

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula aurantiaca*

Daniella Claudia de França Cavalcanti¹; Tânia Lúcia Montenegro Stamford²

¹Estudante do Curso de Nutrição- CCS – UFPE; E-mail: danielladefranca@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto. de Nutrição – CCS – UFPE; E-mail: tlmstamford@yahoo.com.br.

Sumário: Pigmentos carotenóides são largamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em vegetais, animais, e micro-organismos tais como as leveduras do gênero *Rhodotorula* que apresentam elevada produção destes compostos. O objetivo da pesquisa foi avaliar a produção de pigmentos carotenóides por *Rhodotorula* spp. em fermentação submersa, utilizando como fonte de carbono o resíduo (glicerina residual) da produção de biodiesel. As leveduras utilizadas foram: *R. aurantiaca* URM6687 e *R. minuta* URM6693. A seleção das leveduras foi realizada determinando-se o crescimento em meio de fermentação a base de glicerina residual (30 a 100 g.L⁻¹) como substrato (único ou adicionado de glicose) e duas diferentes fontes de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio). A extração dos carotenóides foi realizada com os solventes DMSO (Dimetil Sulfóxido), acetona e éter de petróleo. Os carotenóides totais foram determinados por espectrofotometria e o β -caroteno por HPLC/CLAE. O fornecimento de glicerina residual como fonte de carbono e de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento das leveduras. As leveduras produziram carotenóides em quantidade variáveis, sendo que a *R. minuta* URM6693 produziu β -caroteno determinado pelo HPLC. Conclui-se que a glicerina residual pode ser utilizada como fonte de carbono para a produção de carotenóides, entre eles o β -caroteno.

Palavras-chave: β -caroteno; extração; leveduras; processos fermentativos

INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais vastamente encontrados em diversas espécies vegetais e em alguns micro-organismos. São classificados em dois grupos: carotenos e xantofilas. Os carotenos são os carotenóides hidrocarbonetos, que são formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio. β -caroteno e licopeno, são exemplos dos carotenos mais comuns. Já as xantofilas, são os derivados oxigenados dos carotenos e podem conter grupos funcionais de hidroxila, carbonila, metoxila, carboxila e epóxi. Como exemplos de xantofilas temos a zeaxantina, a cantaxantina, a espiriloxantina, a torularodina e a violaxantina (TRÊS *et al.*, 2007; RIVERA & CANELA-GARAYOA, 2012). O β -caroteno é um potente antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares. A oxidação do LDL-colesterol é fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose onde o β -caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína. Estudos apontam que a luteína e a zeaxantina, que são amplamente encontradas em vegetais verde-escuros, parecem exercer uma ação protetora contra degeneração macular e catarata (AMBROSIO, *et al.* 2006). O β -caroteno é um pigmento de coloração amarelo-avermelhado, é um precursor da vitamina A e é tido como principal fonte desta vitamina, por apresentar atividade antioxidante e pró-vitamina A (AMÂNCIO & SILVA, 2012). É um interessante corante alimentar natural devido ao valor nutricional que associa aos produtos, (PAZ *et al.*, 2012). Favorece a bioacessibilidade ao ferro e ao zinco, podendo ser extraído de fontes vegetais assim como através da fermentação microbiana (GAUTAM *et al.*, 2010;

RIBEIRO, *et al.* 2011). É encontrado em diversas espécies vegetais, em especial, em vegetais amarelo-alaranjados e folhosos. Dentre os micro-organismos produtores de carotenoides, temos as espécies pertencentes aos gêneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* e *Phaffia*. É crescente o uso de processos fermentativos com vistas a produção de carotenóides naturais. Contudo, por possuírem natureza intracelular, os custos de produção aparecem como fator significante. (AKSU & EREN, 2007). O crescente interesse por biocombustíveis como o biodiesel tem gerado um aumento na quantidade de subprodutos, como a glicerina loira (ou bruta), que apresenta cerca de 80% de glicerol na sua composição. Com isso uma crescente disponibilidade do mesmo é esperada. (TABOSA, 2009; MOTA & PESTANA, 2011). O uso do glicerol como fonte de carbono para a síntese de moléculas de alto valor agregado, tem sido mais uma das aplicações que tende a se desenvolver (TABOSA, 2009). Daí vem a importância do uso deste resíduo industrial como uma alternativa de baixo custo que possibilitará uma relação custo-benefício favorável no que se refere a bioprodução de carotenoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

