

Avaliação da ação da luz ultravioleta na linhagem de levedura industrial Ragi Instam utilizada na produção de etanol**Evaluation of the action of ultraviolet light on Ragi Instam industrial yeast strain used in ethanol production**

DOI:10.34117/bjdv5n9-029

Recebimento dos originais: 18/07/2019

Aceitação para publicação: 06/09/2019

Maria do Socorro Mascarenhas Santos

Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970 – Dourados, MS, Brasil – E-mail: maria_mascarenhas@outlook.com

Claudia Andrea Lima Cardoso

Docente do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970 – Dourados, MS, Brasil – E-mail: claudiacardosouems1@gmail.com

Margareth Batistote

Docente do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, CEP 79804-970 – Dourados, MS, Brasil – E-mail: margareth@uems.br

RESUMO

Os estudos acerca das linhagens de leveduras com tolerância a múltiplos estresses têm contribuído muito para a implantação de novas tecnologias para a produção do etanol. No entanto, este processo não dispõe de um tratamento asséptico eficiente do mosto e a contaminação é um fator estressante. Assim, diante do exposto, este estudo visa comparar o crescimento da linhagem de levedura industrial Ragi Instan cultivada em meio sólido de Agar Sabouraud sob a ação da luz branca e da luz ultravioleta. Foi realizada a diluição seriada de 1×10^{-1} a 1×10^{-4} , e as placas de Petri foram distribuídas em dois ambientes sob a ação luz branca e ultravioleta, a temperatura de 30°C por 50 horas. A luz ultravioleta (Uv) interferiu na fisiologia da levedura, alterando a os parâmetros fisiológicos, pois houve uma inibição do crescimento das unidades formadoras de colônias – UFC, afetando, por consequência a produção do etanol

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação, fisiologia celular

ABSTRACT

Studies on multiple stress tolerance yeast strains have greatly contributed to the deployment of new technologies for ethanol production. However, this process lacks efficient aseptic wort treatment and contamination is a stressful factor. Thus, this study aims to compare the growth of Ragi Instan industrial yeast strain grown in Sabouraud Agar solid medium under the action of white light and ultraviolet light. Serial dilution from 1×10^{-1} to 1×10^{-4} was performed, and Petri dishes were distributed in two environments under the action of white

light and ultraviolet, at 30°C for 50 hours. Ultraviolet light (Uv) interfered in the yeast physiology, altering the physiological parameters, since there was an inhibition of the growth of the colony forming units - CFU, consequently affecting the production of ethanol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, cell physiology.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 30 anos, o processo de produção de etanol, no Brasil, passou por uma evolução tecnológica significativa, dada as condições de incentivo proporcionadas com o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL). O processo, que antes apresentava um rendimento de 80% passou, em média, a 92% de conversão, incluindo a produção de outros metabólitos e a produção de biomassa celular, enquanto que os 8% restantes assimilados pelo metabolismo das células promotoras deste processo (BASSO et al., 2008). Assim, pode-se afirmar que o etanol é um dos produtos biotecnológicos mais importantes no cenário brasileiro e até mesmo mundial quando se leva em conta os quesitos valor, quantidade e sustentabilidade (IBELLI, 2015).

Os números mais expressivos de produtividade estão relacionados diretamente com o desenvolvimento de tecnologias que permitiram uma evolução de rendimento e eficiência de processo, que dentre outras destacam-se o desenvolvimento de variedades de cana mais produtivas, as melhorias nas práticas agrícolas, a evolução na engenharia do processo e a utilização de leveduras selecionadas (GOLDEMBERG et al., 2008). Estes microrganismos têm apresentado uma contribuição importante para a produção de etanol combustível, uma vez que este biocombustível é obtido a partir de seu metabolismo (MUSSATO et al., 2010).

A produção do bioetanol brasileiro está pautada na tecnologia de primeira geração utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima. Este processo decorre em etapas que vão desde a extração do caldo, o tratamento para a retirada de impurezas e a fermentação (Figura1).

