

# **INTERFERÊNCIA DO pH INICIAL E VOLUME DE MEIO NA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus pararoseus***

M. N. TAVARES<sup>1</sup>, C. S. SÁ<sup>1</sup>, C. M. BORBA<sup>1</sup>, C. C. MORAES<sup>2</sup> e 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

E-mail para contato: carinamolinsborba@yahoo.com.br

**RESUMO** – Fatores como composição do meio, temperatura, aeração e pH podem interferir na produção de microbiana de carotenoides. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do pH inicial (3 à 5) e a relação de volume de meio para volume de reator (3:10 à 7:10) no cultivo em frascos agitados para produção de carotenoides por *S. pararoseus*. Na faixa estudada, apenas a variável pH apresentou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a resposta carotenoides totais. Os valores máximo de carotenoides totais alcançados foram de 204,7 (ensaio 2) a 463,9  $\mu\text{g/L}$  (ensaio 1) e para biomassa de 4,6 (ensaio 4) a 13,6 g/L (ensaio 1), sendo que os menores valores na produção de carotenoides e de biomassa ocorreram nos ensaios com pH 5,0 (nível +1). A produção em pH próximo a 3 levou a uma aumento e aproximadamente 56% na produção de carotenoides e 66% na biomassa foi produzida nesse pH do que em comparação ao pH 5.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, apresentando papel de destaque na fotossíntese e fotoproteção de sistemas vegetais e como precursores de vitamina A nos seres humanos. Além de funções nos sistemas biológicos, apresentam também grande importância para a indústria farmacêutica na elaboração de cosméticos e como aditivo alimentar na indústria de alimentos (DAMODARAN, et al., 2010).

Diversos estudos demonstram que a composição do meio empregado pode interferir na bioprodução desses pigmentos, além disso, outras condições externas do cultivo como temperatura, agitação, aeração e pH também levam a alterações como variedade e quantidade de carotenoides produzidos pelo micro-organismo (RIBEIRO, et al., 2011; SCHWARTZ, 2010).

Em vista do apresentado o presente trabalho possui como objetivo avaliar a interferência do pH inicial e a relação  $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$  na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1. Preparo do inóculo e Bioprodução

Para a reativação, foram realizados repiques a partir das culturas estoques contendo o mesmo meio e incubados por 48 h a 25°C. Aos tubos de reativação foram adicionados 1 mL de água peptonada (0,1%) para ressuspensão da biomassa, posteriormente adicionada em 9 mL de caldo composto por 40 g/L de melaço e 6,5 g/L de água de maceração de milho, pré-tratado com ácido sulfúrico segundo Machado (2013), sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. O inóculo foi preparado em frascos agitados de 250 mL contendo 90 mL do meio já citado anteriormente, adicionado de 10 mL de cultivo oriundo da reativação, sendo incubados a 180 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.

Os ensaios de bioprodução foram realizados Erlenmeyers de 500 mL à 150 rpm, 27,5°C por 240 h, com acompanhamento de biomassa (g/L) através de uma curva padrão, pH em potenciômetro, açúcares redutores totais – ART (g/L) pelo método DNS (MILLER, 1959) com curva padrão de glicose e hidrólise ácida das amostras e carotenoides totais (µg/L). Os valores de pH e volume de meio foram definidos através de um planejamento experimental  $2^2$  com 3 pontos centrais (Tabela 1).

## 2.2. Rompimento celular e obtenção dos extratos carotenogênicos

Para a determinação da concentração de carotenoides a biomassa foi seca por 48 h a 35°C, macerada em gral, padronizada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012) e congeladas por 48 h. Para o rompimento celular 0,05 g de biomassa foram adicionados de 2 mL de DMSO a 55°C e homogeneizadas por 1 min em vórtex, em intervalos de tempo de 15 min, até completar um período de 1 h de contato (FONSECA *et al.*, 2011). 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 da célula. Aos sobrenadantes foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p.v<sup>-1</sup>) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases a fase apolar foi filtrada com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dando origem aos extratos carotenogênicos (MICHELON, *et al.*, 2012).

## 2.3. 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 absorvância a 448 nm, utilizando a Equação 1, e sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β-caroteno em éter de petróleo com absorvidade específica de = 2592) de acordo com Davies (1976).

