

Avaliação do uso de ZIF-8 como biopreservador de leveduras durante o processo de fermentação

Luana Cristina Camargos Gomes¹, Carlos Alberto Galiano Suarez¹, Caridad Noda Perez^{1*}

¹Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, CEP 74690-900, Brasil
*carynoda60@ufg.br

Resumo

RESUMO - A utilização de sistemas baseados na imobilização de células de levedura é uma técnica promissora para a produção de etanol, sendo amplamente empregada em diversos setores industriais. Com os avanços tecnológicos voltados à otimização da eficiência na produção de etanol, observa-se um crescente interesse por parte das cervejarias na incorporação de inovações aos seus métodos produtivos. Nesse contexto, destaca-se a implementação de sistemas de fermentação contínua, bem como a utilização de leveduras imobilizadas como estratégias para aprimorar o desempenho fermentativo e a qualidade do produto. No presente trabalho foi estudada a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em ZIF-8 como biopreservador, com o objetivo de avaliar o comportamento destas células em um material cristalino. Nesse sentido, foram realizados experimentos fermentativos, visando à análise do crescimento celular, da viabilidade do microrganismo, e do consumo de glicose. Os resultados obtidos indicaram uma similaridade entre os perfis de fermentação para as leveduras livres e imobilizadas. Além disso a imobilização no ZIF-8 proporcionou um aumento na viabilidade da levedura quando comparado com a levedura livre.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, imobilização, ZIF-8.

ABSTRACT - The use of systems based on the immobilization of yeast cells is a promising technique for ethanol production and is widely used in several industrial sectors. With technological advances aimed at optimizing the efficiency of ethanol production, there is a growing interest on the part of breweries in incorporating innovations into their production methods. In this context, the implementation of continuous fermentation systems stands out, as well as the use of immobilized yeasts as strategies to improve fermentation performance and the quality of the final product. This work studied the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells in ZIF-8 as a biopreservative, with the objective of evaluating the behavior of these cells in a crystalline material. In this sense, fermentation experiments were carried out, aiming at the analysis of cell growth, microorganism viability, and glucose consumption. The results obtained indicated a similarity between the fermentation profiles for free and immobilized yeasts. Thus, the immobilization on ZIF-8 provided an increase in yeast viability when compared to free yeast.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, immobilization, ZIF-8.

Introdução

A utilização de microrganismos na produção de produtos por meio de processos industriais configura-se como uma técnica biotecnológica de significativa importância (1). Em escala industrial, as leveduras constituem os microrganismos de maior relevância para os segmentos alimentício e de bebidas, sendo amplamente empregadas na formulação de agentes fermentativos e na produção de etanol, inclusive o etanol de segunda geração (2G). No entanto, a eficiência do processo fermentativo para a obtenção de etanol 2G pode ser comprometida pela presença de substâncias inibitórias no meio de cultivo. Tais

compostos podem interferir negativamente no crescimento e na atividade metabólica das leveduras, ocasionando uma redução na taxa de fermentação e, em determinadas situações, podendo levar à inviabilidade celular (2).

A imobilização de leveduras apresenta diversas aplicações em processos fermentativos industriais, como na produção de cervejas, vinhos ou cidra. Essa abordagem tecnológica visa à encapsulação das células de levedura de forma ativa e intacta em uma área específica, o que favorece o aumento da densidade celular e a produção de determinados metabólitos, especialmente compostos aromáticos. Dessa forma, a utilização de células imobilizadas proporciona maior estabilidade e controle da

linhagem microbiana, além de possibilitar a recuperação e reutilização celular, a implementação de sistemas de fermentação contínua, entre outros avanços operacionais (3).

Nesse contexto, a aplicação de estruturas metalorgânicas (MOFs) e seus derivados, como as estruturas de imidazolato zeolíticas (ZIFs), na imobilização de leveduras, tem se mostrado uma estratégia promissora para aumentar a resistência celular frente aos compostos inibitórios presentes nos hidrolisados de biomassa. Tal efeito deve-se à capacidade dessas matrizes porosas de atuarem como uma barreira protetora, attenuando a exposição das células aos agentes tóxicos. Ademais, a imobilização celular por MOFs ou ZIFs pode representar um fator positivo para a viabilidade econômica do processo fermentativo (4).

