabolized xylose.

Key-words: Sorghum bicolor L. Moench, pentose, ethanol

INTRODUÇÃO

Mesmo derivado de fontes renováveis de energia, a produção de bioetanol em larga escala a partir de culturas agrícolas gera preocupações ambientais e sociais. Para solucionar estes problemas é importante o desenvolvimento de processos tecnológicos para a produção de etanol a partir de biomassa alternativa, os chamados biocombustíveis de segunda geração. Dentre as diversas biomassas, destacam-se as matérias-primas lignocelulósicas, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar e do sorgo sacarino.

Para realização do processo de hidrólise, a biomassa deve passar por um pré-tratamento, permitindo a transformação dos açúcares em fermentescíveis. Neste processo ocorre a conversão das celulosas, hemicelulosas e lignocelulosas, gerando dois tipos de açúcares as pentoses e as hexoses, que são usadas no processo de fermentação para a produção de etanol de segunda geração.

As linhagens de leveduras convencionalmente usadas industrialmente não são capazes de desdobrar pentoses, derivadas dos processos de hidrólise da hemicelulose. Entretanto após o processo de hidrólise, parte significativa dos açúcares apresentam-se nesta forma. Neste contexto, torna-se necessário o isolamento e a identificação de novas linhagens de leveduras eficazes na metabolização de pentoses.

OBJETIVOS

A presente pesquisa objetivou isolar leveduras do ecossistema de produção de sorgo sacarino a partir de amostras do solo. Com o intuito de encontrar leveduras capazes de metabolizar pentoses, caracterizando e identificando novas linhagens através de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de cada camada do solo (Tabela 01) foram coletadas em ecossistema de produção de sorgo sacarino localizado em área experimental do departamento de Produção Vegetal da FCAV- Jaboticabal, no dia 30 de Setembro de 2014, no período matutino, com temperatura média de 23,9° C, após leve precipitação pluviométrica no dia da coleta e ocorrência de precipitação em dias anteriores, de acordo com a Estação Agroclimatológica da FCAV- Jaboticabal.

Tabela 01: Discriminação das camadas do solo do cultivo de sorgo sacarino safra 2015, coletado em área experimental da FCAV- Jaboticabal, para isolamento de leveduras.

Solo	
1ª Parte	Palha – Superficial

2ª Parte	Palha e solo
3ª Parte	Solo (2 cm)
4ª Parte	Solo (5 cm)

Desta forma, coletou-se amostras em três pontos distintos, numeradas de acordo com o procedimento de coleta. Sendo duas na linha de plantio da variedade BRS508 e uma próxima à variedade CV147. Em cada ponto foram coletadas amostras de quatro profundidades do solo, totalizando 12 amostras. É importante ressaltar, que na área experimental, a palha do sorgo sacarino da última colheita encontrava-se presente. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em potes plásticos de 80 mL estéreis devidamente identificados e mantidas sob refrigeração por 48 horas.

Para o isolamento das leveduras, foi utilizado o meio seletivo WLN, que serve para enumerar e isolar leveduras totais (GREEN; GRAY 1950, apud OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1988). Para o plaqueamento das amostras, foram transferidas 1g da amostra do solo através do auxílio de espátula esterilizada e flambada, para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril 0,85%, o tubo foi agitado e procedeu-se a diluição sucessiva até 10^{-7} .

Realizou-se o plaqueamento de 0,1 mL do inóculo no meio WLN, com auxílio de agitação com pérolas de vidro esterilizadas. O plaqueamento foi realizado em duplicata para cada uma das três diluições escolhidas 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} . As placas foram mantidas em crescimento em estufa tipo BOD, por um período de 24 a 48 horas a 28° C. Observou-se após este período o crescimento total das leveduras em cada uma das diluições e tipos de camadas do solo coletado. É importante ressaltar, que a utilização deste meio teve como intenção apenas isolar leveduras a partir da análise das características macromorfológicas das colônias. Deste modo, não houve a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada uma das leveduras isoladas.

A seguir avaliou-se a assimilação de Fonte de Carbono através de meio líquido empregando-se meio Basal de Nitrogênio: BactoYestNitrogen Base – 6,70 g; Fonte de carbono – 5,00 g; Água destilada q.s.p – 100 mL (WICKERHAM; BURTON, 1948; WICKERHAM, 1951; LODDER; KREGER VAN-RIJ, 1952 apud van der WALT; YARROW, 1984). Para avaliação empregou-se: Glicose, Sacarose, Frutose, Xilose, Arabinose e Rafinose. O meio BactoYestNitrogen Base concentrado 10 vezes, juntamente com cada uma das fontes de carbono avaliadas, foram preparados e esterilizados em membrana Millipore. Utilizou-se alíquotas de 0,5 mL do meio concentrado que foram pipetados assepticamente, em tubos de ensaio esterilizados contendo 4,5 mL de água destilada estéril.

