

## **INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA PREPARO DE INÓCULO DE *Sporidiobolus pararoseus* PARA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES**

C. M. BORBA<sup>1</sup>; C. C. MORAES<sup>2</sup>, J. F. M. BURKERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande - Escola de Química e Alimentos

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa – Curso de Engenharia de Alimentos

A produção de carotenoides por micro-organismos vêm sendo estudada como forma alternativa na produção desses corantes naturais, visando alcançar máximo rendimento com menor custo, em diferentes condições de bioprodução. Neste trabalho foi verificada a influência de dois meios para o preparo de inóculo de *S. pararoseus*, M1 com extrato de malte e levedura e M2 com melaço e água de maceração de milho, na produção de carotenoides, a 180 rpm, 25°C por 168h, com meio de produção M2. O acompanhamento de pH, biomassa, carotenoides totais e açúcares foi realizado. As análises foram realizadas em duplicata e as médias avaliadas por teste t. A produção de carotenoides volumétricos (3000,4 µg/L M1 e 2507,6 µg/L M2) e específicos (1010,3 µg/g M1 e 1099,8 µg/g) e as produtividades ( $P_x = 0,01$  g/L.h para ambos os meios) e  $P_c$  (12,61 µg/L.h para M1 e 11,67 µg/L.h para M2) não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

### **1.INTRODUÇÃO**

Os carotenoides são pigmentos naturais, lipofílicos, insolúveis em água e solúveis em solventes, como a acetona, amplamente distribuídos na natureza, de coloração amarela, laranja e vermelho, presente em vegetais e micro-organismos (Damoran, *et al.* 2010). Apesar de se destacarem por seu papel como pigmentos, os carotenoides apresentam outras importantes funções, como por exemplo, precursores de vitamina A e aromas além de propriedades antioxidantes, sendo conhecidos por reagirem com o oxigênio singlete, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular (Ambrósio, *et al.* 2006; Uenojo, *et al.* 2007; Barbosa, 2010; Cipolatti, 2012).

Os corantes sintéticos apresentam menor custo e maior estabilidade química, mas pesquisadores e consumidores da área de alimentos preocupam-se com sua natureza tóxica. Uma alternativa para sua substituição é a utilização de pigmentos naturais extraídos de resíduos industriais como bagaços de frutas e cascas de camarão (Bertolo, 2007; Barbosa, 2010) ou produzidos por via biotecnológica utilizando-se algas (Reis, 2012), bactérias (Gu *et al.* 2008) e leveduras como as do gênero *Sporidiobolus* (Otero, 2011) ganham atenção.

A produção por via biotecnológica pode ser afetada por diferentes fatores, entre eles pH, temperatura, agitação, aeração e fonte de carbono, sendo esta a que recebe maior destaque. A fonte de carbono, não apenas influencia o desenvolvimento do micro-

organismo e a síntese de carotenoides, mas também interfere diretamente nos custos de produção. Glicose e sacarose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides e encontrar fontes alternativas de carbono que elevem o produtividade do processo e reduzam custos é extremamente necessário (Aksu e Eren, 2005; Schwartz, 2010).

Sendo assim no presente trabalho foi realizado o estudo da influência de dois meios para o preparo de inóculo de *Sporidiobolus pararoseus*, M1 com extrato de malte e levedura e M2 com melaço e água de maceração de milho, na produção de carotenoides.

## **2.METODOLOGIA**

### **2.1. REATIVAÇÃO DAS CULTURAS MICROBIANAS**

Foi utilizada a levedura carotenogênica *Sporidiobolus pararoseus* isolada de amostras ambientais (Otero, 2011).

Para a reativação, foram realizados repiques a partir das culturas estoques em meio extrato de malte e levedura (YM) modificado (Parajó *et al.*, 1998) composto por 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e adicionados de 0,2 g/L de KNO<sub>3</sub> por 48h a 25°C. Após foi realizada uma ressuspensão celular em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL de caldo YM modificado, sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente.

### **2.2.PREPARO DO INÓCULO**

Os inóculos foram preparados em frascos agitados de 250mL (Incubadora Tecna TE-420) contendo 90 mL YM modificado (M1) descrito anteriormente (Parajó *et al.*, 1998) ou (M2), composto por melaço de cana de açúcar (40g/L) e água de maceração de milho (6,5 g/L) (Machado, 2013), pré-tratado com ácido sulfúrico (Roukas, 1998), ambos adicionados de 10 mL de cultivo oriundo da reativação, sendo incubados a 150 rpm, 25°C por 48 h, ou tempo necessário para concentração celular atingir  $1 \times 10^7$  células/mL, contadas através de câmara de Neubauer.

