

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**DÉBORA MOTA DOS SANTOS**

**VIABILIDADE DE LEVEDURAS DURANTE O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO  
UTILIZANDO DIFERENTES CROPROTETORES**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PONTA GROSSA  
2013**

**DÉBORA MOTA DOS SANTOS**

**VIABILIDADE DE LEVEDURAS DURANTE O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO  
UTILIZANDO DIFERENTES CRIOPROTETORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, da Coordenação de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giovana de Arruda Moura Pietrowski.

**PONTA GROSSA**

**2013**



---

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **VIABILIDADE DE LEVEDURAS DURANTE O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO UTILIZANDO DIFERENTES CRIOPROTETORES**

por

**DÉBORA MOTA DOS SANTOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 17 de abril de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Profa. Dra. Giovana de Arruda Moura Pietrowski**  
Professora Orientadora

---

**Profa. Dra. Denise Milléo Almeida**  
Membro titular

---

**Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro**  
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se arquivado na Secretaria Acadêmica -

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por ter me dado forças para continuar a cada dia superando as diversas dificuldades desta jornada.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o curso.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa por ter disponibilizado o equipamento de liofilização para o desenvolvimento deste artigo.

A minha mãe, Eliana Souza, pela dedicação, esforço, apoio e amor incondicional.

Ao meu avô, meu anjo da guarda que sempre me acompanhou e protegeu.

À minha orientadora, Professora Giovana de Arruda Moura Pietrowski, pela sua orientação, ensinamentos e pelo apoio e força nos momentos difíceis.

Aos professores do Departamento de Alimentos, pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional durante as aulas aplicadas.

A todos os meus amigos, pela amizade e incentivo de nunca desistir.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

## RESUMO

SANTOS, D.M. **Viabilidade de leveduras durante o processo de liofilização utilizando diferentes crioprotetores.** 2013. n 21. Trabalho de Conclusão de Curso. Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2013.

A importância da manutenção e conservação de leveduras utilizando métodos para garantir a preservação da levedura em laboratórios e centros de pesquisa, vem sendo estudada ao longo do tempo. Apesar de existir poucos estudos sobre diversos processos de preservação em longo prazo para garantir a preservação adequada, alguns fatores devem ser observados para obter bons resultados, como a escolha do meio de crescimento da cultura inicial, a reativação, a temperatura de pré-congelamento e o tipo de crioprotetor. O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência de diversos crioprotetores na viabilidade de cepas de *Hanseniaspora guilliermondii*, aplicando o método de liofilização com adição de lactose, manitol e leite em pó desnatado antes da etapa de congelamento. Deste modo, a cepa foi avaliada em relação à contagem em placas, na sua morfologia macro e microscópica e na fermentação no mosto de maçã, antes, durante e após as etapas do processo de liofilização. Os resultados da contagem em placas mostraram perda celular na etapa do congelamento, de liofilização e de armazenamento de 6 meses, revelando que a contagem inicial de  $2,7 \times 10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup> diminuiu para  $7 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>,  $4 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>,  $1,3 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup> e  $2,5 \times 10$  ufc.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, com lactose, manitol, leite em pó desnatado e sem crioprotetor. Os resultados das características macro e microscópicas das colônias de *Hanseniaspora guilliermondii*, não apresentaram modificações morfológicas durante as etapas do processo de liofilização. Na capacidade fermentativa, usando como parâmetro a velocidade de  $6,74$  gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, em um tempo de 2,29 dias, foi verificado na etapa do congelamento um aumento da velocidade máxima em menor tempo em todos crioprotetores. Na etapa de liofilização, as cepas protegidas pela lactose e sem crioprotetor aumentaram sua velocidade e diminuíram o tempo para atingi-la e o com o leite em pó desnatado apresentaram queda na velocidade máxima, porém em menor espaço de tempo. Após 6 meses de conservação houve fermentação apenas das cepas protegidas com lactose e manitol. Estes resultados demonstram que os crioprotetores utilizados na liofilização, garantem a estabilidade das características macro e microscópicas de *H. guilliermondii*, diminuição nas contagens em todas as etapas do processo e no armazenamento e alterações na capacidade fermentativa da cepa.

**Palavras- chaves:** Liofilização, Crioprotetores, *Hanseniaspora guilliermondii*.

## ABSTRACT

SANTOS, D.M. **Viability of yeasts during the freeze drying process using different cryoprotectants**. 2013. n 21. Trabalho de Conclusão de Curso. Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2013.

