

BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 EM FRASCOS AGITADOS VARIANDO COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

L. URNAU⁽¹⁾, L. TIGGEMANN⁽²⁾, R. COLET, C. STEFFENS⁽¹⁾, E. VALDUGA⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim, Departamento de Engenharia de Alimentos;

⁽²⁾ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos;
E-mail: letiurnau@gmail.com

RESUMO- Os carotenoides são corantes naturais que podem ser sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Devido às suas propriedades corantes, ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana e ao apelo pela substituição dos corantes sintéticos pelos naturais, os carotenoides têm recebido atenção especial, sendo que sua produção por micro-organismos pode tornar-se industrialmente praticável. Este estudo teve como objetivo analisar a influência do meio de cultura e as condições operacionais da bioprodução, na recuperação de carotenoides específicos produzidos por *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 em frascos agitados. A bioprodução foi realizada em frascos agitados em shaker, sem iluminação, variando-se a composição do meio YM (concentração de glicose, peptona, extrato de malte e de levedura), temperatura, agitação e pH inicial. A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração acetona. A determinação dos carotenoides totais foi realizada espectrofotometricamente ($\lambda = 474$ nm). A máxima bioprodução de carotenoides (697 $\mu\text{g/g}$) foi observada no ensaio 1 onde o meio de cultura foi composto apenas por glicose (10 g/L), e maiores faixas de temperatura e pH (30°C e 6, respectivamente).

Palavras-chave: carotenoides, meio de cultura, *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

1. INTRODUÇÃO

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados em fungos, bactérias, tecidos de plantas verdes e também em animais (MEZZOMO, 2012). Apresentam capacidade corante, que provem da presença de uma longa série de duplas ligações conjugadas, que é também responsável por suas propriedades antioxidantes (MACÍAS-SANCHEZ et al. 2010).

Os carotenoides são corantes naturais responsáveis pelas cores vermelha, amarela e laranja, muito empregadas nas indústrias alimentícias, farmacêutica, de cosméticos e até mesmo de ração animal (RODRIGUES-AMAYA, KIMURA, AMAYA-FARFAN, 2008).

A produção biotecnológica de carotenoides para a aplicação industrial, a partir de micro-organismos, tem sido item de destaque nos últimos anos, pois a grande maioria dos carotenoides

utilizados industrialmente é obtida por via química ou por extração de plantas ou algas. Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, os processos biotecnológicos para obtenção de carotenoides têm sido alvo de um crescente interesse (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; AKSU; EREN, 2007).

A produção de carotenoides através de via microbiana constitui atualmente uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos de origem natural em escala industrial (DA SILVA, 2004). Há uma grande quantidade de micro-organismos com capacidade para produzir carotenoides, no entanto, nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pela sua utilização como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos menos dispendiosos e alto teor de açúcar (VALDUGA et al, 2009).

O interesse na produção de astaxantina por fontes naturais vem aumentando significativamente nos últimos anos, devido à possibilidade de atuar como corante e sua capacidade antioxidante biológica potente. É o carotenoide principal encontrado na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, sendo esse micro-organismo adequado para o uso como fonte do pigmento industrial em razão de seu metabolismo heterotrófico, padrão de crescimento relativamente rápido, qualidade nutricional e seguro como aditivo alimentar (MACÍAS-SANCHEZ et al, 2004).

Dentro deste contexto, o trabalho teve por objetivo bioproduzir carotenoides da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y 10921 através da variação do meio de cultivo e condições operacionais, a fim de otimizar a produção dos mesmos, obtendo-se assim, uma maior recuperação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* Y-10921 adquirida da United States Department of Agriculture. A produção foi realizada em frascos agitados (25°C e 150 rpm) com um volume útil de 100 mL, sem iluminação e com 10% de inóculo, durante 96 horas, com meio produzido de acordo com planejamento experimental variando a composição a partir do meio YM (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose).

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições na maximização e/ou otimizar a bioprodução foi utilizado metodologia de planejamento de experimentos. Inicialmente, um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 2, tendo sido temperatura, agitação, pH, extrato de levedura, extrato de malte, peptona e glicose.

2.1 Recuperação dos carotenoides

2.1.1 Preparo das amostras

Inicialmente, as células foram separadas em centrífuga, a 6000 x g, por 10 min a 5° C. As células foram utilizadas foram congeladas em freezer a -80°C por aproximadamente 5 h e secas em liofilizador por aproximadamente 36 h.

2.1.2 Ruptura celular

A célula (0,05 g) foi adicionada de 2 mL de DMSO e homogeneizadas em shaker a 150 rpm por 30 minutos. Após a ruptura foi adicionado o solvente (acetona) para extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada e as lavagens com solvente repetidas até branqueamento da célula.

