

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



PRODUÇÃO DE LEVEDURA EM EFLUENTES INDUSTRIAIS

**SANTOS, Diego Gil^{* 1,2}; GIL TURNES, Carlos¹; LEITE, Fábio Leivas¹;
CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹**

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia

² Instituto Federal Sul-Rio-Grandense

*diegogil@pelotas.ifsul.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As proteínas unicelulares obtidas a partir de cultivos microbianos são uma alternativa interessante para a produção rápida de proteínas, principalmente quando destinadas à alimentação animal. Suas principais fontes de obtenção são algas, fungos (leveduras) e bactérias (Anupama, 2000). Diversos autores demonstraram que as leveduras são eficientes redutores da demanda química de oxigênio (DQO) e da demanda biológica de oxigênio (DBO) em efluentes, além de gerar biomassa ou proteína unicelular (Chanda e CHAKRABARTI, 1996; Choi e PARK, 1999; Nigam, 1999; Queiroz et al., 2007).

No Rio Grande do Sul, o principal grão processado é o arroz, com uma produção de 6.419 mil toneladas na safra 2006/2007 (CONAB, 2009). O arroz parboilizado representa 20% do total do arroz beneficiado no Brasil (ABIAP, 2009). O processo de parboilização gera 4 litros de efluente por quilo de arroz processado, contendo altas concentrações de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo. Queiroz et al. (1997) mostraram que o efluente do arroz parboilizado pode ser usado como fonte de nutrientes para a produção de proteína unicelular a partir de cianobactérias e Schneid et al. (2004) demonstraram que este efluente pode ser usado na multiplicação das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Pichia pastoris*.

P. pastoris é uma levedura usada como sistema heterólogo de expressão de proteínas na moderna biotecnologia. Esta levedura produz alta concentração de células quando dispõe de glicerol em excesso como fonte de carbono, metabolizando-o rapidamente (Higging e CREGG, 1998). O glicerol é um subproduto da produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais, constituindo aproximadamente 10% em volume do biodiesel produzido (Anuário das indústrias químicas brasileira, 2005). Sauer et al. (2006) estimaram que a simples implantação da mistura B5 ao óleo diesel no Brasil implicará em um aumento de 200.000 t/ano na produção de glicerina (glicerol) representando um terço do consumo mundial em 2006. Dessa forma necessita-se encontrar alternativas de uso desse subproduto principalmente em misturas com baixa pureza de glicerol para o qual indústrias produtoras de biodiesel não encontram mercado.

O objetivo deste trabalho foi produzir *P. pastoris* em efluentes dos tanques de maceração de arroz parboilizado, adicionados de um subproduto da produção de biodiesel com 50% de glicerol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Pichia pastoris cepa X-33 (Invitrogen, USA).

2.2. Produção da levedura

Produziu-se o pré-inóculo e o inóculo em meio YM (Yeast Medium, Difco, USA) em agitador orbital a 200 rpm e 30°C por 20 horas. O pré-inóculo foi produzido em balão aletado de 50 mL, colocando-se 5 colônias em 10 mL de meio, e o inóculo em balões aletados de 300 mL contendo 66 mL de meio que foram inoculados com 6,6 mL de pré-inóculo.

Efetuar-se duas repetições (experimento 1 e 2) testando seis meios: efluente de arroz parboilizado adicionado de 10 (AP 10), 20 (AP 20) e 30 (AP 30) g L⁻¹ de subproduto industrial contendo 55% de glicerol, 1,4% de metanol e outros componentes; efluente de arroz parboilizado adicionado de 1 % de sacarose (APS); efluente de arroz parboilizado sem fonte complementar de carbono (AP); e o meio Yeast Peptone Dextrose (YPD). Colocaram-se os meios em balões aletados de 500 mL com 125 mL do meio respectivo, autoclavados a 121°C por 15 minutos e inoculados com 7,5%v/v de cultivo em YM. Incubaram-se em agitador orbital a 200 rpm e 30°C. Amostras foram coletadas às 0, 4, 8, 12, 24 e 50 horas, medindo-se em triplicata a biomassa após secagem a 30°C até peso constante.

2.3. Análise estatística

Os resultados dos seis tratamentos com duas repetições foram analisados utilizando o Statistix software versão 7 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA). Para testar a normalidade usou-se o teste de Shapiro-Wilk e para comparação de médias o teste de Tukey a nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os rendimentos em massa (g.L⁻¹) dos dois experimentos do cultivo de *P. pastoris* nos seis meios testados (Tabela 1 e 2) indicam que os melhores resultados com efluente foram obtidos às 50 h de cultivo. A suplementação com glicerol aumentou a produção de levedura quando comparado ao efluente não suplementado e com sacarose. Os meios com 10, 20 e 30 g L⁻¹ de glicerol produziram na média dos experimentos 3.6, 3.9 e 4.5 g L⁻¹ de biomassa, respectivamente.