The importance of maintenance and upkeep of yeasts using methods to ensure the preservation of the yeast in laboratories and research centers, has been studied over time. Although there is few studies on various long-term preservation processes to ensure adequate preservation, some factors must be observed to obtain good results, as the choice of initial culture growth medium, the reactivation, the prefreezing and cryoprotectant type. The present study aimed to verify the influence of various cryoprotectant, area and viability of strains of *Hanseniaspora guilliermondii*, applying the method of freeze-drying with added lactose, mannitol and skimmed milk powder before freezing step. In this way, the strain was evaluated against the count, in your macro and microscopic morphology and fermentation in the Apple must, before, during and after the freeze-drying process steps. The results of the boards count showed cell loss in step of freezing, freeze-drying and storage of 6 months, revealing that the initial count of  $2,7 \times 10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup>, decreased to  $7 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>,  $4 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup>,  $1,3 \times 10^2$  ufc.mL<sup>-1</sup> e  $2,5 \times 10$  ufc.mL<sup>-1</sup>, respectively with lactose, mannitol, skimmed-milk powder and without cryoprotectant. The results of the macro and microscopic features of *Hanseniaspora guilliermondii* colonies, showed no morphological changes during the freeze-drying process steps. In fermentative capacity, using as a parameter the 6, 74 speed gCO<sub>2</sub>. L<sup>-1</sup>, in a time of 2, 29 days, was checked in step of freezing an increase in maximum speed in the shortest time in all, area. In freeze-drying, protected by lactose and strains without cryoprotectant increased their speed and decreased the time to achieve it and with the skimmed-milk powder showed fall at full speed, but in the shortest time. After 6 months of conservation there was only protected strains fermentation with lactose and mannitol. These results demonstrate that, area used in freeze drying, guarantee the stability of macro and microscopic features of *h. guilliermondii*, decrease in scores in all stages of the process and in storage and changes in fermentative capacity of cepa.

**Keywords:** Freeze drying, Cryoprotective agent, *Hanseniaspora guilliermondii*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
2.1 MATERIAIS .....	9
2.2 MÉTODOS .....	9
2.2.1 Procedimentos antecedentes à liofilização da <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> .....	9
2.2.2 Liofilização da Cepa de <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> .....	10
2.2.3 Recuperação da Cepa de <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> .....	10
2.2.4 Avaliação de Viabilidade das Cepas .....	10
2.2.5 Análise Estatística .....	12
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>13</b>
3.1 CONTAGEM DE LEVEDURAS <i>H. GUILLIERMONDII</i> .....	13
3.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	16
3.3 CAPACIDADE FERMENTATIVA EM MOSTO DE MAÇÃ.....	18
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>21</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras tem sido utilizadas na indústria de alimentos, como agente de fermentação, na fabricação de pães, cervejas e vinhos e na forma inativa, como suplemento nutritivo em produtos naturais, além do uso como matéria prima para produção de autolisados e extrato de leveduras (PÁDUA; OLIVEIRA; SBARBIERI, 2000)

As leveduras não-*Saccharomyces* são conhecidas pela sua contribuição aos compostos voláteis aromáticos, a maioria deles contribuintes para aromas frutais e florais em bebidas fermentativas (VIANA et al., 2009). Diversos trabalhos vêm sendo realizados utilizando cepas não-*Saccharomyces*, do gênero *Hanseniaspora*, obtendo resultados que evidenciam uma melhora na qualidade aromática do produto (XU et al, 2006). Deste modo, torna-se importante e essencial à conservação de cepas deste gênero para a execução de estudos e pesquisas.

Para a manutenção de cepas diversos métodos como preservação a baixas temperaturas (congelamento a - 80°C ou com nitrogênio líquido), preservação em óleo mineral, repique contínuo, preservação em água destilada esterilizada e liofilização, podem ser utilizados para garantir a preservação adequada de micro-organismos (CAVALCANTI, 2010). Mariano (2006) comenta que muitos destes métodos são laboriosos, exigindo maior tempo de trabalho e podendo resultar em variações na expressão das características dos micro-organismos. Os métodos que tem apresentado maior sucesso são aqueles que reduzem o metabolismo a ponto de induzir latência artificial (SILVA et al., 2008).

O processo de liofilização, que consiste na secagem de um material por meio da sublimação da parte congelada a baixas temperaturas e sob vácuo, portanto, um processo de transferência de calor e de massa simultânea, no qual o calor é fornecido para o produto congelado e o vapor d' água é removido continuamente, tem sido considerado uma das formas mais seguras de manutenção de cepas (PITOMBO, 2005; MORGAN et al, 2006). Esse processo visa à secagem de organismos, de tal forma que a atividade metabólica seja fortemente reduzida (ROBERT et al, 2006).



Para o processo de liofilização a etapa inicial de congelamento deve ser realizada para que o mínimo de cristais de gelo seja formado (MELIN et al., 2011). Na etapa subsequente, a secagem primária, a água congelada é removida por sublimação, formando poros no interior do produto e na última etapa, chamada de secagem secundária, a temperatura da água ligada é aumentada fortemente para que deixe o produto (ROBERT et al., 2006).

Para se obter bons resultados com a liofilização, alguns fatores devem ser observados, como a escolha do meio de crescimento da cultura inicial, do meio de reativação, a temperatura de pré-congelamento e o tipo de crioprotetor (ROSE, 1970).

