

Efeito do tamanho do inóculo na fermentação alcoólica com microrganismos imobilizados

Effect of inoculum size in alcoholic fermentation with immobilized microorganisms

RESUMO

ISABELLA TANAKA LOPES DA SILVA
isabella.2000@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

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

Este artigo mostra o estudo da imobilização celular de leveduras, processo que aprisiona a célula em um espaço em que ela ainda tenha boas condições de sobrevivência. O objetivo, dentro da fermentação alcoólica, é estudar a técnica em diferentes condições, como variação de pH, de temperatura, de agitação e de inóculo. Para a realização do experimento, foram feitos testes em soluções de alginato de cálcio. Primeiramente, variando a concentração da solução entre 2,0%, 3,0%, 4,0%. Como resultado, dentre essas a melhor escolhida foi a de concentração 2,0% por decair o seu brix de 9,2% para 4,0%. Posteriormente ocorreu a variação da concentração de inóculo dentro da solução de 2,0%, comparando leveduras livres e encapsuladas. Pelos dados, a de melhor resultado foi a levedura encapsulada de concentração 0,05g/mL.

PALAVRAS-CHAVE: Levedura. Imobilização. Brix.

ABSTRACT

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.



This article shows the study of cellular immobilization of yeasts, process that imprisons the cell in a space where it still has good conditions for survival. The goal, within alcoholic fermentation, is to study the technique in different conditions, as a variation of pH, temperature, agitation and inoculum. For conducting the experiment, tests were performed on calcium alginate solutions. Firstly, varying the solution concentration between 2,0%, 3,0% and 4,0%. As a result, among these the best choice was the 2,0% concentration because its brix dropped from 9,2% to 4,0%. Posteriorly there was variation within the 2,0% solution, comparing free and encapsulated yeasts. According to the data, the best result was encapsulated yeast with a concentration of 0,05g/mL.

KEYWORDS: Yeast. Immobilization. Brix



INTRODUÇÃO

Algumas bactérias e leveduras são capazes de transformar açúcares, como glicose ou sacarose, em álcool etílico e gás carbônico, sem a presença de oxigênio. Esse processo é chamado de fermentação alcoólica. Durante o processo, duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em álcool etílico, com a liberação de duas moléculas de CO₂ e formação de duas moléculas de ATP. O álcool etílico é muito utilizado pelo homem na produção de bebidas alcoólicas, como cerveja ou vinho. Já o gás carbônico pode ser aproveitado na produção de pães (LIMA, et al 2001).

Uma levedura que tem grande destaque por ser muito utilizada nesse processo é a *Saccharomyces cerevisiae*. É um organismo eucariota unicelular que pertence ao reino dos Fungos. Dentre diversas qualidades, algumas delas são que possui um ciclo de vida rápido, é um organismo não patogênico e de fácil manipulação genética. Essa espécie tem um papel milenar na produção de alguns alimentos. É muito utilizado como base para muitas indústrias, como a de panificação e de bebidas. Tem vantagens pois é de fácil manutenção em laboratório e seu conhecimento biológico é bem desenvolvido (LIMA, 2015).

Nos tempos atuais, uma técnica que vem crescendo cada vez mais é a imobilização celular, onde é causado o aprisionamento da célula em um espaço onde ela ainda tenha boa atividade catalítica. Esse material imobilizado pode ser uma célula de levedura, bactéria, enzimas e outros. Ao relacionar a técnica com a fermentação alcoólica percebe-se uma diminuição no tempo do processo e aumento da produção. Há também uma boa transferência de massa das esferas de levedura com o meio fermentado (Kovaleski, 2019).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações de alginato e de inóculo em processo de fermentação alcoólica com células imobilizadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do experimento foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, marca comercial Fleshman, adquirida no comércio local. Para a preparação da levedura foi realizada a pesagem conforme a concentração a ser estudada e as células foram adicionadas em frasco contendo 100mL de água destilada, esterilizada e resfriada.

A esterilização de todas as soluções e amostras utilizadas neste estudo, quando indicada, foi realizada em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Na preparação da solução de alginato de sódio para a concentração de 2,0% foi utilizado 2,001g; 3,0% com 3,081g e 4,0% com 4,002g. Em cada um foi adicionado 100mL de água destilada esterilizada resfriada.

Para o teste de concentração de alginato foi utilizado 10,052g com 100mL de água destilada resfriada.

Foram preparadas 3 soluções de cloreto de cálcio cada uma com 2,00 ± 0,03g adicionadas a 100mL de água destilada estéril em temperatura ambiente.

Para o encapsulamento da levedura no alginato de cálcio foi feito o gotejamento da solução alginato+células no cloreto de cálcio sob agitação magnética constante. Os métodos utilizados neste estudo foram adaptados de Kovaleski (2019).

