


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR  
LEVEDURAS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Iriani Rodrigues Maldonade** aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de março de 2003.

Campinas, 21 de março de 2003.

  
Prof. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini  
Presidente da Banca

**Iriani Rodrigues Maldonade**  
Engenheira de Alimentos

**Prof.ª. Dra. Adilma R. P. Scamparini**  
Orientadora

**Prof.ª. Dra. Délia Rodriguez-Amaya**  
Co-orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas-SP  
2003

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TVUnicamp
	M 293 p
V	EX
TOMBO BCI	55654
PROC.	16-124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/9/03
Nº CPD	

CM00188944-1

Bib id 300069


FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M293p Maldonade, Iriani Rodrigues  
Produção de carotenóides por leveduras / Iriani Rodrigues  
Maldonade. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

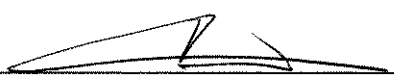
Orientador: Adilma Regina Pippa Sacamparini  
Co-orientador: Délia Rodriguez-Amaya  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Levedos. 2. *Rhodotorula*. 3. Carotenóides. 4. Fermentação.  
I. Scamparini, Adilma Regina Pippa. II. Rodriguez-Amaya, Délia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**


  
\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini  
(Orientadora)

\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Délia Rodriguez-Amaya  
(Co-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho

  
\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Mieko Kimura

  
\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Célia Maria de Sylos

  
\_\_\_\_\_  
Professor Dr. Ranulfo Monte Alegre

\_\_\_\_\_  
Dr. Alexandre Nunes Ponezi

\_\_\_\_\_  
Professora Dra. Helena Teixeira Godoy

200830042

Aos meus pais, Irene e Oswaldo,  
Às minhas filhas, Júlia e Paula,  
Ao meu marido, Paulo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família, pela paciência e incentivo, sobretudo às minhas irmãs.

À Odette pelo apoio, incentivo e pela grande ajuda com as minhas filhas.

À Professora Dra. Adilma Scamparini pela orientação.

À Professora Dra. Délia Rodriguez-Amaya pela co-orientação, apoio e incentivo.

Aos membros da banca, pelas sugestões e correções do trabalho.

À Mieko, pelos ensinamentos e pelas correções.

À Elza Nania, Débora e Karla, pelo trabalho e apoio.

Ao Thiago, pela ajuda nos ensaios.

À Maybi, pela amizade, apoio e ajuda na fase final do trabalho.

À Patinha (Patrícia), pelo apoio e seu alto astral.

Aos amigos dos laboratórios de carotenóides e química geral, pela amizade, ajuda e os bons momentos vividos no laboratório.

Ao Cosme, pela cooperação.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Ao Pronex, pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente incentivaram-me em realizar este trabalho.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO GERAL</b>	<b>xvi</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>xxii</b>

### **CAPÍTULO 1: Carotenóides Produzidos por Leveduras: Uma Revisão**

1. Introdução	2
2. Carotenóides	3
2.1 Estrutura	3
2.2 Propriedade e funções dos carotenóides	4
2.3 Aspecto industrial da produção de carotenóides	5
2.4 Biossíntese	5
3. Microrganismos produtores de carotenóides	8
3.1 Leveduras	10
3.1.1 Efeito da temperatura e pH	12
3.1.2 Efeito da composição do meio	14
3.1.3 Efeito da intensidade luminosa	17
4. Referências bibliográficas	19

### **CAPÍTULO 2: Isolamento, Seleção e Identificação de Leveduras Pigmentadas na Região de Campinas**

1. Introdução	28
2. Material e métodos	30
2.1. Coleta das amostras	30
2.2. Isolamento de leveduras	30
2.3. Preservação das leveduras isoladas	31

2.4. Caracterização das leveduras	31
2.4.1. Características da reprodução vegetativa	32
2.4.1.1. Morfologia das células vegetativas	32
2.4.1.2. Microcultivo	32
2.4.1.3. Formação de balistosporos	32
2.4.2. Características da reprodução sexuada	32
2.4.3. Características fisiológicas e bioquímicas	33
2.4.3.1. Fermentação de carboidratos	33
2.4.3.2. Assimilação de compostos de carbono	33
2.4.3.3. Assimilação de compostos de nitrogênio	33
2.4.3.4. Crescimento a diferentes temperaturas	34
2.4.3.5. Crescimento em meio sem vitaminas	34
2.4.3.6. Produção de ácido a partir da glicose	34
2.4.3.7. Síntese de compostos amilóides	34
2.4.3.8. Hidrólise da uréia e DBB	34
3. Resultados e discussão	35
4. Conclusão	39
5. Referências bibliográficas	40

### **CAPÍTULO 3: Carotenoids of Brazilians Yeasts**

1. Introduction	45
2. Materials and methods	46
2.1. Yeast strains	46
2.2. Culture conditions and harvesting procedure	47
2.3. Carotenoid analysis	47
3. Results and discussion	49
4. Conclusions	61
5. References	62

## **CAPÍTULO 4: Effect of Media Composition on Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa*-137**

1. Introduction	68
2. Material and methods	69
2.1. Cultivation of <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> -137	69
2.2. Sugar, Protein and Carotenoid Determination	70
2.3. Experimental Designs and Statistical Analysis	71
2.3.1. Investigation of the effect of variable on cell growth and carotenoid production	71
2.3.2. Optimization of culture medium composition	72
3. Results and discussion	73
3.1. Effect of pH and Media Composition on Cell Growth and Carotenoid Production	
3.2. Optimization of Media Composition	80
4. Conclusions	88
5. References	89

## **CAPÍTULO 5: Otimização do Meio de Produção de Carotenóides por *Rhodotorula glutinis***

1. Introdução	95
2. Material e métodos	96
2.1. Condições de cultivo	96
2.2. Determinação do crescimento celular	96
2.3. Determinação de açúcares redutores totais e proteínas	97
2.4. Determinação de carotenóides	97
2.5. Delineamento experimental para estudar a influência dos componentes do meio de produção de carotenóides	98
2.5.1. Planejamento fatorial incompleto	98
2.5.2. Planejamento fatorial completo para otimizar a produção de carotenóides	98
3. Resultados e discussão	100
3.1. Planejamento fatorial incompleto $2^{5-1}$	100
3.2. Planejamento completo $2^3$ com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais	103



3.2.1. Carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )	105
3.2.2. Carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )	108
3.2.3. Biomassa ( $\text{g/L}$ )	110
3.2.4. Proteína (%)	113
4. Conclusões	116
5. Bibliografia	117

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>TABELA 1:</b> Microrganismos produtores de carotenóides	9
--	---

### CAPÍTULO 2

<b>TABELA 1:</b> Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das culturas de leveduras	35
---	----

<b>TABELA 2:</b> Resultados dos testes bioquímicos das culturas de leveduras	36
--	----

### CAPÍTULO 3

<b>TABLE 1:</b> Fermentation parameters obtained after 5 days of cultivation in YM medium broth	49
---	----

<b>TABLE 2:</b> Characteristics of carotenoids identified in Brazilians yeasts	50
--	----

<b>TABLE 3:</b> Carotenoids production ( $\mu\text{g/L}$ ) in Brazilians yeasts, determined by open column chromatography-spectrophotometry	58
---	----

<b>TABLE 4:</b> Specific carotenoids production ( $\mu\text{g/g}$ ) in Brazilians yeasts, determined by open column chromatography-spectrophotometry	59
--	----

## CAPÍTULO 4

<b>TABLE 1:</b> Variables at different levels of fermentation media	71
<b>TABLE 2:</b> Central composite experimental design defining yeast extract and glucose concentrations	72
<b>TABLE 3:</b> $2^{5-1}$ factorial design with coded values and experimental results obtained at 5 days of fermentation for biomass and carotenoid production	75
<b>TABLE 4:</b> The t-value effects for the variables tested in the $2^{5-1}$ factorial design with 3 center points for carotenoid production	76
<b>TABLE 5:</b> Residual sugars determined during the fermentation, for carotenoid production by <i>R. mucilaginosa</i> -137	77
<b>TABLE 6:</b> Changes of pH during the fermentation process for carotenoid production by <i>R. mucilaginosa</i> -137	78
<b>TABLE 7:</b> Absorbance of yeast media culture measured at 600 nm during the fermentation for carotenoid production by <i>R. mucilaginosa</i> -137	79
<b>TABLE 8:</b> $2^2$ factorial design values and experimental results obtained by <i>R. mucilaginosa</i> -137, varying the concentrations of glucose and yeast extract	82
<b>TABLE 9:</b> Regression coefficients and t-values of full quadratic equations for the response surfaces of carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ), specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ ) and biomass ( $\text{g/L}$ )	83
<b>TABLE 10:</b> Analysis of variance for the regression model of biomass and protein, by <i>R. mucilaginosa</i> -137, obtained from the response surface experiments	84

**TABLE 11:** Analysis of variance for the regression model of carotenoid production and specific carotenoid production, by *R. mucilaginosa*-137, obtained from the response surface experiments 85

**TABLE 12:** Analysis of variance for the regression model of carotenoid production, specific carotenoid production and protein, by *R. mucilaginosa*-137, obtained from the response surface experiments, after ignoring the insignificant effects 86

## **CAPÍTULO 5**

**TABELA 1:** Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial incompleto  $2^{5-1}$  98

**TABELA 2:** Níveis das variáveis independentes do planejamento completo  $2^3$ , com 3 replicatas no ponto central 99

**TABELA 3:** Efeito das variáveis da composição do meio na produção de carotenóides

**TABELA 4:** Efeitos das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^{5-1}$ , com 3 replicatas no ponto central, para a produção de carotenóides 101

**TABELA 5:** Efeito da composição do meio de produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* 103

**TABELA 6:** Efeito da significância das variáveis independentes nos modelos completos das respostas obtidas experimentalmente 104

**TABELA 7:** Modelo da regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondentes a resposta de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) 106

**TABELA 8:** Modelo da regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondentes a resposta da produção específica carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ ) 109

**TABELA 9:** Modelo da regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondentes a resposta de biomassa (g/L) 111

**TABELA 10:** Modelo da regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondentes a resposta de proteínas (%) 114

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1:** Biossíntese de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) 7

### CAPÍTULO 3

**FIGURE 1:** Carotenoids structures of Brazilians yeasts 53

**FIGURE 2:** HPLC profile of carotenoids from *R. mucilaginosa*-137, *R. mucilaginosa*-135, *R. mucilaginosa*-108 and *R. mucilaginosa*-12 strains that had torulene as principal carotenoid 55

**FIGURE 3:** HPLC profile of carotenoids from *R. glutinis*, *R. graminis*-125 and *Sporobolomyces* sp strains that had  $\beta$ -carotene as principal carotenoid 56

### CAPÍTULO 4

**FIGURE 1:** Kinetic parameters of *R. mucilaginosa*-137 cultivated in YM medium for 5 days at 25°C 73

**FIGURE 2:** Response surface diagram describes the effects of yeast extract and glucose concentrations on carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) 87

**FIGURE 3:** Response surface diagram describes the effects of yeast extract and glucose concentrations on biomass production ( $\text{g/L}$ ) 87

## **CAPÍTULO 5**

**FIGURA 1:** Diagrama de superfície de resposta do efeito do pH inicial e concentração de glicose (g/L) na concentração de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) 107

**FIGURA 2:** Efeito da variação da concentração de glicose (g/L) e concentração de extrato de levedura (g/L) na produção de biomassa (g/L) 112

**FIGURA 3:** Diagrama da superfície de resposta do efeito da variação de pH inicial e glicose (g/L) na variação de teores de proteína celular (%) 115

## RESUMO GERAL

Este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar leveduras produtoras de carotenóides de ecossistemas brasileiros. As leveduras pigmentadas foram isoladas de amostras de solos, flores, folhas, frutos da região de Campinas-SP e de alimentos processados. As amostras foram colocadas em frascos de erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de meio de Extrato de Malte e Levedura (YM), e incubadas a 30° C por 48 horas. Após 48 horas, as amostras foram inoculadas em placas de petri contendo meio ágar-YM e incubadas a 30°C, por 120 horas. As colônias de leveduras que apresentaram coloração entre amarelo e vermelho, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar YM inclinado e incubadas a 30°C até crescimento satisfatório. Estas leveduras foram reisoladas, pelo método de estrias de esgotamento, em placas de petri contendo meio ágar YM (30°C por 72 horas) e, posteriormente, transferidas para tubos de ensaios contendo ágar GYMP inclinado. As culturas pigmentadas foram codificadas do seguinte modo: L12, isolada como contaminante em massa de tomate; L108, isolada de solo da região da Universidade Estadual de Campinas; L125, isolada a partir de folhas da cana-de-açúcar; L135 e L137 isoladas de solo em Holambra-SP. Através das características morfológicas, de reprodução, testes fisiológicos e bioquímicos as leveduras foram identificadas como: L12, L108, L135 e L137 como *Rhodotorula mucilaginosa*, e L125 como *Rhodotorula graminis*.

A composição de carotenóides, das leveduras isoladas no Brasil, foi estudada. As culturas de leveduras foram cultivadas em 200 mL de meio YM a 200 rpm em shaker, a 25°C por 5 dias. Cromatografia de coluna aberta, cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizadas para separar os carotenóides obtidos das leveduras, a fim de identificá-los e quantificá-los. A linhagem de *Rhodotorula glutinis* foi a que apresentou maior concentração total de carotenóide (881 µg/L), seguido por *Rhodotorula graminis* (594 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590 µg/L) e *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545 µg/L). *Rhodotorula minuta* e *Sporobolomyces* tiveram a menor concentração de carotenóides (168 µg/L and 237 µg/L, respectivamente). Os principais pigmentos encontrados nestas linhagens foram toruleno e β-caroteno. β-Caroteno



foi o carotenóide predominante em *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces*, enquanto que o toruleno foi o carotenóide principal nas leveduras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Em termos de produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$  de células secas), *Rhodotorula glutinis* foi a que obteve maior concentração de carotenóides  $132 \mu\text{g/g}$ .

Duas linhagens foram selecionadas para otimização da produção de carotenóides, *R. mucilaginosa*-137 e *R. glutinis*. Estas duas culturas foram cultivadas em shaker a 200 rpm, a  $25^\circ\text{C}$  por 5 dias, sem iluminação. Utilizou-se planejamento experimental e análise de superfície de resposta para estudar o efeito do pH inicial, concentração de glicose, extrato de levedura, sais de fosfato e sulfato de magnésio na produção de carotenóides, de biomassa e proteína celular. Para cada linhagem, foram realizados 2 planejamentos fatoriais, sendo 1 fracionário e 1 completo.

Para a linhagem de *R. mucilaginosa*-137, o extrato de levedura foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, enquanto que os sais de sulfato e fosfato tiveram efeito negativo. O pH inicial não teve efeito significativo tanto na produção de carotenóides como na biomassa. Através dos resultados obtidos pelo planejamento completo, observou-se que a máxima concentração de carotenóides foi de  $745 \mu\text{g/L}$  com  $15 \text{ g/L}$  de extrato de levedura e  $20 \text{ g/L}$  de glicose. Em relação a produção específica de carotenóides, a máxima concentração foi de  $152 \mu\text{g/g}$  com  $5 \text{ g/L}$  de extrato de levedura e  $15 \text{ g/L}$  de glicose. A concentração de extrato de leveduras e glicose também foram importantes na produção da biomassa, que atingiu o valor máximo de  $8 \text{ g/L}$ , na faixa de concentração de  $15$  a  $17,1 \text{ g/L}$  de extrato de levedura e de  $15$  a  $20 \text{ g/L}$  de glicose.

Para a linhagem de *Rhodotorula glutinis* as variáveis de maior influência na produção de carotenóides foram pH inicial, extrato de levedura e glicose. Os sais de sulfato e fosfato não tiveram efeito significativo. Através do planejamento fatorial completo  $2^3$  com três pontos centrais, observou-se que na produção de carotenóides, apenas a glicose teve efeito positivo significativo. Na produção específica de carotenóides, o pH inicial, glicose e extrato de levedura tiveram efeito positivo. A máxima concentração de

carotenóides obtida foi de 1.269  $\mu\text{g/L}$  com pH inicial 4, 4 g/L de extrato de levedura e 17 g/L de glicose. Na produção específica de carotenóides, a máxima concentração foi de 337  $\mu\text{g/g}$  com pH inicial 4, a 4 g/L de extrato de levedura e 7 g/L de glicose. O crescimento celular foi afetado pelo pH inicial, concentração de extrato de levedura e glicose. Entretanto, o modelo matemático referente a biomassa não apresentou uma regressão satisfatória, devendo ser utilizado apenas para estabelecer tendência da resposta.

## SUMMARY

Pigmented yeasts were collected from soils, flowers, leaves, fruits from Campinas-SP region and industrialized foods. The samples were put in 50 mL erlenmeyers flasks, containing YM broth, and they were incubated at 30°C for 48 hours. After 48 hours, these samples were inoculated in Petri plates with YM agar, and incubated at 30°C for 120 hours. The yeasts colonies that had color between red and yellow were transferred to tubes, containing YM agar, and incubated at 30°C. These yeasts were reisolated by screening in Petri plates with YM agar (30°C for 72 hours) and then, transferred into tubes containing GYMP agar. After the selection, the pigmented yeasts were identified by a code: L12, was isolated from tomato sauce; L108, from soils of State University of Campinas; L125, from leaves of sugar cane; L135 e L137, from soils of Holambra-SP. The yeasts were identified by their morphology characteristics, reproduction characteristics, physiology and biochemical tests. The yeasts L12, L108, L135 and L137 were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* and L125 as *Rhodotorula graminis*.

The carotenoid composition of yeasts isolated in Brazil was studied. The yeasts were cultured in 200 mL broth yeast malt at 200 rpm in rotary shaker, 25°C for 5 days without illumination. Open column, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were used to separate, identify and determine carotenoid concentrations. The yeast *Rhodotorula glutinis* had the highest total carotenoid concentration (881 µg/L), followed by *Rhodotorula graminis* (594 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590 µg/L) and *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545 µg/L). *Rhodotorula minuta* and *Sporobolomyces* had the lowest carotenoid contents (168 µg/L and 237 µg/L, respectively). The principal pigments found in these yeasts were torulene and β-carotene. β-Carotene predominated in *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces*, while torulene was the major carotenoid in *Rhodotorula*

*mucilaginosa*. In specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$  of dried cells), *Rhodotorula glutinis* had a total carotenoid concentration of  $132 \mu\text{g/g}$ .