Os agentes crioprotetores são aditivos usados durante a conservação de micro-organismos a baixas temperaturas (BEIRÃO, 2006). Para conservação e preservação da viabilidade dos micro-organismos é necessário que não seja tóxico e não reativo com a água e que tenha uma boa penetração celular (CAMEOTRA et al., 2007). Os crioprotetores mais comumente utilizados são a sacarose, glicose, lactose, manitol e leite em pó desnatado (DENNISTON et al., 2000).

Devido as suas propriedades de preservação contra efeitos danosos a integridade da levedura, os crioprotetores podem ser usados nas concentrações de 10% a 15%, determinando uma boa criopreservação (LUDLAM et al., 1989; BAATI et al., 2000).

A literatura apresenta poucas informações sobre a ação dos crioprotetores em relação às leveduras não-*Saccharomyces* no processo de liofilização, evidenciando a necessidade do desenvolvimento do presente trabalho. Portanto, o objetivo geral foi verificar a influência de diversos crioprotetores na viabilidade de *Hanseniaspora guilliermondii* durante as etapas do processo de liofilização.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

A cepa de *Hanseniaspora guilliermondii* faz parte do acervo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa. Os meios de cultura utilizados foram yeast malt agar (YMA) e glucose peptone yeast extract broth (GPYB) e os crioprotetores foram a lactose (Biotec), manitol (Biotec) e leite em pó desnatado (Molico-Nestle).

Para verificar as características de fermentação da cepa liofilizada sob diferentes crioprotetores foi utilizado mosto de maçã da cultivar Gala (10 Kg), produzido com maçãs obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Procedimentos antecedentes à liofilização da *Hanseniaspora guilliermondii*

Para aumentar a biomassa a ser liofilizada, uma colônia pura da cepa de *Hanseniaspora guilliermondii* isolada em yeast malt agar (YMA) foi inoculada em 5 mL de glucose peptone yeast extract broth (GPYB) previamente esterilizado, que foi incubado a temperatura de 25 °C ( $\pm$  1°C) em estufa com agitação (130 rpm) por 24 horas (Incubadora Tecnal TE 420). Esta cultura foi transferida para um erlenmeyer com 100 mL do mesmo caldo (GPYB) e incubado, na mesma temperatura e agitação, por 48 horas, atingindo uma população de  $10^{12}$  ufc.mL<sup>-1</sup> (PIETROWSKI *et al.*, 2012).

Foram produzidos 300 mL de cultura de *H. guilliermondii*, conforme descrito anteriormente, para submeter à centrifugação com cada crioprotetor (leite em pó desnatado, lactose e manitol) e 300 mL da cultura para a água destilada estéril. As culturas foram centrifugadas por três vezes, sendo a primeira com o próprio caldo GPYB e as demais utilizando a água destilada e os crioprotetores para lavar a biomassa e conferir ou não a crioproteção. As centrifugações ocorreram sob refrigeração a -4°C (Excelsa 4 Microprocessed Centrifuge – Modelo 280 R) por 15

minutos a 3.000 rpm, com a água destilada e com os crioprotetores (lactose 10%, leite em pó desnatado 10% e manitol 10%), a centrifugação ocorreu nas mesmas condições, porém por 30 minutos, pois com 10% de concentração dos crioprotetores, os quinze minutos utilizados com água destilada não foram suficientes para garantir a separação da biomassa.

Após cada lavagem o sobrenadante foi descartado, permanecendo a biomassa que era coletada em frascos estéreis para posterior homogeneização com os respectivos crioprotetores e com água destilada (s/c). O conteúdo obtido foi distribuído em frascos de vidro, com rolhas de borracha, previamente esterilizados. Os frascos foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas.

#### 2.2.2 Liofilização da Cepa de *Hanseniaspora guilliermondii*

Os frascos foram encaminhados ao liofilizador (Marca Terroni – Modelo LD 1500), que trabalhou nas seguintes condições: vácuo inicial + 1760  $\mu\text{Hg}$ ; vácuo final 0  $\mu\text{Hg}$ ; temperatura do condensador  $-30^{\circ}\text{C}$ . O processo foi concluído em 24 horas, quando houve o fechamento das rolhas de borracha ainda sob condições de vácuo. Para garantir a vedação dos frascos foi utilizado parafilme (Laboratory Supplier – 4 IN. X 125 FT). As cepas liofilizadas foram mantidas nos frascos de vidro, em caixa fechada e temperatura ambiente, até o processo de recuperação.

#### 2.2.3 Recuperação da Cepa de *Hanseniaspora guilliermondii*

Para a reidratação das cepas foi utilizado 2 mL de cada crioprotetor no próprio frasco liofilizado, que depois de agitação por 10 segundos em velocidade máxima (Vortex Mixer), foram deixados em repouso por 30 minutos.

A recuperação de *H. guilliermondii* ocorreu logo após a cepa ter sido submetida ao processo de liofilização (tempo 0) e após 6 meses de armazenamento.