### **2.3.CULTIVO**

O meio de cultura utilizado foi M2, descrito no item anterior. Os ensaios realizados em erlenmeyer de 500 mL com 225 mL do meio, acrescidos de 10% de inóculo, sendo as condições operacionais do processo 25°C, 180 rpm por 168 h (Silva, 2009).

Para a recuperação da biomassa produzida o caldo foi centrifugado (Cientec CT-6000R) a 1745xg por 10 min e o sedimento lavado com água destilada. O sobrenadante foi utilizado para medição de pH e quantificação dos açúcares. Após, a biomassa foi submetida à secagem por 48h a 35°C (Fonseca *et al.*, 2011), sendo macerada em um

grau e passada em peneira com mesh 115 (Cipolatti, 2012) e posteriormente submetida ao congelamento a -18°C por 48h (Moraes *et al.*, 2010).

## **2.4. ACOMPANHAMENTO DE BIOMASSA, pH E AÇÚCARES**

Para acompanhamento do processo foram retiradas amostras a cada 24 horas de produção para análise de biomassa, pH e açúcares. A concentração de biomassa ao longo do processo foi estimada por leitura de absorbância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa (Choi e Park, 2003).

O pH foi determinado através da leitura da amostra em um potenciômetro e para acompanhamento de açúcares redutores totais foi utilizado o método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), com uma curva padrão de glicose e prévia hidrólise ácida das amostras.

## **2.4.ROMPIMENTO CELULAR E OBTENÇÃO DO EXTRATO CAROTENOGÊNICO**

O processo de rompimento celular se deu por técnica química aplicando-se DMSO. Em tubos contendo 0,05 g de biomassa foi adicionado 2 mL de DMSO a 55°C sendo agitado em vórtex (Vixar) por 1 min e posteriormente deixado em repouso por 1h (Michelon, *et al.*, 2012)..

Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona, a fim de promover a extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada a 1745xg por 10 min, a fase solvente separada e o procedimento de ruptura repetido até o branqueamento total das células. Aos sobrenadantes foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases a fase apolar foi coletada e filtrada com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dando origem aos extratos carotenogênicos (Michelon, *et al.* 2012).

## **2.5.DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS**

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) através do valor médio da máxima absorbância a 448 nm, utilizando a Equação 1, sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário β-caroteno em éter de petróleo com absorvidade específica de 2592 (Davies, 1976).

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 100 \cdot m_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Onde: CT = concentração específica de carotenoides de totais (µg/g); A = absorvância; V = volume (mL); m<sub>amostra</sub> = massa celular seca (g); A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> = absorvidade específica.

Posteriormente os valores de carotenoides totais foram convertidos à valores de carotenoides volumétricos (µg/L).

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram avaliados por análise de variância seguido de teste t com confiança de 95%, através de software estatístico.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os valores de biomassa, açúcares, pH e carotenoides observados durante o acompanhamento do processo. E na Tabela 1 são apresentadas as médias dos parâmetros cinéticos para a máxima produção de carotenoides volumétricos (168 h).

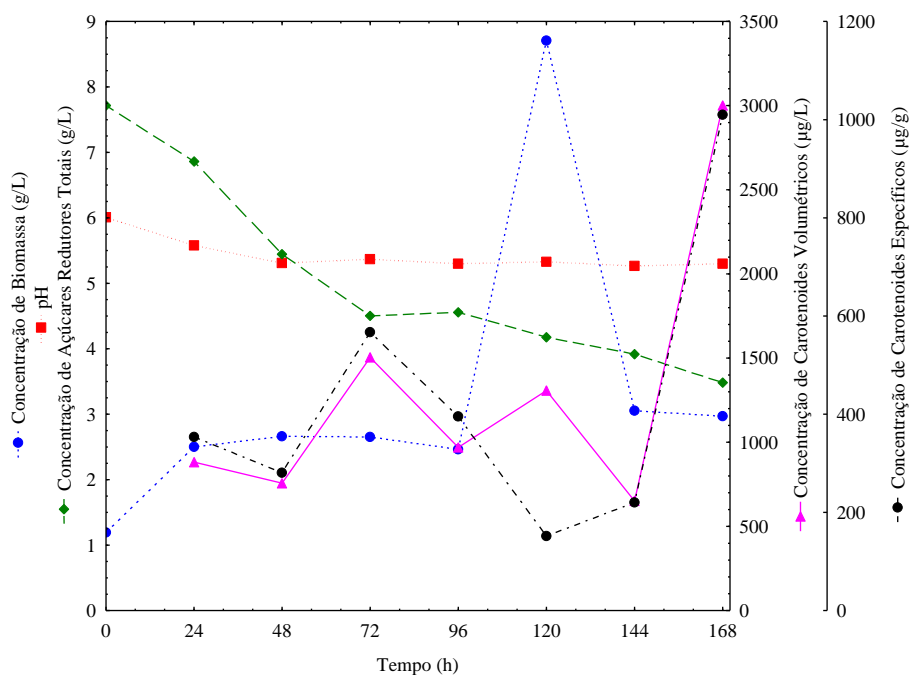
A maior produção volumétrica de carotenoides foi obtida em 168 h, 3000,4 µg/L e 2507,6 µg/L. Nesse ponto, apenas os parâmetros biomassa e pH apresentaram diferenças estatística entre as médias ( $p < 0,05$ ), como observado na Tabela 1.