Two of these strains were selected to optimize the carotenoid production, *Rhodotorula mucilaginosa*-137 and *Rhodotorula glutinis*. The cultures were cultivated into 200 mL broth yeast malt at 200 rpm in rotary shaker,  $25^\circ\text{C}$  for 5 days without illumination. Response surface design was used to study the effects of initial pH and concentrations of glucose, yeast extract, magnesium sulfate and potassium phosphate. Two statistical designs were used for each strain.

For the strain of *Rhodotorula mucilaginosa*-137, the yeast extract the most important variable in terms of enhancing carotenoid formation; magnesium sulfate and potassium phosphate had a negative influence. The initial pH had no significant effect on carotenoid formation or on cell production. Analysis of the quadratic surfaces showed that after 5 days of cultivation at  $25^\circ\text{C}$ , the maximum carotenoid concentration of  $745 \mu\text{g/L}$  appeared at 15 g/L of yeast extract and 20 g/L of glucose. The maximum concentration of specific carotenoid production was  $152 \mu\text{g/g}$  at 5 g/L of yeast extract and 10 g/L of glucose. The concentrations of yeast extract and glucose were also important on biomass production, which reached maximum value of 8.0 g/L at a range of 15 to 17.1 g/L of yeast extract and 15 to 20 g/L of glucose.

The variables that had most influence on carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* were initial pH, yeast extract and glucose. Magnesium sulfate and potassium phosphate had no influence. The carotenoid production was described by second order polynomial equation. Analysis of the  $2^3$  factorial design surfaces showed that after 5 days of cultivation at  $25^\circ\text{C}$ , the maximum carotenoid concentration of  $1,269 \mu\text{g/L}$  with initial pH 4, 4 g/L of yeast extract and 17 g/L de glucose. The maximum specific carotenoid production was  $337 \mu\text{g/g}$  with initial pH 4, 4 g/L of yeast extract and 7 g/L of glucose. Moreover, carotenoid production in  $\mu\text{g}$  per liter was more sensitive to changes in yeast extract than to changes in glucose concentrations, in the vicinity of the optimum point of carotenoid production. The growth of the microorganism was affected by initial pH and

concentration of yeast extract and glucose. However, the model obtained for biomass from the experimental designs had not a good correlation and because of that it should be used only to study the tendency of response.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenóides são corantes naturais e possuem várias ações biológicas, sendo a atividade pró-vitamínica A, a função fisiológica mais conhecida. O grande interesse por estes compostos nos últimos anos, deve-se às funções anticarcinogênica, imunomoduladoras e antioxidante que têm sido atribuídos aos mesmos. A crescente demanda de carotenóides nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticas e de ração tem despertado o interesse de pesquisadores, em produzir carotenóides através de processos biotecnológicos. Além da conotação natural, os produtos obtidos por fermentação microbiana, podem ser produzidos em prazo de tempo curto e em qualquer época do ano, utilizando substratos de baixo custo.

Astaxantina e toruleno são exemplos de alguns carotenóides típicos de microrganismos. A astaxantina é utilizada como suplemento alimentar para humanos e como fonte de pigmentação para peixes e camarões. O desenvolvimento e otimização dos processos fermentativos para a produção de carotenóides, tem a finalidade de aumentar o rendimento destes assim como a redução de custos. Embora a variedade de microrganismos produtores de carotenóides seja grande, apenas alguns microrganismos são industrialmente interessantes, como as leveduras. As leveduras, além de produzirem carotenóides, são fontes naturais de proteína, podendo ser utilizadas em rações de salmões e frutos do mar. Outra razão importante, deve-se à sua história; as leveduras têm sido utilizadas para a produção de alguns alimentos, desde o início da civilização humana, sempre associadas ao processo fermentativo. Com a finalidade de encontrar linhagens de leveduras típicas do ecossistema brasileiro, que produzissem quantidades satisfatórias de carotenóides, os principais objetivos deste trabalho foram: selecionar, isolar e identificar leveduras produtoras de carotenóides; identificar e quantificar os carotenóides produzidos pelas leveduras e otimizar as condições do processo fermentativo para produção dos carotenóides, através da metodologia de superfície de resposta.

# **CAPÍTULO 1**

## **CAROTENÓIDES PRODUZIDOS POR LEVEDURAS:**

### **UMA REVISÃO**

## 1 - INTRODUÇÃO

A produção de carotenóides pelo processo biotecnológico têm sido investigado, destacando-se a produção de  $\beta$ -caroteno ( $\beta,\beta$ -caroteno) por *Dunaliella sp* (BOROWITZKA et al., 1989) e por *Blakeslea trispora* (FEOFILOVA, 1994) e a produção de astaxantina (3S,3'S)-3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona) por *Haematococcus pluvialis* e *Phaffia rhodozyma* (JONHSON & SCHROEDER, 1995).

Os produtos obtidos por fermentação, garantem a estes um mercado promissor e crescente. Embora a variedade de microrganismos produtores de carotenóides seja grande, apenas alguns microrganismos são industrialmente interessantes, como as leveduras. As leveduras, além de produzirem carotenóides, são fontes naturais de proteína, podendo ser utilizadas em rações de animais. O uso de leveduras em alimentos para a produção de pães e vinhos ocorre desde os primórdios das civilizações, sempre associado ao processo fermentativo, utilizando-se substratos ricos em carboidratos.

As leveduras são microrganismos unicelulares que possuem reprodução vegetativa por brotamento ou fissão, amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontradas em folhas, flores, frutos, grãos de cereais e outros substratos que contenham açúcares (SOUZA, 1969). Podem também ser encontradas no solo, ar, águas de lagos, rios e mares, sobre a pele e no intestino de animais e de alguns insetos (PHAFF et al., 1978). Algumas leveduras são causadoras de doenças em plantas, animais e humanos, enquanto outras são deterioradoras de alimentos e bebidas.

As leveduras são caracterizadas e identificadas de acordo com as suas características morfológicas e fisiológicas. Entretanto, para a identificação mais específica, são necessários estudos bioquímicos, uma vez que as exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais. Diferenças na fermentação e na assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras (BARNETT et al., 1983).

Algumas fontes de nitrogênio, como a amônia, são assimiladas por todas as espécies de leveduras, enquanto nitritos, nitratos e alguns aminoácidos são utilizados por apenas



algumas espécies e não por outras (VAN DER WALT, 1970). A capacidade ou não de assimilar nitrato pode caracterizar muitos gêneros tais como *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, que não utilizam nitrato e, os gêneros *Hansenula* e *Citeromyces* que utilizam nitrato (KREGER-VANRIJ, 1984).

As condições de crescimento com temperatura elevada, meio com alto teor de açúcares ou cloreto de sódio, como a cicloheximida e a produção de determinados metabólitos são critérios que também podem ser utilizados na classificação de leveduras. Devido a sua capacidade de crescer em meio com alto teor de açúcar, os resíduos das indústrias de alimentos podem ser utilizados como meio de fermentação, diminuindo desta maneira o custo do processo, além de preservar o ambiente (LODDER, 1970).

## 2 – CAROTENÓIDES

### 2.1 - Estrutura

Os carotenóides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro.

Este esqueleto básico pode ser modificado através de várias maneiras, como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação (PFANDER, 1987).

Os carotenóides hidrocarbonetos são chamados de carotenos e os derivados oxigenados, de xantofilas. O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados.

## 2.2 – Propriedades e funções dos carotenóides

Alguns carotenóides apresentam funções biológicas como a atividade pró-vitamínica A, que é fornecida através da dieta como vitamina A pré-formada, provenientes de alimentos de origem animal (fígado, ovos, peixes, leites e carnes) ou como carotenóides que podem ser biologicamente transformados em vitaminas A, geralmente provenientes de alimentos vegetais. Estima-se que 60% da vitamina A da dieta provenha das pró-vitaminas A (SIMPSON et al., 1971).

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corante, com os objetivos de: repôr a cor perdida durante o processamento e armazenagem, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido as suas atividades biológicas (anticarcinogênico, imunomoduladores, antioxidante, pró-vitamina A), a fim de enriquecer o produto alimentar. São também precursores de compostos voláteis, aos quais contribuem para o sabor e aroma de alimentos.

Nas indústrias de ração, esses pigmentos também são utilizados como corante, com a finalidade de promover a pigmentação adequada dos animais. Destacando-se o uso de astaxantina na criação de peixes salmão e de camarões. A presença de pequenas quantidades de carotenóides pode ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos, seqüestrando oxigênio singlete (SCHROEDER & JOHNSON, 1995).

Devido a alta taxa de insaturação, fatores tais como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda na cor e na atividade pró-vitamínica. São também susceptíveis as oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, reação esta que depende da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, alta temperatura, exposição à luz.

### **2.3 - Aspectos industriais da produção de carotenóides**

Embora mais de 600 carotenóides tenham sido identificados de várias fontes, somente 40 são encontrados em alimentos e, somente alguns destes são utilizados industrialmente como corantes ou substâncias bioativas em rações, cosméticos, alimentos e fármacos.

Atualmente, os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas ou algas. Porém, devido a preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos e, muitas patentes têm sido registradas nos últimos anos. A produção de carotenóides por microrganismos também se deve ao crescente mercado da piscicultura, sendo que a astaxantina é o pigmento mais importante para o cultivo de salmão e crustáceos. Além do poder corante, os carotenóides também são fontes de vitamina A nas dietas dos animais. O cultivo mundial de salmão e siri teve crescimento significativo durante a década de 1980. Cerca de duzentos e sessenta mil toneladas de salmão e setecentos mil toneladas de siri foram produzidas em 1991 em mais de quarenta países. O mercado mundial de carotenóides para piscicultura apresentou demanda de vinte bilhões de dólares/ano durante a década de 1990 (JOHNSON et al., 1995).

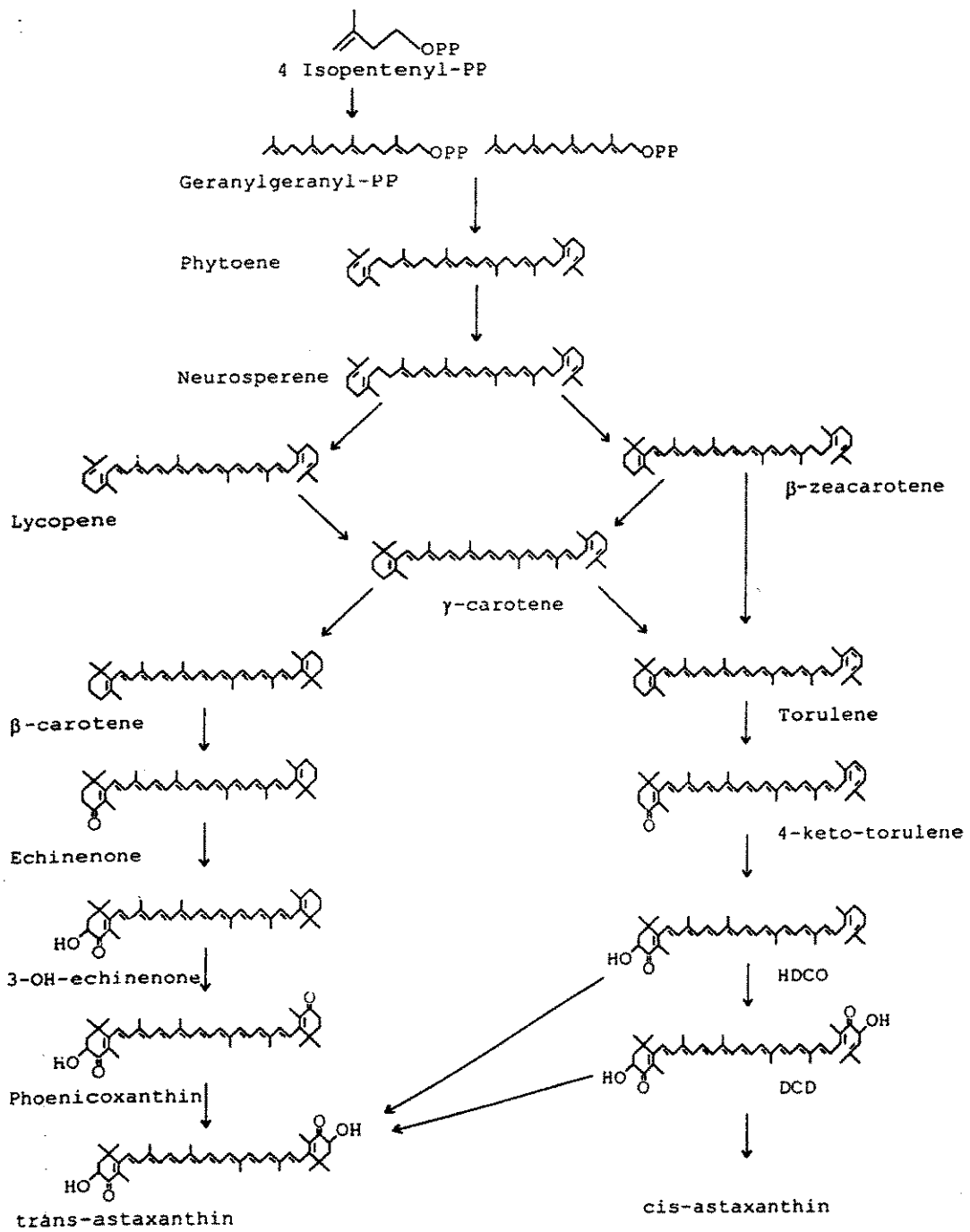
### **2.4 - Biossíntese**

Os carotenóides são sintetizados somente pelas plantas e por microrganismos. Os carotenóides presentes em animais são obtidos através da alimentação destas duas fontes e acumulados nos seus tecidos, podendo ser ligeiramente modificados por reações de oxidação (GOODWIN & JAMIKORN, 1954).

A biossíntese dos carotenóides em plantas tem sido estudada há mais de 50 anos. Trabalhos recentes em relação a biossíntese envolvem a manipulação genética de microrganismos (MISAWA et al., 1990; MISAWA et al., 1997; YOKOYAMA et al., 1995).

A primeira etapa da biossíntese do carotenóide envolve a formação de geranylgeranyl pirofosfato e na sua conversão em fitoeno (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahidro- $\psi,\psi$ -caroteno), através da ação da enzima fitoeno sintetase (Figura 1). Esse primeiro caroteno não apresenta coloração. Através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados. Em *Phycomyces*, 4 desidrogenações resultam na formação do licopeno ( $\psi,\psi$ -caroteno), que é o pigmento característico do tomate. A formação de anéis  $\beta$  nas extremidades da estrutura ocasiona a formação do  $\beta$ -caroteno, pigmento característico da cenoura.

A biossíntese de astaxantina por *X. dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) pode ocorrer de duas maneiras (Figura 1). Em ambas as vias ocorrem oxidação do carbono 4 em um dos anéis do  $\beta$ -caroteno ou no anel do toruleno (3',4'-dideidro- $\beta$ - $\psi$ -caroteno), introduzindo um grupo ceto. Antes que ocorra a oxidação do segundo C-4 do outro anel do  $\beta$ -caroteno para formar outro grupo ceto, ocorre a hidroxilação do C-3 no mesmo anel, permitindo a formação dos intermediários 3-OH-equinenona ( $\beta,\beta$ -caroten-4-ona) e 3-OH-3',4'-dideidro- $\beta$ - $\psi$ -caroteno-4-ona (HDCO), do  $\beta$ -caroteno e toruleno, respectivamente. O intermediário 3-OH-equinenona sofre oxidação, seguida de hidroxilação no anel  $\beta'$ , formando a *trans* astaxantina. Na outra via alternativa, o HDCO também sofre oxidação, seguida de hidroxilação no anel  $\beta'$ , formando a *cis* astaxantina. Em contraste aos *Haematococcus pluvialis* e *A. aurautiacum*, nem a cantaxantina ( $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona) nem a zeaxantina foram encontradas em *X. dendrorhous*, nos meios de cultivos estudados (ANDREWES et al., 1976; JONHSON et al., 1979).



**Figura 1:** Biossíntese de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). HDCO = 3-OH-3',4'-didehidro- $\beta$ - $\psi$ -caroteno-4-ona

### 3 – MICRORGANISMOS PRODUTORES DE CAROTENÓIDES

Os carotenóides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintéticos, como por exemplo, as algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por microrganismos não fotossintéticos como bactéria, fungo e levedura. Muitos destes microrganismos, como as leveduras *Rhodotorula*; o fungo *Neurospora*, *Phycomyces* e *Blakeslea*; e as bactérias *Rhodobacter capsulatus* e *Erwinia*, têm sido utilizados como sistema modelo, para estudar a fotorregulação, biossíntese e a influência de modificações genéticas nos microrganismos.

Apesar de existirem muitos microrganismos produtores de carotenóides, apenas alguns são biotecnologicamente interessantes, destacando-se a produção de beta-caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora*, pelas microalgas marinhas *Dunaliella*, a produção de astaxantina pela microalga de água doce *Haematococcus sp* e pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

Na Tabela 1 estão apresentados os microrganismos tecnologicamente interessantes, com a produção dos principais carotenóides, produzidos pelos processos de biotecnologia.

