

## PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE $\beta$ -CAROTENO EM CULTIVO HETEROTROFICO DE MICROALGA *PHORMIDIUM* SP.

A. S. FERNANDES<sup>1</sup>, S. R. KACHUK-SILVA<sup>1</sup>, D. B. RODRIGUES<sup>1</sup>, A. B. SANTOS<sup>1</sup>,  
E. JACOB-LOPES<sup>1</sup>, L. Q. ZEPKA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Departamento Tecnologia e Ciência dos Alimentos  
E-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br E-mail: zepkaleila@yahoo.com.br

**RESUMO** – O cultivo de microalga em meios heterotróficos é uma alternativa promissora para obtenção de pigmentos como o  $\beta$ -caroteno. Assim, o objetivo do trabalho foi a quantificação deste pigmento em larga escala a partir da biomassa de microalga *Phormidium* sp. A produção desse pigmento foi conduzida através do cultivo heterotrófico, utilizando água residuária como meio. A extração do  $\beta$ -caroteno foi obtido por ultra-som (Sonics, Anaheim, CA, EUA) com sonda de 13 mm de diâmetro. Os isômeros foram quantificados de acordo com os seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna C30 de HPLC, cromatografia com padrões autênticos, e espectros de massa. All-*trans*- $\beta$ -caroteno ( $70,22 \pm 0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno ( $8,0 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) a partir da biomassa. Visando uma escala industrial a partir do cultivo heterotrófico de 10,000 m<sup>3</sup>/d, estima-se uma produção all-*trans*- $\beta$ -caroteno 7.902,5 kg/ano e 4.944,7 kg/ano de 9-*cis*- $\beta$ -caroteno apresentando assim valores de alta rentabilidade no beneficiamento deste tipo de pigmento comparados com a produção em meio autotrófico.

### 1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse em pigmentos naturais produzidos de forma alternativa que não concorra com os suprimentos de culturas agrícolas convencionais, incentiva o desenvolvimento de tecnologias que empregam microrganismos cultivados de forma heterotrófica. As microalgas apresentam uma ampla versatilidade metabólica o que contribui para a habilidade de sintetizar em quantidades consideráveis carotenoides (Albrecht *et al.*, 2009; Mandelli *et al.*, 2012).

As principais fontes industriais de carotenoides são a síntese química e a extração a partir de plantas e microalgas. As formas sintéticas de obtenção são menos onerosas que as naturais, no entanto, carotenoides provenientes da biomassa microalgal apresentam vantagens, como a de possuir uma razão natural de all-*trans*/isômeros (Spolaore, 2006).

O  $\beta$ -caroteno é um pigmento amplamente distribuído na natureza, encontrado principalmente em tecidos de plantas, animais e microrganismos. Possui uma ampla aplicação industrial em função da cor e por possuir propriedades bioativas (Britton, 1983; Britton, 2004).

A produção comercial de carotenoides usando microrganismos é uma alternativa promissora e altamente eficiente. Diferentes microrganismos fotossintetizantes, como algas e cianobactérias demonstram potencial de produção de  $\beta$ -caroteno (Silva, 2004; Johnson e Schroeder, 1995). Sob mudanças nas condições ambientais (por exemplo, privação de nutrientes, a limitação de luz), microalgas podem sofrer condições de stress, levando-as a produzir alguns compostos de interesse, onde destacam-se os carotenoides (López *et al.*, 2013).

Para a produção de biomassa microalgal, fotobiorreatores são amplamente utilizados, entretanto, em culturas de grande escala, a absorção de luz é atenuada pelo sombreamento mútuo das células, afetando seriamente a produtividade e a qualidade dos produtos da biomassa das algas (Markou e Georgakakis, 2011), além do custo elevado da energia elétrica (Ip e Chen, 2005). Então uma alternativa para este processo seria o cultivo heterotrófico, a partir do qual o fornecimento energético para os microrganismos seria uma assimilação de uma fonte de carbono, como por exemplo, açúcares. Desta forma, a associação entre o tratamento de águas residuárias e a produção de bioprodutos a partir da biomassa microalgal pode representar um significativo avanço na direção de reduzir os custos de produção.

Da mesma forma que há a necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção, a fim de torná-los viáveis economicamente, também se faz necessária a identificação e quantificação dos produtos que possam ser extraídos das microalgas, bem como suas possíveis atividades biológicas, para que este sistema se estabeleça. Embora a cianobactéria *Phormidium* sp. tenha a habilidade de se desenvolver em cultivos heterotróficos, não há informações disponíveis sobre os compostos desta biomassa produzida no escuro, principalmente quanto ao perfil de carotenoides. Em fase disso o presente trabalho tem como objetivo a quantificação e o potencial de produção do  $\beta$ -caroteno em larga escala a partir da biomassa da microalga *Phormidium* sp.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Microrganismos e meios de cultura**

Culturas da cianobactéria *Phormidium* sp. foram originalmente isoladas do deserto Cuatro Ciénegas no México (26°59'N 102°03'W). As culturas de reserva foram propagadas e mantidas em solidificado de agar-agar (20 g/L) contendo meio BGN11 sintético (Rippka *et al.*, 1979). As condições de incubação usadas foram de 25 ° C, uma densidade de fluxo de fótons de 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e foto período de 12 horas de luz/escuro.