Apesar da concentração de biomassa máxima ter sido superior quanto utilizado M1, que era um meio de composição mais complexa, não houve interferência do meio de preparo do inóculo na produtividade de biomassa e nem na de produto.

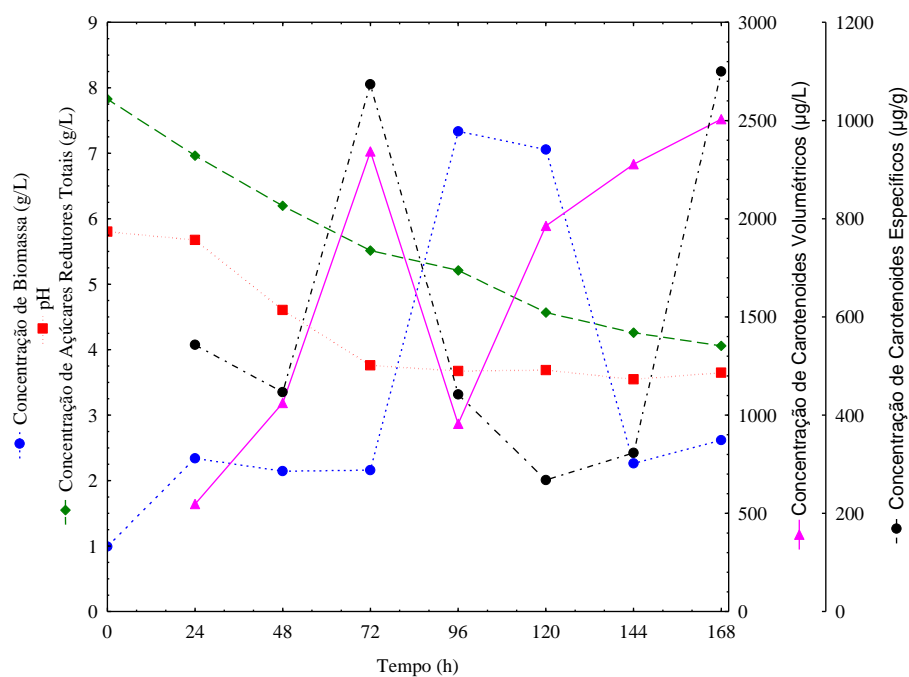
O pH é um dos mais significativos parâmetros na bioprodução de compostos, por influenciar o crescimento do micro-organismo e formação de produto. É natural que durante a síntese de carotenoides ocorram mudanças de pH, sendo essas mais intensas nas primeiras 72 h, com posterior elevação desse pH durante a fase intensa de carotenogênese (Valduga, *et al.*, 2009).

No presente estudo o pH sofreu maior variação para a produção utilizando-se o inóculo preparado em M2, chegando ao final da fermentação ao valor médio de 3,65, ponto esse onde foi obtido a maior produção de carotenoides volumétricos, sendo possível observar na Figura 1b a queda mais acentuada até 72 h e com estabilização do pH após isso. Para M1 a queda foi menos acentuada e o pH final apresentou valor médio de 5,30, onde também foram obtidos o maior valor de carotenoides volumétricos.

Com a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636, utilizando inóculo produzido em meio YM e a produção sendo realizada em meio, pré-tratado com ácido sulfúrico, composto por 10 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 5 g/L de água de maceração de milho e 5g/L de água de maceração de milho, foram alcançados 180,32 µg/g de carotenoides (Valduga, *et al.* (2007), inferiores aos valores encontrados no presente trabalho.



(a)



(b)

Figura 1 – Cinética da produção de carotenóides por *Sporidiobolus pararoseus* com inóculo preparado em M1 (a) e M2(b).

