

Avaliação do Tratamento de Esponja Vegetal (*Luffa cylindrica*) com Hidróxido de Sódio para Imobilização de Células de *Saccharomyces cerevisiae*

Brenda Kishkel¹, Ana Isabel Conejo Costa¹, Giovana Brepohl Benedicto¹, Nicolle Ramos dos Santos¹, Beatriz Paes Silva¹, Bruna Polacchine da Silva¹, André Álvares Monge Neto²

¹Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI – Curso Técnico em Biotecnologia
Rua Vereador Nelson Abraão, 80 – CEP 87015-230 – Maringá - Paraná

²Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Engenharia de Alimentos – E-mail:
andre.monge@outlook.com

Av. Colombo, 5790, Jd. Universitário – Maringá – Paraná – CEP 87020-900

RESUMO

A utilização de matéria orgânica e renovável como bio suporte tem potencial aplicação industrial para imobilização de microrganismos. A invertase é uma enzima produzida pela Saccharomyces cerevisiae, utilizada na produção de açúcar invertido. Este trabalho visa avaliar o tratamento de bucha vegetal com hidróxido de sódio para utilização como bio suporte de Saccharomyces cerevisiae. A esponja vegetal tratada com NaOH (2 %) teve sua eficiência comparada com um controle mediante contagem de células aderidas e pelo teor de proteína liberada na fermentação. Os resultados mostram que maior número de células ficaram aderidas à esponja submetida ao tratamento com NaOH. No entanto, o teor proteico das soluções advindas de ambos os tratamentos não diferiram significativamente entre si. Os microrganismos aderidos às esponjas tratadas com NaOH também tiveram sua contagem reduzida em uma segunda fermentação. Desta forma, este tratamento alcalino não se apresenta viável na imobilização de levedura para produção de invertase.

Palavras-chave: bucha vegetal, NaOH, imobilização de micro-organismos.

INTRODUÇÃO

A utilização de matéria orgânica e renovável como bio suporte, tendo em vista a sustentabilidade, vem sendo atrativa para vários setores da indústria, sendo econômico, de fácil obtenção e auxiliando na preservação do meio ambiente. A bucha vegetal é um material abundante e acessível, dessa forma é um bio suporte adequado para a imobilização de células microbianas e vegetais (COELHO, 2007).

A invertase é uma enzima de interesse industrial que catalisa a hidrólise da sacarose. Esta enzima é obtida, para processos industriais, da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo 80% extracelulares e 20% intracelulares (NOVAKI, 2009 apud MARQUEZ, 2007).

O objetivo do presente trabalho é avaliar a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) submetida a diferentes tratamentos, visando produção de invertase.

MATERIAL E MÉTODOS

As esponjas vegetais foram adquiridas no comércio regional da cidade de Maringá (PR). O preparo foi realizado segundo a por Coelho (2007) com algumas modificações. A bucha vegetal utilizada como suporte foi previamente lavada com água de torneira e seca a 60°C em estufa. Esta foi cortada na vertical, padronizada para diminuir suas irregularidades e cortadas em cubos com base de 2,25 cm². Erlenmeyers contendo 7 unidades de bucha vegetal foram lavados 15 vezes com água da torneira e 3 vezes com água destilada e secos em estufa a 60 °C. Após a higienização procedeu-se os seguintes tratamentos: **Controle** - 15 minutos a 121 °C e 1 atm; **Hidróxido de sódio (NaOH)** – Adicionou-se 50 mL de NaOH (2 %) e manteve-se sob agitação a 120 rpm por 24 horas. Após este período, procedeu-se 15 lavagens com água da torneira e 3 lavagens com água destilada. Depois de secas a 60°C foram autoclavadas a 121°C a 1 atm por 15 min. A Figura 1 apresenta as etapas experimentais realizadas.

