

## PRODUÇÃO DE BIOMASSA E VIABILIDADE CELULAR DO PROBIÓTICO *Saccharomyces boulardii* CULTIVADO EM EFLUENTE SUPLEMENTADO COM 1% DE SACAROSE EM BIORREATOR

SAMANTHA PERLEBERG VARGAS<sup>1</sup>; GIANA CARLA GABOARDI<sup>2</sup>; LARISSA  
HERTER CENTENO<sup>3</sup>; RAFAEL ROSA<sup>4</sup>; DIEGO GIL DE LOS SANTOS<sup>5</sup>;  
FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - samipvargas@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - giana\_gaboardi@hotmail.com

<sup>3</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas - larissahcenteno@gmail.com

<sup>4</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - rafaelbiotec@gmail.com

<sup>5</sup>Instituto Federal Sul-rio-grandense, Campus Pelotas - diegogil@pelotas.ifsul.edu.br

<sup>6</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Biotecnologia, CDTec, UFPel - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Em maio de 2014, o Brasil produziu 11.2 milhões de toneladas de arroz em casca (CONAB, 2014), sendo a região sul responsável por 60% da produção. O arroz parboilizado representa 50% das exportações nacionais de arroz (ABIAP) e aproximadamente 20% do arroz total comercializado no Brasil. Para o processo de parboilização do arroz são necessários 4L de água por Kg de grão, o que resulta em aproximadamente 5,4 bilhões de litros de efluente por ano, que contém nutrientes, como nitrogênio e fósforo (RODRIGUES; KOETZ, 1996) e necessita de tratamento antes do descarte.

A levedura *Saccharomyces boulardii* possui propriedades probióticas em humanos e animais quando administrada em quantidades adequadas, conferindo benefício ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Estudos realizados com animais de experimentação e frangos já apontaram os efeitos probiótico e prebiótico desta levedura (COPPOLA et al. 2005; GIL DE LOS SANTOS et al. 2005). Para exercer a função de probiótico, as células precisam estar viáveis e em quantidade superior a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>) (LEE, Y. K.; SALMINEN, S.; 1995).

SCHNEID et al. (2004) demonstraram que *S. boulardii* pode ser cultivada no efluente de arroz parboilizado. Para tal, é necessária a adição de uma fonte extra de carbono. Anteriormente no cultivo de *Pichia pastoris* cepa X33, utilizou-se 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto da indústria de biodiesel para suplementar o efluente, resultando em biomassa de 7,8 g.L<sup>-1</sup> após 48 h de cultivo (GIL DE LOS SANTOS, 2012). Outra fonte de carbono barata que pode ser utilizada para esta finalidade é a sacarose, produto abundante no Brasil e que poderia ser utilizada sem trazer custos significativos para a produção. Ensaio prévios de seleção de meios para o cultivo de *S. boulardii* foram feitos por nosso grupo, comparando o desempenho de meios compostos por efluente suplementado com glicerol 5 g.L<sup>-1</sup> e 15 g.L<sup>-1</sup> ou com sacarose 1% e 3%. Os melhores resultados de viabilidade celular foram alcançados com o efluente suplementado com sacarose (GABOARDI et al. 2013).

O objetivo deste experimento foi avaliar a produção de biomassa e a viabilidade celular de *Saccharomyces boulardii* cultivada em efluente resultante do processo industrial de parboilização de arroz acrescido de 1% de sacarose.

## 2. METODOLOGIA

O efluente utilizado foi coletado, durante três dias consecutivos, de uma indústria de beneficiamento de arroz de Pelotas, sendo misturado e autoclavado por cerca de 45 minutos. A sacarose foi obtida em comércio local.

Cinco colônias de *Saccharomyces boulardii* foram cultivadas em meio YM em agitador orbital a 150 rpm, a 28°C por 24 horas. O volume de cultivo foi ampliado gradativamente até obter os 700 mL de inóculo necessários para a fermentação. Foram realizadas quatro fermentações em biorreator de 7L utilizando o efluente suplementado com 1% de sacarose como meio de cultivo, o qual apresentou melhores resultados em uma seleção de meios realizada anteriormente. As fermentações foram realizadas a 250 rpm, 28°C, 1vvm e pH= 5,5, durante 48 h.

