

Área: Ciência de Alimentos

VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces* spp. APÓS OS PROCESSOS DE CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO

Janaína Strello*, Karen Nicolini, Christian Oliveira Reinehr

Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: 135020@upf.br

RESUMO – A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados para fermentação biológica e alcoólica. No presente trabalho foram testados diferentes métodos para aumentar a viabilidade dessa levedura. Foi avaliada a aplicação de glicose, em diferentes velocidades de congelamento (lento e rápido), antes do processo de liofilização na manutenção da *shelf life* da levedura. O microrganismo extraído a partir do fermentado da batata, foi quantificado e cultivado em escala para ser utilizado na liofilização. Esse fungo foi cultivado em Ágar batata dextrose através do isolamento em placas pela técnica de *spread-plate* (emplacamento por superfície), por um período de incubação 72 horas. As contagens das colônias foram utilizadas para avaliar a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O congelamento lento, influenciou na maior viabilidade da levedura. Os resultados obtidos foram desfavoráveis a adição de glicose, entendendo-se que a quantidade de glicose aplicada foi insuficiente para garantir o viável crescimento da levedura.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, liofilização, fermentação, congelamento, viabilidade.

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o um fungo que atua em temperatura ambiente e sua levedação resulta em gás carbônico e álcool, por este motivo é bastante utilizada em processos industriais. Sua principal fonte de nutrientes são os polissacarídeos. Essa levedura tem capacidade de desenvolver em substrato barato, é de fácil obtenção e reprodução, e seu fermentado tem vasto valor nutricional. Este microrganismo é facilmente encontrado no comércio na forma de fermento biológico fresco, seco ou liofilizado.

A liofilização é o processo mais utilizado pela indústria de leveduras, pois desidrata os microrganismos, deixando intacta sua parede celular e suas propriedades organolépticas. Esse processo ocorre após o congelamento a vácuo e a sublimação de toda água presente na amostra.

Terroni (2011), afirma que existe a probabilidade de até 80% desses microrganismos não sobrevivam ao processo de liofilização, pelo rompimento da membrana celular. Diversos estudos feitos com monossacarídeos ressaltam a importância da adição da glicose ao processo, podendo aumentar a viabilidade da levedura e fazer uma barreira protetora envolta a célula. A relevância deste estudo, é que a glicose pode influenciar na proteção da célula

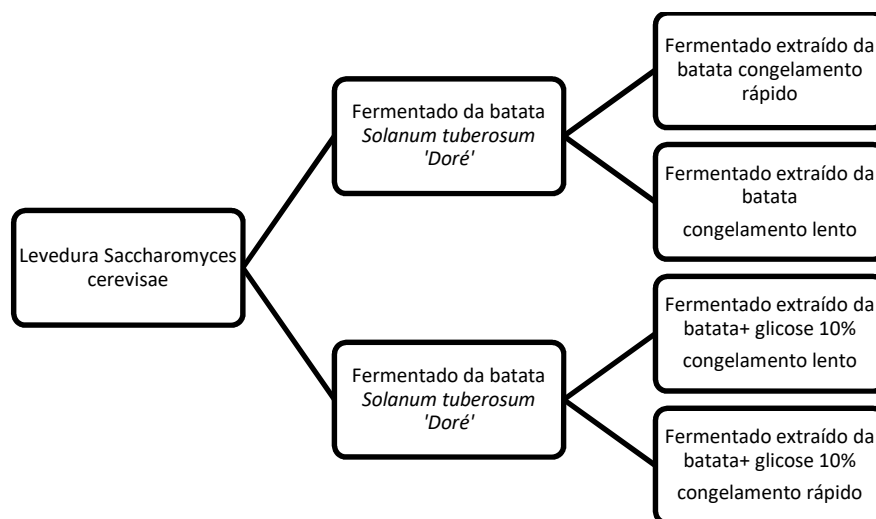
de levedura, e possivelmente depois de reidratada passa ser a fonte energética que a levedura precisa para se reproduzir.

