

PRODUÇÃO DE EQUINENONA A PARTIR DO CULTIVO HETEROTRÓFICO DE MICROALGA *PHORMIDIUM* sp

S. R. KACHUK-SILVA¹, D. B. RODRIGUES¹, A. S. FERNANDES,¹ A B. SANTOS¹, E.
JACOB-LOPES¹, L.Q. ZEPKA¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Departamento Tecnologia e Ciência dos Alimentos
E-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br

RESUMO – Microalgas são importantes fontes comerciais para a produção de produtos químicos de alto valor agregado, como os carotenoides. O objetivo do trabalho foi investigar a produção de equinenona a partir da microalga *Phormidium* sp. em cultivo heterotrófico. A biomassa foi obtida através do cultivo heterotrófico, em reator de coluna de bolhas operando em regime de batelada utilizando 2 litros de água residuária como meio de cultura. A extração dos carotenoides da biomassa foi feita por ultrassom com sonda de 13mm, e a identificação dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, compostos por cromatografia de padrões idênticos. Os resultados demonstraram que as condições de produção de biomassa, visando uma escala industrial de 10.000 m³/d, podem ser estabelecidas permitindo uma produção de 12.728,9 kg.ano⁻¹ de all-*trans*-equinenona e 9.991,9 kg.ano⁻¹ de *cis*-equinenona.

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são consideradas fontes comerciais para a produção de uma grande diversidade de biomoléculas, apresentando inúmeras vantagens quando comparado a matérias primas convencionais, tais como, a disponibilidade de cultivo em terras não aráveis, à possibilidade de crescimento em águas residuais e a versatilidade de modificação de composição bioquímica em função das condições de cultivo (Olaizola, 2003; Li *et al*, 2007; Sheehan *et al*, 1998; Stephenson *et al*, 2010).

As microalgas quando submetidas a modificações nas condições de cultivo, sofrem aumento na produção de alguns compostos de interesse, como os carotenoides (Aflalo *et al*, 2007; García-Malea *et al*, 2009; Shahid *et al*, 2013). Industrialmente, carotenoides como a astaxantina são responsáveis pela coloração vermelha de muitos animais marinhos, como o salmão (Chien e Shiau, 2005). Estima-se que 15 % do custo da produção de salmão está relacionado com a utilização da astaxantina, o que limita economicamente esta cadeia produtiva (Mann, *et al.*, 2000). Nesse sentido, pesquisas vem sendo realizadas na busca de fontes alternativas para produção de cetocarotenoides (Misawa, 2009; Zhu *et al*, 2009).

Cetocarotenoides como a equinenona e a cataxantina que apresentam cromóforo com números superior de ligações duplas conjugadas que o all-*trans*- β -caroteno e característica

estrutural semelhante a astaxantina são carotenoides majoritários em biomassa microalgal e apresentam um apelo econômico promissor (Albrecht *et al*, 2000; Klassen; Foght, 2011). As microalgas possuem uma ampla versatilidade metabólica o que contribui para a habilidade de sintetizar carotenoides em quantidades consideráveis com estruturas químicas diferenciadas (Albrecht *et al*, 2000; Mandelli *et al*, 2012). Em face disso, este trabalho tem por objetivo a avaliação do potencial da produção natural de equinenona a partir da microalga *Phormidium* sp. em cultivo heterotrófico de águas residuárias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e meios de cultura

Culturas de *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⁻¹) contendo meio BGN sintético (Rippka *et al*, 1979). As condições de incubação usadas foram de 25 °C, uma densidade de fluxo de fótons de 15 μmolm⁻²s⁻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. As culturas foram realizadas em um biorreator (Francisco *et al*, 2014), operando em regime de batelada utilizando 2,0 L de água residuária como meio de cultura. As condições experimentais foram as seguintes: concentração inicial do inóculo de 100 mg.l⁻¹, temperatura de 26 °C, pH 7,6, razão de carbono/nitrogênio de 30 (ajustado com glicose), na ausência de luz e tempo de residência de 168 horas. A biomassa foi separada do efluente por centrifugação e liofilizada. Os cultivos foram realizados em duplicata.