**Tabela 1:** Microrganismos produtores de carotenóides

<b>Espécies</b>	<b>Carotenóides principais</b>
<b>1. Cianobactéria</b>	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
<b>2. Algas verdes</b>	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína ((3R,3'R,6'R)- $\beta,\epsilon$ -caroteno-3,3'-diol)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Luteína
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<b>3. Fungos e leveduras</b>	
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula sp</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno e $\beta$ -caroteno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Toruleno e torulahodina (3',4'-didehidro- $\beta,\psi$ -caroten-16'-oico)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina

**Tabela 1:** Microrganismos produtores de carotenóides (continuação)

Espécies	Carotenóides principais
<b>4. Bactérias</b>	
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas
<i>Mycobacterium phlei</i>	Xantofilas e $\beta$ -caroteno
<i>Flavobacterium sp</i>	Zeaxantina e $\beta$ -caroteno
<i>Deinococcus sp</i>	Derivados 4-ceto do $\gamma$ -caroteno
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Derivados 4-ceto do $\gamma$ -caroteno
<i>Brevibacterim sp</i>	Cantaxantina e astaxantina
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium brevicaiie</i>	Cantaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina
<i>Pseudomonas sp</i>	Rodoxantina (4',5'-didehidro-4,5'-retro- $\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diona)

Johnson & Schroeder (1995)

### 3.1 – Leveduras

A grande capacidade que as leveduras têm de crescer em vários substratos como resíduos de alfafa (OKAGBUE & LEWIS, 1984), melão (HAARD, 1988), pasta de leveduras e hidrolisados proteicos, torna-as microrganismos promissores para a produção de carotenóides.

Infelizmente, os carotenóides não são encontrados nas leveduras utilizadas atualmente nas indústrias tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* e *Candida utilis*. A descoberta de *Phaffia* na década de 1960 e a elucidação das estruturas químicas dos pigmentos fez com que o interesse em produzir carotenóides por leveduras aumentasse. As principais leveduras estudadas para a produção de carotenóides são as dos gêneros



*Phaffia rhodozyma* e *Rhodotorula* sp, as quais destacam-se pela alta concentração de astaxantina e toruleno, respectivamente. Recentemente, devido às modernas técnicas de biologia molecular, a *Phaffia rhodozyma* foi reclassificada e renomeada como *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

A concentração total de carotenóides das linhagens selvagens de leveduras do gênero *Rhodotorula*, em geral, varia de 10 a 100 µg/g de biomassa seca, sendo o toruleno, a torulahodina e o β-caroteno os principais carotenóides deste gênero, dependendo das condições de cultivo. Devido a um alto crescimento celular em curto tempo, as linhagens de *Rhodotorula* são uma boa alternativa como fonte de proteína, na preparação de ração para aves e peixes (PERRIER et al., 1995).

O teor de astaxantina presente em linhagens de *Phaffia rhodozyma* varia de 40 a 95% do total de carotenóides, dependendo das linhagens e das condições do processo fermentativo (JOHNSON & GIL-HWAN, 1991). Linhagens selvagens de *Phaffia rhodozyma* sintetizam de 200 a 400 µg de carotenóides totais por célula seca. Esta levedura avermelhada é uma promissora fonte natural de carotenóides para ser usado como suplemento alimentar nas rações de aves (JONHSON et al., 1980), peixes e crustáceos (JONHSON et al., 1977).

Linhagens de *Phaffia* produzem astaxantina, HDCO (3-hidroxi-3',4'-dideidro-β-ψ-caroteno-4-ona), toruleno, β e γ-caroteno como principais pigmentos. Os níveis dos pigmentos isolados nas leveduras selvagens são baixos, porém eles têm sido elevados através da otimização do meio de produção, concomitantemente com técnicas de engenharia genética.

O processo de fermentação como o de batelada, batelada-alimentada e fermentação contínua, devem ser ainda otimizados para a produção comercial de carotenóides. As leveduras e bactérias são mais apropriadas para esses sistemas tradicionais de fermentação, embora a produção dos carotenóides por estes microrganismos ainda não seja viável comercialmente. Porém, trabalhos recentes de engenharia genética de *Rhodobacter*, *Erwinia*, e *Escheria coli* sugerem que num futuro próximo, será possível obter

microrganismos sintetizadores de altas concentrações de carotenóides (YOKOYAMA et al., 1995).

### 3.1.1 - Efeito da temperatura e pH

A temperatura e pH exercem grande influência no crescimento microbiano, metabolismo, e na viabilidade celular. As concentrações enzimáticas de  $\beta$ -caroteno sintetase e toruleno sintetase são afetadas pela temperatura (HAYMAN et al., 1974). De acordo com Goodwin (1980), linhagens de *Rhodotorula* sp podem ser cultivadas em meios fermentativos na faixa de temperatura variando de 5 a 26°C.

A concentração relativa de cada pigmento em relação a concentração de carotenóides totais foi alterada pela temperatura do processo, quando *Rhodotorula glutinis* foi cultivada a 5°C e 25°C. *Rhodotorula* sp produziu predominantemente  $\beta$ -caroteno em temperaturas baixas e, sintetizou toruleno e torulahodina em temperaturas mais elevadas. Entretanto, o crescimento ótimo de *Rhodotorula glutinis*-22P foi a 30°C (FRENGOVA et al., 1995).

A biossíntese de carotenóides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 horas de fermentação, seguida de uma elevação durante a fase intensa da carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo (FRENGOVA et al., 1994).

O pH inicial teve um grande efeito no crescimento da levedura *Rhodotorula rubra*, assim como na produção de carotenóides (SHIH & HANG, 1996). Em pH baixos, na faixa de 3,4 a 4,5, houve inibição do crescimento celular e da produção de carotenóides. A máxima produção celular e de pigmentos ocorreu a pH inicial de 5,0.

A co-fermentação por *Rhodotorula glutinis* 22P e *Lactobacillus helveticus* 12A foi estudada por Frengova et al. (1995) para aumentar a produção de carotenóides, tais como  $\beta$ -caroteno, toruleno e torulahodina. A máxima produção foi de 31,9 g/L para células e de 8.388  $\mu$ g/L para carotenóides, quando cultivados a 30°C com meio contendo lactose como

fonte de carbono. Eles observaram que a temperatura de fermentação de ambas as culturas, influenciava a carotenogênese da levedura, alterando as proporções relativas dos carotenóides formados.

Martin et al. (1993) determinaram os parâmetros de crescimento e produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra*. As condições ótimas de crescimento foram: glicose, 15 g/L, pH 5,5, temperatura de 22°C a 200 rpm em shaker durante 4 dias de cultivo para obtenção de 4,8 g/L de biomassa seca.

Tada & Shiroishi (1982a) estudaram o efeito da temperatura na fotorregulação da carotenogênese e, observaram que o efeito da temperatura na carotenogênese está relacionado à intensidade da luz. A concentração de carotenóide produzido e a taxa de crescimento de *R. minuta* sob iluminação contínua, estão apenas relacionados a reação fotoquímica.

A influência do pH, temperatura, concentração do substrato na fermentação de *Phaffia rhodozyma*, foram avaliados por Fang & Chiou (1993). A temperatura ótima de crescimento celular e produção de carotenóides foi de 15°C em pH inicial de 5,0, obtendo-se 4,90 g de massa celular. Também foi neste valor de pH, que se obteve os maiores valores de rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) e de astaxantina ( $Y_{p/s}$ ), com 1.894,1 µg/g de células secas e 574,3 µg/g de açúcar consumido. Entretanto, Johnson & Gil-Hwan (1991) haviam reportado que a temperatura ótima de crescimento e de produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* foi de 20-22°C.

Johnson et al. (1991) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não são as mesmas para o crescimento celular. O pH ótimo de crescimento para *P. rhodozyma* foi determinado como 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0.

### 3.1.2 – Efeito da composição do meio

Em geral, os valores máximos de carotenóides totais não estão diretamente correlacionados aos valores máximos da biomassa celular, sendo que a máxima produção de carotenóides observada por Fang & Chiou (1993) ocorreu depois de 35 horas de fermentação, enquanto o crescimento celular máximo ocorreu após 25 horas.

As linhagens das leveduras do gênero *Rhodotorula* são oleaginosas (RATLEDGE, 1981). Altas taxas de C/N aumentam a biossíntese de lipídeos em fungos. Martin et al. (1993) obtiveram 5,7% de lipídios na biomassa de *R. rubra*, valor inferior ao de 7% observado por Moo-Young et al. (1979). Linhagens de *Phaffia rhodozyma* cultivadas em meio com limitação de nitrogênio, resultaram em diminuição da concentração de astaxantina. Provavelmente isso aconteceu porque o substrato comum, acetil-coenzima-A, foi deslocado da biossíntese de carotenóides para formação de lipídeos, devido a alta relação C/N.

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *Phaffia rhodozyma*. A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenóides totais (MEYER & PREEZ, 1994). Resultados similares foram obtidos por Calo et al. (1995a), que observaram o aumento de duas vezes da concentração de astaxantina, quando utilizaram extrato de leveduras. An et al. (1991) observaram que a fonte de nitrogênio é lentamente absorvida pelas linhagens mutantes de *P. rhodozyma*, indicando que a biossíntese de astaxantina pode ser regulada pelo teor de nitrogênio.

Shih & Hang (1996) usaram resíduos da produção de chucrutes como substrato para o meio de fermentação de *Rhodotorula rubra*. A produção máxima dos carotenóides totais, expresso como  $\beta$ -caroteno, foi de 1.041  $\mu\text{g/L}$  ou 131 $\mu\text{g/g}$  em relação ao peso celular seco, após 48 h de crescimento a 30°C e pH inicial 5,0. Eles concluíram que este resíduo industrial pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de carotenóides.

Frengova et al. (1994) estudaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, em escala piloto. O meio de fermentação era composto de ultrafiltrado de soro de leite, com concentração de lactose variando de 3,9 a 7,1%. A máxima produção de carotenóides obtida foi de 268 µg/g de células secas, no meio contendo 3,9% de fonte de carbono. Eles observaram que a produção de carotenóides foi paralela ao crescimento celular, porém, a produção máxima de células e a máxima concentração do pigmento não ocorreram simultaneamente. A máxima concentração de carotenóides ocorreu quando o crescimento celular já havia cessado. Os três principais carotenóides identificados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foram β-caroteno (43,9 µg/g), toruleno (23 µg/g) e torularrodina (182 µg/g).

Fang & Chiou (1996) determinaram os valores de rendimento celular ( $Y_{x/s}$ ) de *P. rhodozyma* em vários substratos (g de células secas/ g de açúcar consumido): fonte de nitrogênio, 17,7-19,6; fosfato, 87,2; potássio, 65,8; magnésio, 1.040 e cálcio, 2.687. O baixo valor do rendimento da biomassa de nitrogênio indicava que a utilização do nitrogênio estava relacionada ao acúmulo de carotenóides na célula. Estes autores sugeriram que seria interessante determinar os valores de rendimento celular das linhagens selvagens, assim como das linhagens hiperprodutoras de carotenóides.

Hayman et al. (1995) estudaram o crescimento de *Phaffia rhodozyma*, utilizando farelo de milho como fonte de nitrogênio. Foram realizados ensaios contendo meio YM com e sem o farelo de milho. Os ensaios foram realizados a 20°C, 300 rpm em shaker por 72 horas. Após a centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, as células foram lavadas com água destilada e secas em estufas. Então os carotenóides foram extraídos com acetona ácida, até as células não apresentarem mais coloração. A concentração total de carotenóide foi medida em espectrofotômetro DU-65. Estes pesquisadores concluíram que o farelo de milho pode servir como substrato para a produção de carotenóides, uma vez que a concentração destes quando se utilizou o farelo foi de 2,4 µg/mL, e de 2,1 µg/mL quando se utilizou meio sem farelo, respectivamente.

De acordo com Reed (1982), o teor de proteínas na biomassa celular de leveduras variou de 40 a 65%, dependendo das condições de cultivo e da composição do meio de

cultura. Johnson et al. (1980) determinaram teor de proteína em *Phaffia rhodozyma* de 30%, enquanto que Martin et al. (1993) relataram 47%. Em *Rhodotorula rubra*, os teores de proteínas foram de 48% (MARTIN et al., 1993), 45% (MOO-YOUNG et al., 1979) e 38,2% (MATELLI et al., 1990). Em outro estudo, Jacob (1991) determinou teor de proteína de 21,6% em *Rhodotorula gracilis*, entretanto, nenhum dos artigos consultados sobre determinação de teores de proteínas em células de leveduras pigmentadas apresentou relação entre a composição do meio de cultivo com os teores de proteínas.

A fonte de carbono teve efeito significativo na produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, porém concentrações altas de glicose inibiram a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na pigmentação das colônias. As fontes de carbono que favoreceram melhor crescimento celular foram sacarose e glicose (SUTHERLAND et al., 1996).

Yamane et al. (1997) observaram que houve aumento de até 12 vezes da produção de  $\beta$ -caroteno quando *P. rhodozyma* foi crescida num meio com concentração de açúcar de 5% (p/v). Resultados similares foram obtidos por Haard (1988), que isolou  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -zeacaroteno como principais pigmentos de meio de fermentação com 100g/L de glicose.

Fang & Chiou (1993) aumentaram a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, otimizando as condições de cultivo. O extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de astaxantina, resultando numa concentração máxima de 8.637,5  $\mu\text{g/L}$ . Das fontes de carbono estudadas, a glicose foi a que obteve maior concentração de astaxantina (7.809,3  $\mu\text{g/L}$ ).

Haard (1988) otimizou a produção de astaxantina a partir da fermentação com melaço como fonte de carbono. Os ensaios foram realizados em shaker a 22°C, pH 5,0 e 50 mmoles de oxigênio/l.h. Utilizando-se a concentração de 1% de açúcar, a concentração da astaxantina no meio contendo L-arabinose foi de 379  $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca de levedura e, 552  $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca de levedura quando se utilizou melaço. Entretanto, o aumento da concentração de glicose de 1 a 4% (p/v) resultou em diminuição da concentração de astaxantina.

Vários trabalhos têm sido publicados sobre a adição de ácido acético (MEYER & PREEZ, 1994b) e ácido mevalônico na fermentação de *Phaffia rhodozyma*. Calo et al. (1995b) verificaram que a adição de mevalonato aumentou significativamente a produção de carotenóides, porém a sua utilização em escala industrial torna-se inapropriado devido ao seu alto custo. Gil-Hwan et al. (1996) obtiveram maior rendimento da produção de astaxantina, quando sais de fosfato foram adicionados ao meio de fermentação de *Phaffia rhodozyma*.

### 3.1.3 - Efeito da intensidade luminosa

O efeito da luz na produção de carotenóides por leveduras, vêm sendo estudado há muito tempo (LEDERE, 1933). Em 1952, Praus observou que a síntese de carotenóides em *Rhodotorula gracilis* era afetada pela luz, assim como a composição relativa de cada carotenóide produzido. Por outro lado, Nakagwa & Tatsumi (1960) verificaram que a concentração de carotenóides produzida por *Rhodotorula sp* não era alterada pela presença da luz. O efeito da iluminação durante o processo de fermentação parece variar de acordo com a espécie de levedura.

Tada & Shiroishi (1978) observaram que a luz não afetou a taxa de crescimento celular, assim como o consumo de glicose e aminoácidos por *Rhodotorula minuta*. Porém, a concentração de carotenóides nas células cultivadas sob iluminação, diferiu daquelas cultivadas no escuro. As células cultivadas sob intensidade luminosa de 4.000 lux produziram 140 µg/g de carotenóides por g de célula seca, enquanto que as células crescidas no escuro apresentaram somente de 10 a 15 µg/g.

Tada et al. (1982) mostraram que em *Rhodotorula minuta*, o fitoeno e outros carotenóides tiveram concentrações baixas quando as células foram cultivadas no escuro, mas estas concentrações aumentaram quando as células foram cultivadas sob iluminação. Eles concluíram que as enzimas necessárias para converter o fitoeno em outros carotenóides não eram induzidas pela luz, e somente as enzimas envolvidas na síntese de fitoeno sofreram influência da luz. Tada & Shiroishi (1982b) realizaram outro trabalho com a finalidade de observar o efeito da atividade enzimática de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-

coenzima-A redutase (HMG-Co-A) em relação a intensidade luminosa. Eles observaram que a atividade enzimática da HMG-CoA redutase foi maior para as células cultivadas sob iluminação, ou seja, a atividade enzimática é influenciada pela intensidade luminosa, utilizada durante a fermentação.

Embora a síntese de carotenóides seja estimulada pela luz, estudos realizados por Johnson et al. (1979) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação das células. Estudos realizados posteriormente por An & Johnson (1990), utilizando alta intensidade luminosa, mostraram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmentos. Foi observado, também, que houve aumento na produção de  $\beta$ -zeacaroteno, indicando a presença de estresse celular. Mutantes hiperprodutores de carotenóides foram menos susceptíveis à ação da luz.

A combinação da antimicina e luz foi estudada por aumentarem significativamente os níveis de carotenóides em *P. rhodozyma* (TADA & SHIROISHI, 1982c). A luz restaurou o crescimento de células anteriormente inibidas por antimicina depois de 12-24 horas, sugerindo que a luz deve induzir uma via respiratória alternativa, facilitando a oxidação de NADPH e favorecendo o crescimento celular.

Tada & Shiroishi (1982d) estudaram o efeito da adição de inibidores na fotorregulação em *R. minuta*. Inibidores de proteínas e ácidos nucleicos como 5-fluordesoxiuridina e 5-fluoruracila foram adicionados aos meios de cultivo e os ensaios realizados no escuro. Os pesquisadores observaram que fluordesoxiuridina e 5-fluoruracila reduziram a produção de carotenóides.

Vásques & Santos (1998) verificaram que *Phaffia rhodozyma* quando cultivada sob iluminação produziu astaxantina como principal carotenóide. Entretanto, quando esta levedura foi cultivada na ausência de luz, o carotenóide principal encontrado foi o HDCCO, com concentração acima de 0,75 mg/L.



#### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, GIL-HWAN; SCHUMAN, D.B; JONHSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Applied and Environmental Microbiology**, **55**:116-124, 1989.

AN, GIL-HWAN; JONHSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, **57**:191-202,1990.

AN, GIL-HWAN; BIELICH, J.; AUERBACH, R.; JOHNSON, E. A. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology**, **9**:70-73, 1991.

ANDREWS, A. G.; PHAFF, H. J.; STARR, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**, **15**:1003-1007, 1976.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press p.811, 1983.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A.  $\beta$ -Carotene production with algae. In: Vandamme, J. E. (ed.). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 15-26, 1989.

CALO, P.; VELASQUEZ, J. B.; SIEIRO, C.; VILLA, T. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. **Journal of Agricultural Chemistry**, **43**:1396-1399, 1995a.

