

EFEITO NO NITROGÊNIO TOTAL E NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA PELO CULTIVO DA LEVEDURA *Pichia pastoris* X-33 EM EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE PARBOILIZAÇÃO DE ARROZ EM AGITADOR ORBITAL

BARBOZA, Alessandra Gomes*¹; SANTOS, Diego Gil.^{1,2}; SÁ, Priscila da Silva.¹; CONCEIÇÃO, Fabrício²

¹Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, Pr. Vinte de Setembro, 455 - Pelotas/RS

²Universidade Federal de Pelotas – CDTec, Campus Universitário s/nº Pelotas/RS

*alegomres82@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é um importante pólo da agroindústria, responsável por cerca de 60% da produção nacional.(Saraiva et al, 2009). O estado representa cerca de 14% da produção gaúcha de arroz (IRGA, 2010). O arroz representa 20% do total beneficiado no Brasil (ABIAP, 2009). A parboilização consiste no tratamento hidrotérmico do cereal em casca, realizada através de três operações básicas: o encharcamento, a gelatinização e a secagem, evitando a remoção excessiva de nutrientes. No processo de parboilização são gerados, aproximadamente, 2 litros de efluente a cada quilograma de arroz processado, rico em matéria orgânica e nutrientes como nitrogênio e fósforo. O adequado tratamento do efluente gerado é necessário, já que o mesmo pode colaborar com a poluição hídrica dos corpos receptores e para o processo de eutrofização (Saraiva et al, 2009; Queiroz, et al, 1997) .

Uma alternativa encontrada para o tratamento do efluente da parboilização de arroz é o uso de leveduras a fim de reduzir parâmetros que colaboram para a poluição hídrica. Um exemplo de microrganismo a ser utilizado na biorremediação do efluente de parboilização do arroz é a *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica, ou seja, que possui capacidade de utilizar o metanol como única fonte de carbono em seu crescimento em meio de cultura. Tal alternativa aborda o crescimento do microrganismo com fonte de carbono proveniente do glicerol, um subproduto do processo de produção do biodiesel de fácil obtenção e que ainda não possui uma utilização definida devido ao seu alto grau de impurezas na sua forma bruta. Em 2010 foram gerados 240.000 m³ deste subproduto (Boletim ANP fev 2011) representando um grande problema para a indústria nacional

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do cultivo da levedura *Pichia pastoris* X-33 em efluente dos tanques de maceração de uma indústria de parboilização de arroz e da utilização de glicerol como fonte complementar de carbono, visando a redução de Nitrogênio Total (NTK) associada ao crescimento celular da levedura e à conseqüente produção de biomassa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do efluente:

O efluente do processo de produção de arroz parboilizado foi coletado em quatro meses diferentes na saída dos tanques de maceração de uma indústria de parboilização de arroz, localizada na cidade de Pelotas/RS. As amostras foram obtidas por amostragem simples, autoclavadas e conservados sob refrigeração.

2.2 Cultivo da levedura:

A cepa da levedura *Pichia pastoris* X-33 (Invitrogen, USA) foi utilizada nos cultivos. O pré-inóculo e o inóculo foram cultivados em YM (Yeast Medium, Difco) usando um agitador orbital a 150 rpm e 28°C por 12 horas. O pré-inóculo foi produzido semeando 5 colônias em 11 mL de meio, e o inóculo inoculando-se 10 mL de pré-inóculo em 90 mL de meio YM usando-se 20% dos respectivos balões aletados.

A levedura foi cultivada por 70 horas em cinco meios: efluente bruto de arroz parboilizado sem fonte complementar de carbono (A_P); efluente de arroz parboilizado adicionado de 5 (A_P+G_{PA} 5g.L⁻¹) e 15 (A_P+G_{PA} 15g.L⁻¹) g.L⁻¹ de glicerol p.a. e efluente de arroz parboilizado adicionado de 5 (A_P+G_{BD} 5g.L⁻¹) e 15 (A_P+G_{BD} 15 g.L⁻¹) g.L⁻¹ de glicerol subproduto da industrial de biodiesel de soja. Ajustou-se o pH do meio com NaOH 1N em valor próximo a 5,5, autoclavando-os e inoculando-os com 10% v/v do inóculo em YM. Incubou-se em agitador orbital a 150 rpm e 28°C usando-se balões aletados.

