

ESTUDO MOLECULAR DE ISOLADO INDUSTRIAL PRODUTOR DE CAROTENO E ANÁLISE DA EXTRAÇÃO DE CAROTENO

Izabelly Bianca da Silva Santos¹; Marcia Vanusa da Silva²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: izabelly.ufpe@outlook.com.

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCS – UFPE. E-mail: marciavanusa@yahoo.com.

Sumário: Identificação através de técnicas moleculares de um isolado industrial do grupo das leveduras produtor de caroteno e a análise da extração desse pigmento. Amplificar por PCR a região ITS (ITS1-5.8S-ITS2). A amostra foi submetida à extração de ADN, amplificação por PCR, purificação do produto utilizando kit de purificação e sequenciamento desse produto. Meios caldo LB e de crescimento controle e suplementado com melão de cana de açúcar foram utilizados para o crescimento da levedura em estudo. Para a extração do pigmento utilizou-se diferentes solventes orgânicos. A quantificação do pigmento foi feita através da obtenção da densidade óptica em diferentes comprimentos de onda a análise qualitativa foi obtida por meio de cromatografia de camada delgada. A leitura do Ph final e a curva de crescimento também foram realizados. As sequências do gene rADN apresentaram homologia maior que 97% sugerindo que o isolado industrial pertence a espécie *Rhodotorula glutinis*. Com a utilização de melão de cana de açúcar a concentração dos carotenóides obtida foi de concentração 85,23 essa foi maior que a concentração obtida usando o meio controle. Usar o melão é importante para poder baixar o custo da produção do betacaroteno através de síntese natural.

Palavras-chave: biotecnologia; identificação molecular; pigmentos naturais; *Rhodotorula glutinis*.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos, como as leveduras, são encontrados habitando tanto ambientes naturais como artificiais. Acredita-se que menos de 10% dos que existem no nosso planeta tenha sido descritos e caracterizados; e que a biosfera seja mantida devido a existência desses microrganismos (STALEY, 1989, *apud*. CANHOS e MANFIO). Há leveduras com capacidade de produzir pigmentos e essa produção pode ser explorada por meio de processos biotecnológicos. Nas indústrias a maior parte dos pigmentos que são usados são de origem sintética, porém esses produtos podem causar algum malefício ao homem como o desencadeamento de processos alérgicos. Em contrapartida há relatos dos pigmentos de origem natural sendo responsáveis por efeitos benéficos como contra o aparecimento de doenças do coração (DELGADO-VARGAS et al., 2000 *apud* UENOJO et al., 2007). O presente estudo teve como objetivo identificar através de técnicas moleculares um isolado industrial do grupo das leveduras produtor de carotenoide e a análise da extração desse pigmento. A utilização de técnicas moleculares se destaca em relação a outros métodos de identificação, pois nesse caso trata-se de uma identificação definitiva e correta. Devido as funções benéficas as quais os pigmentos estão atrelados, a busca de condições de crescimento e métodos de extração melhores são importantes para uma maior bioprodução e utilização desses pigmentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou um microrganismo isolado de uma amostra de usina sulco alcooleira localizada na capital de Pernambuco. O isolado está depositado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O cultivo foi no meio Wallerstein Nutrient (WLN) a 28°C e repiques mensais foram realizados para a manutenção do isolado. Para a realização da identificação molecular do isolado o ADN foi extraído segundo o método de Sambrook et al (1989) com algumas modificações de laboratório e a extração foi realizada em triplicata. Para mensurar a quantidade e a qualidade de ADN presente na amostra foi utilizado espectrofotômetro Nano vue onde a absorvância do ADN foi medida a 260nm e das proteínas foi a 280nm a razão das absorvâncias 260\280 permitiu verificar a pureza da amostra. A região ITS (ITS1-5.8S-ITS2) foi amplificada por PCR utilizando os *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTCCG3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') da Invitrogen (Weisburg et al.,1991). Após a extração do ADN e também após a amplificação da região ITS as amostras foram avaliadas por eletroforese, observadas em transiluminador de luz ultravioleta e foto documentadas. Os produtos da amplificação foram purificados com o kit PureLink (Invetrogen) e sequenciadas utilizando o sequenciador automático de ADN ABI 3100. Diferentes meios de crescimento foram utilizados para estimular o crescimento da levedura e produção de pigmentos. Um inóculo foi preparado em triplicata no meio em caldo Luria-Bertani (LB) utilizando 5ml do meio, que foi incubado em agitação por 24 horas, esse foi o inóculo para 45 ml de meio líquido LB em Erlenmeyer de 250 ml também em triplicata, durante 96 horas, alíquotas de 10 ml foram retiradas para a realização da extração do pigmento. Cada triplicata foi utilizada para a extração de pigmentos os solventes utilizados para a extração foram o DMSO (éter de petróleo + acetato de etila), a acetona a 100%, e o metanol a 100% a extração seguiu até que a biomassa ficasse de cor branca. A quantificação do caroteno foi realizada no espectrofotômetro entre os comprimentos de onda de 400 a 600nm, a absorção máxima foi a 480 nm e foi realizada nos tempos 0, 24, 48, 72, e 96 horas. Outros meios de cultura foram feitos e em outras condições para avaliar o crescimento e produção do pigmento pela levedura em estudo. A cultura foi semeada em 2 placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud e incubadas a 30°C durante 48 horas, após isso as culturas foram transferidas para quatro erlenmeyers de 125 ml contendo 25 ml de caldo Sabouraud incubados em 30°C durante 24 horas. Esse foi o inóculo na proporção 1\10 para dois meios de crescimento preparados em duplicata, o controle continha 15g/L de glicose, 2.5 g/L de extrato de levedura , 2 g/ L de extrato de malte, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L de KH₂PO₄ e 0,25 g/L deMgSO₄ • 7H₂O e o outro meio continha os mesmos constituintes do controle, mas foi suplementado com 20g/ L melação de cana de açúcar. O pH inicial foi de 6,5. A incubação foi numa estufa BOD a 30°C durante 96 horas. A densidade óptica da amostra foi mensurada por análise espectrofotométrica utilizou para isso o comprimento de onda de 600nm, nos tempos de 24, 48, 84 e 96 horas, nesse mesmo intervalo de tempo foi realizada a leitura no pHmetro PG1800 da GEHAKA do potencial hidrogeniônico (pH) final. Extraí o pigmento produzido pela levedura utilizando um método de extração e purificação que consistiu no uso dos solventes dimetilsufóxido (DMSO), acetona e éter de petróleo. Analisou quantitativamente o pigmento extraído no comprimento de onda de 485nm. Analisou qualitativamente a amostra por meio da cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como padrão o betacaroteno (sigma).

