

## Área: Engenharia de Alimentos

# EMPREGO DA METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus pararoseus*

Maria M. Cabral, Jamile Zeni, Helen Treichel, Geciane Toniazzo, Eunice Valduga,  
Karine Cence\*

*1*Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e  
Missões - UR/ Campus de Erechim, 1621 – CEP: 99700-000 – Erechim – RS – Brasil, Telefone:  
(54)3520-9000 – Fax: (54)3520-9090

\*E-mail: kahcence@hotmail.com

## RESUMO

Os carotenóides são corantes naturais sintetizados por plantas, algas e micro-organismos, e são de grande utilização industrial. O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de cultivo para a bioprodução de carotenóides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados. A recuperação dos carotenóides foi realizada empregando nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). Para otimizar a bioprodução de carotenóides empregou-se técnica de planejamento experimental. Primeiramente um planejamento do tipo Plackett Burman (Screening Design), seguido de um planejamento completo de segunda ordem, foi utilizado para otimizar a concentração de carotenóides em frascos agitados, obtendo-se uma concentração máxima de carotenóides totais de 856 µg/L em meio contendo 60 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 15 g/L de extrato de malte, a 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm e 100 h de bioprodução.

**Palavras-chave:** Carotenóides, *Sporidiobolus pararoseus*, planejamento de experimentos.

## 1 INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais sintetizados como hidrocarbonetos compostos somente de carbono e átomos de hidrogênio ( $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\alpha$ -caroteno), ou seus derivados oxigenados que carregam pelo menos um átomo de oxigênio ( $\alpha$  e  $\beta$ -criptoxantina,

zeaxantina, luteína, cataxantina e astaxantina) por plantas e micro-organismos (leveduras, fungos filamentosos, algumas espécies de bactérias, algas e líquens) (Armstrong, 1994). Devido às suas propriedades corantes e ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana, os carotenóides têm recebido atenção especial, sendo que sua produção pela fermentação pode tornar-se industrialmente praticável e o custo da produção pode ser minimizado com o uso de subprodutos industriais baratos como fontes de nutrientes (Das et al., 2007).

Dentre os micro-organismos investigados na produção de carotenóides em fermentador, destacam-se: *Haematococcus pluvialis* (Cañizares-Villanueva et al., 2005), *Phaeodactylum tricornutum* (Mirón et al. 2002), *Dunaliella salina* (Hejazi et al, 2004), *Blakeslea trispora* (Mantzouridou et al., 2008), *Phaffia rhodozyma* (Liu et al, 2008) e *Sporidiobolus salmonicolor* (Valduga et al., 2009a).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a bioprodução de carotenóides por uma nova cepa de levedura *Sporidiobolus pararoseus*, isolada de resíduos agroindustriais.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Micro-organismos

Para preservar a cultura e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento da linhagem (levedura isolada de amostras de folhas de laranjeira e eucalipto) em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (MDF – U3086S - Sanyo). A levedura também foi mantida em frascos contendo meio YMA (Yeast Malte Agar) e uma camada superficial de óleo mineral, conservados em geladeira a aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ . A cada dois meses foi realizado um novo repique do micro-organismo.

Uma linhagem de levedura, identificada em parceria com o laboratório CENA/USP como sendo *Sporidiobolus pararoseus*.

## 2.1.2 Bioprodução de carotenóides

A levedura identificada por *Sporidiobolus pararoseus* foi utilizada em ensaios da bioprodução de carotenóides em frascos agitados. Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições de fermentação, foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman: Screening Design (Tabela 1) e fatorial completo  $2^3$  (Tabela 2). As respostas ou variáveis independentes estudadas foram: carotenóides totais (ug/L), produção específica de carotenóides (ug/g), biomassa (g/L) e pH.

**Tabela 1.** Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
pH	X <sub>1</sub>	4,0	6,0	8,0
Extrato de levedura (g/L)	X <sub>2</sub>	0	5,0	10,0
Extrato de malte (g/L)	X <sub>3</sub>	0	5,0	10,0
Peptona (g/L)	X <sub>4</sub>	0	5,0	10,0
Glicose (g/L)	X <sub>5</sub>	2,0	21,0	40,0

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm e 25°C.