O etanol pode ser obtido por meio de processos de síntese química ou via fermentação. Na síntese química, sua produção ocorre a partir de hidrocarbonetos insaturados, como o eteno e o etino, bem como de gases oriundos do petróleo. Contudo, esse método envolve matérias-primas não renováveis, o que impede a classificação do etanol resultante como um biocombustível ou combustível alternativo. Dessa forma, o processo fermentativo, configura-se como a principal abordagem empregada na produção de etanol no Brasil e em diversos outros países, especialmente em virtude de seu caráter sustentável e renovável (5).

As metodologias convencionais para a obtenção de etanol de primeira geração baseiam-se na fermentação direta dos açúcares, catalisada por microrganismos. Dentre as espécies utilizadas nesse processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se como a mais empregada, sendo extensivamente investigada e apresentando um metabolismo mais bem compreendido para a conversão eficiente de açúcares em etanol (6).

Sendo assim, o presente trabalho avaliou o crescimento celular, consumo de glicose e viabilidade da levedura durante 144h de fermentação utilizando a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* livre e encapsulada na estrutura metalorgânica ZIF-8 como biopreservador.

Experimental

Meio YPD

O meio YPD (*Yeast extract–Peptone–Dextrose*) é um meio de cultura complexo, amplamente utilizado para o cultivo de leveduras, devido à sua composição rica em nutrientes essenciais para o crescimento celular. Sua composição por litro de solução é: extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; e glicose, 20 g/L. A preparação do meio consiste na dissolvendo os componentes em água destilada, seguida de esterilização por autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Para preservar a integridade do

açúcar, a glicose deve ser autoclavada separadamente, evitando a degradação molecular e a formação de compostos escurecidos e aromáticos (caramelização).

Preparo do inóculo

Para a obtenção do inóculo, a ativação da levedura foi realizada no meio YPD líquido. A inoculação aconteceu em uma câmara de fluxo laminar, onde 4,5 mg de levedura em 17,5 mL de meio YPD-pH 5,5 e 2,5 mL de solução concentrada de glicose 100g/L (de modo a se obter concentração de inóculo de 0,225g/L) foram colocados em frasco Erlenmeyer de 250 mL.

Em seguida, o erlenmeyer contendo o meio de crescimento e a levedura foi fechado com tampão de algodão e levado para uma câmara incubadora com agitador orbital a 30°C e agitação de 250 rpm por 12h até a fase exponencial.

Imobilização

Após o preparo do inóculo, como descrito anteriormente. As células de levedura utilizadas (4,5 mg) em meio YPD foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min e lavadas três vezes com água deionizada (DI). Após a centrifugação, as células de levedura foram suspensas em 1 mL de solução aquosa de nitrato de zinco 0,05 mol L⁻¹ e 1 mL de solução aquosa de 2-metilimidazol 0,2 mol L⁻¹ foi então adicionado à solução. Após a reação ter sido prosseguida em um agitador orbital a 300 rpm e 30°C por 1 h, o produto foi coletado e lavado três vezes com água DI (7).

Teste de fermentação com células livres e imobilizadas

Os testes de fermentação com células livres e imobilizadas foram realizados para avaliar a capacidade de fermentação da levedura. Para a obtenção do inóculo, foi feita a ativação da levedura em meio YPD e solução concentrada de glicose. A continuação foi inoculada em câmara de fluxo laminar, 4,5mg de levedura em 17,5 mL de meio YPD-pH 5,5 e 2,5 mL de solução concentrada de glicose (100g/L) (de modo a se obter concentração de inóculo de 0,225g/L) em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, o erlenmeyer contendo o meio de crescimento e a levedura foi fechado com tampão de algodão e levado para uma câmara incubadora com agitador orbital a 30°C e agitação de 250 rpm por 12h até a fase exponencial. Para acompanhar o crescimento celular, a absorbância foi determinada a 600nm inicialmente e ao final das 12h. A partir do valor final da absorbância determinou-se o volume do inóculo necessário para se obter 4,5mg de levedura livre e 5,4mg de levedura para posteriormente ser imobilizada, sendo centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min cada vez e então lavadas três vezes com água deionizada (DI).