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

Onde: CT = concentração específica de carotenoides de totais (µg/g); A = absorvância; V = volume (mL);  $m_{\text{amostra}}$  = massa celular seca (g);  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = absorvidade específica. Os valores de carotenoides totais foram convertidos à valores de carotenoides totais (µg/L) utilizando-se a concentração de biomassa (g/L).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os valores codificados e reais das variáveis independentes pH e relação  $V_{meio}:V_{reator}$  e as respostas em carotenoides totais. Considerando as variáveis pH e  $V_{meio}:V_{reator}$ , foi realizada a verificação do modelo de primeira ordem analisando a resposta carotenoides totais.

Para verificação do modelo foram calculados os efeitos, erro padrão, limites de confiança e os coeficientes de regressão (Tabela 2). A análise de anova também foi realizada

Tabela 1- Delineamento experimental  $2^2$  (valores codificados e reais) e valores para resposta carotenoides totais

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Carotenoides Totais (µg/L)
1	-1,00 (3)	-1,00 (3:10)	463,9
2	1,00 (5)	-1,00 (3:10)	204,7
3	-1,00 (3)	1,00 (7:10)	468,4
4	1,00 (5)	1,00 (7:10)	265,8
5	0 (4)	0 (1:2)	338,9
6	0 (4)	0 (1:2)	337,7
7	0 (4)	0 (1:2)	426,7

X<sub>1</sub>: pH inicial; X<sub>2</sub>:  $V_{meio}:V_{reator}$

Tabela 2- Efeito, erro padrão, limites de confiança e coeficiente de regressão do modelo linear

Carotenoides Totais (µg.L <sup>-1</sup> )						
	Efeito	EP	t(3)	p	Coeficiente de Regressão	p
Média	358,0	16,5	21,7	p<0,01	358	<0,01
X <sub>1</sub> (L)*	-230,9	43,6	-5,3	0,01	230,9	<0,01
X <sub>2</sub> (L)	32,8	43,6	0,7	0,51		
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	28,3	43,6	0,6	0,56		

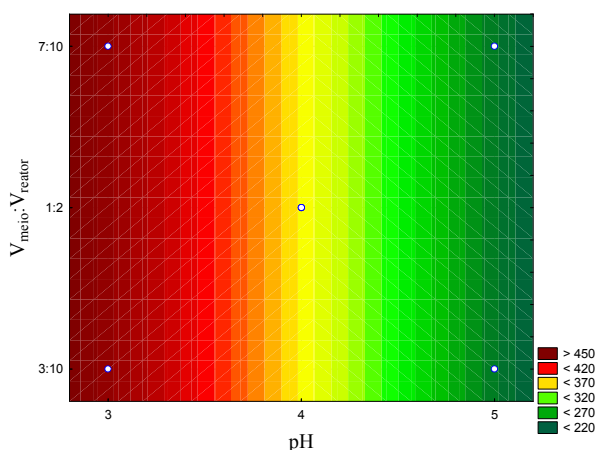
$$\text{Carotenoides Totais} = 358 - 230,4 \cdot \text{pH} \quad (2)$$

Apenas a variável pH apresentou efeito significativo sobre a produção de carotenoides totais dentro da faixa estudada. Sendo que a mudança do pH do nível -1 para +1 acarretou um decréscimo de aproximadamente 115% na resposta. Para uma possível observação do efeito do volume de meio sobre a resposta seria necessário uma ampliação na faixa estudada.

Através da curva de contorno obtida, torna-se mais fácil perceber que, indiferentes do volume de meio utilizados, quanto mais próximo o valor de pH está do nível -1 melhores os resultados obtidos. A equação 2 é o modelo matemático para carotenoides totais. Os valores máximos de carotenoides totais variaram entre 204,7 (ensaio 2) a 463,9 µg/L (ensaio 1). Já os valores de biomassa máxima variaram entre 4,6 (ensaio 4) a 13,6 g/L (ensaio 1). Os menores valores na produção de carotenoides e de biomassa ocorreram nos ensaios com pH no nível +1 (5,0), sendo que no ensaio 4, onde a produção de biomassa foi a menor de todas, além do

pH 5 a relação  $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$  estava no nível +1 (350 mL de meio). Esse volume de meio mais elevado, provavelmente levou a uma maior dificuldade na dissolução do oxigênio no meio diminuindo a taxa de transferência de oxigênio (OTR).