### **2.2 Produção de biomassa de microalgas**

A produção de biomassa foi realizada em condições heterotróficas, utilizando a água residuária de abate de suínos como meio de cultura. As culturas foram realizadas em reator de biorreator bolhas (Francisco *et al.*, 2014), operando em regime de batelada utilizando 2,0 L de água residual como meio de cultura. As condições experimentais foram as seguintes:

concentração inicial do inóculo de 100 mg/L, a temperatura de 26 °C, o pH 7,6, a razão de carbono/nitrogênio de 30 (ajustado com glicose), na ausência de luz e um tempo de residência de 168 horas. A biomassa foi separada do efluente por centrifugação. Posteriormente, foi liofilizado. Os cultivos foram realizados em duplicata.

## **2.3 Métodos analíticos**

### **2.3.1 Extração de carotenóides**

Os carotenóides foram extraídos por extração assistida por ultrassom (UAE) utilizando um processador ultra-sônico (Sonics, Anaheim, CA, EUA) com uma sonda de 13 mm de diâmetro. As amostras secas ( $0,2 \pm 0,2/g$ ) foram colocadas em um recipiente revestido, através do qual a água foi circulada a 20 °C. As extrações foram realizadas com acetona fria durante 20 minutos e a amplitude da aplicação de extração foi ajustado para 50% (61  $\mu$ m aproximadamente). As amostras foram processadas em uma frequência constante de 20 kHz. A sonda do ultra-som foi submersa a uma profundidade de 25 mm na amostra. A suspensão da amostra foi centrifugada durante 10 min a 3000 rpm. O procedimento de extração foi repetido até o sobrenadante se tornar incolor. Os carotenóides foram transferidos para uma mistura de éter de petróleo/éter dietílico [1:1 (v / v)], e saponificado por 12h com 10% (w/v) de hidróxido de potássio (KOH) em metanol, à temperatura ambiente. O meio alcalino foi removido por lavagem do extrato com água destilada e o extrato concentrado em evaporador rotativo ( $T < 30$  °C) e posteriormente armazenado em atmosfera saturada de nitrogênio até o momento da análise cromatográfica.

### **2.3.3 Análise HPLC-DAD-MS/MS**

Os carotenóides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bombas quaternárias (modelo LC- 20AD), degaseificador em linha, e válvula de injeção com um loop de 20  $\mu$ L (Rheodyne, Rohnert Park-CA, EUA). O equipamento foi ligado em série a um detector de PDA (modelo SPD - M20A) e um espectrômetro de massas com um analisador de “ion trap” em ionização química a pressão atmosférica (APCI) (modelo Esquire 4000, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os espectros de UV-visível foram obtidos entre 250 e 600 nm, e os cromatogramas foram processados a 451 nm. Os parâmetros de MS foram definidos de acordo previamente descritos por Zepka e Mercadante, 2009. A separação dos carotenóides foi realizada em uma coluna C30 YMC (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm id) ( Waters , Wilmington , DE, EUA ).

A identificação foi realizada de acordo com a seguinte combinação das informações: ordem de eluição na coluna C30 de HPLC, co-cromatografia com padrões, as características de espectro de UV - visível [comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda$  máx), estrutura fina espectral (% III / II) e *cis* pico intensidade (% AB/AI)] e as características dos espectros de massa (moléculas protonadas e os seus fragmentos MS/MS). Estes resultados foram comparados com

padrões e dados autênticos disponíveis na literatura (Britton *et al*, 2004; De Rosso e Mercadante, 2007; Zepka e Mercadante, 2009; Van Breemen *et al*, 2012).

Os carotenóides foram quantificados usando curvas analíticas de cinco pontos com all-*trans*- $\beta$ -caroteno (1.1-30.2  $\mu\text{g/mL}$ ). Os isômeros *cis* foram estimados usando a curva da correspondente all-*trans*- carotenóides. O teor total de carotenóides foi calculado como a soma dos conteúdos de cada um dos carotenóides individuais separados na coluna C30.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma obtido pela análise em HPLC (Figura 1) demonstra a presença de vinte carotenóides no extrato da biomassa de *Phormidium* sp., os quais foram identificados All-*trans*- $\beta$ -caroteno e 9-*cis*- $\beta$ -caroteno com base nas informações obtidas na coluna C30.