Os testes de fermentação com as leveduras livres e imobilizadas foram realizados como descrito a seguir. O

cultivo foi feito em 2 frascos Erlenmeyer de 250 mL, o primeiro contendo leveduras livres e o segundo contendo leveduras imobilizadas, submersas em 17,5 mL de meio YPD-pH 5,5 e 2,5 mL de solução concentrada de glicose (100g/L) em temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm, por 144 horas. As amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo de cultivo, diversas diluições do cultivo foram realizadas e a absorbância foi determinada a 600 nm para o acompanhamento do crescimento celular e a 510 nm para a avaliação do consumo de glicose.

Resultados e Discussão

Os experimentos de fermentação efetuados para avaliar o desenvolvimento da levedura mediante a medida periódica da concentração celular, da viabilidade do microrganismo e dos níveis de glicose. Os resultados do crescimento celular se apresentam na Figura 1. Já os resultados obtidos para a viabilidade se mostram na Figura 2.

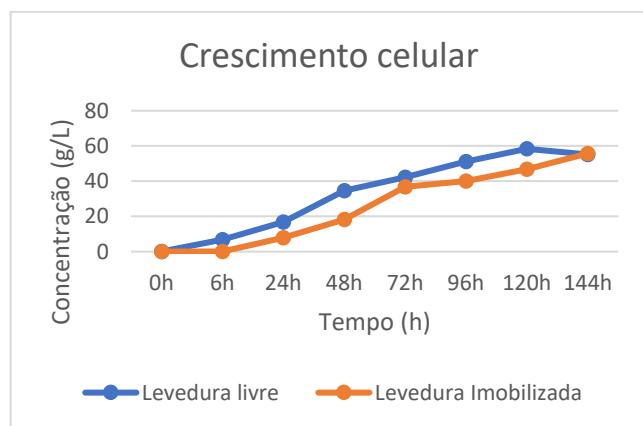


Figura 1. Perfil fermentativo em relação a concentração celular da *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizada em ZIF-8 em função do tempo (volume de 20mL).

A avaliação do crescimento celular durante a fermentação, mostrado na Figura 1, indicou uma semelhança nos perfis cinéticos entre os sistemas contendo leveduras livres e imobilizadas, os quais atingiram concentrações celulares de 55,21 g/L e 55,73 g/L, respectivamente, ao final de 144 horas de processo.

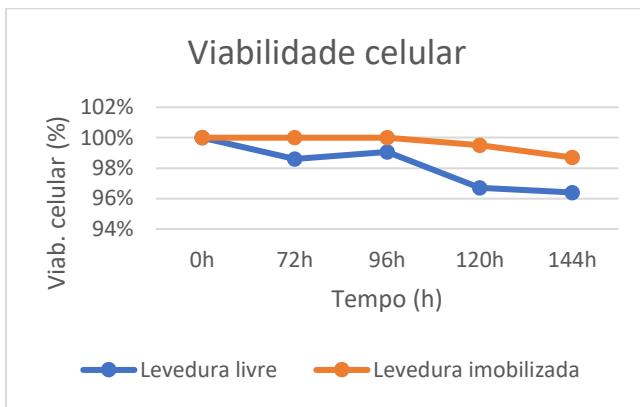


Figura 2. Viabilidade celular da *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizada em ZIF-8 em função do tempo (volume de 20mL).

Como pode ser observado na Figura 1, as células imobilizadas apresentaram um início de atividade fermentativa mais lenta em comparação às células livres. Após 120 horas de processo, observou-se uma redução no crescimento das leveduras livres, resultando em uma viabilidade celular de aproximadamente 96,4% (Figura 2) ao término da fermentação. Com relação as células imobilizadas continuaram a demonstrar aumento em seu crescimento após o mesmo período (Figura 1), alcançando uma viabilidade de 99% (Figura 2).

Além disso, os resultados obtidos para o consumo de glicose com leveduras livres e imobilizadas se apresentam na Figura 3. Na figura observa-se que, no início do processo fermentativo, a redução da concentração de glicose ocorre de forma mais lenta no sistema com levedura imobilizada, enquanto para a levedura livre, verifica-se uma queda mais acentuada, indicando um consumo significativo de glicose.