2.3 Métodos analíticos

Extração de carotenoides. Os carotenóides foram extraídos por ultrassom (UAE) utilizando um processador ultra-sônico (Sonics, Anaheim, CA, EUA) com uma sonda de 13 mm de diâmetro. As amostras secas (2 ± 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 em 61 μm. 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 12 h com 10% (m/v) de hidróxido de potássio (KOH) em metanol, à temperatura ambiente (25°C). 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.

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 μL (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 “íon trap” com 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 com Zepka e Mercadante, 2009. A separação dos carotenóides foi realizada em uma coluna C30 YMC (5 μm , 250 x 4.6 mm id) (Waters, Wilmington, DE, EUA).

A identificação foi realizada em função da ordem de eluição na coluna C30, co-cromatografia com padrões, as características de espectro 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 a literatura (Britton, Liaaen-Jensen e Pfander, 2004; De Rosso e Mercadante, 2007; Zepka e Mercadante, 2009; Van Breemen *et al*, 2012).

Os carotenoides foram quantificados usando curvas analíticas de cinco pontos com padrão de *all-trans*- β -caroteno (1.1-30.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

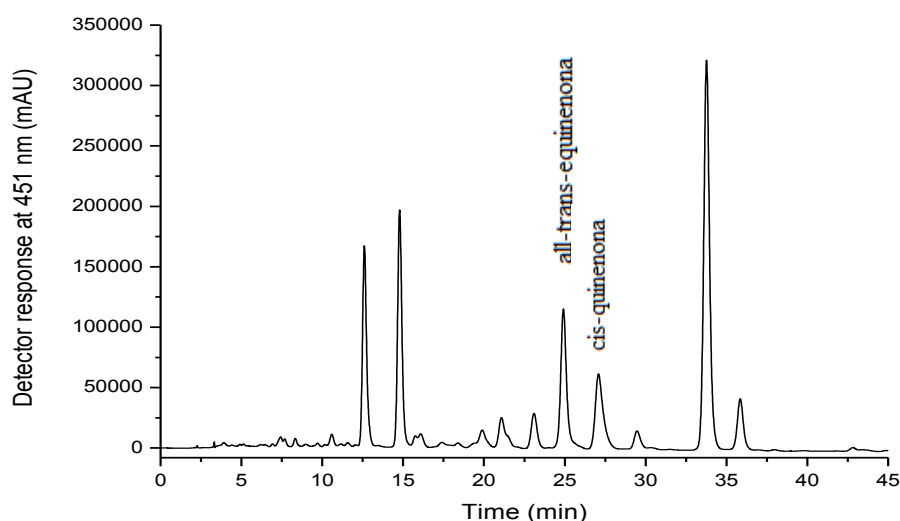


Figura 1. Cromatograma do extrato de carotenoides da biomassa.

Na Figura 1 pode se observar a separação de vinte carotenoides, sendo identificados a *all-trans*-equinonona e *cis*-equinonona com base na informação obtida na coluna C30. Os

carotenoides *all-trans*-equinenona e *cis*-quinenona apresentaram o mesmo padrão de fragmentação de massas. Considerando as características do espectro UV-Vis o isômero *all-trans*-equinenona exibiu estrutura fina correspondente a presença de um grupo carbonila (463 nm), o espectro UV-Vis da *cis*-quinenona corresponde a um deslocamento hipsocromo de 9 nm (452 nm) e o aparecimento de um pico *cis* (344 nm) quando comparado com a conformação *all-trans*. Os espectros de massas de ambas estruturas obtidas no modo íon positivo forneceram moléculas protonada de M/Z 559 e fragmentação MS/MS de M/Z 553 $[M+H-18]^+$ e M/Z 459 $[M+H-92]^+$ que correspondem a perda de uma molécula de água e de um grupamento de tolueno a partir da cadeia poliênica (Tabela 1)

Tabela 1. Características cromatográficas, UV-Vis e de espectro de massas obtidas por HPLC-PDA-MS/MS do extrato de carotenoides da biomassa *Phormidium* sp.

Carotenoides	UV-Vis características			Fragmentos ions (modo positivo) (m/z)		Conteúdos de Carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^d
	t _R (min) ^a	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ^b	AB/II (%) ^c	[M+H] ⁺	MS/MS	
All-trans-equinenona	24.9	463	0	551	533 $[M+H-18]^+$, 495, 459 $[M+H-92]^+$, 203	19.87 ± 0.9
Cis-equinenona	27.1	344, 452	19	551	533 $[M+H-18]^+$, 495, 459 $[M+H-92]^+$, 203	15.70 ± 0.1

^aTr: Tempo de retenção na coluna C30.