O objetivo proposto foi estudar a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após o processo de liofilização, avaliando o efeito da adição de glicose e da velocidade e tipo de congelamento, comparando a destruição celular da levedura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No processo realizado, foi quantificada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* retirada das amostras de fermentado extraído da batata inglesa, conforme a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2003). A Figura 1 demonstra o fluxograma das análises com as amostras de leveduras.

Figura 1 - Fluxograma das amostra de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autoras do projeto

Para a melhor avaliação dos dados, foram realizadas três diluições para cada amostra. As diluições utilizadas foram as de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . As diluições foram feitas em solução salina 0,1%, de acordo com a ISO 6579:1993.

No processo de fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado um mosto feito a partir do descascamento e moagem da batata inglesa. Esse procedimento ocorreu para que a um conjunto de reações enzimáticas, degradassem a molécula orgânica, liberando energia em forma de trifosfato de adenosina. A fermentação ocorreu anaerobicamente em tempo de 6 horas.

O procedimento de liofilização foi executado usando a amostra do fermentado extraído da batata. Foram feitas 6 diluições para cada característica de amostra. Das diluições foram quantificadas 0,1 mL de amostra em meio de cultivo, ágar *Potato Dextrose*. Posteriormente, 5 mL de suspensão de fermentado extraído de batata e 4 mL de fermentado extraído de batata mais 1 mL de glicose 10% foram congeladas em ultra freezer a -80°C por 12 horas. As mesmas amostras também foram testadas em freezer tradicional, a -2°C por 12 horas. Após o congelamento foram desidratadas por liofilização.

No método de liofilização que foi realizado, a amostra foi introduzida a câmara de vácuo do equipamento onde é reduzida gradativamente a pressão, conseqüentemente com a queda da temperatura ocorreu o congelamento da célula. Após o processo de liofilização às leveduras foram quantificadas novamente, sendo feita a comparação, do antes e depois do procedimento, e a influência do tipo de congelamento das leveduras

Para a quantificação das leveduras, foram contadas e consideradas somente as placas com intervalo de contagem entre 15 a 150 colônias, seguindo a metodologia citada Instrução Normativa nº62 de 26/08/2003 do MAPA, Brasil. A quantificação foi realizada antes e depois do processo de liofilização, a fim de comparação do número de células viáveis no final do procedimento. Os resultados obtidos foram expressos a partir do planejamento experimental do tipo fatorial completo 2² (dois fatores de estudo, variando em dois níveis), conforme referido na tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento Experimental

Experimento	[Glicose]%	Tipo de congelamento
1	0	Rápido
2	2	Rápido
3	0	Lento
4	2	Lento

Fonte: Autoras do projeto

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram liofilizadas as amostras em duplicata e em quatro condições diferentes: A primeira condição foram amostras sem adição de glicose e congelamento rápido. A segunda condição foram amostras com adição de glicose e congelamento rápido. A terceira condição foram amostras sem adição de glicose e congelamento lento. E a quarta condição foram amostras com adição de glicose e congelamento lento. Os resultados da quantificação que foram obtidos, antes do processo de liofilização da levedura, estão expressos na tabela 2:

Tabela 2 - Contagem leveduras *Saccharomyces cerevisiae* antes do processo de liofilização.