Durante os cultivos efetuaram-se coletas de 10 mL, em triplicata, para determinação de biomassa e 1 mL para viabilidade celular, às 0, 3, 6, 8, 10, 12, 15, 24, 30 e 48 h. Para determinar a viabilidade celular e a curva de crescimento, foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em YM ágar das amostras coletadas, e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>).

Para quantificar a biomassa as amostras de 10 mL foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos e os *pellets* lavados duas vezes, sendo posteriormente ressuspensos a 10 mL de água destilada para realizar a quantificação de biomassa por meio da leitura por densidade ótica (DO<sub>600</sub>) em um espectrofotômetro. Para calcular o peso da biomassa foi construída uma curva de calibração a partir de oito alíquotas do cultivo previamente centrifugadas, sendo os *pellets* lavados e ressuspensos em volumes iguais e aquecidos a 105 °C até peso constante em cadinhos de cerâmica previamente tarados. Em seguida, foi feita a correlação entre o peso obtido e as absorbâncias geradas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

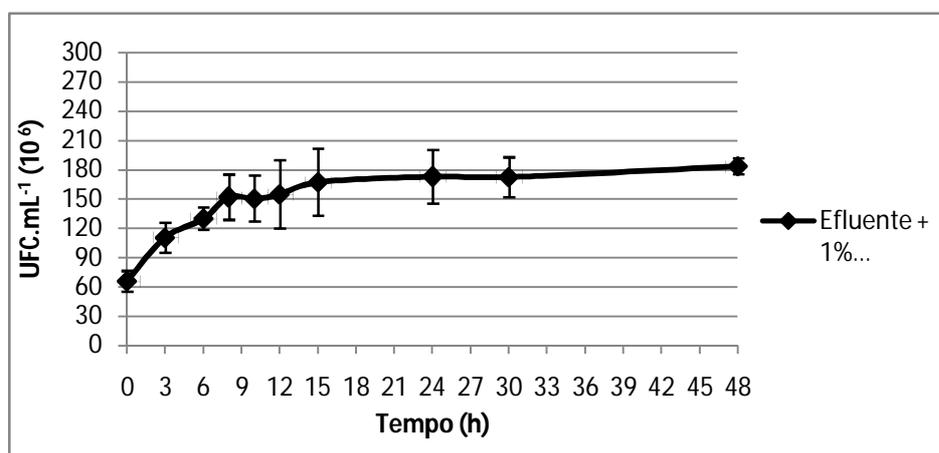


Figura 1. Viabilidade celular média de 4 fermentações de *Saccharomyces boulardii* em efluente + 1% sacarose durante 48 horas, em biorreator.

Na Figura 1, observa-se que a levedura *Saccharomyces boulardii* alcançou a fase estacionária entre 15 e 24 h de cultivo, com viabilidade celular de  $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, mostrando que não há necessidade de estendê-lo até 48 horas. Este valor é superior ao preconizado para o emprego da levedura como probiótico, viabilizando testes *in vivo* posteriores para determinação do potencial probiótico. Além disso, é semelhante ao resultado obtido em outros experimentos em nosso laboratório no

cultivo da mesma levedura em que se utiliza YPD (Yeast Peptone Dextrose), que é um meio de alto custo.

Na figura 2 nota-se que às 24 h de cultivo a levedura atingiu uma biomassa de 3,0 g por litro, enquanto que às 48 h o valor obtido foi de 3,8 g.L<sup>-1</sup>, um aumento de apenas 0,8 g. Estes resultados confirmam a correlação entre viabilidade celular e biomassa, mostrando que ao chegar à fase estacionária, a multiplicação celular diminui e o número de células viáveis é constante e, conseqüentemente, a biomassa produzida é menor que no início do cultivo. Estes dados reforçam a proposição de que não é sustentável o cultivo por mais de 24 h, visto que após este horário a viabilidade e a biomassa gerada são insignificantes.