CALO, P.; MIGUEL, T.; VELASQUEZ, J. B.; VILLA, T. G. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, **17**:575-578, 1995b.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **75**:466-469, 1993.

- FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, **16**:175-181, 1996.
- FEOFILOVA, G. I. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Applied Biochemical Bioengineering**, **30**:143-153, 1994.
- FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultra filtrate. **Biotechnology and Bioengineering**, **44**:888-894, 1994.
- FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, **17**: 1001-1006, 1995.
- GIL-HWAN, AN; CJOI, E.; RHEE, S. Medium optimization for cultivation of carotenoids hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FOIC. **Journal of Fermentation Bioengineering**, **5**:515-518, 1996.
- GOODWIN, T. W.; JAMIKORN, M. Studies in carotenogenesis II. Carotenoid synthesis in alga *Haematococcus pluvialis*. **Biochemical Journal**, **54**:376-399, 1954.
- GOODWIN, T. W. Nature and distribution of carotenoids. **Food Chemistry**, **5**:3-13, 1980.
- HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeast on molasses. **Biotechnology Letters**, **10**:609-614, 1988.
- HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, **120**:1339-1343, 1974.
- HAYMAN, G. T.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. **Journal of Industrial Microbiology**, **14**:389-395, 1995.
- JACOB, Z. Enrichment of wheat bran by *Rhodotorula gracilis* through solid-state fermentation. **Folia Microbiology**, **36**:86-91, 1991.

JONHSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of Fish Board Canadian**, **34**:2417-2421, 1977.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, **115**:173-183, 1979.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Science**, **59**:1777-1782, 1980.

JONHSON, E. A.; GIL-HWAN AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**, **11**:297-326, 1991.

JONHSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, **11**:297-326, 1995.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. General classification of the yeasts. In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. ed. **The yeasts: a Taxonomy Study**. Amsterdam, Elversier Science, p. 1-44, 1984.

LEDERER, E. Carotenoid of red yeast. **Compt. Rend.**, **197**:1964-1965, 1933.

LODDER, J. **The yeasts: a Taxonomic Study**. London, North-Holland p.1385, 1970.

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **76**:321-325, 1993.

MATELLI, H. L.; DE SILVA, I. M.; SOUZA, N. O.; POMEROY, D. Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnology Letters**, **12**:207-208, 1990.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **40**:789-785, 1994a.

- MISAWA 1990, N.; NAKAGAWA, M.; KOBAYASHI, K.; YAMANO, S.; IZAWA, Y.; NAKAMURA, K.; HARASHIMA, K. Elucidation of *Erwinia uredora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **172**:6704-6712, 1990.
- MISAWA, N.; SATOMI, Y.; KONDOO, K.; YOKAYAMA, A.; KAJIWARA, S.; SAITOP, T.; OHTANI, T.; MIKI, W. Structure and functional analysis of marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. **Journal of Bacteriology**, **177**:6575-6584, 1997
- MOO-YOUNG, M.; DAUGULIS, A. J.; CHAHAL, D. S.; MACDONALD, D. G. The waterloo process for SCP production from waste biomass. **Process Biochemical**, **14**:38-40, 1979.
- NAKAGWA, M.; TATSUMI, C. Studies on the carotenogenesis of *Rhodotorula* sp. **Journal of Agricultural Chemistry of Japan**, **34**:195-198, 1960.
- OKAGBUE, R. N.; LEWIS, M. J. Influence of mixed culture conditions on yeast wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal Applied Bacteriology**, **59**:243-255, 1984.
- PFANDER, H. **Key to Carotenoids**, 2nd ed. BIRKHAUSER, BASEL, 1987.
- PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GAYZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives Microbiology**, **168**:173-179, 1995.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MIRAK, E. M. **The life of the Yeasts**. Cambridge Massachusetts, Harvard University Press, p.341, 1978.
- PHAFF, H. J. Isolation of yeasts from natural sources. **In**: LACERDA, D. P. ed. **Isolation of Biotechnology Organisms from Nature**. New York, McGraw-Hill p.53-79, 1990.
- PRAUS, R. Biosynthesis of carotenoids in *Rhodotorula gracilis*. **Chemical Journal**, **46**:643-645, 1952.

RATLEDGE, C. Yeasts and moulds as sources of oils and fats. **IN:** Pryde, E. H., and Mukherjee, K. D. (ed.), **New Sources of Fats and Oils**. American oil chemists society, Champaign, IL (1981). 1981

REED, G. Microbial biomass, single cell protein, and other microbial products. **In** Reed, G. (editor), **Prescott and Dunn's, Industrial Microbiology** (4a edição). Avi publishing company, Westport, CT p. 541-592, 1982.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The journal of Biological Chemistry**, **270**:18374-18379, 1995

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lebensm.-Wiss. U.- Technology**, **29**:570-572, 1996.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. AND PHAFF, H. J.: Carotenoid pigments of yeast, P. 493-515. **In** Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Ed.), **The Yeasts**, Vol. 2. Academic Press, New York, 1971.

SOUZA, L. C. Distribution of yeast in nature. **In:** ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. ed. **The Yeasts: Biology of the Yeasts**. London, Academic Press, v.1, p.79-106, 1969.

SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G.; PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, **18**: 975-980, 1996.

TADA, M.; SHIROISHI, M. The influence of the light illumination on the growth and carotenoid formation of *Rhodotorula minuta*. **Science Agricultural Okayama University**, **50**:63-68, 1978.

TADA, M.; SHIROISHI, M.; HASEGAWA, K.; SUZUKI, T.; IWAI, K. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* IV. **Plant & Cell Physiology**, **23**:607-614, 1982.

TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* I. **Plant & Cell Physiology**, **23**:541-547, 1982a.

TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* V. **Plant & Cell Physiology**, **23**:615-621, 1982b.

TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* II. **Plant & Cell Physiology**, **23**:615-621, 1982c.

TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* III. **Plant & Cell Physiology**, **23**:567-573, 1982d.

VAN DER WALT, J. P. Criteria and methods used in classification. **In**: LODDER, J. (ed). **The Yeasts, a Taxonomic Study**, 2<sup>nd</sup> ed. London, North-Holland Co. Amsterdam, p. 34-113, 1970.

VÁSQUES, M.; SANTOS, V. 3-Hydroxy-3',4'-didehydro- $\beta$ - $\psi$ -caroten-one (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnology Letters**, **20**:181-182, 1998.

YAMANE, YU-ICHI; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, **63**:4471-4478, 1997.

YOKOYAMA, A.; MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiology Letters**, **128**:139-144, 1995.

## **Capítulo 2**

# **Isolamento, seleção e identificação de leveduras pigmentadas isoladas na região de Campinas**

## RESUMO

As leveduras pigmentadas foram isoladas de amostras de solos, flores, folhas, frutos da região de Campinas-SP e de alimentos processados. As amostras foram colocadas em frascos de erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de meio de Extrato de Malte e Levedura (YM), e incubadas a 30° C por 48 horas. Após 48 horas, as amostras foram inoculadas em placas de petri contendo meio ágar-YM e incubadas a 30°C, por 120 horas. As colônias de leveduras que apresentaram coloração entre amarelo e vermelho, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar YM inclinado e incubadas a 30°C até crescimento satisfatório. Estas leveduras foram reisoladas, pelo método de estrias de esgotamento, em placas de petri contendo meio ágar YM (30°C por 72 horas) e, posteriormente, transferidas para tubos de ensaios contendo ágar GYMP inclinado. As culturas pigmentadas foram codificadas do seguinte modo: L12, isolada como contaminante em massa de tomate; L108, isolada de solo da região da Universidade Estadual de Campinas; L125, isolada a partir de folhas da cana-de-açúcar; L135 e L137 isoladas de solo da cidade de Holambra-SP. Através das características morfológicas, de reprodução, testes fisiológicos e bioquímicos as leveduras foram identificadas como: L12, L108, L135 e L137 como *Rhodotorula mucilaginosa*, e L125 como *Rhodotorula graminis*.

**Palavras chave:** Levedura, *Rhodotorula*, carotenóides



## ABSTRACT

Pigmented yeasts were collected from soils, flowers, leaves, fruits from Campinas-SP region, and industrialized foods. The samples were put in 50 mL erlenmeyers flasks, containing YM broth, and they were incubated at 30°C for 48 hours. After 48 hours, these samples were inoculated in Petri plates with YM agar, and incubated at 30°C for 120 hours. The yeasts colonies that had color between red and yellow were transferred to tubes, containing YM agar, and incubated at 30°C. These yeasts were reisolated by screening in Petri plates with YM agar (30°C for 72 hours) and then, transferred into tubes containing GYMP agar. After the selection, the pigmented yeasts were identified by a code: L12, was isolated from tomato sauce; L108, from State University of Campinas; L125, from leaves of sugar cane; L135 e L137, from soils of Holambra-SP. The yeasts were identified by their morphology characteristics, reproduction characteristics, physiology and biochemical tests. The yeasts L12, L108, L135 and L137 were identified as *Rhodotorula mucilaginosa* and L125 as *Rhodotorula graminis*.

**Key words:** Yeast, *Rhodotorula*, carotenoids

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, possuindo reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. A sua distribuição na natureza é ampla, podendo ser encontradas em folhas, frutos, grãos de cereais e outros substratos contendo açúcares (SOUZA, 1969), e também em solos, águas, ar, tecidos de alguns animais e insetos.

O uso destes microrganismos para a produção de alimentos, via fermentação, ocorre desde o início das civilizações, para a fabricação de bebidas alcoólicas, pães e queijos (PHAFF et al., 1978).

As leveduras pertencem à divisão Eumycota, classe Ascomycetes, Basidiomycetes e Deutetromycetes. As leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas produzem esporos e apresentam ciclo sexual já conhecido. As leveduras deuteromicéticas, também conhecidas como leveduras imperfeitas, não possuem ciclo sexual conhecido ou descrito, mas apresentam características morfológicas semelhantes às leveduras ascomicéticas ou basidiomicéticas (KREGER-VAN RIJ, 1984; PHAFF, 1990).

As leveduras são classificadas e identificadas através de características morfológicas e fisiológicas. Para uma identificação mais específica, estudos bioquímicos e de exigências nutricionais são mais relevantes que traços morfológicos e sexuais.

A assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, que dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Açúcares como glicose, frutose, manose são assimilados por todas as espécies estudadas (BARNETT et al., 1983, SOUZA, 1969), enquanto que alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois, ácidos orgânicos entre outros são utilizados por apenas algumas espécies de leveduras (PHAFF, 1990).

As leveduras são capazes de utilizar diversas fontes de nitrogênio inclusive amônia, entretanto assimilação de nitratos, nitritos, aminoácidos e aminas é específica para algumas espécies (PHAFF, 1990).

Os testes de DBB (diazonium blue B) e hidrólise da uréia são de grande importância para classificar e distinguir estados anamórficos de leveduras ascomicéticas e basidiomicéticas (BARNETT et al., 1990, HAGLER, 1978).

Vários meios de cultura são utilizados para o crescimento de leveduras como Extrato de Malte, YM (0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1,0% de glicose), GYMP (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 0,2% de fosfato de sódio monobásico) e Rose Bengal Cloranfenicol (0,5% de farelo de soja, 1,0 % de glicose, 0,1% de fosfato de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,005% de rose bengal, 1,5% de ágar). Estes meios não são seletivos para leveduras, porém apresentam resultados satisfatórios de crescimento.

Nos últimos anos, técnicas de identificação de leveduras como as técnicas moleculares vêm sendo aprimoradas, e novos gêneros e espécies foram descritos ou rearranjados (KURTZMAN & FELL, 1998). Recentemente, as leveduras coloridas pertencentes ao gênero *Phaffia rhodozyma*, foram estudadas e reclassificadas em como *X. dendrorhous*.

A variedade de microrganismos com potencial biotecnológico para produzir carotenóides é limitada, devido ao alto custo de produção. Entretanto, a conotação natural destes bioprodutos, garantem a estes um mercado promissor e crescente. Devido a capacidade das leveduras de crescerem em resíduos orgânicos industriais ricos em açúcares e matéria orgânica, estes microrganismos tornam-se biotecnologicamente interessantes para a produção de carotenóides. As leveduras, também, são fontes naturais de proteína, podendo ser utilizadas em rações de salmões e frutos do mar. Outra razão importante, deve-se à sua história; as leveduras têm sido utilizadas para a produção de alguns alimentos, desde o início da civilização humana, sempre associadas ao processo fermentativo.

Pelo fato das plantas oferecerem uma grande variedade de substratos (PHAFF & STARMER, 1987) para o crescimento de leveduras, e o Brasil possuir um ecossistema diverso e único, este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar leveduras pigmentadas da flora brasileira, capazes de produzir carotenóides.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 - Coleta das Amostras**

Para o isolamento de leveduras pigmentadas, as amostras foram coletadas de solos, flores, folhas e frutos da região de Campinas-SP e de alimentos processados. As amostras foram coletadas e acondicionadas em embalagens assépticas até a realização das análises. Após isolamento das culturas que apresentaram coloração, as culturas foram codificadas para facilitar as futuras análises de identificação.

Os códigos, assim como as origens das culturas que apresentaram coloração foram: L12, isolada como contaminante em massa de tomate; L108 isolada de solo da região da Universidade Estadual de Campinas; L125 isolada a partir de folhas da cana-de-açúcar; L135 e L137 isoladas de solo da cidade de Holambra-SP.

### **2.2 – Isolamento e seleção de Leveduras**

As amostras foram colocadas em frascos de erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de meio de Extrato de Malte e Levedura (YM), e incubadas a 30° C por 48 horas. Após 48 horas, as amostras foram inoculadas em placas de petri contendo meio ágar-YM e incubadas a 30°C por 120 horas. As colônias de leveduras isoladas, com coloração entre amarelo e vermelho, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar YM inclinado e incubadas a 30°C até crescimento satisfatório.

As culturas de leveduras foram reisoladas, pelo método de estrias de esgotamento, em placas de petri contendo meio ágar YM (30°C por 72 horas) e, posteriormente,

transferidas para tubos de ensaios contendo ágar GYMP inclinado. Após esta etapa, a pureza das linhagens foi constatada através de exame microscópico em preparação da lâmina a fresco.

### **2.3 - Preservação das Leveduras Isoladas**

As culturas selecionadas foram transferidas para tubos inclinados, contendo o meio GYMP ágar (HAGLER, 1978) e, após o crescimento, armazenadas a 4°C. As culturas também foram preservadas em óleo mineral, que consiste em recobrir com óleo mineral estéril as culturas crescidas em tubos contendo meio de GYMP ágar inclinado por 24 horas. Para evitar possibilidade de perdas da viabilidade das culturas, estas foram liofilizadas.

### **2.4 - Caracterização das Leveduras**

A classificação das leveduras foi baseada nas características de reprodução vegetativa, reprodução sexuada, testes fisiológicos e bioquímicos, seguindo a metodologia descrita por Lodder (1970), Kreger-Van Rij (1984) e Barnett et al. (1983, 1990). A identificação foi baseada, na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico das linhagens em estudo, cujos resultados foram comparados com os dados das espécies de leveduras de referência descritas na literatura (KREGER-VAN RIJ, 1984, KURTZMAN & FELL, 1998, SPENCER & SPENCER, 1997, BARNETT et al., 1983).

Para utilização dos testes, foram usados os inóculos obtidos das culturas crescidas em GYP-Sabouraud ágar (Difco) por 24-48 horas, que foram transferidos para tubos com YNB (yeast nitrogen base - Difco) e incubados por 5 dias a 27°C, sendo agitados diariamente para exaurir sua reservas nutritivas.

## **2.4.1 - Características da reprodução vegetativa**

### **2.4.1.1 - Morfologia das células vegetativas**

As características como arranjo, forma de células e o tipo de divisão celular, apresentadas pelas culturas, foram observadas através da análise microscópica das linhagens crescidas em meio líquido de GYP (2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de sódio monobásico) a 27°C por 24 horas. A formação de anéis, película e sedimento foram observadas após 7, 14 e 21 dias.

### **2.4.1.2 - Microcultivo**

As características como formação de pseudomicélios, micélios verdadeiros e artrósporos foram observadas através da inoculação das leveduras em placas de Petri, contendo meio CMA (Corn Meal Ágar - Difco), sendo as culturas recobertas com lamínulas estéreis. As placas foram incubadas a 27°C e observadas em microscópio após 5 a 7 dias de incubação.

### **2.4.1.3 - Formação de balistosporos**

A formação de balistosporos foi verificada, utilizando-se a técnica de dois fundos de placas de Petri unidas com fita adesiva, uma contendo meio pobre (CMA) e outra contendo meio rico (GYP-Sabouraud ágar, Difco). As placas foram inoculadas e incubadas a 27°C por 3 a 4 semanas, com meio CMA na parte superior, para que na presença de balistosporos, os esporos sejam liberados no meio GYP, para serem observados macroscopicamente e microscopicamente.

## **2.4.2 - Características da reprodução sexuada**

As características da reprodução sexuada foram observadas através do exame microscópico das linhagens desenvolvidas nas placas com meio de isolamento (GYMP).

### **2.4.3 - Características fisiológicas e bioquímicas**

Depois da determinação das principais características morfológicas das linhagens selecionadas, foram realizados os testes para a verificação das principais características fisiológicas e bioquímicas.

#### **2.4.3.1 - Fermentação de carboidratos**

As linhagens foram testadas quanto a habilidade em metabolizar diferentes tipos de carboidratos. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaios tendo tubos de Durham invertidos, contendo 2 mL de meio basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona e solução de azul de bromotimol) acrescido de 1 mL do carboidrato em estudo. Os tubos foram inoculados com 0,1 mL de uma suspensão celular densa de culturas de 24 horas crescidas em GYP-sabouraud ágar e incubados a 27°C.

#### **2.4.3.2 - Assimilação de compostos de carbono**

Para a caracterização das linhagens, foram testadas fontes de carbono como hexoses, dissacarídeos, trissacarídeos, polissacarídeos, pentoses, álcoois, ácidos orgânicos e glicosídeos. Estas fontes de carbono foram utilizadas na concentração final de 0,5%, em placas de petri contendo YNB ágar (yeast nitrogen base - Difco), e as culturas foram incubadas a 27°C.