Figura 1- Curvas de contorno para produção de carotenoides totais



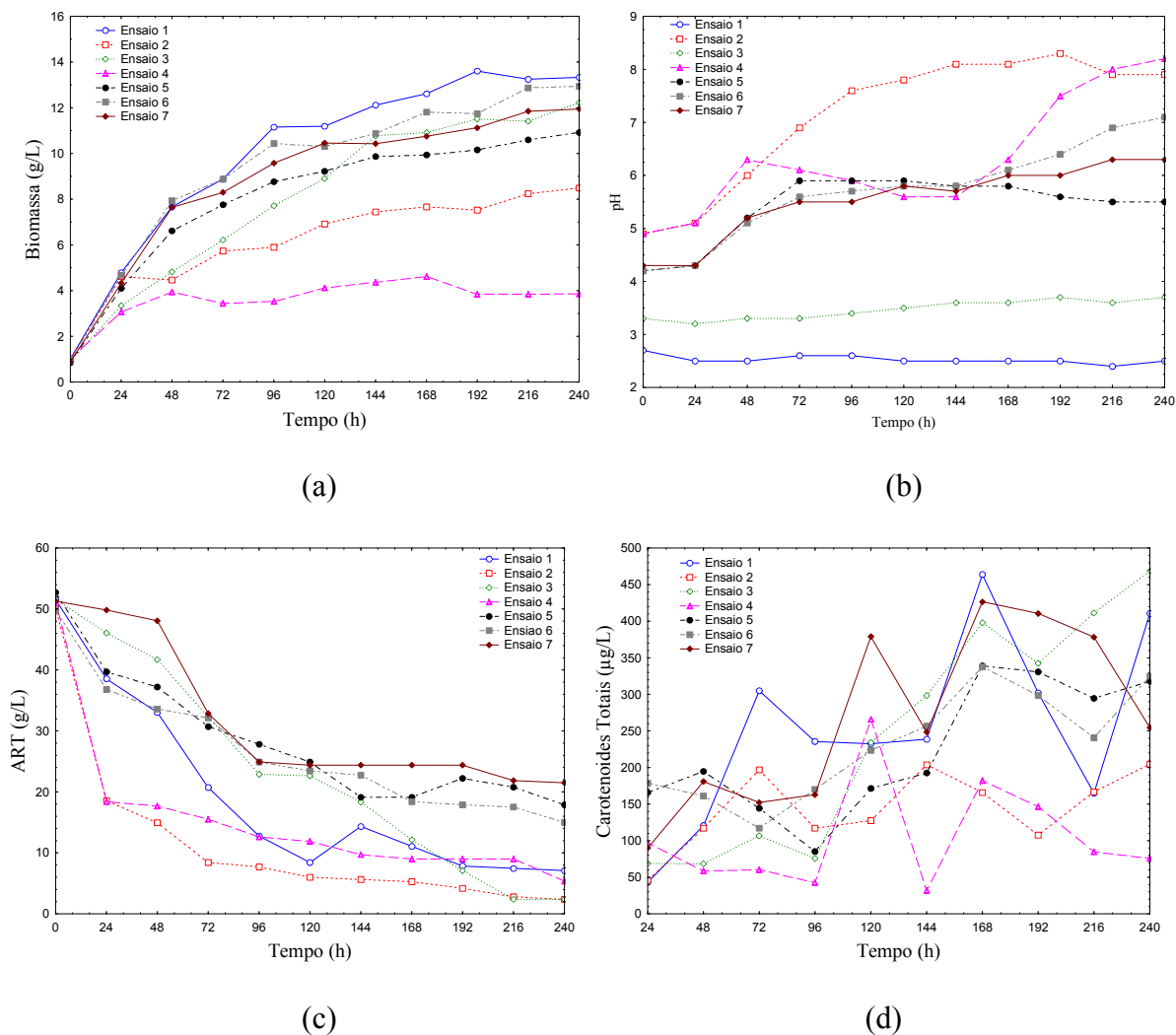
Uma aeração suficiente parece ser de extrema importância para o progresso da produção, sendo um pré-requisito para a produção satisfatória de  $\beta$ -caroteno. Assim sendo, um certo nível de stress oxidativo auxilia na produção de carotenoides, visto que estimula a produção de compostos antioxidantes como o  $\beta$ -caroteno. Porém valores de OTR muito altos podem acarretar a oxidação desses pigmentos, resultando em menores valores de produtividade (MANTZOURIDOU, *et al.*, 2005).

