

## Área: Engenharia de Alimentos

# COMPARAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *SPORIDIOBOLUS SALMONICOLOR* CBS 2636 EM BIORREATOR EM DIFERENTES PROCESSOS: BATELADA SIMPLES, BATELADA ALIMENTADA E SEMICONTÍNUO

Rosicler Colet\*, Letícia Urnau, Naiane Sabedot Marcon, Jaine Bampi, Rafael Colet, Marco Di Luccio, Eunice Valduga

*Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim, Erechim, RS*

\*E-mail: [rosicler.colet@bol.com.br](mailto:rosicler.colet@bol.com.br)

**RESUMO** – Os carotenoides são corantes naturais que podem ser sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Estes são pigmentos de grande utilização industrial e têm despertado interesse devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. A produção destes através de processos biotecnológicos, como em processo de batelada simples, batelada alimentada e semicontínuo, apresentam muitas vantagens, como o aumento do rendimento da concentração de carotenoides, assim com a obtenção deste produto em qualquer época do ano. Objetivou-se estudar a comparação da bioprodução de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processo batelada simples, alimentada e semicontínuo. A bioprodução foi realizada em biorreator Biostat com capacidade total de 2 L, sem iluminação, com uma aeração de 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH inicial 4,0, por um período de 96 horas para o processo em batelada simples e alimentada e 448 h para o processo semicontínuo. A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando nitrogênio líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). As concentrações máximas de carotenoides totais obtidas no biorreator em batelada simples, alimentada e semicontínuo foram de 1510 µg/L, 4400 µg/L e 4375,69 µg/L, respectivamente.

**Palavras-chave:** Carotenoides, batelada simples, batelada alimentada, semicontínuo.

## 1 INTRODUÇÃO

A grande demanda gerada pelas indústrias e a crescente procura por produtos naturais, tem resultado em um aumento nas pesquisas referentes à produção de carotenoides via biotecnológica, podendo ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Os carotenoides têm despertado atenção devido às suas várias funções na saúde humana e na indústria. Alguns carotenos, principalmente o  $\beta$ -caroteno, são precursores da vitamina A. Na indústria, os carotenoides são tradicionalmente utilizados como corantes em alimentos e bebidas, realçador de coloração de ovos, peixes e crustáceos, tornando-os mais atrativos aos consumidores (Vílchez et al. 2011; Christaki et al. 2013).

Embora os corantes sejam considerados essenciais à indústria de alimentos, podendo ser obtidos através de fontes naturais, este campo ainda não é bem explorado, em particular os produzidos por micro-organismos. Dentre os processos de bioprodução, o cultivo em batelada, são impostas condições favoráveis à carotenogênese, maior controle de processo e de contaminações, entretanto desfavoráveis para o alto desempenho do crescimento celular (Del Campo et al., 2007). Os processos em batelada alimentada são eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive para a produção de carotenoides. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. Segundo Mcneil e Harvey (1990) a batelada alimentada permite o controle da concentração de substrato, minimizando os efeitos de inibição e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação. Na literatura, raros são estudos que relatam a produção de carotenoides por micro-organismos em batelada alimentada (Saenge et al. 2011; Liu e Wu, 2007).

Os cultivos semicontínuos propiciam grande produção de células por intervalo de tempo. Nesse sistema, o biorreator é carregado no início do cultivo com o meio e o inoculo, sendo então incubado nas condições ótimas. Uma parcela do meio de cultivo com as células de levedura são removidas e substituídas por meio de cultura novo, sem células. Isso pode ser feito a qualquer momento durante o desenvolvimento do cultivo, porém, geralmente é feito após alguns dias de crescimento, quando já se formou uma biomassa relativamente grande (Lourenço, 2006). Com esse procedimento consegue-se obter produto com o mesmo inoculo por um tempo bem maior. Além disso, não há os estágios de preparação de inoculo nem limpeza dos tanques entre um ciclo e outro. O corte deve ser feito quando o micro-organismo está na fase de crescimento exponencial, para não haver fase de adaptação, conseguindo-se assim um processo quase contínuo de produção de biomassa (Borzani et al. 2001). Não se encontra nenhum trabalho na literatura referente a este processo para a obtenção de carotenoides.

Neste sentido, é de interesse estudar a bioprodução de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processos de batelada, batelada alimentada e semicontínuo em biorreator, visando obter compostos com alto valor agregado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Bioprodução de Carotenoides

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636.

Bioprodução em batelada simples: A produção foi realizada em biorreator (25°C e 180 rpm), contendo 100 mL de inoculo (25°C, 180 rpm, D.O~0,7 U.A) e 900 mL de meio composto de 15g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol, por 96 h de bioprodução.

Bioprodução em batelada alimentada: A produção foi realizada em biorreator (25°C e 180 rpm), contendo inicialmente 100 mL de inoculo (25°C, 180 rpm, D.O~0,7 U.A) e 500 mL de meio composto de 15g/L

de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol. A alimentação foi iniciada após 24h até 84h de produção, com uma taxa de alimentação 112,5 mL a cada 12 h de bioprodução.