#### **2.4.3.3 - Assimilação de compostos de nitrogênio**

Foram testados alguns compostos nitrogenados como única fonte de nitrogênio como nitrato de potássio, nitrito de sódio, L-lisina e etilamina em placas de petri com meio YCB ágar (yeast carbon base, sem fonte de nitrogênio - Difco). As culturas foram mantidas a 27°C até crescimento satisfatório.

#### **2.4.3.4 - Crescimento a diferentes temperaturas**

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaios contendo meio GYP sabouraud, os quais foram inoculados e incubados em banho maria, variando-se a temperatura de 20, 35 e 37°C por 48 horas.

#### **2.4.3.5 - Crescimento em meio sem vitaminas**

As linhagens foram crescidas em placas de petri com meio VFB (vitamin free base – Difco) e incubadas a 27°C por 48 horas.

#### **2.4.3.6 - Produção de ácido a partir da glicose**

A produção de ácidos a partir da glicose foi observada através da inoculação da cultura em meio contendo CaCO<sub>3</sub> ágar (0,5% de extrato de levedura, 5,0% de glicose, 0,5% de carbonato de cálcio e 2,0% de ágar). A incubação foi a 27°C por 7 dias.

#### **2.4.3.7 - Síntese de compostos amilóides**

As placas utilizadas nos ensaios do item 2.4.3.2 também foram aproveitadas para verificar a síntese de compostos amilóides. Para tanto, as placas foram recobertas com lugol durante alguns minutos, após 21 dias de incubação. Se a coloração da colônia tornasse azul, o teste era positivo.

#### **2.4.3.8 - Hidrólise de uréia + DBB**

Nestes testes, a coloração de DBB e o teste de hidrólise de uréia foram observados simultaneamente. Após o crescimento em meio de GYP sabouraud ágar, as culturas foram inoculadas em tubos contendo YCB-uréia ágar (1,17% de YCB, 0,02% de fucsina ácida, 2,0% de ágar e 2,0% de uréia) e incubadas a 27°C por 72 horas.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de morfologia, fisiologia e reações bioquímicas das cinco culturas de leveduras isoladas estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1: Resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos das culturas de leveduras.**

Cultura	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				<i>Rhodotorula graminis</i>
	L12	L108	L135	L137	L125
Prova					
Pigmento	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Superfície	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Textura	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
Ascoporo	-	-	-	-	-
Conjugação	-	-	-	-	-
Pseudohifae	-	-	-	-	-
Micélio verdadeiro	-	-	-	-	-
Balistosporos	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+
DBB	+	+	+	+	+
Glicose 50%	-	-	-	-	-
20°C	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+
37°C	+ (fraco)	+ (fraco)	+ (fraco)	+ (fraco)	-
Fermentação de glicose	-	-	-	-	-
Síntese de amido	-	-	-	-	-

(-) resposta negativa à prova, (+) resposta positiva à prova

**Tabela 2: Resultados dos testes bioquímicos das culturas de leveduras.**

Cultura	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>				<i>Rhodotorula</i>
	L12	L108	L135	L137	<i>graminis</i>
Prova					
D-glicose	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	-
Celobiose	-	-	-	-	-
$\alpha$ -m-D-glucosídeo	-	-	-	-	-
D-xilose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	+
$\alpha$ - $\alpha$ -trealose	-	-	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+
N-acetil- glicosamina	-	-	-	-	-
Xilitol	+	-	-	+	+
Galactitol	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	+
Palatinose	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+
Glucitol	-	-	-	-	+
Meso-eritritol	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Ciclohexamida	-	-	-	-	-
Myo-inositol	-	-	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	+
2-K-gluconato	-	-	-	-	+

(-) resposta negativa à prova, (+) resposta positiva à prova

A partir dos resultados obtidos nas Tabelas 1 e 2, as culturas de leveduras pigmentadas foram tentativamente identificadas e classificadas como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*.

A produção de pigmentos carotenóides, foi pouco frequente entre todas as colônias de leveduras isoladas (242 colônias isoladas). Somente cinco linhagens produziram pigmentação rósea ou vermelha. Os resultados das provas de caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica das leveduras encontram-se nas Tabelas 01 e 02.

Nas Tabelas 1 e 2 observam-se que nenhuma das linhagens de *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula graminis* foram fermentadoras de glicose. Diferentemente das linhagens de *R. mucilaginosa*, somente a linhagem 125 (*Rhodotorula graminis*) assimilou arabinose, glucitol, nitrato de potássio e gluconato e não assimilou maltose, melezitose e palatinose. Nenhuma das linhagens analisadas produziram pseudomicélio e micélio verdadeiro. A produção de esporos não foram observadas nas culturas analisadas. Neste trabalho, as leveduras *R. mucilaginosa* isoladas tiveram um crescimento fraco a 37°C, enquanto que a *Rhodotorula graminis* não cresceu a essa temperatura. Todas as linhagens se mostraram sensíveis à cicloheximida. A capacidade de síntese de todas as vitaminas necessárias ao crescimento foi uma característica frequente entre os biotipos isolados, que cresceram em meio livre de vitaminas. A osmotolerância foi uma característica ausente entre as linhagens analisadas, pois nenhuma das espécies cresceram em meio com alta concentração de açúcar.

Embora quatro destas linhagens pertençam a mesma espécie (*mucilaginosa*), pode-se observar na Tabela 2 que elas diferem em alguns dos resultados quanto a assimilação de carbono. A *Rhodotorula mucilaginosa* L12 difere das outras linhagens de *R. mucilaginosa* L108 e L135, por assimilar xilitol e não assimilar trealose. As linhagens L108 e L135 diferem na assimilação de trealose, sendo o teste negativo e positivo, respectivamente.

Vários estudos sobre ecologia de leveduras têm sido realizados em ecossistemas brasileiros, porém nenhum destes estudos teve como objetivo isolar especificamente as

leveduras pigmentadas, produtoras de carotenóides. Entretanto, uma grande parte destes estudos relatam a presença de leveduras pigmentadas produtoras de carotenóides em ecossistemas brasileiros. Um vasto trabalho de seleção de leveduras da Estação Juréia-Brasil, realizado por Prada (1994), constatou que somente 7% das leveduras isoladas eram produtoras de pigmentos róseo ou vermelho e, 90% destas leveduras foram identificadas como pertencentes ao gênero *Sporobolomyces*.

Oliveira (1980) pesquisou as leveduras presentes em flores e em frutos de cajus, das variedades “amarela” e “vermelha” obtidas em plantações experimentais do Núcleo de Processamento de Alimentos (NUPA). Das 49 espécies analisadas, 80% das leveduras eram fermentativas, dentre elas a espécie de *Rhodotorula rubra*. Outro estudo da microbiota associada a flores e frutos de caju, realizado no estado da Paraíba-Brasil, constatou que as leveduras dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* sp eram predominantes (SANTOS et al., 1984). A presença predominante de leveduras dos gêneros *Rhodotorula* sp em flores e frutos de ecossistema brasileiro, foi também observada nos trabalhos de Robbs (1986) e Souza (1969). A presença de leveduras no solo foi observado por Bowen & Beech (1967) em amostras de maçãs coletadas no chão de pomar, destacando-se as dos gêneros *Totulopsis* e *Rhodotorula*. Assim como Bowen & Beech, Buhagiar & Barnett (1971) também consideram o solo como fonte de leveduras.

#### 4. CONCLUSÃO

A linhagem de L12 apresentou perfil fisiológico, bioquímico e morfológico semelhante à descrição padrão da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, diferindo apenas no teste de assimilação da trealose.

A linhagem de L108 apresentou perfil fisiológico, bioquímico e morfológico semelhante à descrição padrão da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, diferindo apenas nos testes de assimilação da trealose e xilitol.

A linhagem de L125 apresentou perfil fisiológico, bioquímico e morfológico semelhante à descrição padrão da espécie *Rhodotorula graminis*, diferindo apenas no teste de assimilação da ciclohexamida.

A linhagem de L135 apresentou perfil fisiológico, bioquímico e morfológico semelhante à descrição padrão da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, diferindo apenas no teste de assimilação de xilitol.

A linhagem de L137 apresentou perfil fisiológico, bioquímico e morfológico semelhante à descrição padrão da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*.

## 5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press p.811, 1983.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press p.1002, 1990.

BOWEN, J. F.; BEECH, F. W. Yeast flora of cider factories. **Journal Applied Bacteriology**, 30:475, 1967.

BUHAGIAR, R. W. M.; BARNETT, J. A. The yeasts of strawberries. **Journal Applied Bacteriology**, 34:727-739, 1971.

HAGLER, A. N. **Ecologia e Taxonomia de Leveduras em um Estuário Poluído e em Ambientes Marinhos do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. Tese de doutorado em microbiologia defendida no Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 440 1978.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. General classification of the yeasts. **In: KREGER-VAN RIJ, N. J. W. ed. The yeasts: a Taxonomy Study**. Amsterdam, Elsevier Science, p. 1-44, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeast: a Taxonomic Study**. Elsevier, 1998, 4<sup>th</sup> edition, p.1955.

LODDER, J. **The yeasts: a Taxonomic Study**. London, North-Holland p.1385, 1970.

OLIVEIRA, R. B. **Taxonomia de Leveduras Associadas com Cajus e Mangas**. Rio de Janeiro, UFRJ, 1980. Dissertação de tese de mestrado em microbiologia.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MIRAK, E. M. **The Life of the Yeasts**. Cambridge Massachusetts, Harvard University Press, p.341, 1978.

PHAFF, H. J.; STAMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. **In: ROSE, H. & HARRISON, J. S. (eds). The Yeasts: Biology of Yeasts.** London: Academic Press, p. 123-180, 1987.

PHAFF, H. J. Isolation of yeasts from natural sources. **In: LACERDA, D. P. ed. Isolation of Biotechnology Organisms from Nature.** New York, McGraw-Hill p.53-79, 1990.

PRADA, G. M. M. **Leveduras Associadas aos Frutos de Espécies Nativas da Estação Ecológica de Juréia-Itatins (Peruíbe – São Paulo).** Rio Claro-SP. Dissertação de tese em microbiologia, Universidade Estadual Paulista, 1994.

ROBBS, P. G. **Ecologia e Taxonomia de Leveduras Associadas a uma Plantação de Abacaxi do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro. Dissertação de tese em microbiologia, UFRJ, 1986.

SANTOS, E. A.; HAGLER, A. N. MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts associated with Brazilian tropical fruits: cashew, cajá and umbu. **In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROGRESSO CIÊNCIA**, 36, 1984. USP, SP: Resumos, p. 734-735, 1984.

SOUZA, L. C. Distribution of yeast in nature. **In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. ed. The yeasts: Biology of the Yeasts.** London, Academic Press, v.1, p.79-106, 1969.

SPENCER, J. F. T.; SPENCER, D. M. **Yeasts in Natural and Artificial Habitats.** Springer, p. 381 1997.

## **CAPÍTULO 3**

### **CAROTENOIDS OF BRAZILIANS YEASTS**



## CAROTENOIDS COMPOSITION OF BRAZILIANS YEASTS

IRIANI R. MALDONADE, DÉLIA B. RODRIGUEZ-AMAYA, ADILMA R. P.  
SCAMPARINI

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade de Campinas, São Paulo Brasil.

### ABSTRACT

The carotenoid composition of yeasts isolated in Brazil was studied. The yeasts were cultured in 200 mL broth yeast malt at 200 rpm in rotary shaker at 25°C for 5 days without illumination. Open column, thin layer chromatography and high performance liquid chromatography were used to separate, identify and determine carotenoid concentrations. The yeast *Rhodotorula glutinis* had the highest carotenoid concentration (881 µg/L), followed by *Rhodotorula graminis* (594 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590 µg/L) and *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545 µg/L). *Rhodotorula minuta* and *Sporobolomyces* had the lowest carotenoid contents (168 µg/L and 237 µg/L, respectively). The principal pigments found in these yeasts were torulene and β-carotene. β-Carotene predominated in *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces*, while torulene was the major carotenoid in *Rhodotorula mucilaginosa*. In specific carotenoid production (µg/g of dried cells), *Rhodotorula glutinis* had a total carotenoid concentration of 132 µg/g.

**Key words:** Carotenoid, torulene, *Rhodotorula*, fermentation

# COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS ISOLADAS NO BRASIL

## RESUMO

A composição de carotenóides, das leveduras isoladas no Brasil, foi estudada. As culturas de leveduras foram cultivadas em 200 mL de meio YM a 200 rpm em shaker a 25°C por 5 dias, sem iluminação. Cromatografia de coluna aberta, cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizadas para separar os carotenóides obtidos das leveduras, a fim de identificá-los e quantificá-los. A linhagem de *Rhodotorula glutinis* foi a que apresentou maior concentração de carotenóide (881 µg/L), seguido por *Rhodotorula graminis* (594 µg/L), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590 µg/L) e *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545 µg/L). *Rhodotorula minuta* e *Sporobolomyces* tiveram a menor concentração de carotenóides (168 µg/L and 237 µg/L, respectivamente). Os principais pigmentos encontrados nestas linhagens foram toruleno e β-caroteno. β-Caroteno foi o carotenóide predominante em *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces*, enquanto que o toruleno foi o carotenóide principal nas leveduras de *Rhodotorula mucilaginosa*. Em termos de produção específica de carotenóides (µg/g de células secas), *Rhodotorula glutinis* foi a que obteve maior concentração de carotenóides 132µg/g.

**Palavras-chave:** Carotenóide, toruleno, *Rhodotorula*, fermentação

## INTRODUCTION

The red yeasts of the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces* have the capacity to produce carotenoids. The carotenoid compositions are similar, consisting of  $\beta$ -carotene,  $\gamma$ -carotene, torulene and torulahodin (SIMPSON et al., 1971).  $\beta$ -Carotene found in these yeasts has attracted commercial interest as a precursor of vitamin A and as a yellow pigment for food (COSTA et al., 1987).

Carotenoids show much diversity in natural distribution, structure and function. Carotenoids are not synthesized by animals, although carotenes can be altered in some animals by oxidation or isomerization and by conversion to vitamin A and retinoids.

Color is an important attribute that determines consumers' acceptance of foods. Since animals are unable to biosynthesize carotenoids, these pigments must be present in their diet so that foods of animal origin, such as fish and crustaceans, can have the desired color (JOHNSON et al., 1977).

Microbial carotenoids have attracted much interest in recent years for several reasons, one of which is the growth of aquaculture (JOHNSON et al., 1979). The farming of salmon and shrimp increased markedly in 1990. According to Schroeder & Johnson (1995), aquaculture is currently valued at about US\$ 40 billion per year, and carotenoids represent 10-15% of total cost. Astaxanthin is the most important source of pigmentation in farm-raised fish. Besides providing pigmentation in fish and crustaceans, carotenoids have health benefits in humans by preventing or delaying diseases and as cancer, arteriosclerosis, cataracts and other maladies. Traditionally, carotenoids have been marketed as dried powder or natural extracts, such as annatto, paprika and saffron. Carotenoids have also been obtained by chemical synthesis. The chemical synthesis of

carotenoids is complex and costly due to the presence of chiral centers in their molecular structures (REYNDERS et al., 1996).

$\beta$ -Carotene from *Dunaliella salina* is being produced and commercialized by Australia, Israel and the United States (JOHNSON & SCHROEDER, 1995). Recently, astaxanthin has also been produced commercially in the United States by a microalgae *Haematococcus pluvialis*. There are many published reports about producing it by yeast fermentation because yeasts can grow in a variety of carbon sources and this can reduce the process costs. Much effort has been devoted to developing biotechnological processes for the production of carotenoids important to the food industry, aquaculture and human health, as an alternative to chemical synthesis. Moreover, consumers may prefer natural carotenoids to synthetic pigments. In order to find Brazilian yeasts, which had high levels of carotenoids production, the main goal of this study was to identify and quantify the carotenoids produced by yeasts isolated in Brazilians ecosystems.

## MATERIALS AND METHODS

### Yeast strains

The strains of *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta* and *Sporobolomyces* were obtained from the Fundação Tropical-Brazil. *Rhodotorula mucilaginosa*-12 was isolated as a contaminant of tomato sauce; *Rhodotorula mucilaginosa*-108 from the soil of the University of Campinas, São Paulo; *Rhodotorula graminis*-125 from sugar cane leaves; and *Rhodotorula mucilaginosa*-135 and *Rhodotorula mucilaginosa*-137 from the soil of Holambra, São Paulo. Identification of these strains is reported separated by Maldonade (2003). The cultures were maintained by monthly transfers to YM (malt extract, 3 g/L; yeast extract, 3 g/L; peptone, 5g/L and glucose, 10 g/L) agar slants and stored at 4°C.

## **Culture conditions and harvesting procedure**

Each starter culture was prepared by inoculating one loop of a slant culture into 50 mL of YM broth (Difco) in 150 mL erlenmeyers flask, incubating at 25°C, 200 rpm for 72 h in shaker. Fermentation experiments were carried out in 500 mL erlenmeyer flasks containing 200 mL of YM broth. Each flask was inoculated with starter culture (5% v/v) and incubated at 25°C for 5 days at 200 rpm, without illumination.

After cultivation, the cells were harvested by centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes, washed twice with deionized water and centrifuged again. The dry mass was gravimetrically determined by drying centrifuged and washed samples at 105°C to constant weight. The glucose concentration was measured in the supernatant liquid according to the dinitrosalicylic acid (DNS) method (MILLER, 1959).

## **Carotenoid analysis**

The carotenoid composition was determined according to procedures described by Rodriguez-Amaya (1999), taking three replicates of each sample. Wet cells, collected by centrifugation, were macerated with Hyflosupercel with a mortar and pestle and exhaustively extracted with acetone. The carotenoids were transferred to petroleum ether in a separator funnel by the addition of water and washed free of acetone. The pigment solution was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated in a rotary evaporator (< 40°C).