O cultivo de *P. pastoris* nos meios AP 10 e AP 30, e AP 10, AP 20 e AP 30 às 12 h de incubação, do primeiro e segundo experimento respectivamente, apresentaram um rendimento aproximadamente 4 vezes maior, que o obtido por Zepka et al. (2008) com a microalga *Aphanothece microscopica Nægeli* em efluentes de arroz parboilizado (rendimento de 0,57 g L⁻¹ em 15 horas). Chan (2005) cultivando a mesma cepa de *P. pastoris* X-33 em erlenmeyers aletados a 200 rpm e 30°C em um meio rico (2% p/v soytone, 1% p/v de extrato de levedura; 1,36% p/v de Yeast Nitrogen Base sem aminoácidos, 1,4% p/v KPO₄ e 2% v/v de glicerol) obteve

rendimentos variando de 12,5 a 18 g L⁻¹ semelhantes aos valores obtidos nos cultivos de YPD, sendo 2,6 a 4 vezes maior que o resultado obtido em efluente de arroz parboilizado contendo 30 g L⁻¹ de glicerol, porém com um meio de maior custo.

Tabela 1: Rendimento em massa de *Pichia pastoris* (g L⁻¹) do experimento 1

Tratamento	Tempo (h)					
	0	4	8	12	24	50
AP	1,30 ^{a,b,c}	1,10 ± 0,10 ^a	1,50 ± 0,10 ^a	1,47 ± 0,15 ^a	1,43 ± 0,06 ^a	2,10 ^a
AP S	0,85 ± 0,07 ^{a,b}	1,50 ± 0,26 ^a	1,53 ± 0,47 ^a	2,10 ± 0,20 ^b	2,57 ± 0,06 ^b	2,63 ± 0,15 ^b
AP 10	1,00 ± 0,10 ^{a,b}	1,30 ^a	2,00 ± 0,26 ^a	2,90 ± 0,10 ^c	3,40 ± 0,28 ^c	3,15 ± 0,07 ^{b,c}
AP 20	1,70 ± 0,14 ^{a,c,d}	1,30 ± 0,56 ^a	1,50 ± 0,17 ^a	1,00 ± 0,34 ^a	2,10 ± 0,42 ^{a,b}	3,45 ± 0,32 ^c
AP 30	1,85 ± 0,07 ^{c,d}	2,25 ± 0,07 ^b	2,55 ± 0,78 ^a	2,80 ± 0,14 ^c	3,60 ± 0,42 ^c	4,13 ± 0,15 ^d
YPD	2,25 ± 0,07	3,05 ± 0,21	5,10 ± 0,28	8,65 ± 0,35	9,75 ± 0,07	9,10 ± 0,14

Tabela 2: Rendimento em massa de *Pichia pastoris* (g L⁻¹) do experimento 2

Tratamento	Tempo (h)					
	0	4	7 ^{***}	12	24	50
AP	1,03 ± 0,06	1,2 ± 0,00	1,36 ± 0,15 ^a	1,43 ± 0,06	1,60 ± 0,10	2,00 ± 1,12
AP S	1,50 ± 0,26	1,86 ± 0,15	2,13 ± 0,06 ^a	2,53 ± 0,06	3,00 ± 0,00	3,36 ± 0,35
AP + 10 g L ⁻¹	1,03 ± 0,23	1,26 ± 0,06	1,70 ± 0,10 ^a	2,10 ± 0,10	2,80 ± 0,10	4,13 ± 0,06
AP + 20 g L ⁻¹	1,66 ± 0,30	1,76 ± 0,21	2,06 ± 0,11 ^a	2,60 ± 0,00	3,20 ± 0,20	4,50 ± 0,20
AP + 30 g L ⁻¹	1,95 ± 0,07	1,80 ± 0,10	2,50 ± 0,07 ^b	2,83 ± 0,06	3,36 ± 0,06	4,90 ± 0,17
YPD	1,80 ± 0,55	2,73 ± 0,21	4,16 ± 0,55 ^{b,c}	11,60 ± 0,72	18,96 ± 0,30	19,46 ± 0,57

AP: água de parboilização sem fonte complementar; AP S: com 1 % de sacarose; AP 10: com 10 g L⁻¹ de glicerol; AP 20: com 20 g L⁻¹ de glicerol; AP 30: com 30 g L⁻¹ de glicerol; YPD: Yeast Peptone Dextrose

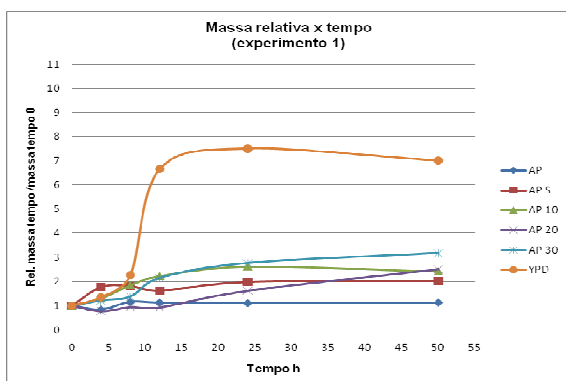
*Dados com somente uma medida.