Bioprodução em processo semicontínuo: A produção foi realizada em biorreator (25°C e 180 rpm), contendo inicialmente 100 mL de inoculo (25°C, 180 rpm, D.O~0,7 U.A) e 1 L de meio composto de 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol por 96 horas. Depois deste período ocorreu o primeiro corte, onde se retirou 500 mL do meio com as células e se acrescentou 500 mL de meio de bioprodução novo, após 264 horas ocorreu o segundo corte seguindo os mesmos procedimentos do primeiro corte.

## 2.2 Recuperação de Carotenoides

A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando N<sub>2</sub> líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração com mistura de acetona/metanol na proporção de 7:3 (v/v). A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 448 nm segundo Valduga et al.(2008).

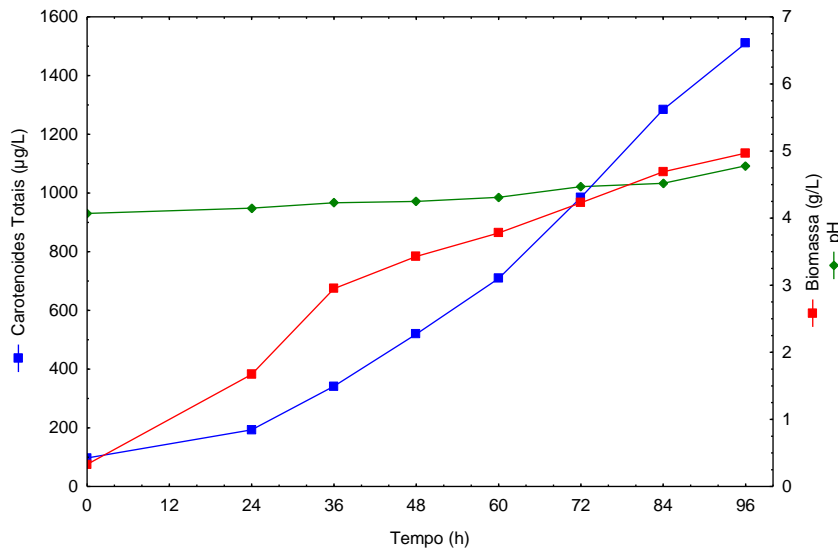
## 2.3 Cinética de Bioprodução

A cada 12 horas para os processos em batelada simples e alimentada, e a cada 24 horas para o processo semicontínuo foram obtidas amostras para a determinação da cinética de bioprodução de carotenoides, biomassa e pH. A biomassa foi determinada, após extração dos carotenoides, onde as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas (6.500 xg e 5°C por 10 min) e a massa celular foi quantificada através de secagem em estufa (Fanem SE-320) a 105°C até peso constante. O pH dos ensaios foi determinado usando o potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

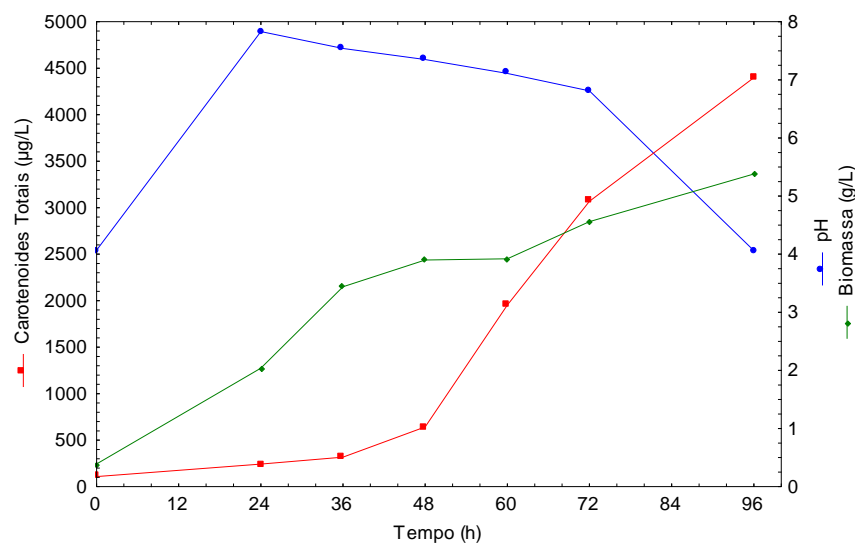
A Figura 1 apresenta os resultados da bioprodução de carotenoides totais, biomassa celular e o pH dos ensaios realizados em batelada simples em biorreator. A concentração máxima de carotenoides totais foi de 1510 µg/L (carotenoides específicos de 304 µg/g) obtida em 96 h de bioprodução.