RESULTADOS

A extração do ADN cromossômico foi confirmada pela corrida eletroforética, onde cada repetição apresentou a mesma banda após o fim da eletroforese. As concentrações do ADN

extraído em ng/μl presente nas amostras e as razões entre as absorvâncias de 260nm (pico de absorção de UVs do ADN) e 280nm (pico de absorção de UVs de proteínas) encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Valores da quantificação do ADN extraído das linhagens e as razões entre A260/A280 .

Amostra/repetições	Concentração de ADN (ng/μl)	A260/A280
R-1	1630	1,929
R-2	1541	1,975
R-3	1655	2,003

Os produtos da amplificação da região ITS apresentaram um peso molecular de aproximadamente 800 pares de bases. A comparação das sequências de rADN da região ITS1-5.8S-ITS2 obtidas neste estudo com sequências presentes no banco de dados (GenBank) revelou similaridade acima de 97% com linhagens de espécies conhecidas (Tabela 2).

Tabela 2: Similaridade entre o isolado industrial e linhagens padrão de outras coleções.

Isolado/Repetições	Similaridade com <i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 204091 (taxid:1001064)	Similaridade com <i>Rhodotorula glutinis</i> ATCC 204091 (taxid:1001064)
R1	99%	98%
R2	99%	98%
R3	99%	98%

Observou-se que após a extração com os solventes DMSO (Éter de petróleo + acetato de etila), acetona 100% e metanol 100%, o solvente metanol a 100% foi o que conseguiu extrair mais pigmentos. A análise quantitativa do caroteno revelou que a produção de carotenoide cresceu, a partir, de 24 horas de incubação. A obtenção da curva de crescimento da levedura *Rhodotorula glutinis* em meios de crescimento controle e suplementado com melaço de cana de açúcar revelou que o crescimento máximo foi a 84 horas de incubação. A análise do pH no final de cada tempo revelou que em 24 horas a média do pH na amostra controle foi de 4,43, já a média na amostra suplementada foi de 4,51. No tempo de 94 horas as médias do pH foram 3,305 e 3,38 respectivamente do meio controle e do meio suplementado. O método de extração do pigmento utilizado consistiu na extração do pigmento e purificação da amostra, obtendo-se no final os pigmentos dissolvidos no solvente orgânico éter de petróleo. A análise quantitativa dessa amostra revelou que a concentração dos carotenoides foi de concentração 85,23 quando a levedura cresceu no meio suplementado com melaço de cana de açúcar e quando o crescimento foi no meio controle a concentração foi de 30,03. A cromatografia de camada delgada revelou a presença de betacaroteno na amostra extraída da levedura.

