

## DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM EFLUENTE DE ARROZ PARBOILIZADO PREVIAMENTE TRATADO COM ENZIMA AMILASE

GRAZIELA L. FERREIRA<sup>1</sup>; FERNANDA M. MANZOLLI<sup>2</sup>; LUIS OTÁVIO P. CARDOZO<sup>2</sup>; VALENTINA F.S. VIDALES<sup>2</sup>; DIEGO G. SANTOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul Rio-grandense – [grazilemos95@gmail.com](mailto:grazilemos95@gmail.com)

<sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul Rio-grandense

<sup>3</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul Rio-grandense – [diegogil@pelotas.if sul.edu.br](mailto:diegogil@pelotas.if sul.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

No estudo de rotas metabólicas descreve-se que leveduras do gênero *Saccharomyces* têm capacidade de sintetizar ácidos orgânicos, tais como: ácido lático e pirúvico. Esses ácidos apresentam interesse comercial, como no caso do ácido lático utilizado como matéria prima na indústria de alimentos e farmacêutica. O ácido pirúvico é um intermediário no metabolismo de carboidratos e proteínas e percussor de etapas de biossíntese de alguns aminoácidos. Uma vantagem geral no uso de leveduras, ao invés de bactérias normalmente utilizadas na produção de ácidos orgânicos, está na tolerância que as leveduras possuem a baixos pHs, tornando desnecessário o uso de neutralizantes e diminuindo o risco de contaminação microbiana durante o processo produtivo (NEVOIGT, 2008).

Estudos recentes demonstraram a possibilidade de cultivo das leveduras *Pichia pastoris* (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012) e *Saccharomyces boulardii* (GABOARDI, 2015) no efluente de arroz parboilizado obtendo bons resultados de remoção e absorção do fósforo presente. Nos dois casos, tornou-se necessário efetuar-se a adição de uma fonte complementar de carbono, pois, mesmo o efluente possuindo altos índices de DQO essas leveduras não conseguem absorver e catabolizar as fontes de carbono existente no efluente. O uso da enzima amilase permitiria disponibilizar as fontes de carbono disponíveis no efluente devido ao processo de encharramento.

Nos estudos efetuados até o momento, ocorre uma redução do pH ao longo dos processos de cultivo dessas leveduras no efluente de arroz parboilizado sugerindo a produção de ácidos. A identificação desses ácidos orgânicos permitiria abrir novas oportunidades de geração de subprodutos durante o processo de tratamento do efluente de arroz parboilizado usando-se leveduras.

Neste trabalho efetuou-se cultivos da levedura *Saccharomyces boulardii* no efluente de arroz parboilizado previamente tratado com a enzima amilase, identificando e quantificando os ácidos orgânicos produzidos durante o processo.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Pré-tratamento utilizando enzimas no efluente

Nos experimentos utilizou-se uma amilase da Novoenzyme AG XXL (ação enzimática numa faixa de 15-55 °C e pH de 4,5). A enzima foi adicionada no efluente em uma concentração de 20 ppm e tempo de ação de 30 minutos, em banho termostatizado em 40°C nos experimentos. O pH foi ajustado 4,5 usando-se NaOH 1M.

#### 2.2 Cultivo

O cultivo foi realizado em agitador orbital por 30h, sem autoclavagem do efluente e previamente tratado com as enzimas no tempo e concentração

descritos no item anterior. Como parâmetro comparativo de controle foi efetuado um cultivo da levedura no efluente de arroz parboilizado sem o uso de enzimas. A viabilidade celular foi determinada ao longo do tempo por contagem de unidades formadoras de colônias ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) usando placas de YM sólido a 28°C.

### 2.3. Determinação de ácidos graxos

#### 2.3.1 Derivatização

No vial, com amostra, foi adicionado 500 $\mu\text{L}$  de diclorometano, 30 $\mu\text{L}$  do derivatizante MSTFA e agitado cuidadosamente. Logo após, a amostra foi submetida a um banho de areia a 80°C por trinta minutos. Feito isso, o volume do vial foi ajustado para 1mL e a amostra levada a injeção no GC-MS.

#### 2.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Coluna cromatográfica usada: CBP1 (25 m x 0,32 mm;  $d_f$  0,25  $\mu\text{m}$ ); programação do forno: temperatura inicial 40 °C, taxa de aquecimento 10 °C  $\text{min}^{-1}$  até 150 °C, então 4 °C  $\text{min}^{-1}$  até 310 °C e isoterma de 10 min. Volume injetado: 1  $\mu\text{L}$ , utilizando o modo sem divisão de fluxo ("splitless") por 30 s. As análises por GC foram realizadas no aparelho da marca Shimadzu (GC-17A), dotado de injetor com e sem divisão de fluxo ("split/splitless") e gás de arraste hélio.

