

# ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR E OBTENÇÃO DE DE FUNGOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS

**GABOARDI, Giana<sup>1</sup>; SANTOS, Diego Gil<sup>1,2</sup>; FERNANDES, Luiza<sup>1</sup>;**

**CONCEIÇÃO, Abri Rochado<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Biotecnologia

<sup>2</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas  
giana\_gaboardi@hotmail.com

## 1 INTRODUÇÃO

A extraordinária expansão da indústria de biodiesel gerando grandes volumes de glicerol como subproduto, correspondendo a aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido. Estudos têm sido direcionados para a conversão deste subproduto em matéria agregada (Chatzifragou et al., 2011); na produção recombinantes (*Celik et al., 2008*) e *Cryptococcus curvatus* a serem usados na indústria de combustíveis (Liang e outros, 2008).

A levedura *Pichia pastoris* tem a capacidade de produzir altas concentrações de células quando dispostas de glicerol e metano, metabolizando-o rapidamente (Higging e Cregg, 1998). Storch et al. (2008) com a levedura *P. pastoris* apresenta propriedades probióticas, o que permite a possibilidade da mesma vir a ser utilizada de forma vantajosa, em associação a outros probióticos já utilizados (Mattila-Sandholm et al. (2003) preconizam que a levedura necessita de células viáveis  $10^7$  unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL<sup>-1</sup> para exercer efeito probiótico. Segundo Schneid et al. (2004), a *P. pastoris* pode ser cultivada em efluente de arroz parboilizado para obtenção de probióticos.

O processo de parboilização do arroz gera, a cada quilo de arroz processado, 4 L de efluente, que contém altas cargas de nutrientes como nitrogênio e fósforo (Faria et al., 2006). Estes nutrientes podem ser aproveitados na obtenção de proteína para a produção de alimentos ambientais (Queiroz e Koetz, 1997).

O objetivo deste experimento foi avaliar a produção de biomassa e a viabilidade celular de *P. pastoris* cultivada em efluente resultante do processo industrial de parboilização de arroz acrescido de glicerol (subproduto da indústria de biodiesel).

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados efluentes de arroz parboilizado coletados em 5 dias consecutivos de uma indústria beneficiadora em Pelotas/RS, como meio de cultivo. As amostras foram misturadas, autoclavadas e

maridas sob refrigeração. Análises a efetuadas com uma alíquota previamente acidificada. O crescimento utilizado nas duas fases de uma indústria gaúcha de produção de soja. Cinco cepas de *P. pastoris* cepa X-33 (Invitrogen, USA) isoladas em Yeast Medium foram cultivadas em Yeast Medium (YM, Difco, USA), em agitador orbital, por 12 horas a 28°C e 150 rpm para inoculação e obtenção da quantidade de inóculo para a fermentação (0,100 mL de inóculo produzidos foram divididos, utilizando-se 20 mL para inoculação de 1000 mL contendo 180 mL de YM).

As duas fermentações ocorreram em fermentador New Brunswick 110 (New Brunswick Scientific, NJ, USA), autoclavando-se por 45 minutos a 121°C o efluente de arroz parboilizado acrescido de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Para a fermentação utilizaram-se 7 L de meio, com 10% em volume de inóculo. O pH foi ajustado a 5,5 com NaOH 1M e o cultivo ocorreu a 28°C, 250 rpm e 1 vvm de ar durante 96 horas.

Amostras com 10 mL foram coletadas, em triplicata, às 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 54, 72, 77 e 96 horas de cultivo. Para cada coleta, 1 mL foi reservado para determinar a viabilidade celular para contagem em meio sólido das unidades formadoras de colônias em placas de YMA. As amostras foram centrifugadas a 1800 g por 10 min. Os pellets foram lavados duas vezes e posteriormente ressuspendidos a 10 mL de água e a biomassa seca por densidade óptica a 600 nm (D<sub>600</sub>) com espectrofotômetro visível (Hitachi, U-1800). Previamente construiu-se uma curva de calibração determinando-se a biomassa seca de uma amostra e realizando-se diluições sucessivas nas quais se determinou a D<sub>600</sub>. A produtividade celular e a taxa máxima de crescimento estimadas segundo Schimidell et al. (2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo da levedura *P. pastoris* s 48 horas produziu em média 11,7 g de biomassa, aumentando 11,7 vezes o seu valor inicial. A maior produção de biomassa foi às 16 horas, sendo de 12 g L<sup>-1</sup>. No cultivo da alga *Aphanothece microscopi* ca por 15 horas Zepka et al. (2008) obtiveram 0,47 g L<sup>-1</sup> de biomassa usando o mesmo efluente como meio. Em nosso experimento, essa diferença de biomassa entre 4 e 8 horas de cultivo, sendo que às 15 horas a biomassa era de aproximadamente 2,86 g L<sup>-1</sup>, valor aproximadamente seis vezes superior ao obtido no cultivo da alga.

A correlação entre a curva de biomassa<sup>-1</sup> foi de 98%, corroborando os resultados obtidos. Analisando a viabilidade celular na Fig. 1, nota-se que a fase está em início e em crescimento, obtendo-se 2,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> nas duas fermentações, ultrapassando 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (Stanton et al., 2001), possibilitando testes *in vivo* posteriores para determinar a produção de etanol. Este valor é semelhante aos obtidos em nossos laboratório no cultivo de *S. cerevisiae* em meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) como meio, sendo este um meio de alto custo. A taxa máxima de crescimento (0,10 h<sup>-1</sup>) ocorreu às 10 h de cultivo, demonstrando que *P. pastoris* foi mais eficiente na produção de biomassa que *Aphanothece microscopi* ca de 10,14 h<sup>-1</sup> (Zepka et al., 2008).

