

CI NÉT CA DE RED UÇÃO DE DQ -NTK POR *Pichia Pastoris* X-33 EM EFLUENTES DO ARROZ PARBOILIZADO

FERNANDES, Luiza¹; SANTOS, Diego Gil^{1,2}; GABOARDI, Giana¹; CONCEIÇÃO, Fabí Rochado¹

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia / U

²Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas

E-mail: diegogil@pelotas.ifsul.edu.br

1 I N T R O D UÇÃO

A cada quilômetro de arroz parboilizado são geradas toneladas de efluentes com altas concentrações de compostos orgânicos e nutrientes. Estudos relatam que esse efluente pode ser utilizado como fonte de nutrientes para produção de proteína unicelular e também como no cultivo das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris* (Schneid et al., 2004). Paralelamente, o Brasil produz cerca de 10% de biodiesel em 2010, sendo 10% desse volume de glicerol obtido como subproduto, para o qual se necessitam alternativas de uso.

Pichia pastoris é uma levedura utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas que apresenta propriedades probióticas (Sbr 2008). O cultivo de leveduras tem se mostrado como um eficiente meio de redução da DQ e N-NTK, amenizando o impacto ambiental de efluentes e, ao mesmo tempo, gerando biomassa ou proteína unicelular (Lacero et al., 2007). Santos et al. (2011) demonstraram que a *P. pastoris* pode ser cultivada em efluentes de arroz parboilizado obtendo os melhores resultados na redução do DQ e N-NTK do efluente quando adicionou-se 15 g.L⁻¹ de glicerol de biodiesel em cultivos efetuados em agitador orbital.

Neste trabalho avalia-se a redução de DQ e N-NTK pelo cultivo de *P. pastoris* em biorreator no efluente de arroz parboilizado adicionado de glicerol de biodiesel.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Em cinco dias consecutivos coletou-se efluente da saída de uma indústria de arroz parboilizado na cidade de Pelotas. Os efluentes foram misturados. Alíquotas foram separadas e acidificadas com ácido sulfúrico a pH < 2,0 para posterior análise dos parâmetros ambientais estudados.

Duas fermentações foram realizadas e, a cada uma, pré-inóculos foram cultivados em meio YM (Yeast Medium, Difco, USA). Utilizou-se agitador orbital a 150 rpm e 28°C, durante 24 horas. No início do cultivo de cinco células de *P. pastoris* cepa X-33 (Invitrogen, USA) em 11 mL de meio. Dessa suspensão, 10 mL foram retirados e a cultura foi dividida em duas partes de 1000 mL, contendo 180 mL

de meio, inoculando-se 20 mL em cada baço. Ao final, o total p de 800 mL de in culo á ser utilizado na fermen taç ão.

Nas duas fermentações foi utilizado co m m e i o arroz parboilizado suplementado com glicerol de biodiesel autoclavado a 121°C po r 45 minutos, sendo o pH ajustado em 5,5 com NaOH 1 M. Foram adicionados ao meio 2 mL de antiespumante Agripec EA 263, diluíd o 1 em 5. O volume total fo i de 7L, sendo 10 % i ó utilizado-se fermentador New Brusnick 110 (N.B.S., NJ, USA), nas seguintes s on 250 rpm, 1 vvm de ar e 28°C. O p r o c e s s o foi realizado ap ós 96 ho r a s.

Amostras com 10 mL, em triplicata, foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 77 e 96 horas e centrifugadas a 1800 g por 10 min. Nos sobrenadantes determinou-se, seguindo mé o d o *Standard Methods* (APHA et al., 1998), a de manda quí m i c a de oxigênio (D Q) por nitrogênio o *Kjeldahl* (N-NTK). Após duas lav age m á g u a de s i l a d a determinou-se nos *pellets* a biomassa p e a m e d i d a d e s i d e ó a 600 n m p (DO₆₀₀), em triplicata, utilizando es p e t r ó t e t r o U V v i s í v e l -1800. H Previamente construiu-se uma curvade al i b r d e t e r m i n a n d o - s e a biomassa seca de uma amostra e realizando-sedi l i ç õ e s s u c e s s í v a s a s e d e t e r m i n o u a DO₆₀₀. O t e m p o de g e r a ç ã o f o i a c u l d o s e g e t a l. (2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 são m o s t r a d o s os valores de biomassa obtidos nas duas fermentações. A fase estacionária foi alc an ç a d a e m de cultivo. Os tempos de g e r a ç ã o f o r a m de 5,01 e na f e r m e n t a ç ã o 1 respectivamente, ambos i n f e r i o r e s h e r e l a t a d o s p o r Zepka et al. (2008), o que sugere maior capacidade de assimilação de n ú t r i e n t e s p r e s e n t e s.