Nos tubos, contendo o Meio basal de Nitrogênio, com suas respectivas fontes de carbono, foram inoculados com alíquotas de 0,1 mL de estepré- inóculo, sendo incubadas a temperatura entre 25° C e 28° C por 21 dias. O crescimento foi avaliado de acordo com a visibilidade de três traços de diferentes espessuras contidos em cartão colocado atrás dos tubos (GUIDI, 2000), sendo considerados os resultados: (-) negativo: 3 traços; (+w) positivo: 2 traços (mais forte e intermediário) são visíveis; (+) positivo: nenhum traço é visível ou somente o traço mais forte é visível.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das sete estirpes de leveduras: quatro foram isoladas da primeira camada (palha), uma da segunda (palha + solo), uma da terceira (2 cm), e uma da

quarta (5 cm). No entanto, observou-se que as leveduras isoladas estavam distribuídas e podiam ser encontradas nas diferentes camadas do solo. Utilizando-se procedimento semelhante, Jocarrelli (2012), isolou o maior número de leveduras da camada palha-solo do cultivo de cana-de-açúcar e obteve resultados similares, isolando seis diferentes estirpes de leveduras.

De acordo com Souza (2011), quando se trabalha com amostras do meio ambiente, todos os resultados podem ser considerados esperados em se tratando de variações populacionais. Sabe-se que a diversidade de leveduras é influenciada por diversos fatores, tais como: clima, temperatura, localização geográfica, substrato entre outros (CARVALHO, 2013).

Na Tabela 02 observa-se as médias dos resultados de assimilação das diferentes fontes de carbono. Em relação às pentoses, açúcares de principal interesse neste trabalho, das sete estirpes isoladas, todas assimilaram xilose e arabinose. No entanto, as estirpes LJ01 e LJ03 são consideradas fracas ou lentas. Por possuírem crescimento moderado tanto para xilose quanto para arabinose.

Tabela 02: Resultados obtidos para assimilação das diferentes fontes de carbono pela estirpes isoladas do ecossistema de produção de sorgo sacarino coletado em área experimental da FCAV- Jaboticabal, na safra 20015.

Estirpes	Glicose	Frutose	Sacarose	Rafinose	Xilose	Arabinose
LJ01	+	+	+	+W	+W	+W
LJ02	+W	+W	+	+W	+	+
LJ03	+W	+W	-	-	+W	+W
LJ04	+W	+W	+	+	+	+
LJ05	-	+W	+W	+W	+	+
LJ06	+	+	+	+	+	+
LJ07	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) Crescimento intenso; (+W) crescimento moderado ou pouco; (-) sem crescimento

Ao comparar a capacidade fermentativa com a assimilação das fontes de carbono os resultados diferem em relação às pentoses. No teste de capacidade fermentativa da arabinose as estirpes LJ02, LJ03, LJ04, LJ05, LJ06 e LJ07 foram consideradas fermentadoras fracas, com exceção da LJ01 que foi considerada como fermentadora lenta, ou seja, foi capaz de metabolizar a arabinose após maior período de tempo. Já no teste de assimilação de fonte de carbono, as estirpes LJ01 e LJ03 tiveram resultados moderado ou lento. E as estirpes LJ02, LJ04, LJ05, LJ06 e LJ07 foram consideradas fortes assimiladoras de arabinose.

CONCLUSÕES

Foram isoladas sete leveduras do sistema de produção de sorgo sacarino através de amostras do solo. A amostra próxima a variedade CV147 foi a que apresentou maior número de colônias e variedade de estirpes.

No teste de assimilação de fonte de carbono as estirpes LJ01 e LJ03 apresentaram crescimento moderado no meio contendo xilose. E as estirpes LJ02, LJ04, LJ05, LJ06 e LJ07 apresentaram-se como fortes assimiladoras de xilose.

LITERATURA CITADA

CARVALHO, F. P. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

GUIDI, R. H. Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares para estirpes de leveduras contaminantes da fermentação etanólica. 2000. 99 p. Dissertação (Mestrado em Aplicada) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

JOCARELLI, L A. C. Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana por leveduras isoladas do ecossistema agroindustrial. 2012. 63 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

OLIVEIRA, M. C. F.; PAGNOCCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados nas indústrias de cervejarias à detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcoleiras. In: SINAFERM, 7. 1988, São Lourenço. Anais. São Lourenço, MG. 1988. p. 78-81.

SOUZA, A. C. Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

van der WALT, J. P.; YARROW, D. Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (Ed.) The Yeasts: a taxonomic study. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1984. cap. 2, p. 45-104.