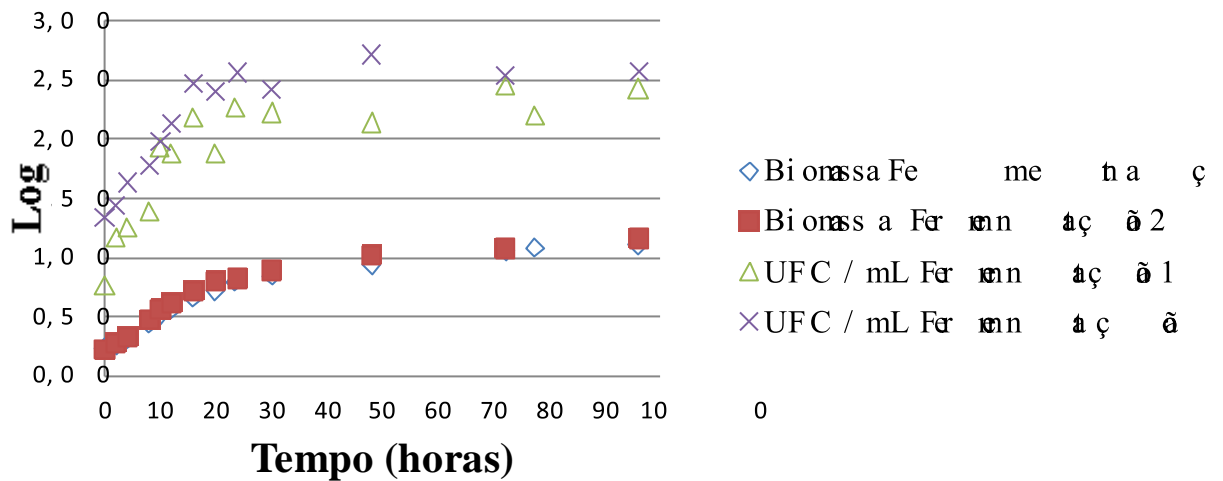


Figura 1. Biomassa e UFC mL<sup>-1</sup> em função do tempo de fermentação de *Pichia pastoris* X-33 obtida em duas fermentações em efluente de arroz para biodiesel.

A média das produtividades de biomassa foi de 0,21 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> obtida entre 20 e 24 horas nas duas fermentações. Este resultado é superior ao resultado de 0,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> obtido por Queiroz et al. (2007), no cultivo de *Aphanot hece rincr* os o perní etuente de arroz parboilizado.

#### 4 CONCLUSÃO

O efluente da indústria de arroz parboilizado contendo 12 g L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto da indústria pode ser utilizado para a cultura de *P. pastoris* X-33. O cultivo da levedura produziu 12 g L<sup>-1</sup> de biomassa em 96 horas e gerou uma viabilidade celular de 2,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 5 REFERÊNCIAS

CHATZIFRAGKOU et al. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, v.36, 1097-1108, 2011.

ÇELİK E.; OZBAĞ N.; OKAÇAL, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 47, nº 9, 2990-2998, 2008.

FARIAS O.L.V.; KOEHLER, P.R.; SANTOS, M.S.; JUNIOR, W. Efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica em *Aspergillus niger*. *Rev. Bras. Eng. e Tecnol.* A Campinas, v.26, nº 2, 309-317. 2006.

HIGGINGS, D.R., CREGG, M. *Methods in molecular Biology – Pichia Protocols*. Human Press Inc, USA, 1998.

LIANG, Y.; CUI, Y.; TRUSHENSKI, J.; BLACKBURN, J.W. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, v.101, 7581–7586, 2010.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDE N R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*. v.2, 173–182, 2002.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia industrial*, v.2 – Engenharia Bioquímica, p. 105, Ed. Blucher, São Paulo, S. P. Brasil, 2001.

SCHNEID, A. S.; GIL DE LOS SANTOS, J. R.; ELIAS, M. C.; STORCH, O. B.; CRUZ, F. W.; GIL-TURNES, C. Wastewater Of Rice Parboiling Process As Substrate For Probiotics. In: 2nd International Probiotic Conference, Kosice, Slovakia, Anais. p. 66, 2004.

STANTON, C.; GARDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P.B.; ROSS, R.P. Market potencial for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v.73, 476 - 483, 2001.

STORCH, O.B., CONCEIÇÃO, F., GIL DE LOS SANTOS, J.R.; GIL TURNES, C. *Pichia pastoris* increased humoral response and feed efficiency in broilers. In: International Probiotic Conference, Kocise. International Probiotic Conference - Conference Proceedings, 2008.

QUEIROZ, M.I.; KÖZ, P.R. Caracterização da influência  
*Rev. Bras. de Agricultura*, v.3, nº3, 139-143, Set.-Dez., 1997.

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, I.Q.; BASTOS, R.G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*, v.98, 2163–2169, 2007.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica nageli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*, v.47, 1305–1310, 2008.