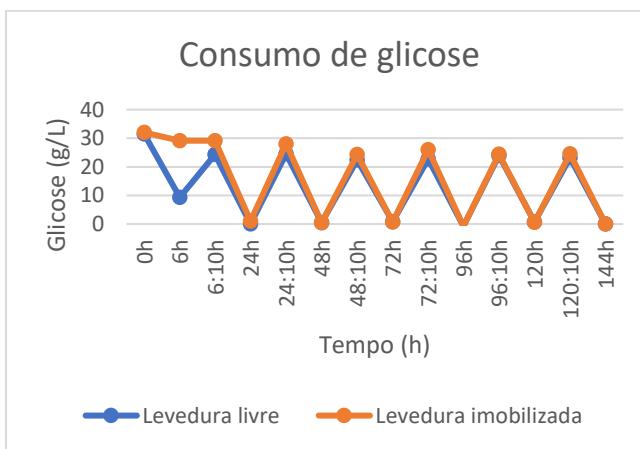


Figura 3. Perfil fermentativo em relação ao consumo de glicose da *Saccharomyces cerevisiae* livre e imobilizada em ZIF-8 em função do tempo (volume de 20mL).

Diante disso, foi necessária a substituição do meio reacional para possibilitar a continuidade da avaliação ao longo de 24 horas de fermentação. Ao final de cada intervalo de 24 horas, verifica-se o consumo completo da glicose em ambos os sistemas, sendo necessário a troca do meio a fim de permitir a reutilização das leveduras e o monitoramento de seu desempenho e crescimento em ciclos subsequentes.

A análise dos dados mostrados nas Figuras 1 e 3 revela que a concentração celular apresenta perfil crescente ao longo do tempo, enquanto a concentração de glicose demonstra uma redução progressiva nos intervalos de 24 horas. Dessa forma, verifica-se que houve um comportamento esperado durante a fermentação, evidenciando o consumo de glicose pelas leveduras e, consequentemente, crescimento celular da levedura.

O atraso observado no início da fermentação pelas leveduras imobilizadas pode ser atribuído à limitação da difusão do substrato até o interior das células, imposta pela barreira física resultante do método de imobilização (8). A técnica de imobilização submete as células a condições de estresse, afastando-as de seu ambiente natural e restringindo o espaço disponível, o que pode levar à morte celular (9). Contudo, essa condição não inviabiliza a ocorrência das principais reações metabólicas, como o crescimento celular, a produção de metabólitos secundários, dióxido de carbono e etanol ao longo do processo fermentativo.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que tanto as leveduras livres quanto as imobilizadas apresentaram um comportamento semelhante durante a fermentação, com consumo eficiente de glicose e crescimento celular significativo. A superioridade na viabilidade celular das leveduras imobilizadas sugere que essa técnica pode proporcionar um ambiente mais favorável para a manutenção da integridade celular ao longo do processo fermentativo. Dessa forma, a imobilização de leveduras se mostra uma estratégia promissora para otimizar a fermentação, garantindo alta produtividade e viabilidade celular, fatores essenciais para aplicações industriais.

Referências

1. TAYLOR, J. *Microorganisms and Biotechnology*. Nelson Thornes. **2001**.
2. VANMARCKE, G.; DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. **2021**, 14, 1-14.
3. NEDOVIĆ, V.; GIBSON, B.; MANTZURIDOU, T. F.; BUGARSKI, B.; DJORDJEVIĆ, V.; KALUŠEVIĆ, A. et al. Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *National Library of Medicine*, **2014**, 32, 173–216.
4. VANMARCKE, G.; DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*. **2021**, 14, 1-14.
5. CANOVA, M. D. Biocombustíveis: análise de viabilidade econômica da implantação de microdestilarias de etanol no Rio Grande do Sul. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
6. BORZANI, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*, Edgard Blücher, São Paulo, 2001.
7. SUN, C.; CHANG, L.; HOU, K.; LIU, S.; TANG, Z. Encapsulation of live cells by metal organic frameworks for viability protection. *Science China Materials*. **2019**, 62, 885–891.
8. VERBELEN, P. J.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, **2006**, 28, 1515-1525.
9. PAJIC-LIJAKOVIC, I.; MILIVOJEVIC, M.; LEVIC, S.; TRIFKOVIC, K.; STEVANOVIC DAJIC, Z.; RADOSEVIC, R.; BUGARSKI, B. Matrix resistance stress: A key parameter for immobilized cell growth regulation. *Process Biochemistry*, **2017**, 52, 30-43.