**Tabela 2.** Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo  $2^3$ .

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extrato de malte (g/L)	X <sub>3</sub>	6,6	10,0	15,0	20,0	23,4
Peptona (g/L)	X <sub>4</sub>	6,6	10,0	15,0	20,0	23,4
Glicose (g/L)	X <sub>5</sub>	26,4	40,0	60,0	80,0	93,6

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C e pH inicial = 4,0

A recuperação dos carotenóides foi realizada segundo metodologia descrita por Valduga et al (2009b), empregando N<sub>2</sub> líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). Os carotenóides totais foram quantificados após leitura em espectrofotômetro (448 nm), conforme equação

descrita por Davies (1976). O coeficiente de absorvância utilizado foi referente ao  $\beta$ -caroteno para o metanol:  $E1\%1cm = 2550$  (Silva, 2004). A biomassa foi quantificada por gravimetria em estufa a  $105^{\circ}C$  até massa constante.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta os valores reais e codificados do planejamento fatorial completo  $2^3$  e a resposta em concentração de carotenóides totais e específicos, biomassa e pH. Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que os ensaios 9, 10 e 11 (ponto central) e o ensaio 17 foram os que apresentaram maior concentração de carotenóides totais.

**Tabela 3.** Matriz do planejamento experimental completo  $2^3$  (valores reais e codificados) com as respostas de carotenóides totais e específicos, biomassa e pH.

Ensaio	Variáveis independentes*			Respostas			
	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	C. Totais (µg/L)	C. Espec. (µg/g)	Biomassa (g/L)	pH
1	-1 (10)	-1 (10)	-1 (40)	384,90	128,30	3,00	3,76
2	-1 (10)	-1 (10)	1 (80)	770,34	255,08	3,02	3,65
3	1 (20)	-1 (10)	-1 (40)	748,53	349,78	2,14	3,80
4	1 (20)	-1 (10)	1 (80)	340,49	161,37	2,11	3,83
5	-1 (10)	1 (20)	-1 (40)	456,54	198,49	2,30	3,63
6	-1 (10)	1 (20)	1 (80)	294,22	133,13	2,21	3,70
7	1 (20)	1 (20)	-1 (40)	595,07	235,20	2,53	3,67
8	1 (20)	1 (20)	1 (80)	516,52	188,51	2,74	3,67
9	0 (15)	0 (15)	0 (60)	865,76	237,85	3,64	3,60
10	0 (15)	0 (15)	0 (60)	836,18	216,63	3,86	3,67
11	0 (15)	0 (15)	0 (60)	847,55	229,69	3,69	3,64
12	15 (0)	15 (0)	26,4 (-1,68)	329,07	190,21	1,73	3,39
13	15 (0)	15 (0)	93,6 (1,68)	424,85	245,58	1,73	3,39
14	15 (0)	6,6 (-1,68)	60 (0)	483,48	302,18	1,60	3,12
15	15 (0)	23,4 (1,68)	60 (0)	783,30	281,76	2,78	3,45
16	6,6 (-1,68)	15 (0)	60 (0)	813,58	228,53	3,56	3,37
17	23,4 (1,68)	15 (0)	60 (0)	916,08	259,51	3,53	3,41