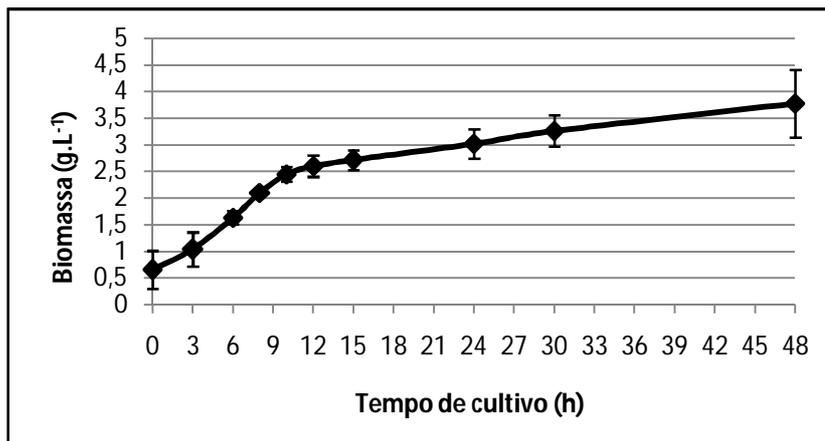


Figura 2. Biomassa média de 4 fermentações de *Saccharomyces boulardii* em efluente + 1% sacarose durante 48 horas, em biorreator.

Neste trabalho, o cultivo de *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado enriquecido com sacarose 1% gerou biomassa inferior ao obtido por GIL DE LOS SANTOS (2012) com o cultivo de *Pichia pastoris* no mesmo efluente, suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de glicerol subproduto do biodiesel, onde após 48 h de cultivo a biomassa obtida foi de 7,8 g.L<sup>-1</sup>. Além disso, a viabilidade celular média às 48 h do cultivo de *Pichia pastoris* foi de  $2,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, superior a  $1,8 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Saccharomyces boulardii* no mesmo horário.

Embora os resultados referentes à biomassa e viabilidade de *Saccharomyces boulardii* tenham sido inferiores àqueles obtidos a partir do cultivo de *Pichia pastoris* em efluente suplementado com glicerol subproduto do biodiesel, o trabalho de MULLER et al. (2007) também com *Saccharomyces boulardii* demonstrou resultados semelhantes ao nosso. Neste estudo, foi obtido o valor de 3,1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 12 h em biorreator *air lift* 1,0 vvm, enquanto que no cultivo em efluente alcançamos o valor de 2,6 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *S. boulardii* neste mesmo horário. Considerando o baixo custo da preparação deste meio, detemos certa vantagem, já que o meio utilizado por MULLER et al. (2007) para cultivar a levedura foi um meio comercial, de custo elevado, composto por glicose anidra, peptona de carne, extrato de levedura, uréia e sulfato de magnésio.

#### 4. CONCLUSÃO

O efluente da indústria de arroz parboilizado suplementado com 1% de sacarose pode ser utilizado para a produção de *Saccharomyces boulardii*. O cultivo da levedura produziu 3,8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa em 48 horas e gerou uma viabilidade celular média de  $1,8 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAP. **Anuário Brasileiro do arroz 2013**. Acesso em 23 de julho de 2014. Online. Disponível em: <http://www.abiap.com.br/>.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira : grãos**. V.1 - SAFRA 2013/14. N.9 - Nono Levantamento. Junho 2014. Acesso em 24 de junho de 2014. Online. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>.

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 Agricultural Immunology**, v.16, p.213–219, 2005.

DE LOS SANTOS D.G. **Cultivo de *Pichia pastoris* X33 em efluentes industriais e suas aplicações**. 2012. Tese (Doutor em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia ambiental)- Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.

GABOARDI, G.C.; DE LOS SANTOS, D.G.; CENTENO, L. H.; MENDES, L.P.; CONCEIÇÃO, F.R. Remoção de fósforo de efluente industrial utilizado como meio de cultivo para a produção do probiótico *Saccharomyces boulardii*. In: **27º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**. Natal, RN. 2013. Anais do 27º CBM 2013.

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*. **Brazilian Poultry Science**, v.46, p.494–497, 2005.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Foods Science and Technology**, Amsterdam, v.6, p. 241-245, 1995.

MULLER, J.L.; PROTTI, K.L.; MACHADO, M.S.; LACERDA, L.L.V.; BRESOLIN, T.M.B.; PODLECH, P.S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.688-693, 2007.

RODRIGUES, R.S.; KOETZ, P.R. Remoção de nitrogênio de efluente da indústria de arroz parboilizado por incorporação em biomassa celular de *Candida utilis* - IZ-1840. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.2, n.3, p.141-146, 1996.

SCHNEID, A. S.; GIL DE LOS SANTOS, J. R.; ELIAS, M. C.; STORCH, O. B.; CRUZ, F. W.; GIL-TURNES, C. Wastewater Of Rice Parboilizing Process As Substrate For Probiotics. In: **2nd International Probiotic Conference**, Kosice, Slovakia, Anais. p. 66, 2004.