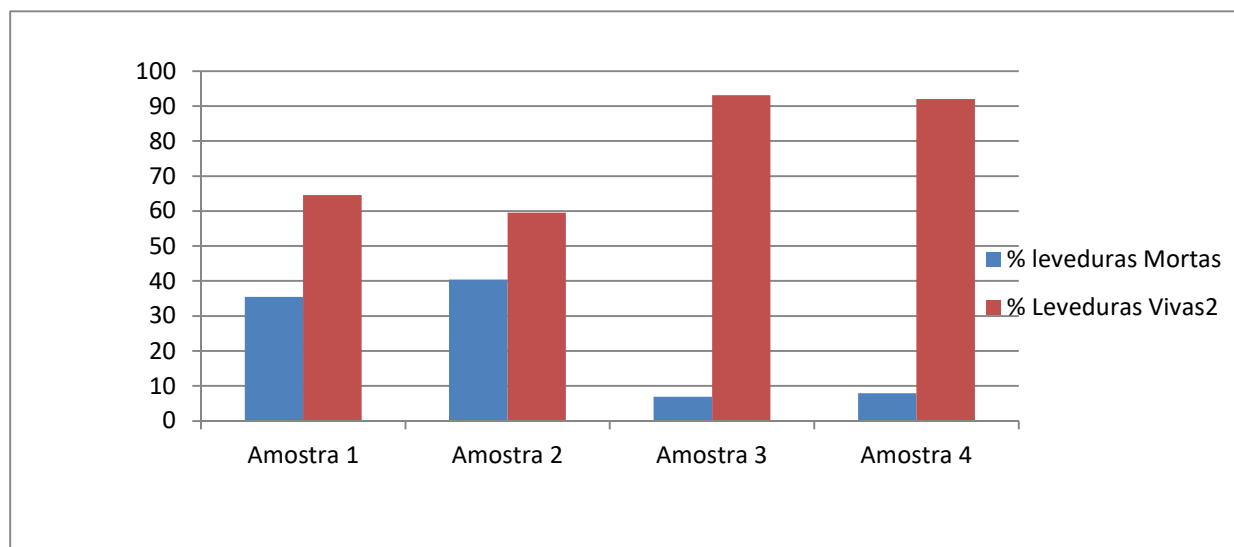
Experimento	Concentração de levedura (log UFC/mL)*
1	8,284 ± 0,231
2	8,036 ± 0,089
3	7,338 ± 0,272
4	6,811 ± 0,721

*Média ± Desvio padrão

Fonte: Autoras do projeto

Após o processo de congelamento, foi utilizada a diluição 10⁻⁵ para quantificação da levedura. Foram constatadas o decaimento do número de colônias após o congelamento, e liofilização, demonstrados na figura 2.

Figura 2 - Porcentagem de leveduras vivas após o processo.



Fonte: Autoras do projeto

Foram relacionados a tabela do planejamento experimental juntamente com os dados das quantificações após o processo de congelamento e liofilização, chegando aos resultados finais representados na tabela 3.

Tabela 3 - Contagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após o congelamento.

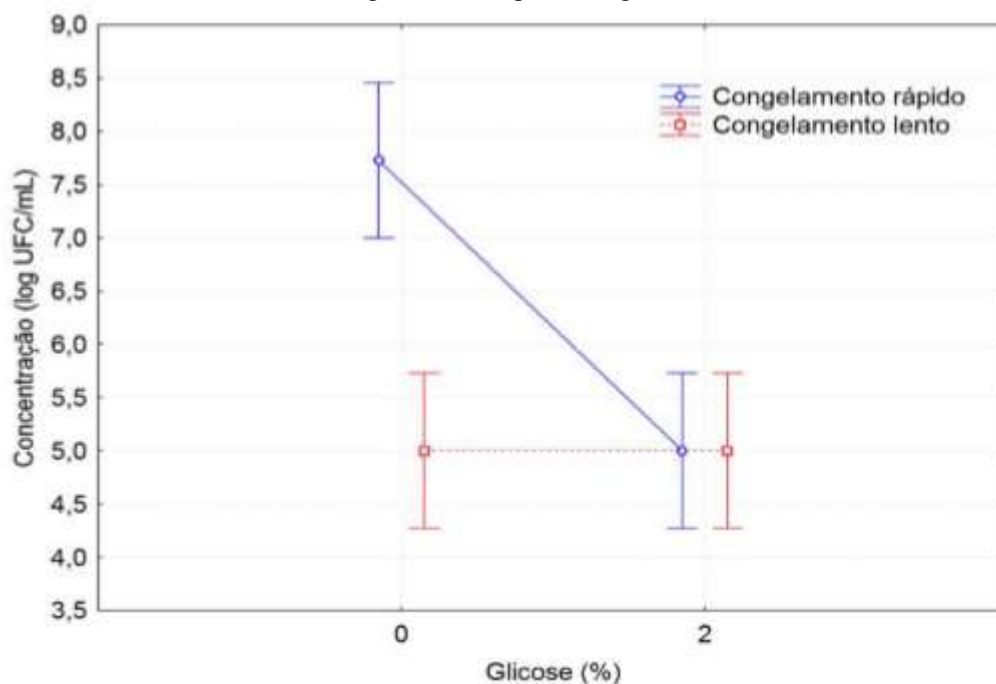
Experimento	[Glicose]%	Congelamento	[] levedura após congelamento (log UFC/mL)	[] levedura após a liofilização (log UFC/mL)
1	0	Rápido	7,861 ± 0,058	7,729 ± 0,743
2	2	Rápido	7,661 ± 0,099	<5
3	0	Lento	8,556 ± 0,077	<5
4	2	Lento	8,335 ± 0,362	<5