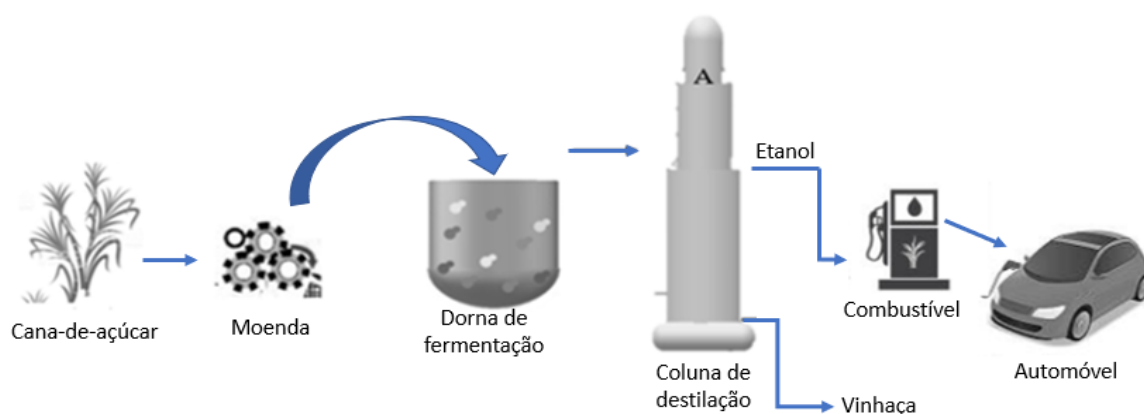


Figura 1: Rota tecnológica de produção de etanol combustível.

Fonte: Elaborada pelos Autores.

Apesar, do processo de produção do etanol combustível brasileiro ser considerado um dos mais avançados, ainda existem muitos aspectos desconhecidos que permeiam a fisiologia das leveduras utilizadas pelas usinas sucroenergéticas (BASSO et al., 2008). Isto tendo em vista, as inúmeras perturbações que podem ocorrer durante o processo fermentativo, tais como: oscilação de temperatura, alta concentração de açúcares no caldo e contaminação bacteriana (CARDOSO, 2006). De acordo com Ravaneli et al. (2006), os microrganismos contaminantes são incorporados ao processo naturalmente pois estão presentes na matéria-prima e podem interferir na eficiência fermentativa e por consequência na produção de etanol.

Neste sentido, um dos métodos de assepsia do mosto em usinas é o tratamento do caldo com altas temperaturas (105°C), no entanto este tratamento não elimina por completo os microrganismos presentes no substrato. Com isso, a busca por métodos mais eficientes de esterilização pode vir a contribuir para o alcance de melhores índices de conversão de sacarose a etanol. Assim, a radiação ultravioleta pode ser uma boa alternativa para minimizar a contaminação do caldo de cana. Segundo Guerrero-Beltran e Barbosa-Cánovas (2004), trata-se de um processo seco e frio relativamente simples e de baixo custo quando comparado a outros processos.

O efeito germicida da luz ultravioleta tem sido utilizado em processos de descontaminação e como agente de desinfecção de água, ar e superfícies, como salienta Pigatto (2008). Os primeiros equipamentos comerciais de ultravioleta (UV), foram produzidos para atender inicialmente as indústrias farmacêuticas e de aquicultura, pois não utilizam compostos químicos para a descontaminação, sendo ampliado para outros segmentos como de alimentos e bebidas. Assim, embora o efeito germicida desta fonte de radiação tenha sido observado pela primeira vez em 1878, ainda se tem pesquisas para avaliar o seu efeito sobre os microrganismos e sobre as alterações nas características dos produtos (LÓPEZ-MALO e PALOU, 2005). Diante do exposto, este estudo visa avaliar a influência da ação da luz branca e ultravioleta na resposta fisiológica da levedura industrial Ragi Instam, utilizada para o processo de fermentação na produção de bioetanol.

2 MATERIAL e MÉTODOS

2.1 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)

Para a contagem de Unidade Formadora de Colônia-UFC, foi utilizado o meio sólido de Agar Sabouraud Dextrose esterilizado em autoclave a 120°C por 20min, que foi disposto em placas de Petri de 20ml. Foi realizada uma diluição seriada com solução salina (0,85%) de 1×10^{-1} a 1×10^{-4} , e alíquotas de 100µL destas diluições foram inoculadas nas placas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski.