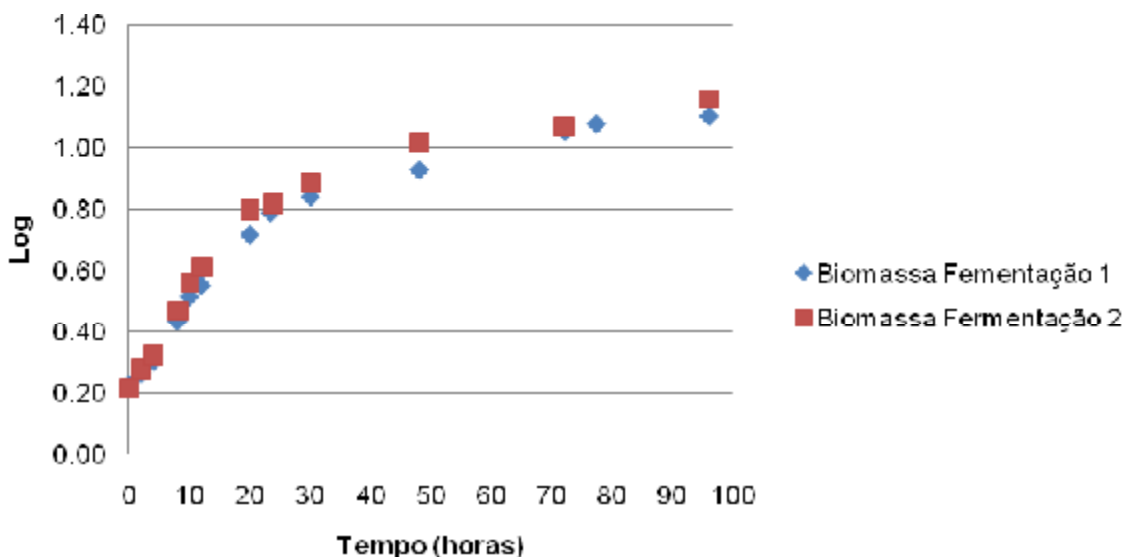


Figura 1 – Logaritmo da diferença de b i o m a s s a *Pichia pastoris*-X33 obtida durante duas fermentações em fl u e n t e de i n d ú s t r i a de a r r o z p a b o i l i z a d o e m f u n ç ã o de t e m p o de c u l t i v o.

Na figura 2 pode-se observar a reduç ã o p e r e n N - N T K e t D Q O ao longo do tempo de cultivo. Comparando-se as duas figuras (1 e 2), nota-se que a taxa percentual de r e m o v i m e n t o de n ú t r i e n t e s m i n u i u ap ó s o i n í c i o da f a s e e s t a c i o n á r i a.

(após 20 h), quando o metabolismo da levedura é reduzido consequentemente, diminui a velocidade de assimilação dos nutrientes presentes no meio. O máximo de remoção de N-NTK foi de 81,6%, às 54 horas de cultivo, semelhante a um reator UASB (83%) com o mesmo tipo de efluente (Isoldi et al., 2005) e superando o nível mínimo de remoção exigido pela FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental, RS) à indústria da queroseno, obtido nestes dados demonstram o potencial desta levedura na remoção de nitrogênio total.

A adição de glicerol como fonte complementar de carbono, elevou os valores médios iniciais de DBO₅ determinado nos efluentes brutos, para 19937 mg.L⁻¹, nos meios suplementados. Desta maneira, a remoção média de DQO (51,8%) em 72 horas foi inferior à alcançada no cultivo com *Candida utilis* (87,4%), nesse mesmo período, porém em efluente de arroz parboilizado previamente tratado num UASB (Rodrigues e Koetz, 1996).

Ao final de 48 horas de cultivo da levedura, obteve-se bons resultados de remoção de DQO detectada de 12078 mg.L⁻¹, valor superior ao encontrado normalmente em efluentes de arroz parboilizado (Queiroz e Koetz, 1997), porém facilmente tratado usando-se um reator UASB posteriormente (Ramirez-Pereira et al., 2004).