Fonte: Autoras do projeto

Verifica-se com os dados obtidos que o tipo de congelamento influenciou na viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois no congelamento rápido pode ter ocorrido o rompimento das membranas das células. No congelamento lento a concentração de leveduras em log de UFC/mL foi maior, devido ao fato de as leveduras ainda poderem se duplicar conforme o decaimento da temperatura, algo que não é possível no congelamento rápido.

Constatou-se que a adição de glicose ao processo, influenciou na viabilidade da levedura. No congelamento lento a quantidade de glicose adicionada as leveduras, não acarretou na viabilidade da levedura. No congelamento rápido a concentração de glicose veio a intervir na viabilidade da levedura, pois quanto maior a concentração de glicose maior foi a quantidade de microrganismos mortos no processo, conforme a figura 3.

Figura 3 - Viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* após o processo de liofilização sobre a influência da glicose e do tipo de congelamento.



Fonte: Software Statistic (2016)

4 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos observados no estudo, conclui-se que o efeito da adição de glicose na viabilidade da levedura não influenciou na proteção das células. Os estudos de Stanier (1960) enfatizam que a adição de glicose ao processo protegeria a célula de levedura, no entanto não foi o ocorrido, recomendando-se maiores pesquisas futuras para este tipo de análise.

No congelamento rápido a concentração de leveduras foi menor, delimita-se isso ao fato, do rompimento da membrana celular. Em contraponto a concentração de leveduras no congelamento lento, foi maior, pelo fato da velocidade de congelamento ser menor, o que influenciou na reprodução das células de levedura durante esse processo. A velocidade de congelamento variou juntamente com a concentração de glicose. No congelamento lento a adição de glicose não interferiu na concentração de leveduras vivas ao final do processo. Já no congelamento rápido a glicose surgiu como interferente no experimento, já que quanto maior foi a concentração de glicose, menor foi a viabilidade da levedura. Entende-se que a concentração de glicose utilizada nos experimentos foi insuficiente, para a proteção inicial da levedura.

5 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA)**. Instrução normativa nº 38 de 1977. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8d1eb580474594e29c74dc3fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_38_1977.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 abr. 2016.

FENNEL, D.I. **Conservation of fungous cultures**. The Botanical Review. New York, v. 26, p. 79-141, 1960.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria De Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os Métodos Analíticos oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. 2003.

EQUIPAMENTOS CIENTÍFICOS TERRONI. **Alta tecnologia em liofilização**. Disponível em: <<http://www.terroni.com.br/alta-tecnologia-em-liofilizacao/>>. Acesso em: 10 abr. 2016.