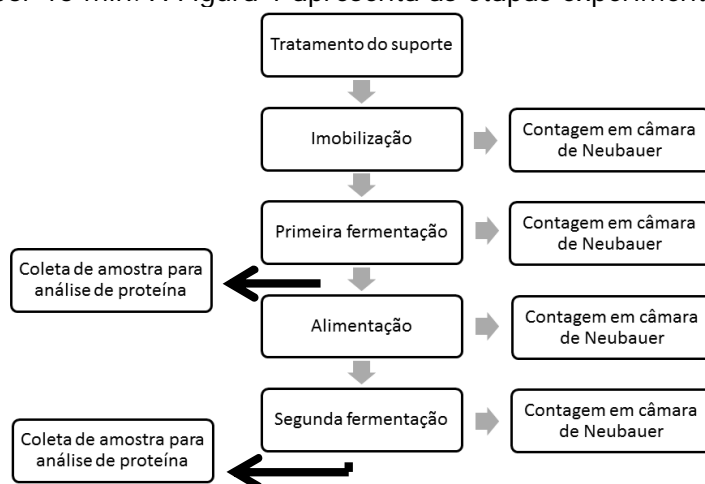


Figura 1. Fluxograma dos experimentos e rotina de coleta.

Adicionou-se 50 mL de uma solução contendo 100 g.L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada comercial nos erlenmeyers. Estes foram mantidos sob agitação a 120 rpm por 6 horas. As amostras foram lavadas com água destilada estéril por dez vezes.

Uma unidade de cada esponja foi retirada do meio reacional para quantificação de microrganismos aderidos. O suporte com a levedura aderida foi retirado do erlenmeyer e colocado em tubos falcon devidamente identificados, controle e NaOH, com 20 mL de solução tween 80 (0,01%) e posto sob agitação intensa em vórtex por 10 minutos (PASTORE, BICAS e MARÓSTICA JR.). Em um eppendorf foi adicionado 1000 µL da solução mais 1000 µL de azul de metileno e procedeu-se contagem em câmara de Neubauer.

Após a primeira fermentação, 20 horas em 50 mL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,15 mol.L⁻¹ a 48,5 °C, as esponjas foram lavadas e distribuiu-se 100 mL de solução de sacarose de 6 °Brix em cada erlenmeyer por 2,5 h. Ao fim da alimentação, lavou-se as esponjas com água destiladas e procedeu-se a segunda fermentação sob as mesmas condições.

Ao final de cada fermentação, coletou-se alíquotas do sobrenadante e realizou-se o método de biureto para quantificação da proteína liberada. As quantificações foram realizadas em triplicata e os resultados comparados com uma curva padrão de albumina bovina (R² > 0,99).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soluções iniciais de *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram contagem de $1,766 \times 10^6$ UFC/mL e $2,534 \cdot 10^6$ UFC/mL e foram utilizadas para imobilização das esponjas tratadas com NaOH e Controle, respectivamente. A Figura 2 apresenta o comportamento das contagens realizadas. O número de células aderidas à bucha tratada com NaOH foi consideravelmente maior que a quantidade de células aderidas ao controle, sendo de 38.000 UFC/mL ou 2,15 % de células da solução inicial de *Saccharomyces cerevisiae* e 24.000 UFC/mL ou 0,95 %, respectivamente. Levando em consideração a menor quantidade de células aderidas ao controle, este tratamento pode ser considerado mais efetivo na produção de invertase, pois, após a primeira fermentação, a quantidade de proteína na solução não se diferenciou da quantidade de proteínas geradas pelas células aderidas ao suporte tratado com NaOH.

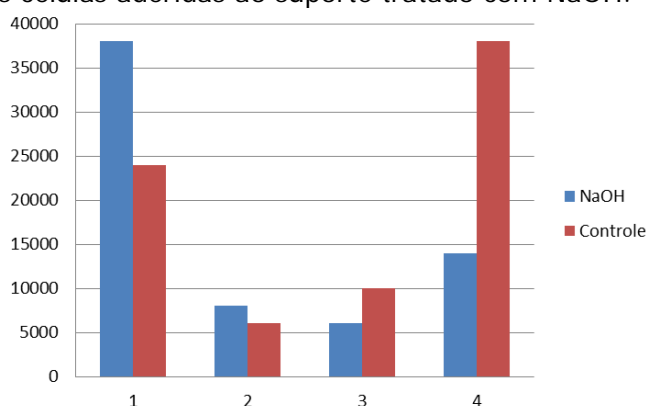


Figura 1. Contagem de células aderidas ao suporte em diferentes etapas do processo: 1) Número de células aderidas ao suporte (UFC/mL) após da imobilização; 2) Número de células aderidas ao suporte após a primeira fermentação; 3) Número de células aderidas ao suporte depois da alimentação; 4) Número de células aderidas ao suporte após a última fermentação.