A Glicerina residual foi produzida e cedida pela Usina Experimental de Biodiesel – Biofábrica Governador Miguel Arraes. A produção de carotenóides foi realizada a partir da biomassa de leveduras do gênero *Rhodotorula* isolados de frutos, pertencentes à coleção de culturas da Micoteca URM-UFPE, do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. As culturas foram mantidas em tubos inclinados com meio Ágar Sabouraud. Após a inoculação, o crescimento ocorreu em estufa a 30°C por 3 a 5 dias. As culturas foram conservadas no refrigerador a 4°C e repicadas mensalmente. Os parâmetros analisados foram: glicerol residual (puro ou adicionado de glicose) numa faixa de 30 a 100g/L, fontes de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio), visando a otimização da produção de carotenóides, em especial o β -caroteno. Para obtenção do inóculo, as leveduras foram cultivadas em Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de Caldo Sabouraud, sob agitação de 150 rpm em shaker, a 30°C, por 24 horas. Após o crescimento, 10mL do inóculo (concentração inicial de 10%) foi transferido para 90mL do meio de cultivo. Para estimar o número de células presentes no inóculo, uma alíquota de 1mL do inóculo foi submetida a diluição de 10^{-1} a 10^{-8} em tubos com 9mL de água estéril. As diluições foram plaqueadas em Ágar Sabouraud através da técnica pour-plate. Após 48h, foi feita a contagem das UFC em cada placa, com número de colônias variando entre 30 a 300, determinando o número de células. As fermentações foram realizadas em três fases. Na primeira fase em meios constituídos por glicose, ou glicerina P. A., ou glicerina residual ou ainda pela associação glicerina bruta e glicose (1:1), como fonte de carbono numa concentração de 30g/L (3%) e ajuste de pH. Na segunda etapa, foram analisados os crescimentos obtidos em meios constituídos pela fonte de carbono nas concentrações de 30, 50 e 100g/L (3, 5 e 10%). A relação C/N (carbono/nitrogênio) foi avaliada na terceira etapa, cujas fontes de nitrogênio testadas foram uréia e sulfato de amônio, nas concentrações de 2,27g/L e 5g/L, respectivamente, perfazendo um total de 1,06g de N. A concentração de carbono, foi de 1,96g de C, sendo a relação C/N igual a 1,85. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Amostras foram retiradas a cada 12 ou 24 horas para avaliação da biomassa. Para extração de carotenoides o conteúdo de cada Erlenmeyer foi centrifugado a 3000×g por 5 minutos, tendo sido o “pellet” ressuspendido em 5 mL de água destilada estéril, agitado em vórtex e centrifugado a 3000×g por 5 min. Um volume de 10 mL do sobrenadante foi reservado a -20°C. Ao “pellet” foi adicionado 1mL de DMSO (Dimetil Sulfóxido) sendo agitados em vórtex por 1 min, homogeneizando-os. A mistura foi incubada em banho-maria a 55°C por 1 hora e centrifugada a 3000×g por 5 min. O sobrenadante foi reservado em tubo e mantido a -20°C. Repetindo-se as três etapas

anteriores. Adicionou-se 1 mL de acetona P. A. ao pellet, extraiu-se os pigmentos por agitação vórtex durante 1 min e centrifugou-se a mistura a 3000×g por 5 min, juntando a fração de acetona do sobrenadante à fração de DMSO já reservada. Repetiu-se esta etapa até extração exaustiva. Aos extratos obtidos (DMSO e Acetona) foram adicionados 2 mL de éter de petróleo (35-60°C) e 0,5 mL de solução saturada de NaCl a 5°C, e agitados em vórtex por 15 seg. A mistura foi centrifugada a 3000×g por 10 min a 5°C. Coletou-se a fase de éter de petróleo, com os pigmentos, a qual foram adicionados 5 mL de água destilada estéril a 5°C, misturados em vórtex por 30 seg e centrifugados a 3000×g por 10 min, coletando o sobrenadante. O éter de petróleo foi evaporado sob fluxo contínuo de N₂, concentrando os pigmentos, conforme Moliné et al. (2012). A quantificação dos carotenóides totais foi realizada em espectrofotômetro e a identificação do β-caroteno em CLAE/HPLC. A biomassa foi avaliada mediante turbidimetria a uma absorbância de 570 nm. Posteriormente foi quantificada mediante gravimetria, segundo Orozco *et al.* (2003). Para determinação da concentração de biomassa em unidade de massa/volume, foi utilizado o método de determinação de massa seca. A biomassa úmida foi submetida a secagem em estufa, a 100°C até completa secagem. Os tubos foram pesados como proposto por Moliné *et al.* (2012). O pH foi analisado utilizando-se Fitas Indicadoras de pH (MERCK). Os carotenóides totais foram quantificados em espectrofotômetro Biospectro – Modelo SP-22, sob um comprimento de onda de 485nm sendo quantificado como β-caroteno. O β-caroteno todo trans (pureza ≥97% - SIGMA-ALDRICH) foi utilizado como padrão para a construção da curva de calibração de β-caroteno. Todo o experimento foi realizado sob condições de baixa luminosidade. O β-caroteno foi determinado por meio de análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). Para quantificar o β-caroteno foram utilizadas duas curvas de calibração para um melhor ajuste. Uma ajustada para concentrações dentro de uma faixa de 0,003815 a 0,6 mg/L, e outra numa faixa de 0,6 a 2,1 mg/L. O glicerol foi determinado através de análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC). Para quantificar o glicerol, foi utilizada uma curva de calibração. Os resultados obtidos nos testes de fermentação foram analisados através do teste de análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%, e do teste estatístico de Tukey-Kramer, através do programa GradPad Instat.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leveduras apresentaram uma tendência de comportamento similar aquele dado em meios com fontes de carbono tradicionais, como a glicose e a glicerina P. A. Ratledge & Cohen (2008) explicam que micro-organismos oleaginosos como leveduras e algas precisam ser cultivados em condições limitadas de nutrientes e excesso de carbono, favorecendo a síntese de lipídios, uma vez que, neste caso, o carbono é usado para a acumulação de lipídios e carotenóides em vez de processos de proliferação de biomassa. Isto explica a baixa produção de biomassa, em termos de absorbância, apresentada pelas linhagens estudadas. Para Braunwald e colaboradores (2013), a principal restrição para aplicação em escala comercial desses processos com micro-organismos oleaginosos convencionais é o alto custo, sendo fundamental baratear utilizando fontes de carbono orgânico de baixo custo. A *R. minuta* URM6693 foi selecionada, devido a sua capacidade de produção de biomassa em meio a base de glicerina residual. O meio de cultivo formado por 50g/L de glicerina residual e uma relação carbono/nitrogênio (C/N) de 1,07 foi o mais adequado para a produção de biomassa, carotenóides totais e β-caroteno. Foi a que demonstrou maior poder de adaptação, apresentando a maior taxa de velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{max} = 0,0109h^{-1}$), os melhores rendimentos do produto sobre a biomassa ($Y_{P/X} = 14,27mg/g$) e sobre o substrato ($Y_{P/S} = 16,40mg/g$) e a maior produção

