

## AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Pichia pastoris* CEPA KM EM EFLUENTE INDUSTRIAL SUPLEMENTADO COM GLICEROL DE BIODIESEL

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

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia/UFPel

<sup>2</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas  
luiza.fernandess@hotmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

O termo probiótico é aplicado para micro-organismos viáveis que, utilizados como suplemento alimentar, provocam efeitos benéficos na saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal (Kaur et al, 2001). Muitos micro-organismos já demonstraram apresentar propriedades probióticas em animais, dentre os quais, *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* (Zani et al., 1998; Gil de los Santos et al., 2005; Conceição et al., 2000; Coppola et al., 2005). Em estudos recentes, Gil de los Santos e colaboradores (2012) mostraram que a levedura *Pichia pastoris* cepa KM auxilia no ganho de peso de frangos de corte podendo, então, ser considerada um probiótico.

O efluente de arroz parboilizado suplementado com glicerol subproduto de biodiesel pode ser utilizado como meio alternativo para o cultivo da levedura *P. pastoris* cepa X33, sendo os melhores resultados obtidos com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (Santos et al, 2012). O cultivo de *P. pastoris* X33 nesse meio promove redução nos níveis de DQO, N-NTK e fósforo, amenizando o impacto associado ao descarte destes resíduos no ambiente (Fernandes et al., 2011; Gaboardi et al., 2011a; Santos et al., 2012;). Além disso, o cultivo em fermentador, utilizando esse meio, pode gerar biomassa de 12 g.L<sup>-1</sup> com viabilidade celular média de 2,7 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Gaboardi et al., 2011b), ultrapassando o valor de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> fornecidos a frangos de corte, no experimento de Gil de los Santos e colaboradores (2012).

Este trabalho teve como objetivo analisar o cultivo da levedura *P. pastoris* cepa KM em efluente dos tanques de maceração de arroz parboilizado suplementado ou não de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto da indústria de biodiesel, visando a produção de probiótico para uso animal em meios alternativos de baixo custo.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Pré-inóculo e inóculo de *P. pastoris* KM foram preparados em meio YM. O pré-inóculo partiu de cinco colônias de *P. pastoris* em 10 mL de meio. A partir disso foram produzidos 50 mL de inóculo usando-se 5 mL de pré inóculo. As condições de cultivo em agitador orbital foram 150 rpm a 28°C, por 12 h.

O crescimento da *P. pastoris* cepa KM foi avaliado em: a) efluente dos tanques de parboilização de arroz parboilizado (KM EFL), b) efluente dos tanques de parboilização de arroz adicionando-se 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel (KM EF+ GLI) e YM (Yeast Medium, Difco, USA) (KM YM). Para isso, adicionou-se 13 mL do inóculo a 117 mL de cada meio, colocados em três balões aletados de 500 mL.

O cultivo foi efetuado em triplicata num agitador orbital a 150 rpm, 28°C por 48 h. Coletas de amostras foram realizadas nos tempos 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 32 h e 48 h. A curva de crescimento foi construída com base na viabilidade celular, determinada por diluições seriadas, estimando-se as unidades formadoras de colônia (UFC.mL<sup>-1</sup>) em meio sólido YM. A produção de biomassa foi estimada por densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm (DO<sub>600</sub>) usando-se a expressão de biomassa (g/L) = ((0.0027\*DO<sub>600nm</sub>)-0.0002)\*1000.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três cultivos iniciaram a fase estacionária em torno de 24 h, alcançando uma viabilidade celular semelhante de aproximadamente 2,0 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Fig. 1). A viabilidade celular obtida é superior a 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, usado por Gil de los Santos et al. (2012) no experimento em que verificou-se a ação probiótica da *P. pastoris* KM. Esses resultados corroboram os obtidos em estudos anteriores com *P. pastoris* cepa X33, cultivada em efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel, a qual atingiu viabilidade aproximada de 2,7 x 10<sup>8</sup>, em 20 h de cultivo (Fernandes et al., 2011), porém sugerem que a adição de glicerol de biodiesel não trouxe um acréscimo na viabilidade celular e que esta levedura possui capacidade de assimilar os nutrientes existentes no efluente dos tanques de parboilização obtendo viabilidade semelhante à obtida no meio padrão YM, fato este não comunicado até o presente momento.

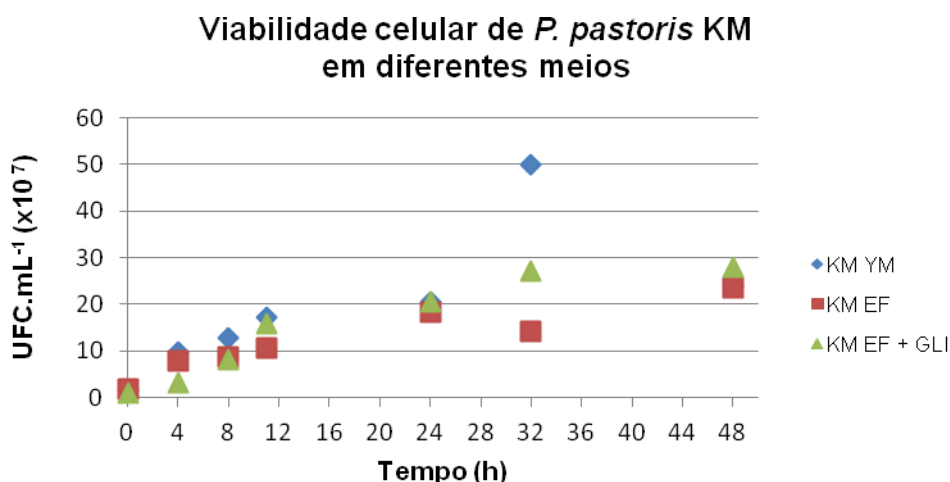


Figura 1 – Viabilidade celular média de três cultivos de *P. pastoris* cepa KM em: meio padrão YM (KM YM); efluente de arroz parboilizado (KM EFL) e efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel (KM EFL + Gli).

