

Imobilização de leveduras em gel de alginato e pectina

Yeasts immobilization in alginate and pectin gel

RESUMO

Layla de Fátima Gonçalves
laylafgoncalves2001@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Ponta Grossa, Paraná,
Brasil

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

Este artigo aborda uma versão laboratorial do processo fermentativo alcoólico de escala industrial. Utilizando-se das propriedades químicas de gelificação e encapsulação, duas substâncias foram testadas a fim de formar cápsulas em gel com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram testadas 3 concentrações de alginato 2%, 3% e 4% e concentrações de pectina 0,2%, 0,1%, 0,001% para o aprisionamento das células de *Saccharomyces cerevisiae*. As cápsulas contendo as células imobilizadas foram inoculadas em meio sintético e incubadas a 28°C por 12 dias. O acompanhamento do processo fermentativo foi realizado através da medida o °Brix das amostras diariamente. Como resultados, obteve-se que a pectina influenciou negativamente na formação e aparência das capsulas, porém a velocidade do consumo de açúcares durante o processo não foi afetada. Somado à isto, conclui-se que o alginato apresenta melhor manipulação para a formação de cápsulas, e sua porcentagem mais adequada para o processo é a de 4%.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharomyces cerevisiae*. Cápsulas. Fermentação.

ABSTRACT

This article addresses a laboratory version of the alcoholic fermentation in industrial scale. Using the chemical properties of gelling and encapsulation, two chemical substances were tested in use to form capsules in gel with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Three concentrations of alginate 2%, 3% and 4% and pectin 0.2%, 0.1% and 0.001% were evaluated for the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells. The capsules containing the immobilized cells were inoculated in synthetic medium and incubated at 28°C for 12 days. The fermentation processes was monitored by measuring the °Brix of the samples daily. It is possible to conclude that pectin had a negative influence on the formation and appearance of capsules, however the speed of sugar consumption during the process was not affected.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*. Capsules. Fermentation.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

Os processos de fermentação alcoólica, de modo geral, são conduzidos por leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* disponibilizadas livremente no meio fermentativo. Existem outras formas de condução deste tipo de processo que consistem em aprisionar a levedura em gel poroso. Chamado de encapsulação em matriz porosa, aplica-se este para trânsito de micro-organismos sem que sejam danificados ou danifiquem o meio externo. Pode ser utilizado qualquer material que apresente capacidade de gelificação, tais como alginato de sódio e pectina (KOVALESKI, 2019).

O alginato de sódio é solúvel em água e se torna insolúvel na presença de cátions bivalentes (GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETI, U., DA SILVA, A. N., 2007), como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , por isso o gotejamento em cloreto de cálcio para o processo de encapsulação celular. Assim, é formado um gel irreversível, que não retorna ao estado líquido com o calor, constituindo uma película esférica porosa. As suas principais aplicações biotecnológicas são biossorções de locais contaminados.

Pectinas são hidrocoloides naturais presentes em plantas superiores que formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido. A pectina também é determinante na firmeza dos vegetais, característica que se estabelece durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (PAIXÃO, LIMA, e PAIVA, 2009). Suas principais aplicações biotecnológicas estão na indústria de cosméticos e alimentícia devido à sua função aglutinante favorecedora à formação de géis.

O método de aprisionamento das células microbianas em gel é o mais utilizado pela sua facilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de retenção celular (GIESE, 2015). Como pode-se utilizar de pectinas para esse processo, o custo também diminui, sabendo-se que estas advêm de plantas.

Dentro de cada cápsula, as leveduras estarão realizando fermentação alcoólica, a fim de gerar energia para seus processos metabólicos. Com isso, terá a formação de CO_2 e etanol. Para garantir que tudo ocorra conforme o desejado, é necessário analisar quais as condições ótimas dessa levedura específica.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da concentração de alginato e pectina na formação das cápsulas e consumo de sacarose no processo fermentativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

As leveduras empregadas neste processo foram *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada marca comercial Fleshman. Para o preparo das leveduras estas foram pesadas (10,034 g) em balança analítica em béquer com capacidade para 250mL e hidratadas com 100mL de água destilada estéril durante 1 hora, antes de serem adicionadas às soluções para encapsulação.

Foram realizados dois experimentos de encapsulação: o primeiro utilizando alginato de sódio (2%,3% e 4%) e o segundo utilizando pectina (0,2%, 0,1%, 0,001%). Para imobilização das leveduras, os procedimentos foram adaptados dos descritos por Kovaleski (2019).

