

## AVALIAÇÃO DE MEIOS ALTERNATIVOS PARA O CULTIVO DA LEVEDURA *Pichia pastoris* X33

**GABOARDI, Giana Carla**<sup>1</sup>; **SANTOS, Diego Gil**<sup>1,2</sup>; **FERNANDES, Luiza**<sup>1</sup>  
**CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo**<sup>1</sup>; **MOREIRA, Angela Nunes**<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia/UFPeL;

<sup>2</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas;

<sup>3</sup>Faculdade de Nutrição/ UFPeL;

giana\_gaboardi@hotmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

A cada 1 kg de arroz processado na parboilização, são gerados em torno de 2 L de efluente, o qual contém alto nível de substâncias orgânicas e nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo (Faria et al., 2006). Paralelamente a isso, só no Brasil foram produzidos cerca de 200.000m<sup>3</sup>/mês de biodiesel em 2010, sendo 10% desse volume correspondente ao glicerol, obtido como subproduto, para o qual se necessitam alternativas de uso. Estudos têm sido direcionados para a conversão deste substrato em materiais de maior valor agregado (Chatzifragkou et al., 2011).

A levedura *Pichia pastoris* cepa X33 cresce em efluente de arroz parboilizado suplementado com glicerol p.a. ou glicerol subproduto do biodiesel, obtendo-se biomassa associada à redução de parâmetros físico-químicos do efluente, sendo os melhores resultados alcançados com a adição de glicerol de biodiesel numa concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> (Santos et al, 2012). O cultivo dessa levedura em fermentador 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., 2011). Além disso, os níveis de remoção de nitrogênio e fósforo do efluente, neste processo, superam o mínimo exigido pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental para cada um dos parâmetros (Fernandes et al., 2011).

*P. pastoris* é amplamente utilizada na expressão de proteínas heterólogas, utilizando glicerol como fonte de carbono (Higgins e Cregg, 1998). Além disso, Gil de los Santos et al. (2012) demonstraram, em frangos, que *P. pastoris* KM possui propriedades probióticas, podendo ser empregada na produção animal.

Higgins e Cregg (1998) propõem um meio de sais basais associados a micronutrientes e glicerol para o cultivo da levedura *P. pastoris*, onde se consegue obter 75-100 g de biomassa seca.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a contribuição da adição de sais basais ao cultivo em efluente e em efluente suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> glicerol de biodiesel, a partir da adaptação do meio descrito por Higgins e Cregg, para a produção de *P. pastoris*.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

#### 2.1 Preparo de meios

Nesse experimento, foram comparados, em duplicata, seis diferentes tipos de meios alternativos (Tab. 1) para o cultivo de *P. pastoris* cepa X33. Para isso, foram utilizados sete balões aletados de 100 mL, contendo: 1) apenas efluente de arroz parboilizado; 2) efluente adicionado de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel; 3) eflu-

ente adicionado de glicerol de biodiesel (15 g.L<sup>-1</sup>) e solução de sais; 4) efluente adicionado da solução de sais 5) Solução de sais dissolvida apenas em água destilada, com adição de 15 g.L<sup>-1</sup> glicerol de biodiesel; e 6) Solução de sais dissolvida apenas em água destilada, com adição de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol p.a. O volume total de meio de cultura em cada balão foi de 21 mL. O sétimo balão continha 21 mL de meio comercial YM (Yeast Medium, Difco, USA), que serviu como controle. O efluente foi coletado dos tanques de maceração de uma indústria localizada em Pelotas (RS), autoclavado e mantido sob refrigeração a 4 °C até seu uso. O glicerol de biodiesel utilizado, obtido a partir do processamento da soja, é proveniente de uma indústria da cidade de Rosário do Sul (RS).

Os meios contendo sais foram adaptados de Higgins e Cregg (1998), conforme mostrado na Tabela 1, porém sem a adição de micronutrientes à solução. Os meios foram autoclavados por 20 min a 121°C. O pH de cada meio foi ajustado de maneira estéril com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) para aproximadamente 5,5.