As análises dos extratos derivatizados foram realizados por espectrometria de massas acoplado a cromatografia gasosa, equipamento da marca Shimadzu modelo GC-MS-QP2010 Ultra, dotado de injetor com e sem divisão de fluxo. O espectrômetro de massas foi programado para trabalhar com a variação de massa/carga ( $m/z$ ) entre 50–600 com tempo total de ciclo de 1,0 s. Condições extras do MS: a temperatura da fonte de íons mantida a 170 °C, a emissão de corrente a 300  $\mu\text{A}$  e o potencial de elétron ionização a 70 eV. A interface GC-MS foi mantida a 300 °C e hélio será usado como gás de arraste. Os picos foram identificados com ajuda da biblioteca eletrônica disponível.

### 2.4. Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o software Statistix versão 7 (Analytica Software, Tallahassee, FL, USA).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TABELA 1 está os principais ácidos orgânicos encontrados ao longo do cultivo em amostras de efluente de arroz pré-tratadas. Um enfoque maior foi dado ao ácido propanóico por estar presente em maiores quantidades nas amostras.

Na TABELA 2 são apresentados os resultados obtidos a partir da derivatização das respectivas amostras e posterior análise em cromatografia gasosa, obtendo-se os resultados em % de área aparente.

TABELA 1- Ácidos orgânicos presentes ao longo do cultivo em amostras de efluente de arroz parboilzado pré-tratados

Ácidos Orgânicos
Ácido propanóico
Ácido benzoico
Ácido ribônico
Ácido glucônico
Ácido xilônico
Ácido butanoico
Ácido acético
Ácido hexanôico
Ácido octadecanôico
Ácido malônico
Ácido heptadecanoico

TABELA 2- Porcentagem em área aparente de ácido propanóico em relação ao tempo de cultivo em efluente de arroz parboilizado pré-tratado e não tratado

Tempo (horas)	Efluente tratado com enzima (%)	Efluente sem tratamento (%)
0	24.98 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>
3	17.815 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>
9	40.615 <sup>a</sup>	16.07 <sup>a</sup>
12	35.565 <sup>a</sup>	22.59 <sup>a</sup>
15	15.895 <sup>a</sup>	21.47 <sup>a</sup>
30	0.36 <sup>a</sup>	4.36 <sup>a</sup>

\*as letras representam diferença estatística entre os tratamentos no mesmo tempo de cultivo para  $\alpha < 0,5$

Utilizando-se do teste de normalidade Shapiro Wilk, verificou-se que os cultivos efetuados com tratamento prévio do efluente usando a enzima e sem pré-tratamento apresentam comportamento semelhante em todos os horários com exceção nos tempos de 0h e 3h onde o efluente pré-tratado obteve um valor maior do que dez vezes ( $p < 0,05$ ).

Estudos realizados por CHEN (2016) verificaram a produção de ácidos orgânicos a partir de rotas metabólicas que utilizam o açúcar glucose como fonte para levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo a *Saccharomyces boulardii* muito semelhante a *Saccharomyces cerevisiae*, acredita-se que a maior produção de ácido propanóico detectado nos cultivos com tratamento prévio ocorreu devido a ação da enzima  $\alpha$ -amilase a qual provavelmente desdobrou o material orgânico oriundo do processo de encharcamento do arroz em açúcar glucose e outras fontes de carbono de pequena cadeia. Conforme pode ser observado na TABELA 2, ao longo do tempo de cultivo há um decaimento da presença deste ácido, na faixa de menor velocidade de crescimento da *S. boulardii*. Acredita-se que a maioria dos ácidos orgânicos produzidos por microorganismo se deve à um ciclo incompleto TCA (Cílico dos Ácidos Tricarboxílicos) que ocorre em um estado de anaerobiose. Um ácido obtido por uma via glicolítica e posterior TCA, se apresenta em maior quantidade no meio durante a fase exponencial de crescimento e posteriormente, quando o crescimento começa a diminuir, este é reutilizado para o acumulo de acetato (YOSHITA, 2012). Como os cultivos foram realizados em balões aletados, não se pode garantir a oxigenação por longos períodos, podendo

gerar um meio de anaerobiose e portanto, o consumo dos ácidos orgânicos ao final do cultivo.

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização da levedura *S. boulardii* no tratamento de efluente de arroz parboilizado, além de reduzir seu impacto ambiental, pode também, gerar um subproduto como ácidos orgânicos em sua faixa exponencial de crescimento. Além disso, a utilização da enzima alfa-amilase no pré-tratamento gerou um aumento de aproximadamente dez vezes na faixa inicial de cultivo em relação ao efluente sem pré-tratamento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chen, Y.; Nielsen, J.; Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. Current Opinion in Biotechnology, 2016.

Gaboardi, G , “Produção do probiótico *Saccharomyces boulardii* em efluente de arroz parboilizado e avaliação da biorremediação”. 63f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015.

Gil de los Santos, D., Gil-Turnes, C., Conceição, F.R.,, Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. TheScientificWorldJournal. 2012 doi:10.1100/2012/492925

NEVOIGT, E., 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 379–412

Yoshida, S.; Yokoyama, A.; Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113 (5), 556-561, 2012.