2.3 Determinação de biomassa e análise de Nitrogênio Total Kjeldahl (N-NTK)

As amostras coletadas nos tempos 0 e 70h, foram divididas em três alíquotas de 5 mL, sendo centrifugadas em tubos *Falcon* de 15 mL a 1800xg. Os *pellets* gerados foram secos em estufa a 80°C até peso constante e a biomassa gerada foi calculada por diferença.

Nos sobrenadantes adicionou-se H₂SO₄ p.a. até pH<2,0 conservando-se sob refrigeração até realização das análises. O Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) seguiu o método de titulometria segundo o *Standard Methods (Eaton, 2005)*. A eficiência de redução foi expressa em porcentagem de acordo com a equação abaixo:

$$Ef = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$$

Onde:

E_f = Eficiência de redução dos parâmetros.

C_i = Concentração inicial (tempo: 0h) do parâmetro avaliado, no efluente de parboilização de arroz (A_P), na ausência de fonte complementar de carbono.

C_f = Concentração final (70h) do parâmetro avaliado, no meio que ocorreu o cultivo.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o Statistix software versão 7 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, comparando-se as médias o teste de Tukey a nível de significância de 5%.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Biomassa:

Nos cultivos em efluentes de arroz parboilizado de quatro meses diferentes, obteve-se uma média de 0,75 g L⁻¹ de levedura, demonstrando ser possível cultivar *Pichia pastoris* X-33 neste tipo de meio, de acordo com os resultados obtidos por Schneid et al (2004).

Tabela 1. Valores médios da biomassa seca de *P. pastoris* X-33 (g L⁻¹) obtida em quatro cultivos em efluentes do processo de arroz parboilizado após 70 hs de cultivo

Tratamentos				
A_P	A_P+G_{PA} 5g.L ⁻¹	A_P+G_{PA} 15g.L ⁻¹	A_P+G_{BD} 5g.L ⁻¹	A_P+G_{BD} 15g.L ⁻¹

$0,75 \pm 0,37^a$	$1,09 \pm 0,64^{ab}$	$1,56 \pm 0,48^{ab}$	$1,88 \pm 0,56^{ab}$	$2,06 \pm 0,41^b$
-------------------	----------------------	----------------------	----------------------	-------------------

Legenda: A_P : efluente bruto dos tanques de maceração de arroz parboilizado (água de parboilização sem fonte complementar); A_P+G_{PA} $5gL^{-1}$ com $5 g.L^{-1}$ de glicerol p.A.; A_P+G_{PA} $15gL^{-1}$ com $15 g.L^{-1}$ de glicerol p.A.; A_P+G_{BD} $5gL^{-1}$ com $5 g.L^{-1}$ de glicerol subproduto da indústria de biodiesel; A_P+G_{BD} $15gL^{-1}$ com $15 g.L^{-1}$ de glicerol subproduto da indústria de biodiesel.

A adição de glicerol p.A. (G_{PA}) e glicerol de biodiesel (G_{BD}) aumentaram a biomassa média obtida comparando-se com os cultivos sem a adição de uma fonte complementar de carbono (A_P). Os valores médios de biomassa com adição de G_{PA} foram 45 e 100% superiores aos obtidos nos efluentes brutos (A_P). A adição de glicerol de biodiesel obteve os maiores valores médios de biomassa, sendo 72 e 32 % superiores quando foram adicionados as mesmas concentrações de G_{PA} , 5 e $15 g L^{-1}$ respectivamente. O subproduto da indústria de biodiesel contém ácidos graxos, metanol e traços de elementos (Rivaldi et al., 2007), além do glicerol, os quais possivelmente auxiliaram o metabolismo celular aumentando a produção de biomassa.