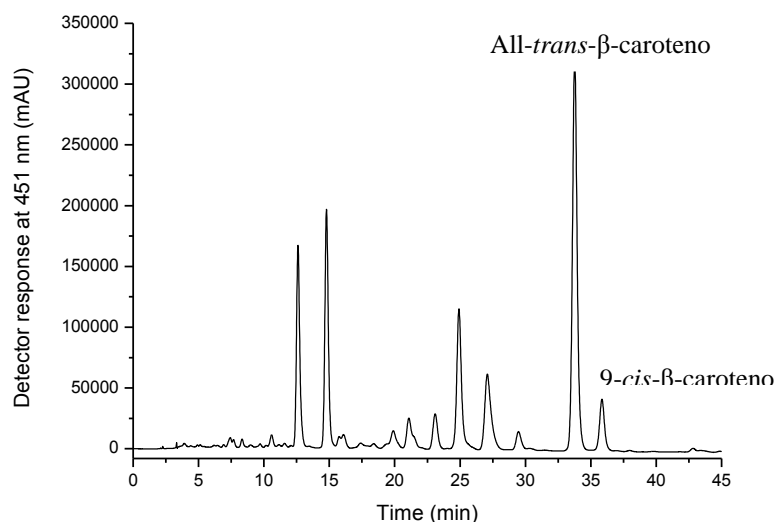


Figura 1 – Cromatograma, obtido por meio de HPLC-PDA, do extrato da biomassa de carotenoide da microalga *Phormidium* sp.

A biomassa pode ser considerado o primeiro bioproduto de biorrefinaria de microalgas e a produtividade do crescimento heterotrófico de *Phormidium* sp. em diferentes capacidades industriais é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1– O balanço de massa para a produção de biomassa de microalgas em diferentes capacidades industriais

Capacidade industrial (m <sup>3</sup> /d)	Produção (ton/ano)
100	5,690
1,000	56,902
10,000	56,9016

Industrialmente, dependendo do tamanho da planta de processo é possível produzir 5.690, 56.902 e 56,9016 ton/ano de biomassa em uma pequena (100m<sup>3</sup>/d), média (1.000 m<sup>3</sup>/d) e grande indústria (10.000 m<sup>3</sup>/d), resultando numa produção total dos carotenoides de até 107.902,5 kg /ano. Individualmente, isso representa uma produção (Tabela 2) dos carotenoides majoritários: *all-trans*- $\beta$ -caroteno (397,1 para 39.717,3 kg /ano) e seu isômero *9-cis*- $\beta$ -caroteno (49,4 para 4,944.7 kg/ano).

O conteúdo de carotenoides totais foi de 183.03  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de biomassa seca e representa um valor substancial quando comparada com o teor de carotenoides a partir de outras fontes, como frutas e vegetais (Rodriguez-Amaya et al., 2008).

Tabela 2– O balanço de massa para a produção de biomassa de microalgas em diferentes capacidades industriais

Caratenóides (kg.ano <sup>-1</sup> )	Capacidade industrial		
	100 (m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	1000 (m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )	10000 (m <sup>3</sup> .d <sup>-1</sup> )
Total carotenoids	1.079,0	10.790,3	107.902,5
<i>All-trans</i> - $\beta$ -carotene	397,1	3.971,7	39.717,3
<i>9-cis</i> - $\beta$ -carotene	49,4	494,5	4.944,7

## 4. CONCLUSÃO

A biomassa da microalga *Phormidium* sp. é mostrada como uma alternativa, renovável e uma fonte de baixo custo para obtenção de carotenoides. Demonstrou potencial para ser explorada em uma larga gama de aplicações e uma matéria prima que pode ser melhor aplicada em fins industriais.

## 5. REFERÊNCIAS

- Albrecht, M., Takaichi, S., Steiger, S., Wang, Z., & Sandmann, G. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Nature*, v.18, p.843-846, 2009.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. *Carotenoids: handbook*. Basel: Birkhäuser Verlag, 2004.
- C. SILVA, J.M.S. CABRAL, F. VAN KEULEN, Isolation of a carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp., *Biotech. Lett.*, v.26, p. 257-262, 2004.
- DE ROSSO, V. V., & MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.5062-5072, 2007.
- FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess and Biosyst. Eng.*, v. 36, p. 1986-2013, 2014.
- G. BRITTON, The Biochemistry of Natural Pigments, *Cambridge University Press*, v. 21, 1983.
- IP, P.; CHEN, F. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochem.*, v. 40, p.733-738, 2005.
- JOHNSON, E. A. SCHROEDER W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. of Biolog. Chem.*, v.270, p.18374-18379, 1995.
- LÓPEZ, P.P.; GARCÍA, S.G.; CLAYTON, J.; AGATHOS S.N.; MCHUGH, E.; WALSH, D.; MURRAY, P.; MOANE, S.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *J. Clean. Produc.*, v.64, p. 332-344, 2014.
- MANDELLI, F., MIRANDA, V. S., RODRIGUES, E., MERCADANTE, A. Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *W. J. Microb. Biotech.*, v.28, p. 1781-1790, 2012.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Appl. Energy*, v. 88, p.3389-3401, 2011.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., & STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microb.*, v.111, p. 1-61, 1979.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., KIMURA, M., GODOY, H. T., AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. *J. Food Comp. Anal.*, v.21, p. 445-463, 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosc. Bioeng.*, v.101, p. 87-96, 2006.

VAN BREEMEN, R. B., DONG, L., PAJKOVIC, N. D. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *I. J. Mass Spectrom.*, v.312, p.163-172, 2012.

ZEPKA, L. Q., MERCADANTE, A. Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chem.*, v.117, p. 28-34, 2009.