Nas etapas 2 e 3 observa-se um decaimento na quantidade de células. O tempo de fermentação, de 20 horas, pode ter sido o causador da morte celular, visto que o micro-organismo produzia e não era alimentado. Após a última fermentação, com o lote alimentado, a quantidade de células no lote NaOH foi inferior ao Controle. Este fato pode ser em decorrência de que o NaOH, por ser uma base forte, tenha interferido no metabolismo da levedura e impedido sua multiplicação. Além disto, o tratamento com base forte pode ter liberado substâncias nocivas provenientes do próprio suporte. No controle o número de células se apresentou muito superior ao lote tratado com NaOH, visto que este não tinha interferentes para que levedura se multiplicasse de forma efetiva. Desta forma o controle exibiu melhores resultados, já que o número de células após a última fermentação foi maior, podendo assim ser mais eficiente se utilizada para uma nova fermentação e produzir uma maior quantidade do produto desejado. As concentrações proteicas do meio após cada uma das fermentações estão dispostas na Tabela 1.

Nota-se que ambos os tratamentos ofereceram resultados que não diferenciaram entre si a um nível de 5 % de significância e que, mesmo após a alimentação por 2,5 h, a quantidade de proteína liberada ao meio diminuiu.

Tabela 1. Quantidade de proteínas em cada erlenmeyer após as fermentações.

| Média do teor de proteína | Primeira Fermentação | | Segunda Fermentação | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | NaOH | Controle | NaOH | Controle |
| | 0,205±0,040 ^a | 0,197±0,031 ^a | 0,137±0,026 ^b | 0,117±0,025 ^b |

^{a,b} – Amostras com letras iguais não diferem entre si a um nível de 5 % de significância (P < 0,05).

Behera, Mohanty e Ray (2012) produziram de etanol com *Zymomonas mobilis* imobilizada em bucha vegetal em suporte não tratado e obtiveram resultados positivos. Marques, Buzato e Celligoi (2006) produziram invertase com *Saccharomyces cerevisiae* e mesmo sem tratamento algum no suporte (*Luffa cylindrica*) conseguiram bons resultados. Desta forma, o resultado obtido no presente trabalho não se mostra diferente de respostas encontradas na literatura.

CONCLUSÃO

Após a realização do tratamento da bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) com NaOH, constatou-se que o lote tratado ofereceu melhores condições para que as células se aderissem ao suporte. Contudo, mesmo apresentando quantidade de células aderidas mais elevado, o tratamento controle deve ser preferido para estudos posteriores, pois, mesmo com menor número de células viáveis aderidas, a quantidade de proteína lançada ao meio não diferiu significativamente ao tratamento e propiciou a multiplicação celular após o período de alimentação com solução de sacarose. Estudos posteriores devem ser realizados para a verificação da atividade enzimática da proteína liberada, para a verificação das condições de maior atividade da enzima.

REFERÊNCIAS

- BAHERA S., MOHANTY R. C. e HAY, R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in luffa cylindrica I. Sponge discs and ca-alginate matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 1499-1507, 2012
- COELHO, T. C.; **Avaliação de condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol**. 2007. 90p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2007.
- GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; JÚNIOR, V. S. **REOLOGIA DO AÇÚCAR LÍQUIDO INVERTIDO: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA VISCOSIDADE**. 2004, 5f. Campinas – São Paulo.
- HASAN, S. D. M.; NOVAKI, L.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. **PRODUÇÃO DE INVERTASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A PARTIR DE FARELO DE SOJA**. 2010. 9f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.
- MARQUES, L. L. M.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Effect of raffinose and ultrasound pulses on invertase release by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 49, n. 6, p. 873-880, 2006.
- NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casii***. 2009, 70f. Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo – Paraná.
- PASTORE, G. M.; BICAS, J. B.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. **BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS**. 1ed. São Paulo: Atheneu, 2013, 520f, v. 12.

Agências de Fomento: SENAI (PR)

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br