3.2. Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK):

A remoção média de nitrogênio de 6,8% nos cultivos em efluente bruto (Tabela 2) foi inferior aos 50% de remoção obtido no cultivo de *Candida utilis* (Rodrigues et al., 1996) usando o mesmo tipo de efluente

Tabela 2: Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) médio dos tratamentos antes e após cultivo por 70 h da levedura *Pichia pastoris* X-33 em quatro cultivos em efluentes do processo de arroz parboilizado

Tratamentos	N- NTK (mg .L ⁻¹)		% de redução às 70 h	% com referência ao controle às 70 h
	0 h	70 h		
AP (controle)	229.0 ± 81.6	213.5 ± 53.6	6.8	0.0 ^a
A_P+G_{PA} $5gL^{-1}$	204.7 ± 66.0	188.1 ± 32.7	8.1	-11.9 ^{a,b}
A_P+G_{PA} $15gL^{-1}$	230.1 ± 56.2	187.0 ± 61.2	18.8*	-12.4 ^{a,b}
A_P+G_{BD} $5gL^{-1}$	187.0 ± 68.8	154.9 ± 35.7	17.2	-27.5 ^{b,c}
A_P+G_{BD} $15gL^{-1}$	245.6 ± 48.4	135.0 ± 54.5	45.0*	-36.8 ^c

Legenda: ver legenda tabela 1

Os melhores resultados de remoção de nitrogênio foram obtidos com a adição de glicerol de biodiesel, assim como, os de biomassa. O melhor resultado de remoção de nitrogênio foi 45% obtido quando se adicionou $15 gL^{-1}$ de biodiesel, sugerindo que o aumento do metabolismo permitiu obter um aumento no processo de assimilação deste nutriente. Comparativamente, o cultivo da alga *Aphanothece microscopica Nägeli* (Queiroz et al., 2007) mostrou obter melhores resultados na remoção de nitrogênio do efluente de arroz parboilizado que as leveduras até hoje estudadas. A adição de $15 gL^{-1}$ de glicerol de biodiesel no efluente foi o único tratamento que apresentou diferença estatística ($p < 0.05$) na biomassa e na remoção de nitrogênio quando comparado com o efluente bruto (A_P).

4 CONCLUSÃO

O efluente de parboilização de arroz permite o cultivo de *Pichia pastoris* e a adição de $15 gL^{-1}$ de glicerol subproduto do processo de obtenção de biodiesel ao efluente permite reduzir em 45% o nitrogênio total e obter em

média 2,06 g L⁻¹ de biomassa independente da variabilidade inerente do efluente.

5 REFERÊNCIAS

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

Boletim da Agência Nacional de Petróleo Fevereiro de 2011.

EATON,A.D.;CLESCERI,L.S.;RICE,E.W.;GREENBERG,A.E.,**Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed. American Public Health Association/American water Works Association/Water Environment Federation, Washington, D.C.2005.

IRGA - Instituto Rio-grandense do Arroz - disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br>; Acesso em: maio de 2010.

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

SARAIVA, Libertalamar; KOETZ, Paulo. Avaliação da remoção de nutrientes em efluentes de parboilização de arroz, **R. Bras. Agrociência**, v. 8, n. 3, p 259-264, 2002.

SCHNEID, A.S.; GIL DE LOS SANTOS, J.R.; ELÍAS, JR., M.; GIL-TURNES, C.,4, Wastewater of rice parboiling process as substrate for probiotics. In: **2nd International Probiotic Conference**, Kosice, Eslovaquia. **2nd International Probiotic Conference.**, p. 66. 2004.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.G.; GOLDBECK, R.; **Bioresource Technology**. v.98, 2163-2169, 2008.

RODRIGUES, R.; KOETZ, P.; **Rev. Bras. de Agrociência**, v.2, nº 3, 141-146, 1996.

RIVALDI,J.D.; SARROUB,B.F.; FIORILO,R. e SILVA,S.S.,Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**,n.37,p.44-51, 2007.