**ISOLAMENTO E SELECÃO DE MICROORGANISMOS PROVENIENTES DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇUCAR PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS**

**Vanessa do Nascimento Rodrigues**

**Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Unidade Universitária de Naviraí**

**vannessarodrigues63@gmail.com**

**MarioCezar Rodrigues Mano**

**Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Unidade Universitária de Naviraí**

**mario.mano@uems.br**

**RESUMO**

Muitos resíduos como o bagaço da cana-de-açúcar podem ser aplicados como suporte e substrato para o crescimento de micro-organismos com a finalidade de obtenção de bioetanol ou enzimas. Isso se dá devido à composição do bagaço, que estimula a produção de enzimas por parte dos micro-organismos. Dentre esses métodos, as enzimas têm se mostrado alternativas eficientes no tratamento de resíduos, aplicada em muitas áreas industriais. Micro-organismos, como fungos e bactérias, são capazes de produzir enzimas através de seu metabolismo. Nesse contexto, esse trabalho visa reaproveitar o bagaço da cana-de açúcar, testando seu potencial com o isolamento e seleção de micro-organismos para a produção de compostos de interesse em alimentos. Dessa forma foi possível o isolamento de leveduras com características visuais microscópicas semelhantes a levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de cultura contendo o bagaço da cana-de-açúcar nas diluições 10-6, 10-7 e 10-5, para avaliar o potencial de produção de leveduras para essas enzimas novos estudos devem ser realizados envolvendo a quantificação das enzimas produzidas, uma vez que é possível a Linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes ou manipuladas ser capaz de ajudar na manipulação da produção do etanol 2G ou características desejáveis aos micro-organismos probióticos com possibilidade de uso em alimentação animal.

**Palavras-chave:** Reaproveitamento, levedura, inovação.

**1 INTRODUÇÃO**

A valorização dos resíduos agroindustriais através da utilização de rotas biológicas tem contribuído para o desenvolvimento de processos sustentáveis, gerando produtos com um maior valor agregado. Muitos resíduos como bagaço da cana-de-açúcar, casca de arroz e de eucalipto podem ser aplicados como suporte e substrato para o crescimento de microrganismos com a finalidade de obtenção de bioetanol, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos e enzimas (DINIS et al., 2009; VAN & PLETSCHKE, 2012). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China, existe um grande potencial energético no bagaço da cana-de-açúcar e, por isso, a cada tonelada de cana colhida, 90% do bagaço resultante é destinado para produção de energia através da queima, segundo a UNICA (União das Indústrias de Cana-de-Açúcar) (UNICA, 2016)

O bagaço da cana pode ser utilizado como substrato na fermentação no estado sólido, agregando valor a esse resíduo e evitando o descarte de toneladas de material de modo indevido. Isso se dá devido à composição do bagaço, que estimula a produção de enzimas por parte de micro-organismos e, assim, a produção de enzimas se torna mais sustentável. Dentre esses métodos, as enzimas têm se mostrado alternativas eficientes no tratamento de resíduos (CARDOSO, 2006).

Nesse contexto, esse trabalho visou reaproveitar o bagaço da cana-de açúcar, testando seu potencial como o isolamento e seleção de micro-organismos para a produção de compostos de interesse em alimentos a partir do isolamento de leveduras pelo meio de cultura contendo bagaço da cana-de-açúcar como principal substrato, e também avaliar o crescimento desses micro-organismos.

**1.1 Obtenção da matéria prima e preparo do bagaço da cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado na Usina Rio Amambaí Agroenergia, localizada no município de Naviraí – MS. Inicialmente foram elaboradas três formulações, ambas constituindo 10 gramas de bagaço umedecido adicionado em um Erlenmeyer (250 ml) junto a 100 ml de meio de cultura devidamente esterilizado contendo 10 g/L de extrato de levedura, 10g/L de peptona e 20 g/L de glicose. Após a adição do bagaço da cana-de-açúcar ao meio de cultura, o mesmo foi deixado em agitador metabólico (shaker) a 30ºC e 150 rpm por 72 horas, obtendo como produto final o meio enriquecido com células microbianas.

**1.2 Isolamento do microrganismo**

Primeiramente para cada Erlenmeyer incubado foram preparados 10 tubos contendo 9 ml de água peptonada (peptona bacteriológica, 10 g/L) e 1 frasco schott de 225 ml com o mesmo para as diluições junto a 8 placas de petri contendo o cultivo complexo YPD ágar (10 g/L; peptona bacteriológica, 20 g/L; glicose, 20 g/L e ágar-ágar, 20g/L) para o isolamento da linhagem de um possível microrganismo, que foram cultivadas a 30 °C até o alcance da fase estacionária. O isolamento do microrganismo ocorreu conforme o protocolo descrito por Bicas e Pastore (2007), com algumas alterações: a partir do meio de cultivo original foram pipetados 25 ml do mesmo no frasco schott de 225 ml perfazendo a primeira diluição (10-1), seguindo do pipetamento de 1 ml do conteúdo do frasco schott de 225 ml já com a primeira diluição em um tubo contendo 9 ml de água peptonada obtendo a segunda diluição (10-2). Para a próxima diluição foi pipetado do tubo contendo a segunda diluição 1 ml para um segundo tubo fazendo assim a terceira diluição (10-3), repetindo esse mesmo processo descrito anteriormente até completar a oitava diluição (10-8) para os três meios de cultivo. Com a formação das diluições (10-1 a 10-8) concluídas foi pipetado 2 ml de cada diluição dos três extratos enzimáticos para suas respectivas placas de petri com o meio de cultivo complexo de YPD ágar já endurecido e o liquido (2 ml) foi devidamente espalhado com uma alça de Drigalski devidamente esterilizada assim como todo o material utilizado, e incubado em estufa microbiológica a 30ºC por 48 horas.