O meio utilizado para fermentação foi elaborado com 140g/L de sacarose, 5g/L de extrato de levedura, 0,7g/L de MgSO₄, 1,2g/L de NH₄Cl e 0,95g/L de KH₂PO₄. Foram preparados 3 erlenmeyers com 100mL do meio e todos foram esterilizados conforme descrito anteriormente.

Após a autoclave e resfriamento, adicionou-se em cada Erlenmeyer as esferas de leveduras e incubadas a 28°C por 5 dias com leitura do °Brix em refratômetro portátil no tempo D1 (0h), D2 (24h), D3 (48h), D4 (72h) e D5 (96h).

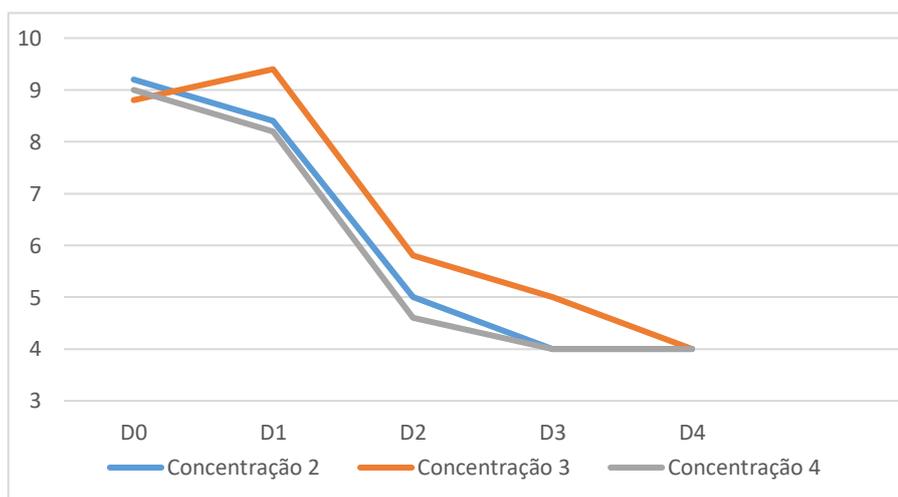
Ao final deste primeiro experimento foi selecionada a concentração de 2% de alginato para a elaboração das capsulas onde o processo acima descrito de imobilização foi repetido para 4 diferentes concentrações de inóculo: 0,05g/mL; 0,10g/mL; 0,15g/mL; 0,20g/mL. Estas concentrações foram testadas em células livres e imobilizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A averiguação do consumo de açúcares através da medida no °Brix no meio fermentado é uma das formas de acompanhar o desenvolvimento da fermentação alcoólica (LIMA et al, 2001). Segundo os autores, o conteúdo de sólidos solúveis totais, representado principalmente pelos açúcares redutores, inicialmente alto, é consumido pelas leveduras durante o processo e transformado em etanol.

No primeiro experimento foi possível observar (Gráfico 1) que a partir todas as concentrações de alginato utilizadas na imobilização celular foi possível obter células imobilizadas viáveis, com capacidade de consumo de cerca 50% dos açúcares presentes no meio em um período de 24 horas de fermentação.

Gráfico 1 – Teor de sólidos solúveis totais (°Brix) ao longo de 96 horas de fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em gel com diferentes concentrações de alginato

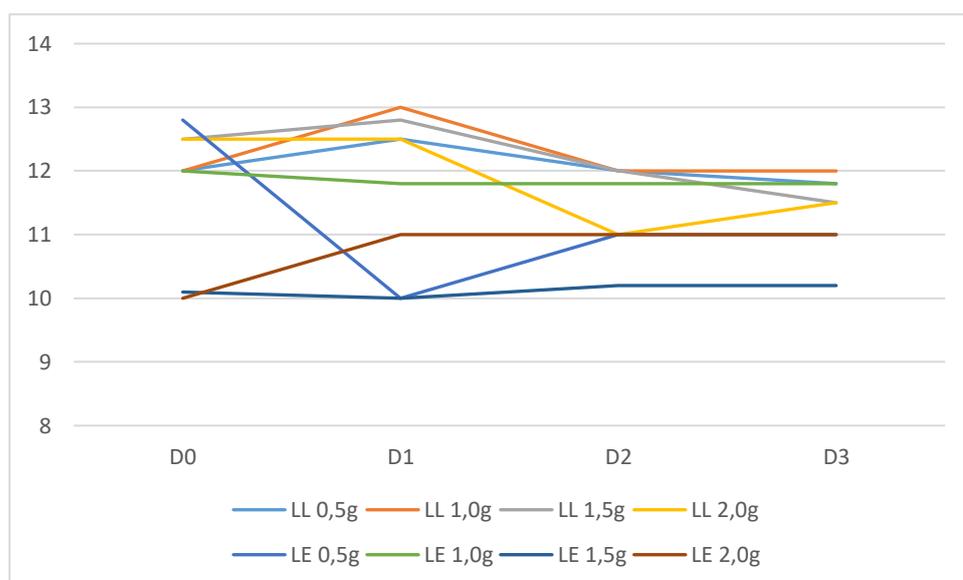


Fonte: Autoria própria.