A produção de biomassa celular (Fig. 2) em efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel alcançou em 32 h em torno de 1,6 g.L<sup>-1</sup> de produção de biomassa, aumentando 7,5 vezes o seu valor inicial. O cultivo em meio YM atingiu esse valor mais rapidamente (12h), provavelmente pela maior disponibilidade e o tipo de nutrientes. Estes valores são semelhantes às 2,0 g.L<sup>-1</sup> relatados no cultivo de *P. pastoris* cepa X33 (Santos et al., 2012) e inferiores aos 12 g.L<sup>-1</sup> obtidos no cultivo em fermentador no mesmo tipo de efluente também suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel (Gaboardi et al., 2011). A biomassa atingida pelo cultivo

em efluente com glicerol de biodiesel foi, em 24 h, duas vezes maior que a obtida em efluente puro.

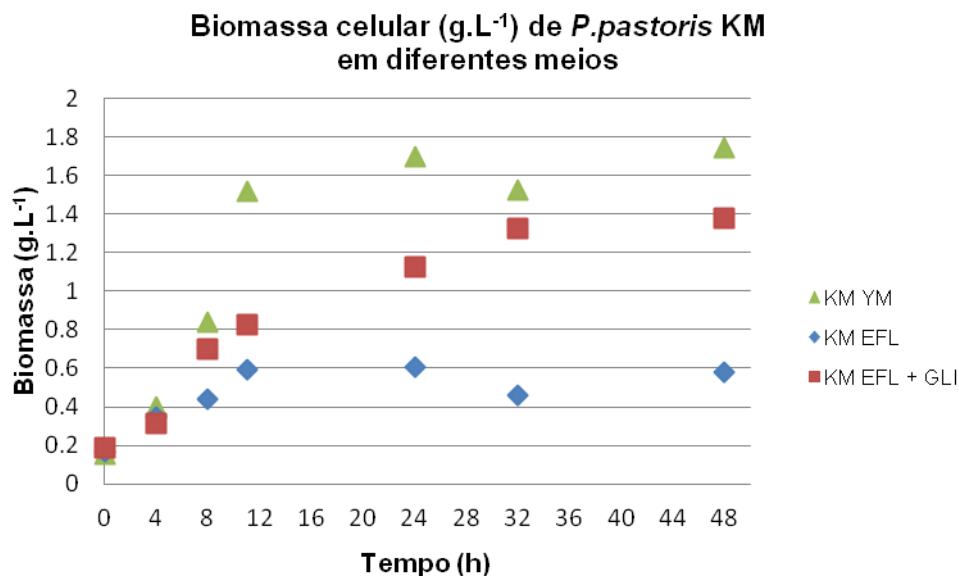


Figura 2 – Biomassa celular média de três cultivos de *P. pastoris* cepa KM em: meio padrão YM (KM YM); efluente de arroz parboilizado (KM EFL) e efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel (KM EFL + Gli).

#### 4 CONCLUSÃO

A levedura *P. pastoris* cepa KM pode ser cultivada em efluente dos tanques de parboilização de arroz obtendo uma viabilidade celular de  $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo e aproximadamente 1,2 g.L<sup>-1</sup> de biomassa quando suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel.

#### 5 REFERÊNCIAS

CONCEIÇÃO, F.R., ZANI, J.L., GIL-TURNES, C. Effect of the probiotic CenBiot on the humoral response to an *Escherichia coli* bacterin. **Food Agric. Immunol.** V.14, 135-140. 2000.

COPPOLA, M.M., CONCEIÇÃO, F.R., GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food Agric. Immunol.** V.16, 213-219. 2005.

FERNANDES, L.; SANTOS, D.G.; GABOARDI, G.; CONCEIÇÃO, F.R. Remoção de DQO e N-NTK por *Pichia pastoris* X33 em efluentes do arroz parboilizado adicionado de glicerol de biodiesel. In: **V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada.** Porto Alegre, RS, 2011.

GABOARDI, G.; SANTOS, D.G.; FERNANDES, L.; CONCEIÇÃO, F.R. Estudo da viabilidade celular e obtenção de biomassa de fungos em efluentes industriais. In: **XXI CIC UFPeL**. Pelotas, RS, 8 a 11 de novembro. 2011.

GABOARDI, G.; SANTOS, D.G.; FERNANDES, L.; CONCEIÇÃO, F.R. Avaliação da remoção de fósforo pelo cultivo de *Pichia pastoris* X-33 em efluentes de arroz parboilizado. In: **V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada**. Porto Alegre, RS, 2011.

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; STORCH, O.B.; FERNANDES, C.G.; TURNES, C.G. Evaluation in broilers of the probiótico properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**. v.156, 448-451. 2012.

GIL DE LOS SANTOS, J.R., STORCH, O.B., GIL-TURNES, C. *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **Br. Poult. Sci.** v.46, 494-497. 2005.

KAUR, I.P.; KANWALJIT, C.; AMARPREET, S. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V.15, 1–9. 2002.

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

SANTOS, D.G.; TURNES, C.G.; CONCEIÇÃO, F.R. Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. **The Scientific World Journal**; artigo em impressão aceito em 12/04/2012. Disponível em <<http://www.tswj.com/aip/492925.pdf>>, acesso em 30/06/2012.

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.

ZANI, J.L., CRUZ, F.W., SANTOS, A.F., GIL-TURNES, C. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhea and feed efficiency in pigs. **J. Appl.Microbiol.** v.84, 68-71. 1998.