#### 2.2.4 Avaliação de Viabilidade das Cepas

A suspensão obtida na recuperação da cepa foi utilizada para a verificação da capacidade fermentativa das cepas conservadas, para contagem em placas e também para verificação das características morfológicas.

#### 2.2.4.1 Contagem de leveduras em placas

Para a realização da contagem em placas de *H. guilliermondii* preservada pelo processo de liofilização, foi retirada uma alíquota de 1mL da suspensão obtida na recuperação e após concluídas as diluições seriadas até  $10^{-6}$ , foi realizada semeadura superficial com alça de Drigalski em YMA. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 48 horas (CROUS *et al*, 2009).

#### 2.2.4.2 Caracterização morfológica

O aspecto macroscópico das colônias de *H. guilliermondii* obtidas foram observados nas placas utilizadas para as contagens. As colônias foram submetidas à preparações microscópicas coradas pelo método de Gram, para a observação das características microscópicas das cepas preservadas.

#### 2.2.4.3 Capacidade fermentativa em mosto de maçã

O mosto de maçã clarificado, filtrado e pasteurizado foi acondicionado em erlenmeyers de 250 mL com volume de 200 mL, previamente esterilizados em autoclave (Modelo Phoenix AV75)  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e providos de batoque para avaliação da cinética de fermentação. Em seguida, foi adicionado 1 mL da suspensão obtida na recuperação da cepa em cada crioprotetor, como inóculo inicial de fermentação nos erlenmeyeres devidamente identificados. Foram incubados em estufa bacteriológica (Quimis – Modelo Q 31B24) a  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por 10 dias. A cinética da fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado durante a liberação do gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), com pesagens dos fermentadores em balança analítica (Modelo AS-F1) no mínimo três vezes ao dia até o peso constante (BELY *et al*, 1990; ROGER *et al*, 2002). A velocidade de fermentação foi obtida pela equação 1. Os dados de perda de  $\text{CO}_2$  pelo tempo decorrido na fermentação foram plotados em gráfico de dispersão e depois de adicionar linha de tendência, o valor da perda de  $\text{CO}_2$  foi corrigido pela equação do gráfico utilizando o valor de  $R^2$  mínimo de 0,99, para o cálculo das velocidades.

Equação (1)

$$V = \Delta \text{CO}_2 / \Delta t$$

Onde:

V: velocidade de fermentação ( $\text{g} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )

$\Delta \text{CO}_2$ : Variação de produção de  $\text{CO}_2$  ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

$\Delta t$ : Variação do tempo (d).

#### 2.2.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), para verificar a similaridade dos tratamentos. O processamento de dados e a análise estatística foram realizados com o uso do programa estatístico SASM - Agri (CANTERI *et al.*, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Contagem de leveduras *H. guilliermondii*

Os resultados da contagem da levedura *H. guilliermondii* em placas são apresentados na figura 1 e mostram instabilidade populacional perante a adição dos crioprotetores na etapa de congelamento e de liofilização, quando comparadas com a contagem inicial da referida cepa.

Com relação à concentração inicial para a liofilização, Morgan et al (2006) afirma que existem poucas publicações definindo a concentração de células ideal para a liofilização, porém historicamente as quantidades superiores que  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  garante a recuperação de células viáveis de uma amostra liofilizada. Desta forma, considerando que na etapa de centrifugação ocorreu perda de algumas células, a concentração inicial de leveduras foi de  $10^9$  ufc. $\text{mL}^{-1}$  e foi constatado uma diminuição dessa população tanto na etapa de congelamento, na liofilização como também na recuperação após 6 meses de conservação.