**2 DISCUSSÃO E ANÁLISE DOS DADOS**

No decorrer da incubação foi observado nas diluições em quais houve a formação de leveduras e quais poderiam ser isoladas das demais. Foi possível obter colônias isoladas de leveduras nas diluições 10-6 da formulação de meio de cultura do segundo Erlenmeyer, 10-7 da formulação de meio de cultura do primeiro Erlenmeyer e 10-5 da formulação de meio de cultura do terceiro Erlenmeyer. Com a identificação das mesmas, ocorreu um segundo isolamento das colônias de leveduras com uma alça de platina por meio da técnica por esfregaço em placas de petri com o meio YPD ágar solidificado. Em seguida, a placa foi novamente incubada por mais 48 horas a 30ºC em estufa. Com o auxílio de uma alça estéril, células puras dessas colônias de leveduras isoladas foram transferidas para tubos inclinados com o meio YPD solido logo após a verificação das mesmas em um microscópio com objetiva de 1000 vezes.

As leveduras isoladas do bagaço da cana-de-açúcar desse presente trabalho tem características visuais microscopias semelhantes a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que embora possua dificuldades em fermentar significativamente o polissacarídeo xilana e o monossacarídeo que constitui a xilose encontrada na biomassa lignocelulósica de acordo com Stambuk et al., (2008), a estudas como o de Mouro (2016) que nos remete que é possível a Linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes ou manipuladas ser capazes de crescer e ajudar na manipulação da produção do etanol de segunda geração e consumir xilose que pode ser viabilizada pela otimização das condições de fermentação em estudos futuros visando a vim demonstrar características desejáveis aos micro-organismos probióticos com possibilidade de uso na alimentação animal como retratado em Martins (2009).

Trabalhos como o de Araújo (2015), nos trazem resultados promissores quanto ao isolamento de leveduras usando o meio de cultura solido YEPD (semelhante ao usado nesse presente trabalho) que apresentaram um potencial biotecnológico satisfatório para a produção de enzimas invertases, pectinases e β-glicosidases. Milani et al., (2017), propôs uma metodologia para o isolamento de leveduras a partir do bagaço e palha de cana-de-açúcar com o seu pré crescimento em um meio rico contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose. Assim, a sua caracterização bioquímica resulta em leveduras capazes de assimilar os carboidratos xilose e celobiose durante o seu tempo de cultivo, além de demostrar capacidades fermentativas para a glicose e fonte de genes para a codificação das enzimas necessárias para o metabolismo de xilose e celobiose.

**3 CONCLUSÕES**

A originalidade da proposta reside no isolamento e seleção de microrganismos provenientes do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de compostos de interesse em alimentos. Para avaliar o potencial de produção de leveduras, novos estudos devem ser realizados, em culturas submersas, envolvendo a quantificação das enzimas potencialmente produzidas. A proposta do isolamento de um microrganismo foi alcançada com o isolamento de leveduras com características visuais microscopias semelhantes a levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos Erlenmeyer contendo meio de cultura com bagaço de cana-de-açúcar em suas mais altas diluições (10-6, 10-7 e 10-5). Além de grande relevância no contexto do desenvolvimento cientifico tanto para o estado de Mato Grosso do Sul quanto para o Brasil e para a Ciência como um todo, esta nova linha de pesquisas contribuirá para o crescimento das áreas de alimentos e recursos naturais.

**AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da UEMS e o CNPq junto ao meu professor e orientador Dr. Mario Cezar Rodrigues Mano, obrigado pelo apoio e ajuda.

**REFERÊNCIAS**

ARAÚJO, M.A.M. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutas do cerrado**. Campo Grande-MS, 2015.

BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. **Isolation and Screening of D-Limonene-Resistant Microorganisms**. Brazilian Journal of Microbiology 2007.

CARDOSO, M. G. **Produção De Aguardente De Qualidade**. LAVRAS: UFLA. p. 263, 2006.

DINIS, M. J. et al. Modification of wheat straw lignina by solid state fermentation with white-rot fungi. **Bioresource Technology.** v. 100, p. 4829-4835, 2009.

MARTINS, M. S. **Leveduras de cerveja e cana-de-açúcar (Saccharomyces cerevisiae), autolisada e íntegra, na dieta de cães**. Jaboticabal-SP, 2009.

MILANI, L.M.; TADIOTO, V.; FILLIPPINI, M.; BARRILLI, E. T.; ALVES JR, S. L. **Caracterização bioquímica de leveduras isoladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. São Carlos-SP, 2017.

MOURO, A. **Clonagem e expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de xilose redutases e xilitol desidrogenase das leveduras brasileiras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum***. Florianópolis, 2016.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.M.; BON, E.P.S. **Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains**. J. Sci. Ind. Res. v. 67, p. 918-926, 2008.

ÚNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Bagaço de cana pode ganhar valor substituindo areia na construção civil. 2016.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**. v. 30, p. 1458-1480, 2012.