O experimento foi conduzido em triplicata, e distribuídos em dois ambientes distintos, um sob a ação da luz branca (FOX LUX 15W) e o outro sob a luz ultravioleta (STAR LUX 15W). As placas permaneceram incubadas sob uma chapa de aquecimento com temperatura controlada de 30°C por 50 horas no interior do fluxo laminar. Após o período de cultivo as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas, o resultado foi obtido a partir da média de cada tratamento e foram consideradas as placas que continham, em média, de 30 a 300 colônias.

3 ANALISE DA RESPOSTA FISIOLÓGICA FRENTE A AÇÃO DA LUZ

3.1 PRÉ-INÓCULO

Inicialmente foi feito um pré-inóculo com 50mL do meio YPD 2%, previamente esterilizado no qual foram adicionadas 0,10g da levedura liofilizada que permaneceu incubado por 30°C por 24 horas. Após este período as células foram lavadas por 3 vezes consecutivas em solução salina (0,85%) e centrifugadas. A biomassa obtida foi utilizada nos experimentos fermentativos.

3.2 CONDIÇÃO FERMENTATIVA

Para a avaliação da ação da luz branca e ultravioleta, foi utilizado 50 mL de caldo de cana esterilizado na concentração de 22°Brix, sem correção de pH que foram dispostos em frascos erlenmeyers, no qual a biomassa celular obtida foi inoculada. Os frascos com as amostras foram mantidos sobre uma chapa de aquecimento com temperatura controlada de 30 °C. E alíquotas foram retiradas para análises dos parâmetros fermentativos.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises do crescimento celular foram realizadas através de medidas espectrofotométricas a 570nm, correlacionada com curva de calibração de acordo com o método de Batistote et al. (2010) e a viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE, ROBINSON e WANG, 1981).

A concentração do etanol foi determinada no cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização de chama (Varian), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento (ZB-5). A condição cromatográfica empregada foi: volume de injeção 1µL, razão de split 1:20 e temperatura do forno de 90°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 240°C. As amostras foram filtradas em ultrafiltro de 0,22µm (BATISTOTE et al., 2010).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Na avaliação das unidades formadoras de colônias-UFC, foi observado que sob a ação da luz branca ocorreu o favorecimento da fase log de crescimento da levedura e na luz UV o número de UFC foi inferior, talvez isso tenha ocorrido pela característica da luz ultravioleta em promover a inativação dos microrganismos. Os dados mostram que a ação da luz UV inibiu os contaminantes em relação as diluições analisadas. Neste estudo, este método de assepsia se mostrou eficiente, sugerindo, deste modo, que talvez possa ser utilizado como um agente esterilizante para o mosto (Figura 1).

Estudos realizados por Lobo et al. (2009), utilizando uma lâmpada ultravioleta de 30W, analisou a inativação de células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* em água, variando a concentração de células e o tempo de exposição a luz UV, esses autores observaram que para a concentração de células de 0,01 g L⁻¹ quando irradiadas por 60 segundos, houve uma inativação celular de 99,99 %, e que possivelmente isto tenha ocorrido devido a ação da radiação da luz UV sobre a multiplicação dos microrganismos (PIGATTO, 2008).

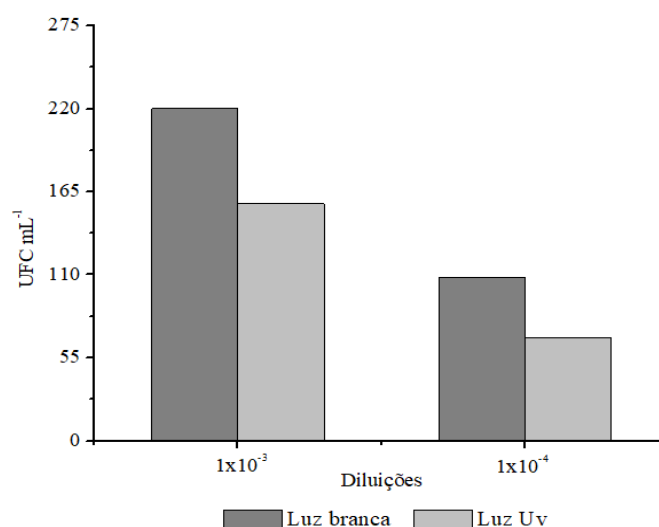


Figura 1: Análise das Unidade Formadora de Colônia-UFC da levedura Ragi Instam sob a ação da luz branca e ultravioleta em diferentes diluições.