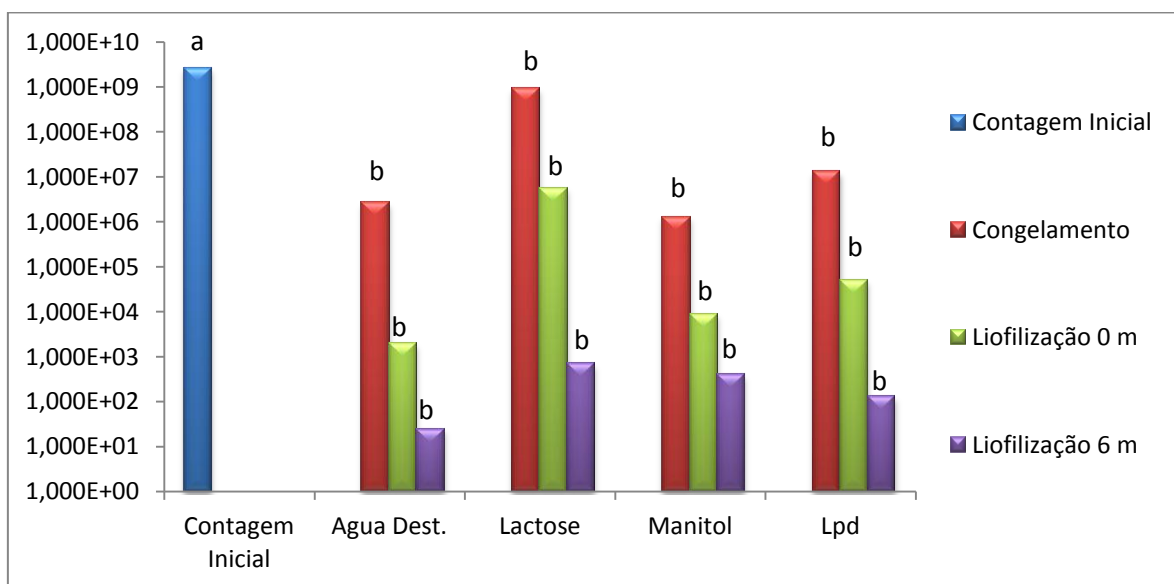


Figura 1 – População de *H. guilliermondii* expressa em ufc. $\text{mL}^{-1}$  nas etapas do processo de liofilização

Nota: <sup>a,b</sup> = letras diferentes nos diferentes crioprotetores/etapas da liofilização indicam que há diferenças significativas nas contagens ( $p < 0,05$ )

Fonte: Autoria própria.

As etapas que compõem o processo de liofilização podem causar injúrias ou danos celulares levando ao aumento da sensibilidade, da fase lag de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (ABREU & TUNTUNJI, 2003; CANHOS et al., 2004). Desta forma Hubálek (2003) e Paoli (2005) recomendam na tentativa de contornar os danos celulares, substâncias protetoras que podem ser adicionadas durante o desenvolvimento do microrganismo, antes do congelamento ou da secagem, podendo destacar compostos como o leite desnatado, soro, trealose, glicerol, sacarose, glicose, lactose, entre outros. No presente trabalho foram utilizados os crioprotetores somente a partir da etapa do congelamento e não no crescimento do microrganismo.

O crioprotetor com maior influencia na estabilidade da população de levedura durante o processo de congelamento (figura 1) foi à lactose, tendo diminuído apenas um ciclo logarítmico na contagem, o leite em pó reduziu dois ciclos logarítmicos. Os crioprotetores com menor proteção às cepas foram o manitol e a água destilada, decresceram três ciclos logarítmicos, porém pelo teste de Tukey não houve diferença significativa entre todas as contagens ( $p < 0,05$ ).

Oliveira et al (2003) comentam que os crioprotetores são essenciais para o congelamento, mas essas substâncias não permitem a sobrevivência de todas as células, pois apresentam efeitos tóxicos que dependem da concentração do crioprotetor utilizado bem como o tempo de exposição da célula. Neste trabalho, foi observado que a concentração utilizada de 10% da lactose não influenciou na viabilidade das células da levedura, pois manteve uma concentração estável comparado com a população inicial. De acordo com as observações de Vergne e Tutunji et al (2004) a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  de congelamento é adequada para a maior parte dos microrganismos, porém, algumas células são sensíveis e não sobrevivem a longos períodos.

Na etapa de transferência de calor e de massa simultânea, ou seja, na secagem inicial, foi observada uma diminuição desta população perante todos os crioprotetores e esta redução ocorreu em menor quantidade na lactose, com uma redução de dois ciclos logarítmicos, frente às cepas sem crioprotetores e protegidas com leite em pó desnatado e manitol, que evidenciaram uma perda de três ciclos logarítmicos em relação a contagem do congelamento para a liofilização. Com base nestes resultados o melhor crioprotetor para *H. guilliermondii* foi a lactose que apresentou a contagem de  $5,7 \times 10^6$  ufc.  $\text{mL}^{-1}$  após a liofilização. Entretanto, a

aplicação do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os valores das contagens nos diferentes crioprotetores e inclusive sem crioprotetor não apresentou diferença significativa, contrapondo as afirmações de Hubálek (2003) que afirma ser essencial a utilização de crioprotetores, para contornar os danos celulares dos microrganismos.

Na recuperação da cepa após seis meses de liofilização e conservação em temperatura ambiente, houve perda celular em todos os tratamentos. As contagens das cepas da água destilada e do leite em pó desnatado revelaram uma perda de dois ciclos logarítmicos, da lactose houve perda de quatro ciclos logarítmicos e com o manitol apenas um ciclo logarítmico. Entretanto, as afirmações de Silva et al (1992) e Costa & Ferreira (1991) salientam que embora a liofilização como método de preservação de leveduras promova alta taxa de morte, a viabilidade celular remanescente permanece estável durante o período de estocagem, no entanto este aspecto não foi observado neste trabalho.

Costa (2010) e Morgan (2006) sugerem que os procedimentos de estocagem e acondicionamento após a liofilização influenciam significativamente na vida de prateleira nos materiais liofilizados. Desta forma, devem ser armazenados em ampolas ou frascos de vidro e acondicionados em ambientes com baixa umidade, baixas temperaturas, abrigo de oxigênio, luz e contaminantes.