Chromatography on a MgO:Hyflosupercel (1:2) column was carried out with the following mobile phases: 1, 2, 5 % ethyl ether in petroleum ether; 2, 5, 8, 10 to 100 % of acetone in petroleum ether; and 2, 5, 10 to 50 % of acetone in petroleum ether. The eluates were transferred to petroleum ether and washed with water until being free of acetone. The pigment solution was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated

in a rotary evaporator ( $< 40^{\circ}\text{C}$ ). After adjusting the volume in a volumetric flask, the carotenoid content was estimated by measuring the absorbance in a spectrophotometer BRCKMAN DU 640 and using the formula provided by Davies (1976). All eluates were concentrated for further chromatography. The results of concentration of carotenoid were expressed as carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) and specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ ), where: Carotenoid production = total carotenoid content ( $\mu\text{g}$ ) / 1 liter of medium

Specific carotenoid production = total carotenoid content ( $\mu\text{g}$ ) / g of dried biomass.

For high performance liquid chromatography (HPLC) analysis, the eluates were concentrated in rotary evaporator, dried under nitrogen and redissolved in 1 mL acetone with the aid of sonication. An aliquot of 10  $\mu\text{L}$  was then injected into the liquid chromatograph. The HPLC was 9010 VARIAN with diode array detector, WATERS 994. The column used was Vydac 218 TP54, C18, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 mm x 250 mm. The mobile phase for *Rhodotorula glutinis* was: the flow rate was 0.5 mL/min, the solvent being THF (tetrahydrofuran):H<sub>2</sub>O:methanol from 15:4:81 to 35:0:65 in linear gradient in 40 minutes, maintaining this proportion until the end of the run (80 minutes). The mobile phase for *Rhodotorula mucilaginosa* was: the flow rate was 0.5 mL/min, the solvent being THF (tetrahydrofuran):H<sub>2</sub>O:methanol from 15:4:81 to 30:0:70 in linear gradient in 40 minutes, maintaining this proportion until the end of the run (70 minutes).

The carotenoids were identified with the combined use of several parameters: UV/visible absorption spectra, position on the column, thin layer chromatography (TLC) (silica) R<sub>F</sub> values, HPLC retention times and for the xanthophylls, specific group chemical reactions. The mobile phase for TLC was 5% methanol in toluene. The chemical reactions carried out were acetylation with acetic anhydride, methylation with acidified methanol, iodine-catalyzed isomerization, reduction with sodium borohydride and epoxide tests. The carotenoid concentrations were determined by spectrophotometer,

based on the maximum absorbance of the fractions obtained from the open column, the calculation being done according to Davies (1976).

## RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained after 5 days of cultivation of the yeasts in YM medium broth are presented in Table 1. The production of carotenoids and biomass depend on the strain and culture conditions. *R. mucilaginosa*-137 had the highest biomass yield (8.6 g/L), followed by *R. graminis*-125 (8.5 g/L) and *R. mucilaginosa*-108 (8.3 g/L), while *Sporobolomyces* sp had the lowest biomass yield. The final pH of all the yeasts decreased from the YM initial pH of 6.8. The media of *R. minuta* and *Sporobolomyces* had high residual sugar, indicating that the carbon source had not been well consumed.

**Table 1:** Fermentation parameters obtained after 5 days of cultivation in YM medium broth.

Yeast strain	Dried biomass (g/L)	Final pH	Residual sugar (g/L)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> -135	7.2	6.1	0.2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> -137	8.6	6.3	0.3
<i>Rhodotorula graminis</i> -125	8.5	6.4	0.3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> -108	8.3	6.4	0.2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> -12	6.8	5.7	0.5
<i>Rhodotorula glutinis</i>	6.7	6.5	0.2
<i>Rhodotorula minuta</i>	5.1	5.1	3.6
<i>Sporobolomyces</i>	3.3	5.8	4.2

Nine carotenoids were identified in the strains of Brazilians yeasts: phytofluene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -zeacarotene,  $\gamma$ -carotene, neurosporene, hydroxy-torulene, torulene, echinenone and torulahodin. The physic-chemical characteristics used for their identification are presented in Table 2. The structures are shown in Figure 1.

**Table 2:** Characteristics of the carotenoids identified in Brazilians yeasts

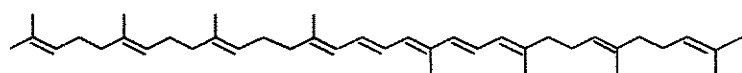
Carotenoid	$\lambda_{\max}$ in petroleum ether (nm)	$\lambda_{\max}$ in HPLC mobile phase (nm) <sup>a</sup>	R <sub>F</sub> values <sup>b</sup>
Phytofluene	331 347 367	334 350 370	-
$\beta$ -Carotene	(423) 447 475	(424) 449 477	0.97
$\beta$ -Zeaxarotene	403 424 450	404 426 452	0.96
$\gamma$ -Carotene	435 458 490	437 461 491	0.97
Neurosporene	412 436 465	414 439 467	0.97
Torulene	458 483 515	461 484 519	0.98
Hydroxy-torulene <sup>c</sup>	456 480 513	457 482 517	0.61
Echinenone <sup>c</sup>	452 (476)	456 (478)	0.93
Torulahodin	(465) 492 523	(468) 494 526	0.48-0.50

<sup>a</sup> THF:H<sub>2</sub>O:methanol from 15:4:81 to 35:0:65 in linear gradient

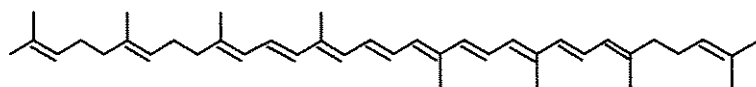
<sup>b</sup> In silica TLC plate developed with 5% methanol in toluene

<sup>c</sup>Tentative identification

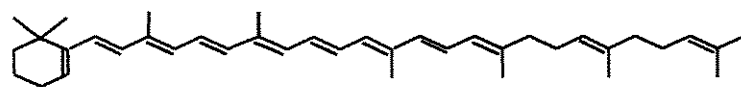




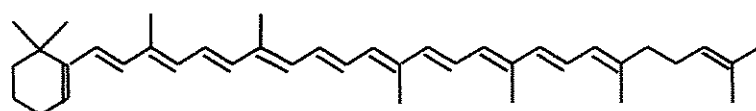
Phytofluene



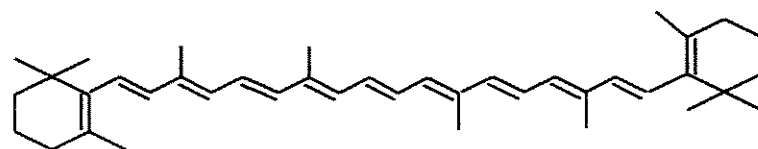
Neurosporene



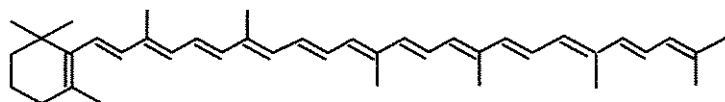
$\beta$ -Zeaxarotene



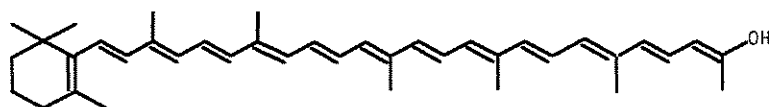
$\gamma$ -Carotene



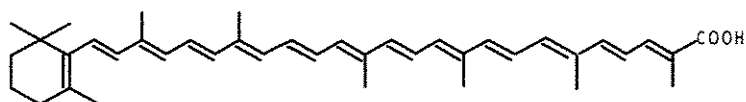
$\beta$ -carotene



Torulene



Hydroxy-torulene



Torulahodin

**Figure 1:** Carotenoids structures of Brazilians yeasts.

The first fraction obtained from the MgO:Hyflosupercel open column, a colorless zone before the first colored band, showed the visible absorption spectrum typical of phytofluene, with well-defined peaks at 331, 347 and 367 nm in petroleum ether. It was found in appreciable amount only in *Rhodotorula minuta*.

Fraction 2, orange in color, was eluted from the column with 2-6% ethyl ether in petroleum ether. It showed the characteristic absorption curve of  $\beta$ -carotene, with  $\lambda_{\max}$  at 447 and 475 nm and a shoulder at 423 nm in petroleum ether, and co-eluted with authentic  $\beta$ -carotene in TLC and HPLC. The absence of substituents was shown in the TLC plate developed with 5% methanol in toluene and it ran with the solvent front. Exposition of the TLC plate to HCl gas confirmed the absence of epoxide groups, the orange color of the spot not changing to blue or green.

The following band, eluted with 6-10% ethyl ether in petroleum ether, was identified as  $\beta$ -zeacarotene. The  $R_F$  value of 0.96 on the TLC plate indicated its carotene nature and the spectrum with  $\lambda_{\max}$  at 403, 424 and 450 nm in petroleum ether was consistent with a carotenoid of 9 conjugated double bonds, 8 in the polyene chain and one in a  $\beta$ -ring.

Changing the mobile phase to 1-10% acetone in petroleum ether, another band was separated on the MgO:Hyflosupercel column, which showed a visible absorption spectrum typical of  $\gamma$ -carotene. This bright-orange monocyclic carotenoid, had an adsorption spectrum with  $\lambda_{\max}$  at 435, 458 and 490 nm in petroleum ether commensurate with a carotenoid with 11 conjugated double bonds, 10 in the polyene chain and one in the ring. The  $R_F$  on the silica plate of 0.97 indicated the absence of substituents.

Fraction 5, yellow-orange in color, was eluted with 30-80% acetone in petroleum ether. The visible spectrum had well defined peaks at 412, 436, and 465 nm in petroleum ether, typical of neurosporene with nine conjugated double bonds in the polyene chain. The  $R_F$  of 0.96 was consistent with a carotene.

Torulene was eluted with 2-6% of acetone in petroleum ether. The red-purple torulene absorbed maximally at 460, 484, and 518 nm in petroleum ether. In all strains studied, torulene appeared as a mixture of *trans* and *cis*-torulene, with peaks at 458, 483 and 515, with the *trans* isomer predominating. As a carotene it ran with the solvent front in the silica TLC ( $R_F=0.98$ ). In the column of *R. mucilaginos*-137 and *R. mucilaginos*-108, two *cis* fractions were separated from the *trans* isomer. The first was a carotene, *cis*-torulene, with an  $R_F$  of 0.98. The second was tentatively identified as *cis*-hydroxy-torulene with maximum absorbance at 456, 481, and 513 nm with an  $R_F$  of 0.61.

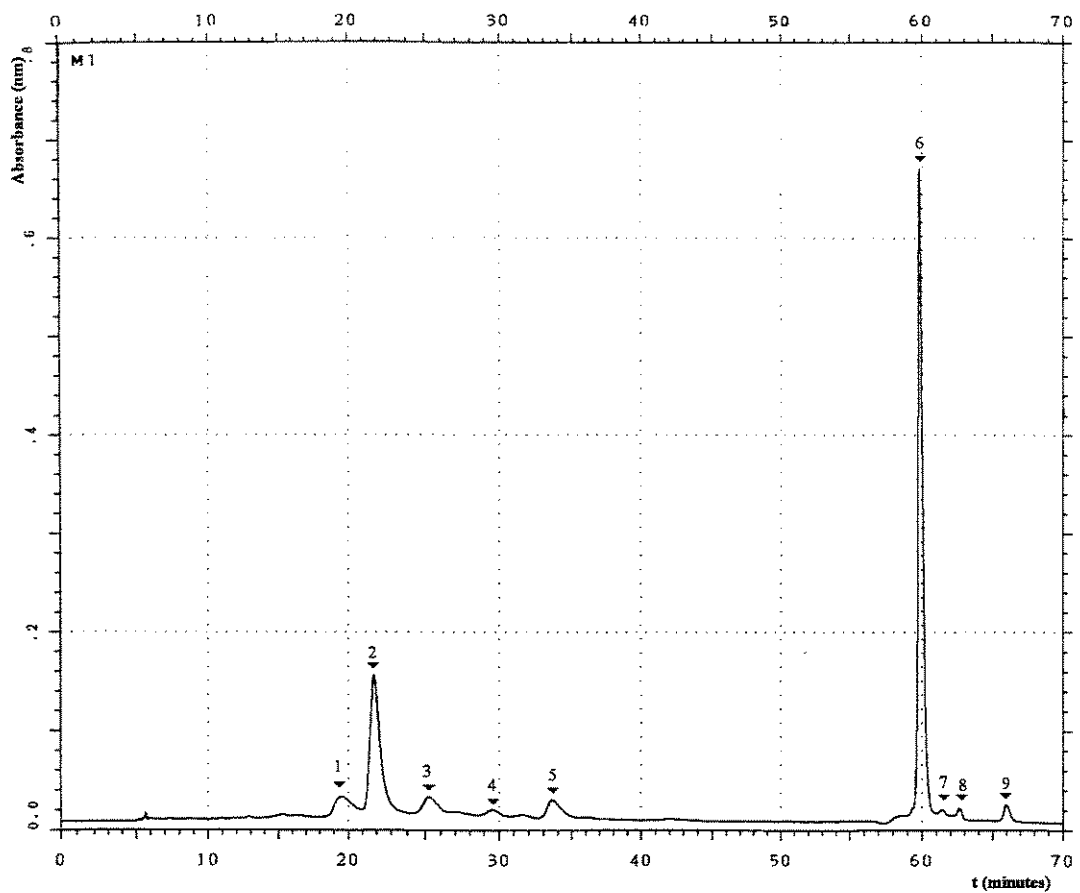
The next band on the column was eluted with 6-10% of acetone in petroleum ether, was tentatively identified as echinenone, a keto carotenoid with one conjugated carbonyl group. Its spectrum had an unsymmetrical broad peak at 456 nm and a shoulder at 476 nm in petroleum ether. Since its concentration in all the strains analyzed was very low, reduction with sodium borohydride could not be carried out. The  $R_F$  was estimated to be about 0.83.

Torulahodin is a carboxylic acid carotenoid typical of fungal xanthophylls. This pink pigment absorbed maximally at (465), 492, and 523 nm in petroleum ether with  $R_F$  of 0,48-0,50. After acetylation, the  $R_F$  increased to 0,92.

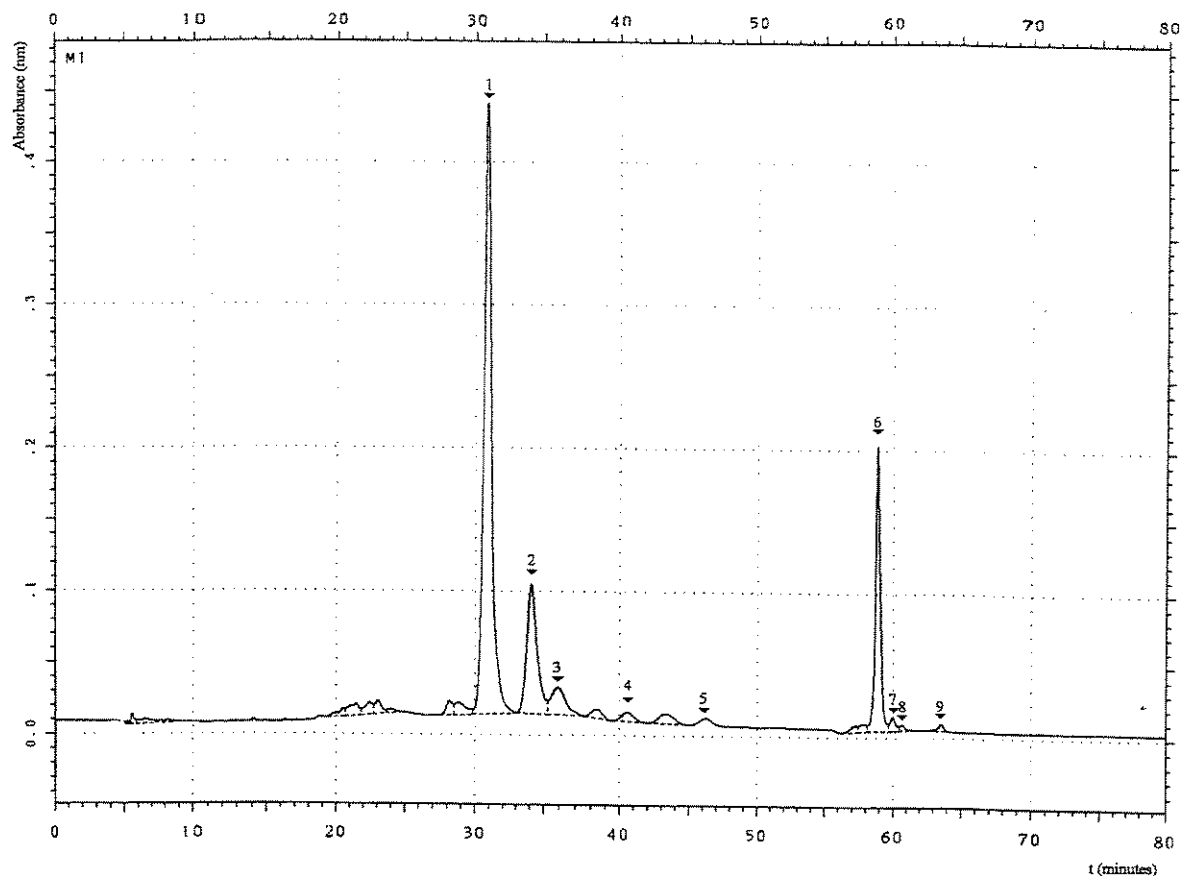
The HPLC chromatograms of the carotenoids of Brazilian yeasts are shown in Figures 2 and 3. The visible spectra obtained by the photodiode array detector corroborated those obtained spectrophotometrically of fractions isolated by the open

column (MgO:Hyflosupersel, 1:2). Two *cis*-torulenes separated well from the *trans*-form and the spectrum obtained by the photodiode array detector showed the *cis*-peak at about 380 nm clearly.