A medida da concentração de carotenoides específicos foi feita em espectrofotômetro a 474 nm. O cálculo para determinação foi realizado através da Equação 1, utilizando o coeficiente de absortividade específica para xantofilas de 1600 (LIU, WU & HO, 2006).

$$\frac{\mu g}{g} = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\%}^{1\text{cm}} * 100 * m_{amostra}}$$

onde: A= absorbância; V= volume (mL); $m_{amostra}$ = massa celular seca (g); $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ = absortividade específica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento tipo Plackett-Burman com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em carotenoides específicos (µg/g).

Tabela 2- Matriz do planejamento tipo Plackett & Burmann (valores reais e codificados) e respostas em carotenoides específicos em rompimento celular realizado com ultrassom.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>							<i>Respostas</i>
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	<i>Carotenoides específicos (µg/g)</i>
1	1 (30)	-1 (150)	1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	697,24
2	1 (30)	1 (200)	-1 (4)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	366,56
3	-1 (20)	1 (200)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	-1 (0)	-1 (10)	497,5
4	1 (30)	-1 (150)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	-1 (10)	353,25
5	1 (30)	1 (200)	-1 (4)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (30)	260,62
6	1 (30)	1 (200)	1 (6)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	-1 (10)	394,5
7	-1 (20)	1 (200)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	1 (10)	1 (30)	372,5
8	-1 (20)	-1 (150)	1 (6)	1 (10)	1 (10)	-1 (0)	1 (30)	230,25
9	-1 (20)	-1 (150)	-1 (4)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	-1 (10)	268,75
10	1 (30)	-1 (150)	-1 (4)	-1 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (30)	329,75
11	-1 (20)	1 (200)	-1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10)	1 (30)	552,5
12	-1 (20)	-1 (150)	-1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	91,25
13	0 (25)	0 (180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	432,5
14	0 (25)	0 (180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	410,25
15	0 (25)	0 (180)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (5)	0 (20)	398,75

*X1=Temperatura (°C); X2= Agitação (rpm); X3=pH; X4=Extrato de levedura (g/L); X5=Extrato de malte (g/L); X6=Peptona (g/L); X7= Glicose (g/L)

Conforme resultados apresentados na Tabela 2, a maior recuperação de carotenoides específicos (697,24 $\mu\text{g/g}$) foi obtida no ensaio 1, onde o meio de cultivo apresentava apenas glicose na sua composição, e as maiores faixas de temperatura (30°C) e pH (6).

Silva (2009) testando o efeito do meio de cultura adicionado de efluente de parboilização de arroz, na otimização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (formalmente *X. dedrorhous*), obteve o melhor resultado (538,4 $\mu\text{g/g}$) utilizando 10g/L de extrato de levedura, 1g/L de extrato de malte, 10g/L de peptona, 5g/L de sacarose e 0g/L de efluente.

Valduga et al. (2008) utilizando resíduos agroindustriais para variar o meio de cultura na bioprodução de *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e utilizando método de extração similar com DMSO, encontrou o maior resultado de carotenoides específicos (137,8 $\mu\text{g/g}$) empregando 17,1 g/L de melaço de cana, 1,4 g/L de água de maceração de milho e 1,4 g/L de levedura hidrolisada.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram investigadas as condições de bioprodução e variação no meio de cultura a fim de aumentar a produção e consequentemente a recuperação de carotenoides. Em meio composto apenas por 10 g/L de glicose, com 150 rpm, temperatura de 30°C e pH 6 obteve-se uma recuperação de 697,24 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides específicos, valores superiores aos encontrados na literatura.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Bioch.l Eng. Journal*. v. 35, p. 107 – 113, 2007.

DA SILVA, M. C. *Alteração na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos*. 2004. Tese (Doutorado em ciência de alimentos)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Bio. Chem.*, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Eng.*, v. 66, p. 245-251, 2004.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J.M.; ACIÉN FERNANDEZ, F.G.; CERÓN GARCIA, M.C.; GRIMMA, E.M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chem.*. V. 123, p. 928–935, 2010.

MEZZOMO, N. Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão. *Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)* – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2012.

MORIEL, D. G.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; BONFIM, T. M. Optimization of biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharm. Scie.*, V. 40, n. 3, jul./set., 2004.

RODRIGUES-AMAYA, D.B; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. *Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos*. Brasília: MMA/SBF, 2008.

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

VALDUGA, E. ; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FURIGO JUNIOR, A. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. *Journal of Chem. Tech. and Biotech.*, v.83, p.1267 - 1274, 2008.

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. *Quím. Nova*, v. 32, p. 2429-2436, 2009.