Tabela 1. Composição dos seis tipos de meios alternativos avaliados para o cultivo de *P. pastoris* X33.

Meios	Efluente (mL)	Glicerol (mL)	Solução de sais					H <sub>2</sub> O destilada (mL)
			85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mL)	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (g)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O (g)	KOH (g)	
1- Efluente	21	0	0	0	0	0	0	0
2- Efluente + Glicerol de Biodiesel	20,704	0,296	0	0	0	0	0	0
3- Efluente + Glicerol de Biodiesel + sol. de sais	20,02192	0,296	0,28035	0,00966	0,1911	0,1575	0,04347	0
4- Efluente + sol. de sais	20,31792	0	0,28035	0,00966	0,1911	0,1575	0,04347	0
5- Glicerol de Biodiesel + sol. de sais em H <sub>2</sub> O	0	0,296	0,28035	0,00966	0,1911	0,1575	0,04347	20,704
6- Glicerol p.a.+ sol. de sais em H <sub>2</sub> O	0	0,242	0,28035	0,00966	0,1911	0,1575	0,04347	20,704

## 2.2 Cultivo da levedura

Em meio YM produziu-se o pré-inóculo, partindo-se de cinco colônias de *P. pastoris* em 10 mL de meio, e sendo mantida a proporção de 10% do volume total. A partir disso foram produzidos 50 mL de um inóculo único a ser distribuído para todos os balões. As condições de cultivo foram de 150 rpm a 28°C, por 12 h. Cada balão foi, então, inoculado com 2,1 mL dessa suspensão. Os cultivos foram feitos simultaneamente em um único shaker orbital, a 150 rpm e 28°C.

## 2.3 Análise da viabilidade celular

A curva de crescimento foi construída a partir de coletas de amostras nos tempos 0 h, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h. As amostras foram utilizadas para análise de viabilidade celular ao longo do tempo, através da contagem em meio sólido de unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>), em placas de YM Ágar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fase estacionária foi alcançada em torno de 24 h de cultivo (Fig. 1). Os melhores resultados foram obtidos nos cultivos em efluente suplementado com glicerol de biodiesel e no meio adaptado de alta produção, constituído de sais dissolvidos em água destilada com adição de glicerol p.a. Essas duas curvas de crescimento tiveram comportamento semelhante, com um rendimento máximo de aproximadamente  $4 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Tal comportamento já havia sido observado anteriormente (Gaboardi et al., 2011), em cultivos feitos em fermentador, onde a fase estacionária iniciou em aproximadamente 20 h, obtendo-se em média  $2,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> nas duas fermentações. Segundo Thompson (2006), o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio que podem ser assimilados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos, explicando o melhor desempenho quando este é adicionado ao meio.