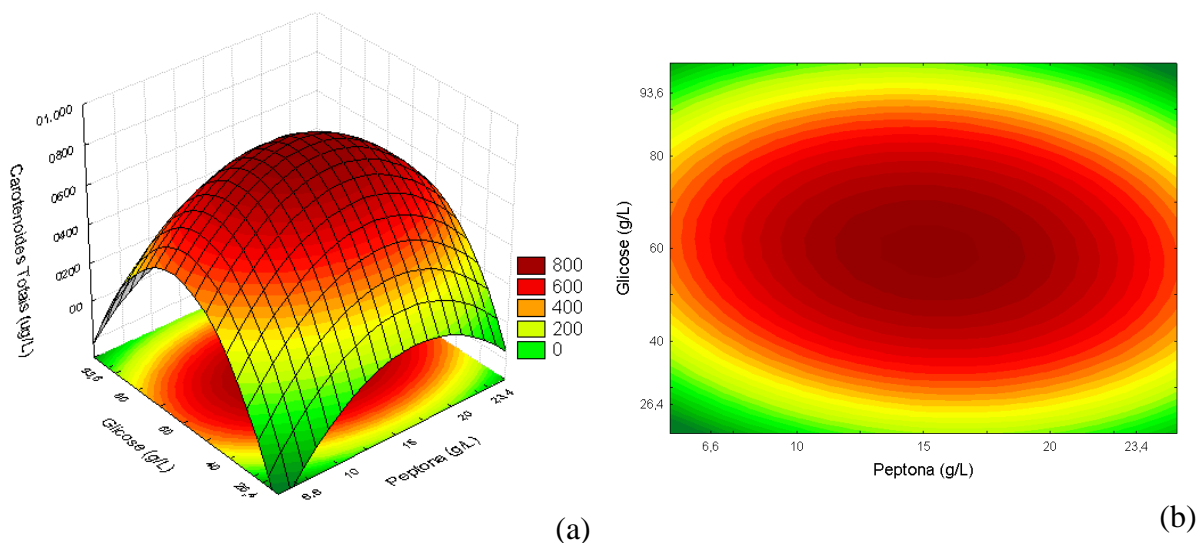
\*X<sub>3</sub> = Extrato de malte (g/L); X<sub>4</sub> = Peptona (g/L); X<sub>5</sub> = Glicose (g/L); Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C, pH = 4,0.

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância, onde o coeficiente de correlação obtido de 0,86 e o F calculado de 1,41 vezes maior que o valor tabelado, permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 1.

Equação 1:

$$C_{\text{totais}} = 856,33 + 34,21 \cdot X_3 - 98,46 \cdot X_4 - 189,32 \cdot (X_5)^2 + 53,38 \cdot X_3 \cdot X_4 - 88,71 \cdot X_3 \cdot X_5 - 27,28 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (1)$$

Onde:  $C_{\text{totais}}$  = Carotenóides totais ( $\mu\text{g/L}$ );  $X_3$  = extrato de malte;  $X_4$  = peptona ;  $X_5$  = glicose.



**Figura 1.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para os carotenóides totais ( $\mu\text{g/L}$ ) em função da concentração de glicose e peptona.

### 3 CONCLUSÃO

O planejamento fatorial completo de segunda ordem possibilitou a otimização da bioprodução de carotenóides por *S. pararoseus*, obtendo-se um teor médio de carotenóides de 856  $\mu\text{g/L}$  (227  $\mu\text{g/g}$ ) com concentração de glicose 60  $\text{g/L}$ , extrato de malte 15  $\text{g/L}$ , peptona 15  $\text{g/L}$ , 180 rpm, 25C e pH inicial 4,0.

## REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, G. A. Eubactéria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol* v. 176, p. 4795- 4802, 1994.
- CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. et al. Haematococcus pluvialis cultivation in splitcylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 68, p. 31 – 35, 2005.
- DAS, A., YOON, S., LEE, S., KIM, J., OH, D., KIM, S. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 77, p. 505–512, 2007.
- DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, p. 38 – 165. Academic Press, New York, 1976.
- HEJAZI, M. A. et al. Milking microalga *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production in twophase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 85, n. 5, p. 475 – 481, 2004.
- LIU, Z. Q.; et al. Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low-energy ion beam implantation. *J Appl Microbiol*, v.104, n.3, p.861-872, 2008.
- MANTZOURIDOU, F.; TSIMIDOU, M. Z.; NAZIRI, E.. Industrial Glycerol as a Supplementary Carbon Source in the Production of  $\beta$ -Carotene by *Blakeslea Trispora*. *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 2668–2675, 2008.
- MIRÓN, A. S. et al. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 1015 – 1023, 2002.
- SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
- VALDUGA, E., TATSCH, P. O., TIGGEMANN, L., ZENI, J., COLET, R., CANSIAN, J. M., TREICHEL, H., DI LUCCIO, M. Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. *International Journal of Food Science & Technology*. , v.44, p.2445 - 2451, 2009a.
- VALDUGA, E., VALERIO, Alexandra, TATSCH, P. O., TREICHEL, H., FURIGO, J., A., DI LUCCIO, M. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*. v.2, p.234 - 238, 2009b.