Pode-se perceber a redução da quantidade de açúcar ao longo dos 5 dias, como esperado. A solução de concentração 2% foi a que apresentou maior diferença de brix nesse período de tempo, indo dos 9,2 % até 4,0%. As soluções de concentração 3,0% e 4,0% também permaneceram com o brix em 4,0. Por terem apresentados resultados equivalentes e a menor concentração de reagentes proporcionar um menor custo ao processo, a concentração de 2% de alginato foi selecionada para a próxima fase, onde foi avaliada a concentração do inóculo.

Diferentemente do experimento anterior, neta etapa não foi possível observar o consumo dos açúcares (Gráfico 2) pelas leveduras imobilizadas ou mesmo pelas leveduras livres (que não passaram pelo processo de encapsulamento).

Gráfico 2 – Teor de sólidos solúveis totais (°Brix) ao longo de 72 horas de fermentação alcoólica com leveduras livres (LL) e leveduras imobilizadas (LE) em gel de alginato



Fonte: Autoria própria.

As leveduras utilizadas são do mesmo lote utilizado no experimento anterior, que apresentou viabilidade celular. Isto nos leva a crer que uma ou mais falhas no processo levaram à inativação celular, e que estas falhas não estão relacionadas ao processo de encapsulação, uma vez que as leveduras livres também estavam inativadas. Dois momentos no processo são potenciais fontes de erros: a hidratação e a inoculação da levedura. Isto porque estas etapas são realizadas após a autoclavagem e resfriamento do meio; quando os microrganismos são adicionados com o meio ainda quente pode ocorrer a morte ou inativação celular (LIMA et al, 2001). Porém não se pode descartar outras hipóteses, como falhas na pesagem do meio levando à concentrações elevadas de nutrientes que inviabilizem o sistema de regulação osmótica da célula; falhas operacionais que possam ter ocasionado por engano a esterilização do inóculo antes da encapsulação e inoculação; falhas mecânicas que possam ter levado à um sobreaquecimento da estufa mesmo que por um curto período e possam ter inativado as células, e ainda a falha na coleta da amostra e realização da leitura no refratômetro.

Apesar de não atingir o resultado esperado com relação à seleção da concentração ideal de inóculo para o método proposto, optamos pela publicação deste resultado para que fique demonstrada a importância da realização de *checklists* e do acompanhamento criterioso de todas as etapas do processo, manutenção periódica e registro constante da temperatura nas estufas e principalmente da relevância da atenção plena na realização das atividades de laboratório quer seja na iniciação científica ou em atividades de pesquisa mais avançadas, uma vez que as falhas no processo podem conduzir não apenas a resultados falhos ou inconclusivos mas também a acidentes de trabalho com potenciais riscos à saúde do pesquisador e danos ao ambiente; toda as características descritas neste parágrafo não são possíveis sem constante treinamento da equipe (COSTA, 2003).

CONCLUSÃO

Foi possível realizar a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes concentrações de alginato de sódio, com obtenção de células viáveis e definir a concentração de 2% de alginato como mais apropriada para uso.

Não foi possível chegar a resultado conclusivo acerca da concentração de inóculo pois a fermentação realizada demonstrou a inviabilidade das células. Este resultado levou à busca pelas possíveis causas da inativação celular e à discussão sobre controle de qualidade e biossegurança nos laboratórios de biotecnologia para garantia dos resultados e segurança dos pesquisadores.

As etapas desta pesquisa não foram concluídas devido à suspensão das atividades presenciais na UTFPR em decorrência da pandemia COVID-19.

REFERÊNCIAS

COSTA, Marco Antonio F. Qualidade em Biossegurança. Qualitymark. 2003. 9788573032512

KOVALESKI, Gabriela. Estudo da Imobilização Celular de Leveduras em Alginato de Cálcio na Fermentação Alcoólica. f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIMA, E. R. A.; TÔRRES, A. R.; "OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL HIDRATADO",

p. 2362-2369 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014** [= **Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2**]. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-1659-18176-156101

SIEPMANN, FRANCIELI BEGNINI; JESUS, MANOELLA MOURA MONTEIRO DE; CANAN, CRISTIANE; FLORES, EDER LISANDRO DE MORAES et al. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TAMANHO DO INÓCULO E DA AGITAÇÃO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO. In: ANAIS DO SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 2013, . Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2013. Disponível em: <https://proceedings.science/slaca/slaca-2013/trabalhos/avaliacao-do-efeito-do-tamanho-do-inoculo-e-da-agitacao-na-fermentacao-alcoolica-de-farelo-de-arroz?lang=pt-br> Acesso em: 02 set. 2020.