** Os dados com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

*** Os dados com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os outros dados não seguem uma distribuição normal.

No meio YPD a fase estacionária foi alcançada em 12 e 24 horas, semelhante aos meios com o efluente do arroz parboilizado sem fonte complementar e adicionado de 1 % de sacarose (Figura 1a e 1b). Chan (2005) no cultivo da mesma cepa alcançou esta fase com 48 horas. Contudo, os meios suplementados com 10, 20 e 30 g L⁻¹ de glicerol não alcançaram a fase estacionária às 50 h de cultivo, indicando a necessidade de aperfeiçoar as condições operacionais e os meios usados buscando aumentar os rendimentos obtidos. De qualquer forma, estes resultados demonstraram que o efluente de arroz parboilizado adicionado de 30 g L⁻¹ de glicerol permite obter de 25 a 45% da massa de *P. pastoris* produzida no meio de referência YPD, sem mostrar efeitos tóxicos sobre a levedura.

1a



1b

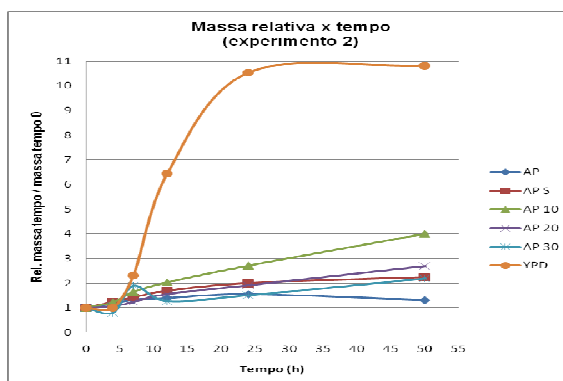


Figura 1a e 1b: Relação da massa no tempo de incubação/massa às 0 horas. AP: água de parboilização sem fonte complementar; AP S: com 1 % de sacarose; AP 10: com 10 g L⁻¹ de glicerol; AP 20: com 20 g L⁻¹ de glicerol; AP 30: com 30 g L⁻¹ de glicerol; YPD: Yeast Peptone.

4. CONCLUSÕES

O efluente dos tanques de maceração do arroz parboilizado suplementado com um subproduto da indústria de biodiesel, sem valor comercial, contendo glicerol é uma opção adequada para a produção de biomassa de *P. pastoris*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAP-Associação Brasileira de Indústrias de Arroz Parboilizado – Disponível em: www.abiap.com.br acesso em 29/04/2009.

Anuário da Indústria Química Brasileira, ABIQUIM, São Paulo, 2005.

ANUPAMA, P.R. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459–479, 2000.

CHANDA. S. E., CHAKRABARTI, S. (1996) Plant origin liquid waste a resource for single cell protein production by yeast. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 51-54.

CHOI, M.H E., PARK, Y.H. (1999) Growth of *Pichia pastoris* guilliermondii A9, and osmotolerant yeast, in waste brine generated from kimichi production. **Bioresource Technology**, v.70, p. 231-236.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em www.conab.gov.br, acesso em 20/03/2009.

HIGGINGS, D.R.; CREGG, M., (1998) **Methods in molecular Biology-Pichia Protocols**, Humana Press Inc, USA, p. 270.

NIGAM,J., (1999) Continuous ethanol production pineapple cannery waste, **Journal of Biotechnology**, v. 72, p. 197–202.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.G.; GOLDBECK. 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**, v. 98, p. 2163–2169.

QUEIROZ, M; KOETZ, P.R. (1997) Caracterização do efluente da parboilização do arroz, **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, no 3, 139-143.

SAUER, I.L.; QUEIROZ, M. S.; MIRAGAYA, J.C.G.; MASCARENHAS, R.C.; JÚNIOR, A.R.Q.; Energias renováveis: ações e perspectivas na Petrobras. **Bahia Análise & Dados**, v. 16, n. 1, p. 9-22, jun. 2006.

SCHNEID, A.S.; GIL DE LOS SANTOS, J.R.; ELÍAS, Jr., M.; GIL-TURNES, C. (2004) Wastewater of rice parboiling process as substrate for probiotics. In: **2nd International Probiotic Conference**, 2004, Kosice, Eslovaquia. 2nd International Probiotic Conference. Kosice, Eslovaquia: Research Institute of Veterinary Medicine, p. 66.

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.