Practically, the same carotenoids were found in the Brazilians yeasts studied, but considerable quantitative differences were seen between strains (Table 3). *R. mucilaginosa*-135, *R. mucilaginosa*-137, *R. mucilaginosa*-108, *R. mucilaginosa*-12 had similar profiles, having torulene as principal carotenoid and  $\beta$ -carotene as the second major carotenoid (Figure 2). On the other hand,  $\beta$ -carotene predominated in *R. glutinis*, *R. graminis*-125 and *Sporobolomyces* sp (Figure 3), with torulene as the second major carotenoid. *R. minuta* had the most different pattern, the main carotenoid being  $\beta$ -zeacarotene followed by phytofluene.



**Figure 2:** HPLC profile of carotenoids from *R. mucilaginoso*-137, *R. mucilaginoso*-135, *R. mucilaginoso*-108 and *R. mucilaginoso*-12 strains that had torulene as principal carotenoid. Peak identification: 1. torulahodin, 2.  $\beta$ -carotene, 3.  $\gamma$ -carotene, 4. unidentified, 5. unidentified, 6. *trans*-torulene, 7. unidentified, 8. *cis*-torulene, 9. *cis*-torulene. HPLC conditions were: the flow rate was 0.5 mL/min, the solvent being THF (tetrahydrofuran):H<sub>2</sub>O:methanol from 15:4:81 to 30:0:70 in linear gradient in 40 minutes, maintaining this proportion until the end of the run (70 minutes).



**Figure 3:** HPLC profile of carotenoids from *R. glutinis*, *R. graminis*-125 and *Sporobolomyces* sp strains that had  $\beta$ -carotene as principal carotenoid. Peak identification: 1.  $\beta$ -carotene, 2.  $\gamma$ -carotene, 3. unidentified, 4. echinenone, 5. unidentified, 6. *trans*-torulene, 7. mixture, 8. *cis*-torulene, 9. *cis*-torulene. HPLC conditions were: the flow rate was 0.5 mL/min, the solvent being THF (tetrahydrofuran):H<sub>2</sub>O:methanol from 15:4:81 to 35:0:65 in linear gradient in 40 minutes, maintaining this proportion until the end of the run (80 minutes).

Torulohodin was the third major carotenoid in the strains *R. mucilaginosa*-135, *R. mucilaginosa*-108 and *R. mucilaginosa*-12, but it was not detected in *R. minuta*, *R. graminis*-125. According to Martin et al. (1993), the torulohodin content produced by *R. glutinis* varies significantly, from 2 to 55% of the total carotenoids, depending on culture conditions.

Phytofluene, the colorless carotenoid, was found only in *Rhodotorula minuta*. Carotenoids found in small amounts were  $\gamma$ -carotene,  $\beta$ -zeacarotene, neurosporene, which are known intermediates in carotenoid biosynthesis.

The total carotenoid production (sum of the individual carotenoid concentrations) in  $\mu\text{g}$  per liter of fermentation medium is shown in Table 3. *R. glutinis* had the highest yield of total carotenoid (881 $\mu\text{g/L}$ ), followed by *R. graminis*-125 (594  $\mu\text{g/L}$ ), *R. mucilaginosa*-137 (590  $\mu\text{g/L}$ ), *R. mucilaginosa*-108 (562  $\mu\text{g/L}$ ), *R. mucilaginosa*-135 (545  $\mu\text{g/L}$ ), and *R. mucilaginosa*-12 (487  $\mu\text{g/L}$ ). *Sporobolomyces* and *R. minuta* had lower carotenoid contents (237 and 168  $\mu\text{g/L}$ , respectively).

In specific carotenoid production (Table 4), the corresponding values were: *R. glutinis*, 132; *R. mucilaginosa*-135, 76; *Sporobolomyces*, 72  $\mu\text{g/g}$ ; *R. mucilaginosa*-12, 72; *R. graminis*-125, 70; *R. mucilaginosa*-137, 69; *R. mucilaginosa*-108, 68; *R. minuta*, 33. Although *R. glutinis* remained to be the strain with highest carotenoid content and *R. minuta* the lowest, the order of the other strains was different because of the differences in biomass concentration.

The wild strains isolated in Brazil contained less than 200  $\mu\text{g/g}$  of specific carotenoid production. The low carotenoid content of the yeast strains of genus *Rhodotorula* sp and *Sporobolomyces* is typical of wild strains (PERRIER et al., 1995).

**Table 3:** Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) in Brazilians yeasts, determined by open column chromatography-spectrophotometry.

Carotenoid	<i>R. mucilaginosa-135</i>	<i>R. mucilaginosa-137</i>	<i>R. graminis-125</i>	<i>R. mucilaginosa-108</i>	<i>R. mucilaginosa-12</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. minuta</i>	<i>Sporobolomyces</i>
Phytofluene	-	-	-	-	-	-	56 $\pm$ 0.5	-
Neurosporene	5 $\pm$ 0.1	15 $\pm$ 0.7	-	-	Tr	46 $\pm$ 0.4	18 $\pm$ 1.1	-
$\beta$ -Zeacarotene	Tr	13 $\pm$ 0.4	21 $\pm$ 0.6	12 $\pm$ 0.3	Tr	30 $\pm$ 0.6	71 $\pm$ 0.9	18 $\pm$ 0.2
Echinenone	7 $\pm$ 0.2	Tr	Tr	19 $\pm$ 0.2	Tr	Tr	Tr	Tr
$\gamma$ -Carotene	26 $\pm$ 0.4	47 $\pm$ 0.7	84 $\pm$ 0.5	30 $\pm$ 0.7	Tr	142 $\pm$ 0.6	Tr	20 $\pm$ 0.5
$\beta$ -Carotene	95 $\pm$ 0.3	139 $\pm$ 0.2	303 $\pm$ 0.2	129 $\pm$ 0.1	105 $\pm$ 0.4	382 $\pm$ 0.2	23 $\pm$ 0.2	118 $\pm$ 0.1
Torulene	365 $\pm$ 0.3	352 $\pm$ 0.2	186 $\pm$ 0.4	307 $\pm$ 0.3	372 $\pm$ 0.4	261 $\pm$ 0.2	-	71 $\pm$ 0.2
Torulahodin	47 $\pm$ 0.7	24 $\pm$ 0.6	-	65 $\pm$ 0.6	10 $\pm$ 0.8	20 $\pm$ 0.5	-	10 $\pm$ 0.8
Total	545 $\pm$ 0.4	590 $\pm$ 0.5	594 $\pm$ 0.5	562 $\pm$ 0.6	487 $\pm$ 0.6	881 $\pm$ 0.2	168 $\pm$ 0.4	237 $\pm$ 0.6

Tr: traces, (-): not found



**Table 4:** Specific carotenoid productions ( $\mu\text{g/g}$  dried cell) in Brazilians yeasts determined by open column chromatography-spectrophotometry.

Carotenoid	<i>R. mucilaginoso-135</i>	<i>R. mucilaginoso-137</i>	<i>R. graminis-125</i>	<i>R. mucilaginoso-108</i>	<i>R. mucilaginoso-12</i>	<i>R. glutinis</i>	<i>R. minuta</i>	<i>Sporobolomyces</i>
Phytofluene	-	-	-	-	-	-	11 $\pm$ 0.5	-
Neurosporene	0.7 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.7	-	-	Tr	7.0 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 1.1	-
$\beta$ -Zeaxarotene	Tr	1.7 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.3	Tr	5.0 $\pm$ 0.6	14 $\pm$ 0.9	5.0 $\pm$ 0.2
Echinenone	1.0 $\pm$ 0.2	Tr	Tr	2.1 $\pm$ 0.2	Tr	Tr	Tr	Tr
$\gamma$ -Carotene	3.7 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.7	9.8 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.7	Tr	21 $\pm$ 0.6	Tr	6.0 $\pm$ 0.5
$\beta$ -Carotene	13 $\pm$ 0.3	16 $\pm$ 0.2	36 $\pm$ 0.2	16 $\pm$ 0.1	16 $\pm$ 0.4	57 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.2	36 $\pm$ 0.1
Torulene	51 $\pm$ 0.3	42 $\pm$ 0.2	22 $\pm$ 0.4	38 $\pm$ 0.3	54 $\pm$ 0.4	39 $\pm$ 0.2	-	22 $\pm$ 0.2
Torulahodin	6.6 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.6	-	7.0 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.5	-	3.0 $\pm$ 0.8
Total	76 $\pm$ 0.4	69 $\pm$ 0.5	70 $\pm$ 0.5	68 $\pm$ 0.6	72 $\pm$ 0.6	132 $\pm$ 0.2	33 $\pm$ 0.4	72 $\pm$ 0.6

Tr: traces, (-): not found

In this work, the percentages of the carotenoids found in *R. glutinis* were: torulahodin (2.3%), torulene (29.5%),  $\beta$ -carotene (43.2%),  $\gamma$ -carotene (15.9%),  $\beta$ -zeaxarotene (3.8%) and neurosporene (5.3%). These data agree with those obtained by

Simpson et al. (1964), who also identified  $\beta$ -carotene, torulene and torulahodin as major carotenoids of *Rhodotorula* sp and *Rhodospiridium*. In a subsequent report Simpson et al. (1971) determined the carotenoids in *R. glutinis* after 12 days of fermentation were torulene (27.8%), torulahodin (24.3%),  $\beta$ -carotene (25.2%),  $\gamma$ -carotene (12.5%),  $\beta$ -zeacarotene (0.9%) and neurosporene (1.3%). Differently in other study, Frengova et al. (1994) observed that torulahodin was the major carotenoid of *R. glutinis*, which reached a maximum concentration of 182  $\mu\text{g/g}$  on the sixth day of cultivation, followed by  $\beta$ -carotene (43.9  $\mu\text{g/g}$ ). Torulene content reached 23  $\mu\text{g/g}$  dry cells on the fifth day and then decreased.

Some carotenoids found in *R. mucilaginoso* strains, in this work, had already been determined by Villoutreix (1960), who isolated phytoene, phytofluene,  $\zeta$ -carotene, neurosporene,  $\beta$ -zeacarotene,  $\gamma$ -carotene, torulene, torulahodin and  $\beta$ -carotene. In the seven strains studied, five contained torulahodin; one, lycopene; four, torulene; five, neurosporene; six,  $\gamma$ -carotene; five,  $\zeta$ -carotene; two,  $\beta$ -zeacarotene; six,  $\beta$ -carotene; and three, phytofluene, proposing that  $\beta$ -zeacarotene and  $\gamma$ -carotene were the precursors of torulene and torulahodin. The results obtained in this work of total specific carotenoid production determined by *R. mucilaginoso* strains were lower of those reported by Shih & Hang (1996) (130  $\mu\text{g/g}$ ), and Bhuyan et al. (1985) (146  $\mu\text{g/g}$ ).

The low value of specific carotenoid production obtained by *R. minuta* in this work (33  $\mu\text{g/g}$ ), was lower than the result determined (93.4  $\mu\text{g/g}$ ) by Peterson et al. (1958). However, this value agree with data reported of 40  $\mu\text{g/g}$  obtained by Tada & Shiroishi (1978) and Perrier et al. (1995).

## CONCLUSIONS

The concentrations and compositions of carotenoids on pigmented yeasts depend on the genus of yeast and the culture conditions. The principal pigments found in these yeasts were torulene and  $\beta$ -carotene.  $\beta$ -Carotene predominated in *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces*, while torulene was the major carotenoid in *Rhodotorula mucilaginosa*.

The yeast *Rhodotorula glutinis* had the highest carotenoid production (881  $\mu\text{g/L}$ ), followed by *Rhodotorula graminis* (594  $\mu\text{g/L}$ ), *Rhodotorula mucilaginosa*-137 (590  $\mu\text{g/L}$ ) and *Rhodotorula mucilaginosa*-135 (545  $\mu\text{g/L}$ ). *Rhodotorula minuta* and *Sporobolomyces* had the lowest carotenoid contents (168  $\mu\text{g/L}$  and 237  $\mu\text{g/L}$ , respectively).

In specific carotenoid production, the corresponding values were: *R. glutinis*, 132  $\mu\text{g/g}$ ; *R. mucilaginosa*-135, 76  $\mu\text{g/g}$ ; *Sporobolomyces*, 72  $\mu\text{g/g}$ ; *R. mucilaginosa*-12, 72; *R. graminis*-125, 70  $\mu\text{g/g}$ ; *R. mucilaginosa*-137, 69  $\mu\text{g/g}$ ; *R. mucilaginosa*-108, 68  $\mu\text{g/g}$ ; *R. minuta*, 33  $\mu\text{g/g}$ .

Although the yeasts being wild strains, the carotenoid concentrations found in Brazilian yeasts are in the range of those reported in the literature. Therefore, they have potential to be used as microbial source for producing carotenoids by fermentation.

## REFERENCES

- COSTA, I.; MATELLI, H. L.; SILVA, I. M. E; POMEROY, D. Production of  $\beta$ -carotene by *Rhodotorula* strain. **Biotechnology Letters** 9:373-375, 1987.
- DAVIES, B. H. Carotenoids. In: Goodwin, T.W. (Ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.**, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.
- FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, 44:888-894, 1994.
- JOHNSON, E. A. CONKLIN, D. E. AND LEWIS, M. J.: The yeast *Phaffia rhodozyma* as dietary pigment source for salmononids and crustaceans. **Journal of the Fishing Research Board of Canada**, 34:2417-2421, 1977.
- JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, 115:173-183, 1979.
- JONHSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, 11:297-326, 1995.
- MALDONADE, I. R. **Produção de Carotenóides por Leveduras**. Campinas. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, chapter 2, 2003.

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 76:321-325, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31:426-428, 1959.

PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GAYZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives Microbiology**, 168:173-179, 1995.

PETERSON, W. J.; LECCE, E. E.; BELL, T. A.; ETCHELLS, J. L. **Journal of Bacteriology**, 75:586, 1958.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. F.; HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modeling and pigment production by yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivations. **Biotechnology Letters**, 18:649-654, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, B. D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, D. C.: International Life Science Institute Prece, p. 64 1999.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, 14:502-507, 1995.

SIMPSON, K. L.; NAKAYAMA, T. O. M.; CHICHESTER, C. O. The biosynthetic origin of carboxyl oxygen atoms of the carotenoid pigment torulahodin. **Biochemistry Journal**, 91:508-511, 1964.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O. AND PHAFF, H. J.: Carotenoid pigments of yeast, P. 493-515. **In** Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Ed.), **The Yeasts**, Vol. 2. Academic Press, New York, 1971.

VILLOUTREIX, M.; JOHNSON, K. Production of carotenoids by *Rhodotorula* strain. **Applied Environmental Microbiology**, **54**:1155-1158, 1960.

## **CAPÍTULO 4**

### **EFFECT OF MEDIA COMPOSITION ON CAROTENOID PRODUCTION BY *Rhodotorula mucilaginosa* - 137**

# EFFECT OF MEDIA COMPOSITION ON CAROTENOID PRODUCTION BY

*Rhodotorula mucilaginosa* - 137

IRIANI RODRIGUES MALDONADE; DÉLIA B. RODRIGUEZ-AMAYA; ADILMA  
REGINA PIPPA SCAMPARINI

Departamento de Ciência de Alimentos-FEA-Universidade Estadual de Campinas, CP  
6121, Campinas-SP, Cep 13083-970, Brasil

## ABSTRACT

Response surface designs and statistical analysis were used to optimize the carotenoid production of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* – 137. The yeast extract of the medium was the most important variable in terms of enhancing carotenoid formation; magnesium sulfate and potassium phosphate had a negative influence. The initial pH had no significant effect on carotenoid formation nor on cell production. The carotenoid production was adequately approximated with a full quadratic equation obtained from two-factor-2-level central composite design. Analysis of the quadratic surfaces showed that after 5 days of cultivation at 25°C, the maximum carotenoid concentration of 745 µg/L appeared at 15 g/L of yeast extract and 20 g/L of glucose. The maximum concentration of specific carotenoid production was 152 µg/g at 5 g/L of yeast extract and 10 g/L of glucose. The concentrations of yeast extract and glucose were also important on biomass production, which reached maximum value of 8.0 g/L at a range of 15 to 17.1 g/L of yeast extract and 15 to 20 g/L of glucose. Moreover, carotenoid production was more sensitive to changes in yeast extract than to changes in glucose concentrations, in the vicinity of the optimum point of carotenoid.

**Key words:** Carotenoids, yeast, fermentation, response surface



# EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO NA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula mucilaginosa* - 137

## RESUMO

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar a produção de *Rhodotorula mucilaginosa*-137. O extrato de levedura foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, enquanto que os sais de sulfato e fosfato tiveram efeito negativo. O pH inicial não teve efeito significativo tanto na produção de carotenóides como na biomassa. A produção de carotenóides foi descrita por uma equação polinomial de segunda ordem, obtida dos dados referentes ao planejamento completo  $2^2$  com três pontos centrais. Através dos diagramas de superfície de resposta, após 5 dias de cultivo a 25°C, observou-se que a máxima concentração de carotenóides foi de 745 µg/L com 15 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de glicose. Em relação a produção específica de carotenóides, a máxima concentração foi de 152 µg/g com 5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de glicose. A concentração de extrato de leveduras e glicose também foram importantes na produção da biomassa, que atingiu o valor máximo de 8 g/L, na faixa de concentração de 15 a 17,1 g/L de extrato de levedura e de 15 a 20 g/L de glicose. Além do mais, a produção de carotenóide é mais sensível à variação da concentração de extrato de levedura do que da concentração de glicose, na faixa vizinha das condições ótimas de produção.

**Palavras-chave:** Carotenóides, levedura, fermentação, superfície de resposta

## INTRODUCTION

Carotenoids have important properties such as antioxidant capacity, photoprotection, anticarcinogen action and food coloring. These substances can be synthesized by some microorganisms, including algae and yeasts. Owing to the specificity of biological reactions, carotenoids from microorganisms are preferred to those produced by chemical synthesis (SIMPSON et al., 1991).

Carotenoid pigment biosynthesis is a characteristic ability of yeasts of the genus *Rhodotorula*. In some yeast species, the major carotenoids are torulene,  $\beta$ -carotene, torulahodin and astaxanthin in different amounts. Carotenogenesis depends on the strains, which produce variable quantities and different carotenoids.