Os valores mais elevados para as duas respostas foram encontrados no ensaio 5, onde o pH e a relação  $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$  foram mantidos no ponto central (pH 4 e 250 mL de meio). Na Figura 2 está apresentado o acompanhamento cinético dos cultivos através dos valores de biomassa (a), pH (b), ART (c) e carotenoides totais (d). Os ensaios 1, 3 e 5 apresentam mudanças de pH pouco acentuadas, sendo que os ensaios 2 e 4 essas mudanças foram mais perceptíveis. Esses dois ensaios apresentaram um consumo de substrato superior a 60% nas primeiras 24 horas e os menores valores de biomassa, podendo essas três observações estarem relacionadas.

Durante o estudo da produção de carotenoides por *S. salmonicolor* (CBS 2636) em dois meios de cultivo, um meio sintético e outro agroindustrial (5 g.L<sup>-1</sup> água de maceração de milho, 10 g.L<sup>-1</sup> de melaço e 5 g.L<sup>-1</sup> de hidrolisado de levedura - Prodex Lac®), os autores perceberam que em aproximadamente 100 h, ponto onde ocorreram as maiores produções de carotenoides (913  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para o meio sintético e 502  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para o meio agroindustrial), as concentrações de glicose era de 20 e 0,2 g.L<sup>-1</sup>, para o meio sintético e agroindustrial, respectivamente. O pH do meio sintético apresentou pouca variação (de 4 para 3,7) enquanto que o meio agroindustrial apresentou uma elevação considerável de 4 para 8,5, comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Os autores relacionam essas alterações de pH a uma possível proteólise das células, um fenômeno natural devido a escassez de substrato e consequente degradação dos aminoácidos, o que leva a liberação de compostos amoníacos que elevam o pH a faixas alcalinas, principalmente quando o micro-

organismo não possui capacidade de assimilar outra fonte de carbono (VALDUGA, et al. 2009).

Figura 2- acompanhamento cinético dos ensaios do delineamento composto central 2<sup>2</sup> : biomassa (a), pH (b), ART (c) e carotenoides totais (d)



## 4. CONCLUSÃO

Os valores máximos de carotenoides totais variaram entre 204,7 (ensaio 2) a 463,9 µg/L (ensaio 1). Já os valores de biomassa máxima variaram entre 4,6 (ensaio 4) a 13,6 g/L (ensaio 1). Foi possível perceber que, a produção em pH próximo de 3 levou a uma aumento e aproximadamente 56% na produção de carotenoides e 66% mais biomassa foi produzida nesse pH do que em comparação ao pH 5.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DAVIES, B. H. Chemical Biochemistry Plant Pigments. GOODWIN, T. W., Academic Press: New York, 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*. African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.
- MACHADO, W. R. C. Otimização da produção de carotenoides por *Sporidiobolus 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.
- MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T. ACHATZ, B. Effect of oxygen transfer rate on  $\beta$ -carotene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in shake flask culture. Enzyme and Microbial Technology, v. 37, p. 687-694, 2005.
- MICHELON, M.; de 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 different techniques of cell disruption. Food Science and Biotechnology, v. 21, n. 1, p. 1-8; 2012
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological Aspects of  $\beta$ -Carotene Production. Food Bioprocess Technology, v. 4, p. 693–701, 2011.
- SCHWARTZ, C. R. M. Otimização da produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmicolor* CBS 2636 em biorreator. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.
- VALDUGA, E, VALERIO, A., TREICHEL, H., FURIGO, A.J., Di LUCCIO, M., Kinetic and stoichiometric parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 157, p. 61-69, 2009.