Neste trabalho, conforme as sugestões destes autores o material liofilizado foi armazenado em frascos de vidro, com rolha de borracha fechada à vácuo no liofilizador, a ausência de oxigênio foi garantida com a utilização de parafilm, ao abrigo da luz, entretanto, as amostras liofilizadas foram conservadas a temperatura ambiente. Contudo, a recuperação das leveduras recém-liofilizadas e após seis meses de recuperação com a adição dos crioprotetores mostraram resultados de contagens diferentes, sugerindo que a morte das células ocorreu tanto na liofilização quanto durante o tempo de armazenamento.

Em estudo realizado para conhecer a melhor sobrevida e a manutenção das propriedades como agente biocontrolador, Abadias et al (2001) utilizaram diferentes agentes protetores e meios de reidratação na liofilização das cepas de leveduras. Concluíram que o melhor resultado foi obtido utilizando-se 10% de lactose e 10% de leite desnatado como protetores, e a taxa de sobrevida foi também superior quando uma solução de 10% de leite desnatado foi utilizada na reidratação. Neste trabalho foi constatado que a concentração utilizada de 10% dos mesmos crioprotetores,



houve uma diminuição da preservação após os seis meses de estocagem da levedura *H. guilliermondii*.

### 3.2 Caracterização morfológica

Nas características macro e microscópicas das colônias de *H. guilliermondii*, apresentadas nos quadros 1 e 2, foi observado que em todas as etapas do processo de liofilização com a adição dos diferentes crioprotetores as amostras permaneceram inalteradas, como encontrado na fase de aumento da biomassa com as características das colônias esbranquiçadas, de bordas lisos e brilhantes e com células apiculadas.

<b>Etapas do Processo de Liofilização</b>	<b>Aspectos Macroscópicos de <i>H. guilliermondii</i></b>			
	<b>Crioprotetores</b>			
	<b>S/Crio</b>	<b>Lac</b>	<b>Man</b>	<b>Lpd</b>
<b>Congelamento</b>	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes
<b>Liofilização (tempo 0)</b>	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes
<b>Liofilização (6 meses)</b>	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes	Esbranquiçadas, bordas lisos e brilhantes

**Quadro 1 - Resultados das características macroscópicas da cepa de *H. guilliermondii* nas etapas do processo de liofilização com diferentes crioprotetores.**

**Fonte: Autoria própria.**

<b>Etapas do Processo de Liofilização</b>	<b>Aspecto Microscópico de <i>H. guilliermondii</i></b>			
	<b>Crioprotetores</b>			
	<b>S/Crio</b>	<b>Lac</b>	<b>Man</b>	<b>Lpd</b>
<b>Congelamento</b>	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas
<b>Liofilização (tempo 0)</b>	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas
<b>Liofilização (6 meses)</b>	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas	Células apiculadas

**Quadro 2- Resultados das características microscópicas da cepa de *H. guilliermondii* nas etapas do processo de liofilização com diferentes crioprotetores.**

**Fonte: Autoria própria.**

A utilização da liofilização para armazenamento de leveduras pode ser de grande utilidade, pois geralmente esses organismos se mantêm inalterados morfológicamente (SOUZU, 1973; KIRSOP & SNELL, 1984).

Cavalcante (2010) que trabalhou com três gêneros de levedura, concluiu que o processo de liofilização e a manutenção em água destilada são os mais adequados para a preservação das características fenotípicas e genotípicas destes microrganismos. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com o relato deste autor, indicando que o processo de liofilização pode ser utilizado com sucesso também em leveduras não-*Saccharomyces*. No entanto, Voyron et al (2009) e Paoli (2005) relatam modificações morfológicas após a liofilização ou até mesmo inviabilidade do fungo no congelamento que antecede a liofilização, mas que não foi observado na cepa de *H. guilliermondii* em seis meses de preservação.

Para Fuller (2004) o uso de crioprotetores pode ser limitado por efeitos tóxicos particulares ou mesmo pela indução de estresses osmóticos, o que aumenta a possibilidade de alteração do perfil morfológico e/ou genético dos espécimes, além do risco de morte celular, Porém, neste trabalho, utilizando a concentração de 10%

de lactose, manitol e leite em pó desnatado, não houve alteração no perfil das colônias e nos aspectos microscópicos das células.

### 3.3 Capacidade fermentativa em mosto de maçã

Os resultados da capacidade de *H. guilliermondii* fermentar o mosto de maçã estão apresentados na Tabela 1, e evidenciam que ocorreram variações nos resultados de cada crioprotetor nas diferentes etapas do processo de liofilização.