Figura 1 – Bioprodução de carotenoides totais, biomassa e pH por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processo batelada simples



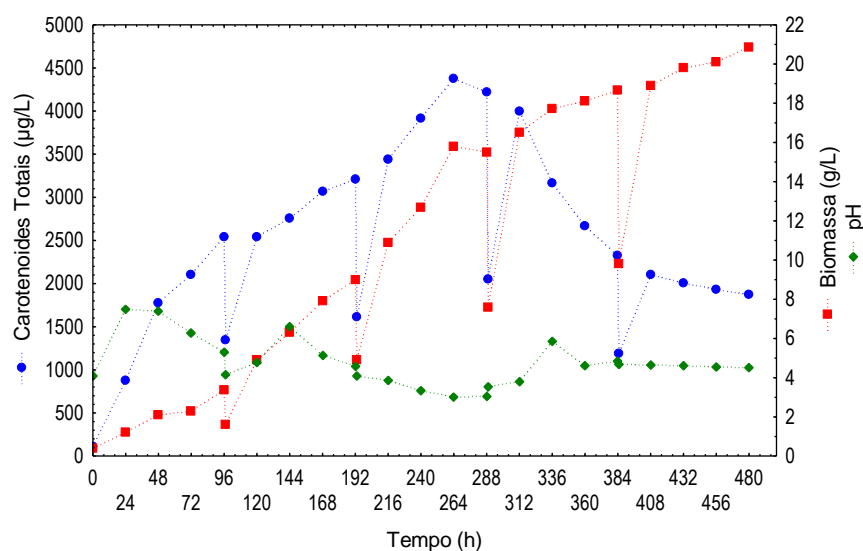
A Figura 2 apresenta os resultados da bioprodução de carotenoides totais, biomassa celular e o pH dos ensaios realizados em batelada alimentada em biorreator. A concentração máxima de carotenoides totais foi de 4400 µg/L (carotenoides específicos de 817 µg/g) obtida em 96 h do início da bioprodução, com taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h. A maior produção de carotenoides totais em batelada alimentada foi obtida no menor valor de pH 4,06.

Figura 2 – Bioprodução de carotenoides totais, biomassa e pH por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processo batelada alimentada



A Figura 3 apresenta os resultados da bioprodução de carotenoides totais, biomassa celular e pH dos ensaios realizados em processo semicontínuo em biorreator. A concentração máxima de carotenoides totais foi de 4376  $\mu\text{g/L}$  (15,8 g/L de biomassa) obtido em 264 h do início da bioprodução. Ressalta-se que a maior produção de carotenoides totais em semicontínuo foi obtida no menor valor de pH (3,02).

Figura 3 – Bioprodução de carotenoides totais, biomassa e pH por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processo semicontínuo



Observa-se que o micro-organismo precisou cerca de 48 horas inicialmente para a adaptação com o meio e início da fase log, após o primeiro corte (96h) e o segundo corte (264h) esta adaptação ocorreu em cerca de 12 horas, isto se deve ao menor tempo da fase lag devido o processo semicontínuo, onde o meio fermentado não retirado do reator serviu de inóculo ao meio de fermentação adicionado, sendo esta uma das vantagens desse processo (Borzani et al. 2001).

Comparando os processos de batelada simples, alimentada e semicontínuo se observou uma maior bioprodução quando se alimentou nutrientes a cada 12 horas, isto pode ser explicado devido a não inibição da produção pelas altas concentrações de substrato, onde estes eram alimentados ao longo da bioprodução. Destaca-se também os resultados do processo semicontínuo, onde os cortes foram realizados na fase exponencial do microrganismo, assim podendo ter uma maior bioprodução com uma mesma quantidade de substratos (Lourenço, 2006). Valduga et al. (2014) através do planejamento completo de segunda ordem otimizou a bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados, obtendo-se um teor de máximo de carotenoides totais de 843  $\mu\text{g/L}$  com concentração de 40 g/L de glicerol, 40 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz, 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0.

## 4 CONCLUSÃO

O processo de batelada alimentada (4400 µg/L) apresentou-se uma boa alternativa para o aumento da bioprodução de carotenoides em biorreator, conduzindo um aumento na concentração de carotenoides totais de 190 % se comparada à batelada simples (1510 µg/L).

## 5 AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao apoio financeiro e estrutural da CAPES, FAPERGS e URI Campus Erechim.

## 6 REFERÊNCIAS

- BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biocología Industrial**. v.II. São Paulo - SP. Editora Edgard Blucher Ltda., 541 pp ISBN 04531-012, 2001.
- CHRISTAKI, E., BONOS, E.; GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 5-11, 2013.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1163-1174, 2007.
- LIU, Y.S.; WU, J.Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 182–189, 2007.
- LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: **RiMa**, 2006.
- McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Viscous fermentation products. **Critical Review in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 275-304, 1990.
- SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROGGE, T.T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.
- VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.Di.; FURIGO JÚNIOR, A. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1267-1274, 2008.
- VALDUGA, E.; Ribeiro, A.H.R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 207-213, 2014.
- VÍLCHEZ, C. et al. Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-333, 2011.