O alginato de sódio foi pesado (3,027g; 4,027g e 2,019g) em 3 diferentes béqueres de 100ml e adicionados à 100ml de água destilada estéril, previamente medida em balão volumétrico para cada béquer. A dissolução foi efetuada em banho maria.

O preparo do meio de cloreto de cálcio foi realizado pesando 2,015g do reagente em béquer de 500ml e misturando com 100ml de água destilada, previamente medida em balão volumétrico. A solução foi autoclavada à 121°C por 15 minutos. Cada solução foi preparada seis vezes, sendo três para encapsulação das amostras de alginato e três para pectina. Todas as soluções foram mantidas refrigeradas até o momento do uso.

Para a formação das cápsulas, foram misturados 20ml da solução de levedura em cada uma das soluções de alginato. O frasco contendo a solução de cloreto de cálcio foi posicionado sobre agitador magnético e, sob constante agitação, foi feito o gotejamento da mistura das soluções de alginato + levedura na solução de cloreto de cálcio, para cada uma das três concentrações. Para controle do gotejamento foi utilizada bomba peristáltica acoplada ao equipamento Lab Plant SD-05.

As soluções de pectina foram preparadas de modo similar ao preparo das soluções de alginato, respeitando as proporções em estudo. Assim como o processo de obtenção das cápsulas, também seguiu o mesmo procedimento de gotejamento da solução pectina + levedura em solução de cloreto de cálcio. Ambas as cápsulas foram mantidas refrigeradas até formação do meio sintético.

Após a obtenção das cápsulas, foi realizado processo fermentativo em meio sintético (42g de sacarose, 1,5g de extrato de levedura, 0,21g de $MgSO_4$, 0,36g de NH_4Cl e 0,285g de KH_2PO_4 em 300mL de água destilada - pH final 4,5) esterilizado a 121°C por 15 minutos.

As cápsulas obtidas nos seis processos descritos anteriormente foram inoculadas em Erlenmeyer contendo o meio acima descrito, assim como uma amostra controle foi conduzida com as leveduras livres. Os frascos foram incubados em estufa com controle de temperatura a 28°C.

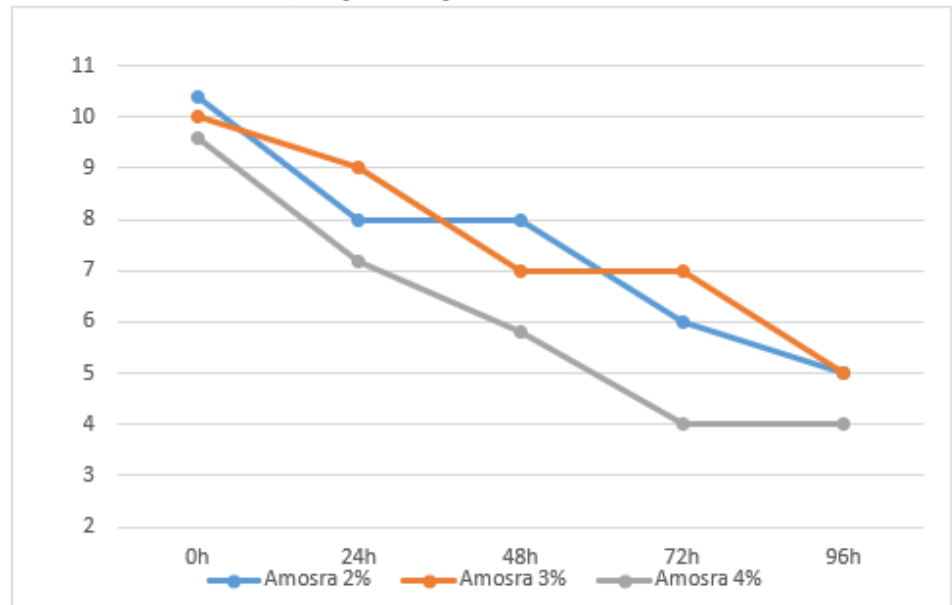
Para acompanhamento do processo fermentativo, foi realizada a medida do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) no início da fermentação e a cada 24 horas durante 5 dias. No desenvolvimento dos resultados, foi plotado um gráfico com os dados obtidos durante o processo fermentativo. Assim, somando este à teoria sobre os compostos químicos presentes e as diferenças entre os Brix de diferentes concentrações, pode-se avaliar as melhores referências para realizar o método em escala industrial.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em todas as amostras analisadas foi possível constatar a viabilidade das leveduras, ou seja, o processo de encapsulação não provocou a inativação celular. O °Brix inicial das amostras apresentava-se em torno de 13°Brix após os primeiros dias de fermentação. Todas apresentaram queda expressiva deste valor, atingindo valores próximos a 4°Brix. Percebe-se queda constante no valor do BRIX em todas as concentrações de alginato (Gráfico 1) e pectina.