DISCUSSÃO

O método de extração de ADN utilizado mostrou-se eficiente para o isolamento do ADN das repetições. Estando as bandas do AND cromossômico na mesma posição. Os valores das concentrações de ADN extraído foi uma quantidade considerável. E uma amostra é considerada pura quando a razão A260/280 é $\geq 1,8$. Todas as amostras tiveram razões maiores que esse valor e

quanto maior esse valor maior é o grau de pureza das amostras. O tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação da região ITS está de acordo com os fragmentos da amplificação descritos na literatura. De acordo com Stackebrant e Goebel (1994), para considerar que isolados pertencem a diferentes espécies é necessário que eles possuam uma homologia na sequência do gene rADN da região ITS1-5.8S-ITS2 menor que 97%. As sequências do gene rADN da região ITS1-5.8S-ITS2 obtidas no presente estudo apresentaram homologia maior que 97%, sugerindo que o isolado do estudo pertence a espécie *Rhodotorula glutinis*. O solvente metanol utilizado para extrair o pigmento da levedura que cresceu em meio caldo LB teve um maior potencial de extração de pigmentos da biomassa. A análise quantitativa desse pigmento extraído revelou que uma produção considerável de pigmento ocorreu a partir de 24 horas de incubação e no tempo de 72 horas a produção de pigmento foi máxima, com a incubação adicional a produção diminuiu, como foi observado em 96 horas. Observou com a curva de crescimento de *R.glutinis* nos meios de crescimento controle e suplementado que o pico de o crescimento máximo ocorreu a 84 horas e que em 96 horas o crescimento não foi muito diferente do tempo anterior. Com a leitura do pH no fim de cada tempo, foi observado que o pH das amostras foi ficando mais ácido e que o da amostra controle ficou mais ácido do que o da amostra suplementada. O DMSO utilizado no início da extração lisa a membrana plasmática liberando componentes e produtos de síntese celular, como o pigmento betacaroteno, ficando solúveis no solvente; a acetona é utilizada para continuar extraindo o pigmento. E o éter de petróleo, um solvente apolar utilizado na etapa de purificação solubiliza os pigmentos carotenoides devido a esses pigmentos também serem apolares e por terem uma maior afinidade por esse solvente permanecem solúveis a ele no final da purificação. A concentração dos pigmentos extraídos foi maior quando utilizou o meio suplementado do que quando usou o meio controle. O CCD revelou a presença de carotenoide nas amostras, as condições de cultivo foi ideal para que *R.glutinis* produzisse o betacaroteno e o método de extração e purificação também foi eficiente.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a identificação de microrganismo isolado de indústria é importante para a caracterização correta dos microrganismos encontrados nesse ambiente. A pesquisa de condições de cultivos ideais e de substratos de baixo custo para o melhor crescimento e produção de pigmentos naturais é importante devido as atividades biológicas benéficas as quais esses pigmentos podem está relacionados e também devido a importância de sua produção para o segmento industrial. A obtenção de extratos contendo pigmentos naturais como o betacaroteno produzido por *R.glutinis* pode ser utilizado em testes a procura de atividades biológicas benéficas. O resultado positivo de utilizar o melaço como suplemento no meio de crescimento é importante, pois o melaço é um substrato de baixo custo e além disso aumenta a produção do betacaroteno, que sendo produzido por um microrganismo pode ser obtido a qualquer momento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida. A universidade Federal de Pernambuco. A Orientadora Dr. Marcia Vanusa da Silva pela confiança e conhecimento compartilhado. Ao departamento de Bioquímica. E aos alunos de pós-graduação do laboratório de Biologia Molecular, em especial Tayane, Bruno e Karine.

REFERÊNCIAS

CANHOS, V. P., MANFIO, G. P., Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0000/439.pdf

UENOJO, M., MAROSTICA, M. R., PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades,

aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, v.30, n.3, 616-622, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/21.pdf>

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703, 1991.

Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*44:846-849.