^bgradiente linear de metanol:TBME

^crazao entre o pico *cis* e o pico II

^dn=3

Através do balanço de massa, foram realizadas estimativas teóricas do aumento de escala do processo, considerando em diferentes escalas industriais. Conforme o tamanho da planta foi estimado a produção de biomassa de 5.690, 56.902 e 56.9016 ton_{biomassa}ano⁻¹ numa pequena (100m³.d⁻¹), média (1.000 m³.d⁻¹) e grande (10.000 m³.d⁻¹) indústria respectivamente, resultando numa produção total de carotenóides de 107.902,5 kg.ano⁻¹. No que se refere a produção de *all-trans*-equinenona nas mesmas condições citadas acima estimou-se 127,3, 1.272,9 e 12.728,9 kg.ano⁻¹ enquanto seu isômero *cis*-quinenona 99,9, 999,2 e 9.991,9 kg.ano⁻¹ respectivamente. O interesse na produção de carotenoides a partir de microalgas deve-se ao fato destes pigmentos apresentarem relevante importância comercial. Como estes pigmentos são sintetizados biotecnologicamente, a produção, é considerada renovável com elevado potencial de aplicabilidade econômica (Armstrong *et al*, 1997; Mendonça *et al*, 2012).

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, verifica-se o potencial de aplicação destas rotas tecnológicas para a produção em escala industrial de equinenona na conformação *trans* e *cis* por *Phormidium* sp. cultivada em efluentes agroindustriais.

5. REFERÊNCIA

ALBRECHT, M. et al. Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 18, 843-846, 2000.

AFLALO, C., MESHULAM, Y., ZARKA, A., BOUSSIBA, S. On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioenerg.*, 98, 300-305, 2007.

ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis, a colourful tale. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 629-659, 1997.

BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S., PFANDER, H. (EDS.). Carotenoids: handbook. Birkhäuser Verlag, Basel, 2004.

CHIEN, Y.H., SHIAU, W.C. The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *J.Exp. Mar.Biol.Ecol.*, 318, 201-211, 2005.

DE ROSSO, V.V., MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 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 Biosystems Engineering*, 36, 1986-1995, 2014.

GARCÍA-MALEA, M.C., ACIÉN, F.G., DEL RÍO, E., FERNÁNDEZ, J.M., CERÓN, M.C., GUERRERO, M.G., ET AL. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the onestep system outdoors. *Biotechnol. Bioeng.*, 102, 651-657, 2009.

LI, X., XU, H., WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 98, 764-771, 2007.

KLASSEN, J. L.; FOGHT, J. M. Characterization of hymenobacter isolates from Victoria Upper Glacier, Antarctica reveals five new species and substantial non-vertical evolution within this genus. *Extremophiles*, 15, 45-57, 2011.

MANDELLI, F., MIRANDA, V.S., RODRIGUES, E., MERCADANTE, A.Z. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. *World J. Microb. Biot.*, 28, 1781–1790, 2012.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, I. J.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. *Cadernos de Prospecção Tecnológica*, 5, 44-52, 2012.

MISAWA, N. Pathway engineering of plants to ward astaxanthin production. *Plant Biotechnol.*, 26, 93–99, 2009.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.*, 20, 459-466, 2003.

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. Microbiol.*, 111, 1–61, 1979.

SHAHID, M., SHAHID-UL-ISLAM, MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. *J. Clean. Prod.*, 53, 310-331, 2013.

SHEEHAN, J., DUNAHAY, T., BENEMANN, J., ROESSLER, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. NREL/TP-580-24190. U.S. Department of Energy, Washington D.C. (United States), 1998.

STEPHENSON, A.L., KAZAMIA, E., DENNIS, J.S., HOWE, C.J., SCOTT, S.A., SMITH, A.G. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels*, 24, 4062-4077, 2010.

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

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

ZHU, C., NAQVI, S., CAPELL, T., CRISTOU, P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch.Biochem.Biophys.*483,182– 190, 2009.