A ação da luz branca na linhagem Ragi Instam apresentou nos tempos de 30 e 40 horas de fermentação um aumento da biomassa e da viabilidade. Na ação da luz UV a levedura mostrou perda nos parâmetros fermentativos analisados a partir de 20 horas de fermentação, principalmente em relação a produção de etanol (Tabela 1).

Estudos realizados por Li et al. (2009), utilizando leveduras, mostram que a pressão osmótica do substrato, a forte inibição do etanol durante a fase de produção e o aumento do tempo de fermentação podem causar a perda da viabilidade. Ademais, de acordo com Tortora, Funke e Case (2005) quando os microrganismos são expostos aos agentes antimicrobianos, estes normalmente morrem em uma taxa constante.

A ação da luz ultravioleta pode alterar o metabolismo dos microrganismos interferindo na sua reprodução e inativando-o o que causa a perda de viabilidade celular (GUERRERO-BELTRÁN e BARBOSA-CÁNOVAS, 2004).

Tabela 1: Análise da ação da luz branca e ultravioleta nos parâmetros fermentativos da levedura Ragi Instam.

Tempo (h)	Biomassa (mg mL ⁻¹)		Viabilidade (%)		Etanol % (v v ⁻¹)	
	Branca	Uv	Branca	Uv	Branca	Uv
10	3,5	3	92	80	3,5	1,5
20	3,7	2,3	85	74	4,4	2,8
30	5	1,8	76	57	3,2	2,5
40	5,3	1,3	65	43	2	1,4

Fonte: Elaborada pelos autores.

5 CONCLUSÕES

A ação da luz branca não alterou o crescimento celular, contudo houve inibição na presença da luz Uv. Na análise dos parâmetros fermentativos a ação da luz uv foi mais efetiva implicando na resposta fisiológica da levedura e por consequência na produção do etanol.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do

Sul (FUNDECT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PGRN) e ao Programa Institucional de Bolsas aos Alunos de Pós-Graduação (PIBAP) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

REFERÊNCIAS

BASSO, L. C., AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J., LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1155-63, 2008.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana-de-açúcar. **Ciência e Natura**, v. 32, 83-95, 2010.

CARDOSO, M. G. **Produção de Etanol de Tratada com Processo de Flotação**. Produção de Aguardente de Cana. 2.ed. Lavras: UFLA- MG, p.455, 2006.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnol Biofuels**. v. 1. p. 6-15, 2008.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. **Food Science and Technology International**, v. 3, p.137-147, 2004.

IBELLI, F. D. **Avaliação fenotípica e genotípica de segregantes de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”. 107 fl. Araraquara, 2015.

LEE, S. S.; ROBINSON; F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**. v. 11, p. 641-649, 1981.

LI, F.; ZHAO, X. Q.; GE, X. M.; BAI, F. W. An innovative consecutive batch fermentation process for very – high – gravity ethanol fermentation with self – flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p.1079-1086, 2009.

LOBO, M. G.; COSTA, B. P.; WISBECK, E. Avaliação da desinfecção de água por reator utilizando radiação ultravioleta. **Revista de Ciências Ambientais**, v.3, p.1981-8858, 2009.

LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Ultraviolet light and food preservation. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G; TAPIA, M.S.; CANO, M.P. **Novel food processing technologies**. New York: CRC, 2005. Chap. 18.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

PIGATTO, G. **Irradiação UV em Xantomonas campestris PV. Campestris visando a produção da goma xantana**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2008.

RAVANELI, G. C.; MADALENO, L. L.; PRESOTTI, L. E.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 543-546, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Porto Alegre: Artmed, 827 p. 2005.