**Tabela 1- Resultados de velocidade máxima de fermentação de *H. guilliermondii* no mosto de maçã nas etapas do processo de liofilização com diferentes crioprotetores.**

Crioprotetores	Etapas do Processo de Liofilização							
	Aumento da biomassa		Congelamento		Liofilização		Conservação (6 meses)	
	V máx (g CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo v máx (dias)	V máx (g CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo v máx (dias)	V máx (g CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo v máx (dias)	V máx (g CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tempo v máx (dias)
<b>Sem</b>								
<b>crioprotetor</b>	6,74	2,29	7,19	2,22	8,77	3,14	0	-
<b>Lactose</b>	-	-	9,77	1,93	8,15	2,27	6,21	4,26
<b>Manitol</b>	-	-	7,36	1,93	5,01	1,34	4,52	4,26
<b>Leite em pó</b>								
<b>desnatado</b>	-	-	9,50	1,93	1,74	1,98	0	-

Fonte: Autoria própria

Na fermentação do mosto de maçã com a cepa *H. guilliermondii*, antes e durante o processo de liofilização, foi determinado como padrão, a velocidade de 6,74 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, em um tempo de 2,29 dias, obtida na fermentação do mosto de maçã antes que a cepa fosse submetida a qualquer etapa da liofilização. A partir deste parâmetro foi verificado que com a adição dos três crioprotetores na etapa de congelamento, houve um aumento da velocidade máxima (variando de 7,19 a 9,77 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e que a mesma foi atingida em um menor espaço de tempo, evidenciando que a adição dos crioprotetores, além de garantir a proteção das leveduras, afetou positivamente o metabolismo da cepa. Não há informação na literatura a respeito da sobrevivência de micro-organismos durante a etapa do congelamento que antecede a

liofilização, em relação à proteção ou não dos crioprotetores nesta etapa, todos os estudos apresentam dados apenas após a etapa de secagem.

Na etapa de liofilização, propriamente dita, foi verificado que somente as cepas sem crioprotetor e protegidas pela lactose, aumentaram sua velocidade máxima, embora somente a da lactose diminuiu o tempo para atingí-la. As fermentações conduzidas com a cepa liofilizada com manitol e leite em pó desnatado apresentaram uma queda na velocidade máxima atingida, e mesmo tendo atingido esta velocidade num menor espaço de tempo, sugerem que o processo de liofilização pode comprometer alguns caminhos metabólicos dos microrganismos.

Com relação à conservação da cepa após 6 meses de liofilização, a lactose e o manitol mostraram um aumento de 186% no tempo para atingir a velocidade máxima, que foi menor 8% (lactose) e 33% (manitol), ao valor considerado padrão, sugerindo que quanto maior o tempo de preservação maior o tempo necessário para que a cepa possa realizar o processo de fermentação, pois conforme já discutido anteriormente, houve redução nas contagens durante o processo de armazenamento. Para Cameotra (2007) trata-se de mutações que resultam em alterações fisiológicas como modificações no aspecto na cor, da cultura, perda da capacidade de esporulação, redução ou perda da patogenicidade, perda da capacidade de sintetizar certas substâncias e outras modificações em geral irreversíveis.

Mariano (2006), em estudo realizado com leveduras, afirma que, embora passível de ser influenciada pelas condições em que são mantidas as cepas, a utilização de açúcares como fonte de carbono não parecem ser instáveis. Porém, neste trabalho, observando os resultados da levedura *H. guilliermondii* com leite em pó desnatado e sem crioprotetor, foi verificado não ter ocorrido fermentação no mosto de maçã, característica fisiológica que deveria ter estabilidade assim como aquela investigada por Mariano (2006).

## 4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o método de conservação por liofilização com a adição de crioprotetores antes do congelamento é adequado à cepa *Hanseniaspora guilliermondii*, garantindo a estabilidade em suas características macro e microscópicas.

Com relação a contagem de *Hanseniaspora guilliermondii* nas diversas etapas da liofilização, foi evidenciada uma perda de 1 a 3 ciclos logarítmicos no congelamento e de 2 e 3 ciclos logarítmicos na liofilização e de até quatro ciclos após 6 meses de conservação, não apresentando diferença estatística significativa sob os diferentes crioprotetores.

Na capacidade fermentativa, usando como parâmetro a velocidade obtida com a cepa sem sofrer nenhum tratamento, foi verificado na etapa do congelamento um aumento da velocidade máxima em menor tempo em todos crioprotetores, mostrando que a adição dos mesmos garante a proteção das cepas. Na etapa de liofilização, as cepas protegidas pela lactose e sem crioprotetor aumentaram sua velocidade de fermentação, mas só a lactose diminuiu o tempo para atingi-la. As cepas com manitol e o leite em pó desnatado apresentaram queda na velocidade máxima, porém em menor espaço de tempo. Após 6 meses de conservação a cepa protegida por lactose e manitol aumentaram seu tempo para atingir a velocidade máxima, que foi menor que o parâmetro considerado, evidenciando uma relação direta entre a contagem e a velocidade de fermentação.

A escassez de trabalhos específicos publicados na área de processos biotecnológicos, mostrando a perda celular da levedura, em todas as etapas do processo de liofilização. Para melhorar essa realidade, estudos futuros poderão ser realizados com crioprotetores e/ou concentrações diferentes, daquelas utilizadas neste trabalho, para garantir a manutenção de leveduras não-*Saccharomyces* sem alterações metabólicas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; BENABARRE, A.; VIÑAS I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent **Candida sake** using different protective and rehydration media. **J Food Prot.** p. 856- 61. 2001.