volumétrica de β -caroteno (1,021mg/L), sendo assim a mais eficiente. A relação carbono/nitrogênio (C/N) foi bem-sucedida quando da associação da glicerina bruta a 5% com o sulfato de amônio a 5%. A relação C/N do meio de crescimento desempenha um papel crucial, seja na rota metabólica dos lipídios ou dos carotenóides (BRAUNDWALD, 2013). Para Saenge et al. (2011), a relação C/N apresenta uma correlação positiva entre e produção de carotenóides.

CONCLUSÕES

A *R. minuta* produziu uma biomassa menor, porém a quantidade de β -caroteno foi significativa, em relação à *R. aurantiaca*. O fornecimento de glicerina residual como fonte de carbono e de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento das leveduras. Estes resultados demonstram que é possível a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de β -caroteno, desencadeando inúmeras possibilidades para obtenção de novos produtos, gerando ainda aplicações inovadoras de ampla gama de setores da indústria e do mercado de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq/PIBIC/UFPE pela concessão da bolsa; a orientadora Profa. Dra. Tânia L. Montenegro Stamford; a Msc Sabrina Santana, e demais funcionários dos laboratórios.

REFERÊNCIAS

- AMÂNCIO, R. D.; SILVA, M. V. (2012). Consumo de carotenóides no Brasil: a contribuição da alimentação fora do domicílio. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 19, n. 2, p. 130-141.
- AKSU, Z.; EREN, A. T. (2007). Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 107-113.
- BRAUNDWALD, T., SCHWEMMLEIN, L., GRAEFF-HONNINGER, S., FRENCH, W. T., HERNANDEZ, R., HOLMES, W. E., CLAUPEIN, W. (2013). Effect of different C/N-ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbial Biotechnology*, v. 97, p. 6581-6588.
- GAUTAM, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. (2010). Influence of β -carotene-rich vegetables on the bioaccessibility of zinc and iron from food grains. *Food Chemistry*, vol. 122, no. 3, p. 668-672.
- MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. (2011). Co-produtos da Produção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 5, p. 416-425.
- PAZ, E.D.; MARTÍN, Á. ESTRELLA, A.; RODRÍGUEZ-ROJO, S.; MATIAS, A.A.; DUARTE, C.M.M. and COCERO, M.J. (2012). Formulation of β -carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-on-water emulsions for application as natural colorant. *Food Hydrocolloids*, v. 26, n. 1, p. 17-27.
- RATLEDGE, C., COHEN, Z. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils?. *Lipid Technology*, v. 20, p. 155-160.
- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W., COELHO, M.A.Z. (2011). Technological aspects of β -carotene production. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 5, p. 693-701.
- RIVERA, S. M.; CANELA-GARAYOA, R. (2012). Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *Journal of Chromatography A*. v. 1224, p. 1-10.