Além da constância apresentada, o gel de 4% de alginato também foi o que obteve menores valores de °Brix no final do processo, indicando melhor rendimento em relação aos demais.

Gráfico 1. Valores de °Brix das amostras de caldo fermentado com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em diferentes concentrações (2%, 3% e 4%) de gel de alginato de cálcio.



Fonte: Autoria própria.

Quanto maior a concentração de alginato no gel, mais moléculas ficam concentradas naquele mesmo meio, gerando menor porosidade da capsula. Assim, a levedura fica com menor difusão de oxigênio, obrigando-a a entrar para o método fermentativo. Somado a isto, tem-se o fato de que a matriz gélica protege o microrganismo de todos os cátions, ânions e outros eletrólitos utilizados no meio sintético (KOVALESKI, 2019).

Quanto à pectina, seu uso isolado como agente encapsulante não resultou na formação de esferas homogêneas (Figura 1). Levando em consideração sua composição química, a estrutura deste composto pode ser extremamente heterogênea entre as espécies de vegetais, entre tecidos e até mesmo partes do fruto de onde é proveniente. Isso interfere no controle de sua absorção e porosidade (PAIXÃO et al., 2009)

Figura 1. Aparência das cápsulas feitas com gel de pectina após dois dias em estufa.



Fonte: Autoria própria.

As amostras testadas neste experimento com imobilização em pectina apresentaram rápido consumo de açúcares, atingindo o máximo de consumo em 24 horas - fato este que pode ser desfavorável dependendo do processo onde é aplicado, já que o tempo rápido de fermentação favorece a formação alcoólica, porém não a de compostos secundários que contribuem com formação de aroma e sabor (CARVALHO, 2017).

Nas próximas etapas desta pesquisa está previsto a análise da interação de alginato com pectina em diferentes concentrações, assim como a verificação da influência dos parâmetros fermentativos na resistência e durabilidade das capsulas. O uso de leveduras selecionadas e a aplicação em processo fermentativo para obtenção de bebida alcoólica com posterior caracterização físico-química e sensorial, a ser submetida ao comitê de ética da UTFPR.

CONCLUSÕES

Foi possível promover a imobilização da *Saccharomyces cerevisiae* em géis de alginato e de pectina mantendo a viabilidade celular. As cápsulas obtidas foram aplicadas em processos fermentativos com consumo de até 70% da sacarose.

Apesar de possibilitar a imobilização, a pectina formou imobilizados de aparência disforme diferentemente das esferas obtidas com alginato.

A imobilização em gel de alginato de sódio a 4% apresentou maior consumo de açúcares comparado às demais amostras no processo fermentativo.

Em função da suspensão das atividades presenciais na UTFPR, em decorrência da pandemia, não foi possível concluir todas as atividades previstas no plano de trabalho do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio moral e financeiro durante toda a minha caminhada escolar para que eu chegasse até aqui, especialmente à minha mãe e irmãs. Agradeço também à Professora Doutora Sabrina, pela oportunidade concedida, e minhas colegas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, R. F. **Fermentação alcoólica**. Disponível em: <http://revistaeletronicadequimica.blogspot.com/2010/05/fermentacao-alcoolica.html>. Acesso em: 25 jul. 2020.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de microrganismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. *Série Tecnológica Ambiental CETEM*, p. 47, 2015.

INTRUTEMP. **O que é o refratômetro**. 2020. Disponível em: <https://instrutemp.com.br/o-que-e->

[refratometro/#:~:text=Refrat%C3%B4metro%20\(Pt\)%20ou%20refrat%C3%B4metro%20\(,refra%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20subst%C3%A2ncia%20transl%C3%BAcida.&text=O%20uso%20mais%20comum%20de,preparados%2C%20mel%20e%20outros%20alimentos.](#) Acesso em: 25 jul. 2020

KOVALESKI, G. **Estudo de imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio**. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

MONTEIRO, R. F. G., ***Saccharomyces cerevisiae* – O modelo**. Disponível em: <http://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/micologia/genetica-e-biologia-molecular-de-fungos/saccharomyces-cerevisiae-o-modelo/> Acesso em: 25 jul. 2020

PAIXÃO, J. A., LIMA, M. S., PAIVA, E. P., **Pectina: Propriedades químicas e importância da parede celular de frutos durante o processo de maturação** - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2009.

GARCIA-CRUZ, C. H., FOGGETI, U., DA SILVA, A. N., **Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto - SP, Brasil, 2007.