. Tabela 1– Médias dos parâmetros cinéticos da produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* com inóculo preparado em M1 e M2

Inóculo	Biomassa (g/L)	Carotenoides Volumétricos (µg/L)	pH	Px (g/L.h)	Pc (µg/L.h)
<b>M1</b>	2,97 <sup>a</sup>	3000,4 <sup>b</sup>	5,30 <sup>d</sup>	0,01 <sup>f</sup>	12,61 <sup>g</sup>
<b>M2</b>	2,62 <sup>b</sup>	2507,6 <sup>b</sup>	3,65 <sup>e</sup>	0,01 <sup>f</sup>	11,67 <sup>g</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna demonstram resultados estatisticamente iguais (p>0,05).

A semelhança entre os dois meios na produção de carotenoides volumétricos, permite que se possa optar pelo meio mais barato, nesse caso, composto pelos co-produtos água de maceração de milho e melaço. Além disso, a utilização do mesmo meio para o preparo de inóculo e produção, pode diminuir a fase de latência do micro-organismos que representa o tempo necessário para a adaptação ao meio, tendo maior ou menor duração dependendo de fatores como concentração inicial do inóculo, tempo de pré-cultivo e estado fisiológico, sendo que o pré-cultivo dos micro-organismos em um meio de mesma composição do que utilizado para a produção, diminui o tempo de indução, reduzindo ou eliminando essa fase inicial e assim permitindo a obtenção de maior biomassa em menor tempo (Schimidell, *et al.* 2001).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio utilizado para a produção do inóculo tem influência significativa (p<0,05) na produção de biomassa de *Sporidiobolus pararoseus*. No tempo de 168 h, utilizando-se o meio M1, de composição mais complexa, foi obtida a maior quantidade de biomassa (2,97g/L), porém a produção de carotenoides volumétricos (3000,4 e 2507,6 µg/L) e as produtividades (Px = 0,01 g/L.h e Pc = 12,61 µg/L.h para M1 e 11,67 µg/L.h para M2) em ambos os meios não apresentaram diferença estatística (p> 0,05), o que permite que se opte pelo meio de menor custo, neste caso o meio M2.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. *Process Biochem.*, n.40, p. 2985–2991, 2005.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochem. Eng. J.*, n.35, p. 107–113, 2007.
- AMBRÓSIO, C. L.; CAMPO, F. de A. C. e S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Rev. Nut.*, n. 19, v. 2, p. 233-243, 2005.

- BARBOSA, M. M. *Obtenção de carotenoides de flavonoides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática e prensagem*. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BERTOLO, A. L. *Avaliação de um processo de extração e recuperação dos carotenoides presentes no resíduo da industrialização do camarão-rosa (Farfantepenaeus paulensis)*. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.
- CIPOLATTI, E. P. *Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais*. 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.
- CHOI, M.H.; PARK, Y.H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. *Biomass Bioenerg.*, v. 25, p. 221-226, 2003.
- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DAVIES, B. H. *Chemical Biochemistry Plant Pigments*. New York: Academic Press, 1976.
- FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.
- GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT*, v. 41, p. 1082–1088, 2008.
- MACHADO, W. R. C. *Otimização da produção de carotenoids por Sporodibolus pararoseus e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais*. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- MICHELON, M. BORBA, T. de M.; RAFAEL, R. da S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. de M.; Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between diferent techniques of cell disruption. *Food, Sci, Biotechnol.* v.1, p. 1-8, 2012.
- MILLER, G. L Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. *J. Food Biochem.*, v. 34, p. 133-148, 2010.
- OTERO, D. M. *Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides*. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Feradal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- PARAJÓ, J. C. V. S., VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cell grown on xylose. *Process Biochem.*, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.



REIS, D. F. *Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga Haematococcus pluvialis*. 2012. 81 f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

ROUKAS, T. Preatreatment of beet molasses to increase pillilan production, *Process Biochem.*, v. 33, n. 8, p. 805-810, 1998.

SILVA, D. A. *Maximização da produção de astaxantina por Phaffia rhodozyma utilizando água de parboilização do arroz*. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. *Biotechnologia industrial – Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Blucher, 2001.

SCHWARTZ, C. R. M. *Otimização da produção de carotenoides em meio sintético por Sporodibolos salminicolor CBS 2636 em biorreator*. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.

UENOJO, M., MARÓSTICA Jr., M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P; O;; TIGGEMANN, L. TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. ZENI, J. DI LUCCIO, M.; Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quimi. Nova*, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenoides. *Quim. Nova*, v. 30, n. 8, p.1860-1866, 2007.