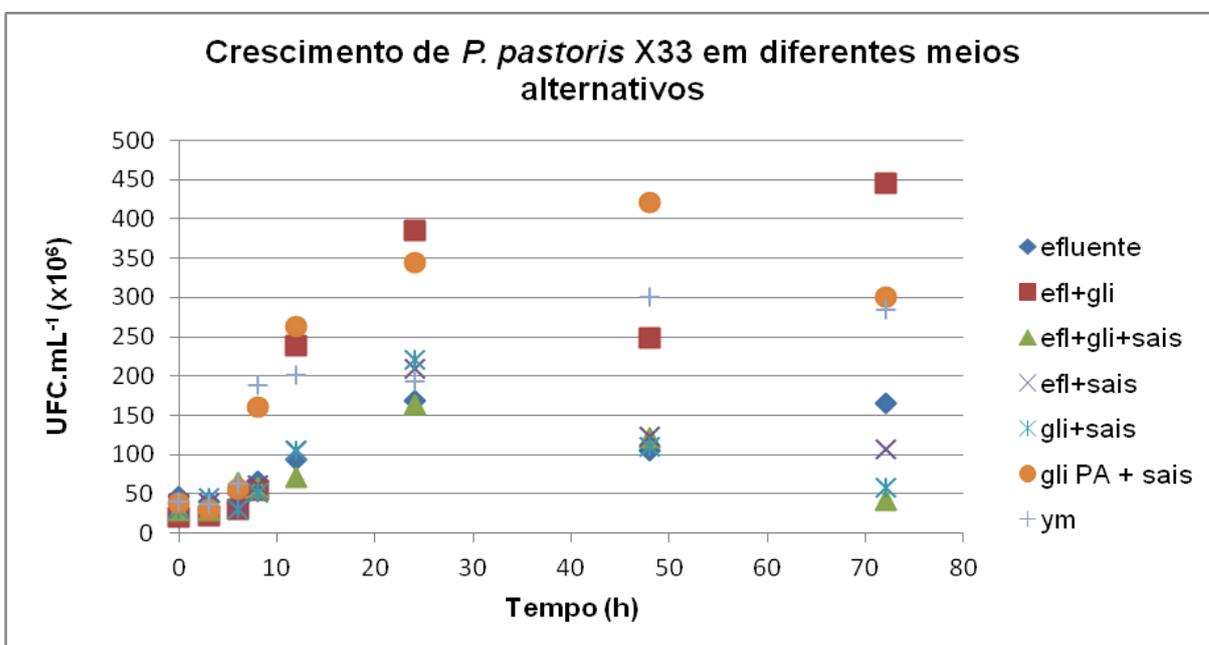


Figura1. Valor médio de crescimento (UFC.mL<sup>-1</sup>) de dois cultivos de *P. pastoris* X33 em diferentes meios alternativos e em meio comercial padrão, utilizado como controle. efl = efluente; gli = glicerol; gli PA = glicerol p.a.; ym = Yeast Medium, meio padrão de cultivo de leveduras.

A adição da solução de sais não contribuiu para o crescimento da *P. pastoris* X33 em efluente, observando-se um comportamento similar nos cultivos efetuados em efluente puro, em efluente com solução de sais e na combinação de efluente suplementado com glicerol de biodiesel e solução de sais. A substituição do glicerol p.a. pelo glicerol de biodiesel nos meios sem efluente também resultou em rendimento semelhante. Apesar disso, o comportamento nesses quatro meios foi semelhante ao apresentado pelo cultivo em meio comercial padrão, YM. A viabilidade celular máxima atingida por esses cinco meios ficou em torno de  $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em 24 h de cultivo, sendo a metade do resultado obtido com efluente adicionado de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol de biodiesel no mesmo período.

O fato da adição de sais ao meio contendo efluente e glicerol de biodiesel não ter contribuído para o crescimento celular pode estar relacionado ao uso exclusivo do efluente como fonte de fósforo e carbono pela levedura, e a não utilização do

ácido fosfórico presente na solução de sais, o que poderia diminuir drasticamente o pH do meio até um nível impróprio para o cultivo celular. Outra hipótese para não haver obtido melhoras com a adição de sais, é que o glicerol bruto tenha interagido com os sais, tornando-o indisponível para assimilação pelo micro-organismo.

#### 4 CONCLUSÃO

A adição de sais não contribuiu positivamente para o cultivo de *P. pastoris* X33 em efluente de arroz parboilizado, nas diferentes composições testadas nesse estudo. O meio composto por efluente adicionado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto, oriundo da indústria de biodiesel, foi o que possibilitou melhor crescimento celular.

#### 5 REFERÊNCIAS

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

FARIA, O.L.V.; KOETZ, P.R.; SANTOS, M.S.; NUNES, W.A. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.26, nº 2, 309-317. 2006.

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.

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

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

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.

THOMPSON J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl. Eng. Agri**. v.22, nº 2. 261- 265. 2006.