

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE β -CAROTENO EM CULTIVO HETEROTROFICO DE MICROALGA *PHORMIDIUM* SP.

A. S. FERNANDES¹, S. R. KACHUK-SILVA¹, D. B. RODRIGUES¹, A. B. SANTOS¹,
E. JACOB-LOPES¹, L. Q. ZEPKA¹.

¹ 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 β -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 β -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*- β -caroteno ($70,22 \pm 0,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e 9-*cis*- β -caroteno ($8,0 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a partir da biomassa. Visando uma escala industrial a partir do cultivo heterotrófico de 10,000 m³/d, estima-se uma produção all-*trans*- β -caroteno 7.902,5 kg/ano e 4.944,7 kg/ano de 9-*cis*- β -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 β -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 β -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 β -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 $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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 μ 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 μ 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 μ 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 (λ 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*- β -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*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno com base nas informações obtidas na coluna C30.

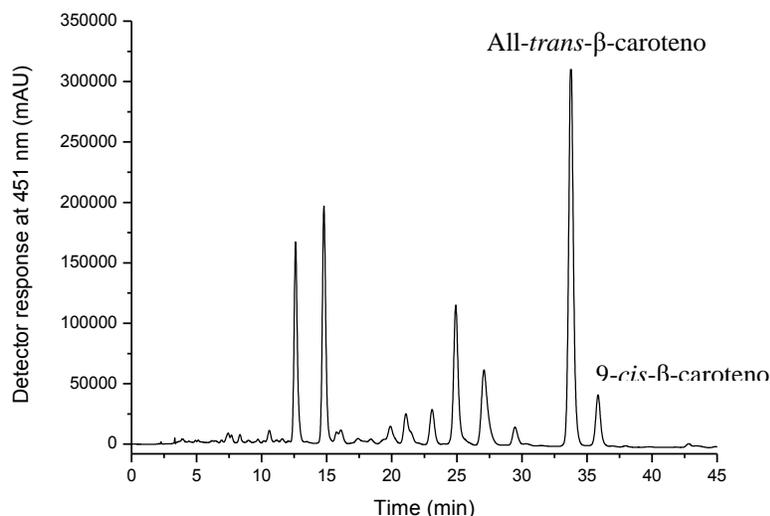


Figura 1 – Cromatograma, obtido por meio de HPLC-PDA, do extrato da biomassa de carotenoide da microalga *Phormidium* sp.

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 ³ /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 (100m³/d), média (1.000 m³/d) e grande indústria (10.000 m³/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*- β -caroteno (397,1 para 39.717,3 kg /ano) e seu isômero 9-*cis*- β -caroteno (49,4 para 4,944.7 kg/ano).

O conteúdo de carotenoides totais foi de 183.03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 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 ⁻¹)	Capacidade industrial		
	100 (m ³ .d ⁻¹)	1000 (m ³ .d ⁻¹)	10000 (m ³ .d ⁻¹)
Total carotenoids	1.079,0	10.790,3	107.902,5
All- <i>trans</i> - β -carotene	397,1	3.971,7	39.717,3
9- <i>cis</i> - β -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*. Badel: 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.