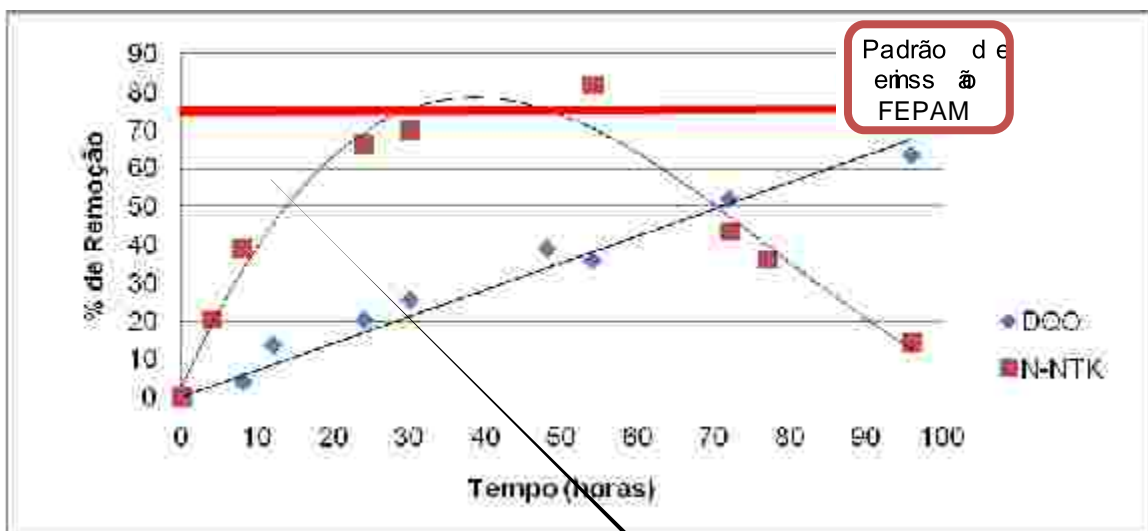


Figura 2 – Eficiência (%) de remoção de N-NTK em função do tempo. A linha vermelha salienta o nível de 75% exigido pela FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental, RS) à indústria da queroseno, obtido nestes dados demonstram o potencial desta levedura na remoção de nitrogênio total.

4 CONCLUSÃO

O cultivo da levedura *P. pastoris* X-33 em efluente de arroz parboilizado adicionado de glicerol residual da indústria, em 48 h, 7,8 g.L⁻¹ de biomassa que poderá ser utilizada como inóculo em processos de nitrificação, com valores que superam o solicitado pela FEPAM (≈80%). No entanto, deverá ser associado a um tratamento, buscando reduzir o nível de DQO remanescentes.

5 REFERÊNCIAS

APHA, (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed., American Public Health Association, DC.

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

ISOLDI, L.A.; KOETZ, P.R., 2005. Post-treatment a nitrified parboiled rice wastewater using denitrification in UASB reactor, **Engenharia Sanitaria Ambiental**, Vd.10 , N ° 4 -dez, 271-277.

QUEIROZ, M.; KOETZ, P.R., 1997. Caracterização de efluente da p arroz, **Rev Brasileira de Agri** v.3, n.3,139-143.

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

RAMIREZ-PEREIRA, O.; QUADRO, M.; ANTUNES, R.M.; KOETZ, P.R., 2004. Influência da recirculação e da diluição no de s e tratamento de efluente de suinocultura, **Rev. Brasileira de Agri** v. 10, n. 1 p. 103-110.

RODRIGUES, R.; KOETZ, P., 1996, Produção de nitrogênio e de e triaf de arroz parboilizado por incorporação em *Candida utilis*-1840. **Rev Bas de A gr** v.2, n.1, 146-151

SANTOS, D.G.; GIL TURNES, C.; DIAS, D. C; SÁ, P. S.; BOROZA, CONCEIÇÃO, 2011, Influência em Parâmetros Ambientais do Cultivo da Levedura *Pichia pastoris* X33 em Efluentes da Indústria Ar, Anais do XVII Simpósio Nacional de Biorrecursos, XVII Simpósio Nacional de Biorrecursos 2011

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., 2001, **Biotecnologia industrial, volume 2 – Engenharia Biotecnológica**, Ed. Blucher, Paulo, S.P., Brasil.

SCHNEIDER, S.; GIL DE LOS SANTOS, J. R.M.; GIL-TURNES, C., 2004, Wastewater of rice parboiling process as substrate for probiotics. In: 2nd International Probiotic Conference, Kosice, Eslovaquia. 2ND INTERNATIONAL PROBIOTIC CONFERENCE., p. 66.

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

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