ABREU, M.M.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde.** V.02 n.02. p. 236-251, 2007.

BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. **Internation Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241- 247. 2000.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J-M.; BAKIR, U. Description of alcoholic fermentation kinetics: is variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture.** n. 41, p. 319- 324, 1990).

BEIRÃO, J.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, M.P. et al. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. **Aquaculture**, v.261, p.897-903, 2006.

CAMEOTRA, S.S Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** p. 849- 850. 2007.

CANHOS, V.P. **Estudos da Diversidade Microbiana: Bactérias, Fungos e Filamentosos e Leveduras do Estado de São Paulo.** Disponível em: <http://www.biota.org.br/inf/historico/workshop/revisoes/micro.pdf>. Acesso em: 02.fev.2004

CANTERI et al., SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CAVALCANTI, S.D. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo. 2010.

COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263- 268, 1991.

COSTA, E.C. **Conservação de amostras de vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós- graduação em Ciências Veterinária. Universidade Estadual do Ceará.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z e SAMSON, R.A. **Fungal Biodiversity**. Netherlands: CBS- KNAW Fungal Biodiversity Center, 2009.

DENNISTON, R. et al. Principles of cryopreservation. In. TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species**. World Aquaculture Society: Baton Rouge. cap.2, p.59-74, 2000.

FULLER, B.L. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, [online], v. 25, n. 6, p. 375- 388, 2004. Disponível em: <http://www.fisicabiologica.com.ar/curso-criopreservacion-de-gametas2009>. Acesso em 26 abril. 2013.

HULÁBEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiol.** v. 46, p. 205- 229. Bem Yourk. 2003.

KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J.S. Maintenance of microorganisms. **A manual of Laboratory Methods**. Academic Press Inc. London. 1984.

MARIANO, P.L. Diferentes **processos de armazenamento de leveduras**; Estudos sobre a variabilidade fenotípica e genotípica. Piracicaba. São Paulo, 2006.

MELIN, P.; SHUNÜRER, J.; HAKANSSON, S. Formulation and stabilisation of the biocontrol yeast *Pichia anamala*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 99, p.107 – 112, 2011. NEVES, P.R.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**. Amsterdam, [online], v.66, n. 2, p.183- 193, aug 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632005>. Acesso em 14 de março de 2012.

OLIVEIRA, C.H. Avaliação das características do espermatozoide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. Dissertação. **Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária**. 2003.

OLIVEIRA, A.C.; PÁDUA, E.A.; SGARBIERI, V.C. Importância da parede celular de leveduras (*Saccharomyces* sp.) como fonte de fibra na alimentação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n. 2, p.233, 200.

PAOLI, P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnostics and research**. FERMS Microbiology, v.29, p.817- 910, 2005.

PIETROWSKI, G. A. M., DOS SANTOS, C. M. E., SAUER, E., WOSIACKI, G., & NOGUEIRA, A. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9815-9821, 2012.

PITOMBO, R.N.M. Liofilização. In: PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, São Paulo: Manole, 2005.

ROBERT, V.; STALPERS, J.; BOEKHOUT, T.; TAN, S. Years biodiversity and culture collection. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. (Eds). **Biodiversity and Ecophysiology of yearsts**. Berlin Heidelberg: Springer – Verlag, 2006.



ROGER, J.M.; SABLAYROLLES, J-M.; STEYER, J.P.; BELLON- MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 79, n. 7, p. 804- 815, 2002.

SILVA, J.O.; COSTA, P.P.; RECHE, S.H.C. Yeasts maintainance for freezing at – 20°C. **RBAC**, v. 40, n. 1, p. 73 – 74, 2008.

SILVA, F.L.; KAMIYA, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; ALTERTHUM, F. Comparison of preservation methods applied to yeasts used for ethanol production in Brazil. **Revista Microbiol.** p. 177- 82. 1992.

SMITH, M.T. *Hanseniasporazikes*. In: KURTZMAN, C.; FELL, J.M. **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Florida: Elsevier Science Publishers, 1998. p. 214- 220.

SOUZU H. Proceedings: the pospholipid degradation and cellular death caused by freeze- thawing of freezer drying of yeast **Cryobiology**. 1973.

VERGNE, M.; TUTUNJI, V. Implantação e Manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**. v. 2, n. 2, p. 236- 251. 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetato in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 135, p. 68- 74, 2009.

VOYRON, S.; ROUSSEL, S.; MANAUT, F.; VARES, G.C.; GINEPRO, M.; DECLERCK, S.; FILIPELLO MARCHISTO, V. **Vitality and genetic fidelity of white-rot fungi mycelia folloing different methods of preservation**. Mycology Research, v. 113, p. 1027- 1038, 2009.

XU, Y.; ZHAO, G.A.; WANG, L.P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China. V. 33, p.192- 196. 2006.