Culture conditions are very important to yeast growth and metabolite production. Biomass production is also an important consideration in terms of reducing the process cost, since it can be used in animal feed as protein source (NELIS & DELEENHEER, 1991; COSTA et al., 1987; JOHNSON et al., 1977; JOHNSON et al., 1980).

The relative concentrations of individual pigments can be altered by modifying the fermentation conditions, such as the pH, carbon and nitrogen sources, temperature, presence and levels of salts and light. Reported temperatures for the growth of *Rhodotorula* sp range widely, from 5 to 35°C, but most studies report experimental temperatures of 25 to 30°C. Hayman et al. (1974) reported that the optimum temperature for carotenoid production was about 30°C, while Frengova et al. (1995) found that the best temperature was 25°C. Most studies with *Rhodotorula* strain used culture medium Difco Yeast Malt (YM) base, which has an initial pH of 6.8. Fang & Cheng (1993) reported that the culture of *Rhodotorula* sp for highest carotenoid production was at pH 5.0, whereas data from Martin et al. (1993) indicated an optimum of about pH 5.5. The nitrogen source also affected the production of carotenoids by yeasts (AN et al., 1991), the peptone and yeast extract being found to be the best media for carotenoid production.

Yeast extract has been successfully used for the cultivation of pigmented yeasts (JOHNSON et al., 1979). Fang et al. (1993) reported that less carotenoid was produced when yeast extract source was decreased, demonstrating that carotenoid concentration in the cells was related to excess nitrogen source in the medium. Gil-Hwan et al. (1996) obtained high levels of carotenoids concentration, using a medium containing yeast extract and glucose.

Usually, strains of *Rhodotorula* sp need an initial concentration of sugar of 1 to 5% to allow the yeast to grow in batch fermentation. Martin et al. (1993) observed the optimal biomass yield at total carbohydrate concentration of 1.5%, which also led to maximal carotenoid production (1,256 µg/L). These values are higher than those reported for *Rhodotorula* sp by Raitsina & Evdokimova (1980).

This work describes the optimization of culture conditions for carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa* which was isolated in Brazil. Response surface model was applied to determine the optimal yeast extract and glucose concentration, for carotenoid production. A two-factorial design was chosen for this work, with the range of independent variables chosen from previously reported data.

## MATERIAL AND METHODS

### **Cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa*-137**

The yeast isolated from the soil of the Campinas-SP region, Brazil, was used throughout this study. It was identified previously (chapter 2) and maintained on yeast malt (YM) agar slants containing in g/L 0.3 yeast extract; 0.3 malt extract; 0.5 peptone, 10.0 glucose and 20.0 agar. The culture was stored at 4°C.

The inoculum was prepared by inoculating one loop of slant culture into 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 200 mL of YM medium and incubated at 25°C, at 200 rpm for 72 h.

Fermentation was carried out using 500 mL Erlenmeyer flasks with 200 mL of media prepared with different combinations of initial pH, glucose, yeast extract, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Each flask was inoculated with 7.5% (v/v) of inoculum and was incubated at 25°C, 200 rpm in a rotary shaker for 5 days under darkness.

Cell growth was monitored periodically, by measuring the absorbance of samples withdrawn aseptically from the flasks at 600 nm against a water blank, using UV/visible spectrophotometer BECKMAN model DU-640 and 1 cm disposable cuvettes, after appropriate dilution to obtain absorbance values < 0.7. Cell dry weight was determined gravimetrically after drying to a constant weight at 105°C.

### **Sugar, Protein and Carotenoid Determination**

The glucose concentration was measured in the supernatant liquid according to the dinitrosalicylic acid (DNS) method (MILLER, 1959). The amount of cell protein was determined by the Kjeldahl method, using the general factor of 6.25.

The carotenoid composition was determined according to procedures described by Rodriguez-Amaya (1999). Cells were harvested by centrifugation at 10,000xg for 10 minutes at 5°C and washed twice with distilled water. Wet cells, collected by centrifugation, were macerated with Hyflosupercel with a mortar and pestle and exhaustively extracted with acetone. The carotenoids were transferred to petroleum ether in a separator funnel by the addition of water and washed free of acetone. The pigment solution was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated in a rotary evaporator (< 40°C). After adjusting the volume in a volumetric flask, the total carotenoid content was estimated by measuring the absorbance at 481 nm and using the formula provided by

Davies (1976). The absorption coefficient of torulene ( $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 3240$ ) was used because it was the principal carotenoid. The results of carotenoid concentrations were expressed as carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) and specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ ).

Carotenoid production = total carotenoid content ( $\mu\text{g}$ ) / 1 liter of medium

Specific carotenoid production = total carotenoid content ( $\mu\text{g}$ ) / g of dried biomass

The torulene yield in terms of sugar consumed ( $Y_{P/S}$ ) is defined as  $Y_{P/S} = (P_f - P_i)/(S_i - S_f)$ , where  $S_i$  and  $P_i$  are the substrate and total torulene concentration ( $\mu\text{g/L}$ ), and  $S_f$  and  $P_f$  the substrate and total torulene concentration ( $\text{g/L}$ ), respectively.

## Experimental Designs and Statistical Analysis

### Investigation of the effect of variables on cell growth and carotenoid production

The  $2^{5-1}$  factorial design (BOX et al., 1978) was used to study the effect of medium components on yeast growth and carotenoid production. The experimental variables were: glucose concentration, initial pH, yeast extract concentration,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Table 1). The experimental data were analyzed using the software Statistica for Windows, version 5.0.

**Table 1:** Variables at different levels of fermentation media

Variables	Symbol	Levels		
		-1	0	+1
Initial pH	A	4	5	6
Glucose (g/L)	B	10	25	40
Yeast extract (g/L)	C	1	3	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	D	0	0.5	1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	E	0	4	8

## Optimization of culture medium composition

A 2<sup>2</sup>-factorial experimental design with three replicates at the center point (BARROS et al., 1996; BOX et al., 1978) was used to study the combined effect of yeast extract and glucose concentrations on carotenoid production. Response surface methodology (RSM) was adopted to optimize the medium composition. The yeast and glucose concentrations studied are presented in the Table 2. The experimental data were analyzed by the response surface regression procedure, using the software Statistica for Windows version 5.0.

This method is based on the use of the polynomial model:  $Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + E_i$ , where Y is the variable dependent response; b, the regression coefficient; X, the independent variable or experimental factor level and E, the experimental error.

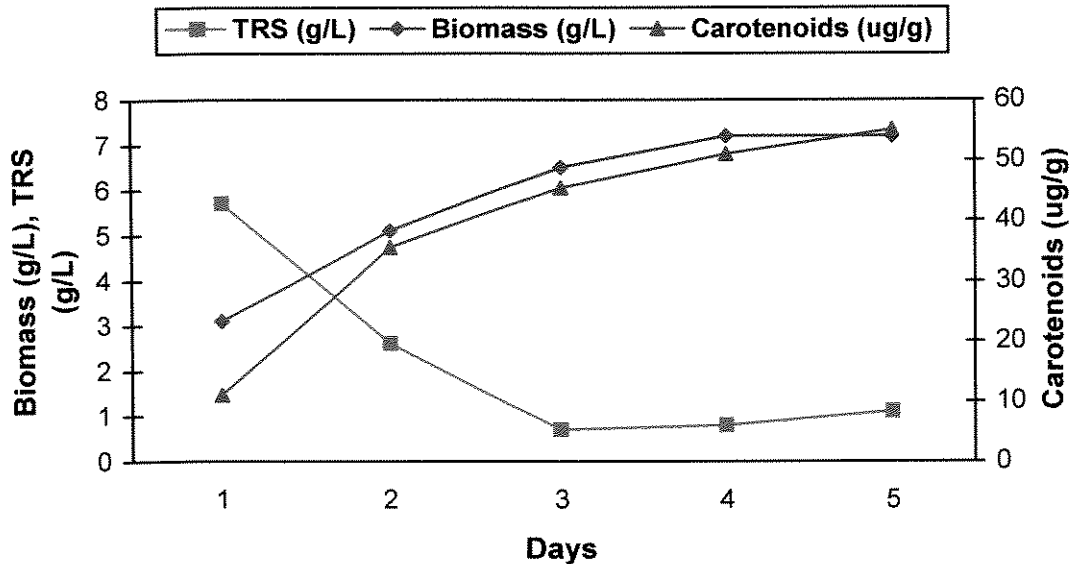
**Table 2:** Central composite experimental design defining yeast extract and glucose concentrations.

Variable	Coded levels				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
Yeast extract (g/L)	2.93	5.0	10	15	17.07
Glucose (g/L)	7.93	10	15	20	22.07

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of pH and Media Composition on Cell Growth and Carotenoid Production

Figure 1 shows the kinetics of cell growth and carotenoid production of *Rhodotorula mucilaginosa*-137, cultivated in YM medium.



**Figure 1:** Kinetic parameters of *R. mucilaginosa*-137 cultivated in YM medium for 5 days at 25°C. TRS: Total reducing sugar (g/L).

Total carotenoid reached concentration of 55  $\mu\text{g/g}$  after 5 days of fermentation. The carbon source was greatly consumed until 3 days of fermentation, after which residual sugar remained at low levels. In addition to glucose as substrate, yeast extract was chosen as nitrogen source based on previous results. The results after 5 days of incubation are presented in Table 3. The biomass of yeast varied with the conditions tested, within the range of 1.1 to 11 and the reproducibility of replicate flasks was very good ( $R^2 = 0.99$ ). When the medium was composed of glucose and yeast extract (assay 5), specific carotenoid concentration, biomass production and yield were 173  $\mu\text{g/g}$ , 3.8 g/L and 70, respectively. When  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was added to the medium (assay 14), the specific carotenoid concentration decreased to 122  $\mu\text{g/g}$  although the biomass increased

to 6.2 g/L. Such results demonstrated that growth of yeasts did not have a direct correlation with carotenoid production.

Assay 8 had maximum production (904  $\mu\text{g/L}$ ) of carotenoid production, although the yield was 50. This low yield value indicated that the levels of substrate must be reduced, because of high residual sugar concentration. The highest concentration of biomass (11 g/L) was obtained in assay 16, which had supplementation with salts. On the other hand, the assays 5 and 8 had the highest value of total carotenoid concentration, 173  $\mu\text{g/g}$  and 162  $\mu\text{g/g}$ , respectively.

In Table 4, the experimental results were used to estimate the main effects of variables and their interactions. From these data it is evident that yeast extract, magnesium sulfate and potassium phosphate had significant effect ( $p < 0.05$ ) on specific carotenoids production, although only yeast extract had positive effect. On carotenoid production, only yeast extract had positive effect. For the carotenoid yield, yeast extract had significant positive influence, and glucose and potassium phosphate had significant negative influence.

An increase in yeast extract concentration stimulated both cell growth and carotenoid formation. The addition of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  promoted significant negative effect on the parameters evaluated, while magnesium sulfate had positive effect on biomass formation, but a negative effect on specific carotenoid production.

As carbon source is essential for microorganism growth, glucose had a positive effect on yeast growth, however it had no significant effect on carotenoid production. The initial pH had no significant influence on biomass production or carotenoid formation. The interactions between the variables were not significant on carotenoid production. However, on specific carotenoid production, the interactions between glucose and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  had a positive effect.



**Table 3:**  $2^{5-1}$  factorial design with coded values and experimental results obtained at 5 days of fermentation for biomass, carotenoid production, specific carotenoid production and yield.

Assays	Variables*					Results				
	A	B	C	D	E	Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ )	Specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g dry}$ weight)	Yield ( $\mu\text{g/g}$ sugar)	Biomass ( $\text{g/L}$ )	Residual sugars ( $\text{g/L}$ )
1	-1	-1	-1	-1	1	59.0	52.7	10	1.1	4.1
2	1	-1	-1	-1	-1	255	138	39	1.8	3.5
3	-1	1	-1	-1	-1	160	75.8	18	2.1	31
4	1	1	-1	-1	1	142	77.4	15	1.8	31
5	-1	-1	1	-1	-1	665	173	70	3.8	0.6
6	1	-1	1	-1	1	445	128	46	3.5	0.3
7	-1	1	1	-1	1	678	139	44	4.9	25
8	1	1	1	-1	-1	904	162	50	5.6	22
9	-1	-1	-1	1	-1	389	93.3	41	4.2	0.6
10	1	-1	-1	1	1	145	32.5	15	4.5	0.7
11	-1	1	-1	1	1	243	55.6	16	4.4	25
12	1	1	-1	1	-1	431	79.6	29	5.4	25
13	-1	-1	1	1	1	731	120	75	6.1	0.2
14	1	-1	1	1	-1	758	122	78	6.2	0.2
15	-1	1	1	1	-1	397	46.6	17	8.5	16
16	1	1	1	1	1	713	67.4	27	11	14
17	0	0	0	0	0	670	77.1	34	8.7	5.1
18	0	0	0	0	0	671	72.2	33	9.3	4.5
19	0	0	0	0	0	620	67.8	30	9.1	4.5

\* A=Initial pH, B=Glucose (g/L), C= Yeast extract (g/L), D=  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E=  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

**Table 4:** The t-value effects for the variables tested in the  $2^{5-1}$  factorial design with 3 center points for carotenoid production, specific carotenoid production, biomass and yield.

Source of variation	t-values			
	Biomass (g/L)	Specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ )	Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ )	Yield ( $\mu\text{g/g}$ sugar)
A	2.41	1.03	1.30	0.39
B	6.73*	-3.16	0.61	-9.48*
C	13.41*	7.21*	9.62*	13.24*
D	14.15*	-6.75*	1.38	0.32
E	-0.51	-4.46*	-2.23	-5.61*
AB	1.54	1.79	2.64	2.56
AC	0.42	-1.01	0.63	-1.14
AD	1.52	-1.60	0.28	-0.43
AE	1.94	-3.57*	-2.78	-5.42*
BC	4.35*	-2.00	-0.09	-6.19*
BD	2.14	-1.66	-1.94	-4.95*
BE	0.53	3.45*	1.58	4.35*
CD	1.22	-3.36*	-1.90	-1.93
CE	1.47	2.43	1.35	2.89
DE	1.83	1.76	1.43	1.89

Significant at 95% level.

A=Initial pH, B=Glucose (g/L), C= Yeast extract (g/L), D=  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E=  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

The fermentation determinations such as pH, residual sugar and absorbance, are presented in Tables 5 to 7. All experiments in which the medium initiated with 40 g/L of glucose (Table 5) had high residual sugar levels after 5 days of fermentation (assays 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 and 16). This indicated that the glucose concentration could be decreased to reduce costs.

**Table 5:** Residual sugars determined during the fermentation to carotenoid production by *R. mucilaginosa*-137.

Assays	Residual sugar (g/L)					
	0	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
1	10	8.5	6.6	4.8	4.3	4.1
2	10	8.5	6.6	4.8	4.4	3.5
3	40	4.5	31	29	27	31
4	40	39	33	26	25	31
5	10	5.8	3.1	0.5	0.4	0.5
6	10	5.4	2.9	0.4	0.3	0.3
7	40	33	27	22	22	25
8	40	32	26	22	19	22
9	10	5.2	3.5	2.0	1.4	0.6
10	10	6.0	3.1	1.4	0.9	0.7
11	40	31	26	22	22	25
12	40	35	27	21	20	25
13	10	5.0	1.0	0.3	0.2	0.2
14	10	5.1	24	0.2	0.3	0.2
15	40	25	27	19	17	16
16	40	28	15	15	15	14
17	25	18	17	8.3	7.4	5.1
18	25	18	8.9	8.0	6.2	5.4
19	25	18	9.2	8.1	6.2	4.5
Control	10	7.6	4.2	1.9	1.5	1.3

Carotenogenesis naturally proceeds at changing pH of the fermentation medium (FRENGOVA et al., 1995). The pH decreased in most of the assays, although the pH of medium 1, 4, 6, 7, 10, 11 and 16 had no significant changes. It is interesting to observe that in assays 5 and 14 the pH increased above 6 after 5 days of fermentation (Table 6). Frengova et al. (1995) observed that the pH decreased slightly during the first 3 days of fermentation, followed by an increase to 6.5 until the end of the fermentation process.

Shih & Hang (1996) also observed the rise of the medium pH, from an initial value of 5.0 to 8.2.

**Table 6:** Changes of pH during the fermentation process to carotenoid production by *R. mucilaginosa*-137.

Assays	pH					
	0	1 days	2 days	3 days	4 days	5 days
1	4.1	4.2	4.1	4.1	4.1	4.1
2	5.5	4.9	4.7	4.6	4.5	4.5
3	4.3	3.8	3.7	3.6	3.7	3.7
4	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
5	4.1	3.6	3.6	3.7	3.9	6.1
6	5.9	5.9	5.9	5.9	6.0	6.0
7	4.1	3.7	3.7	3.8	3.8	3.9
8	5.4	5.1	4.8	4.6	4.5	4.5
9	4.2	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5
10	6.0	6.0	6.0	5.9	5.9	6.0
11	4.1	3.9	3.9	3.9	3.9	3.8
12	5.1	4.3	4.2	4.1	4.1	4.1
13	4.1	3.7	3.6	3.8	3.7	4.7
14	5.7	5.0	4.5	6.2	6.3	6.5
15	4.0	3.5	3.3	3.3	3.3	3.3
16	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	5.8
17	4.9	4.3	4.3	4.5	4.6	4.5
18	4.9	4.2	4.4	4.5	4.5	4.5
19	4.9	4.3	4.3	4.5	4.5	4.5
Control	6.1	5.1	4.8	4.9	6.2	6.5

**Table 7:** Absorbance of yeast media culture measured at 600 nm during the fermentation to carotenoid production by *R. mucilaginosa*-137.

Assays	OD (600 nm)					
	0	1 day	2 days	3 days	4 days	5 days
1	0.1	3.1	4.2	3.2	3.3	3.2
2	0.1	3.3	4.0	3.0	3.8	2.9
3	0.1	3.1	4.2	3.2	4.4	3.8
4	0.1	3.2	3.3	3.3	3.5	3.6
5	0.1	8.5	9.3	10	11	8.9
6	0.1	8.3	9.0	12	11	10
7	0.1	7.3	8.6	10	11	11
8	0.1	8.1	9.5	13	13	13
9	0.1	8.0	9.3	11	12	12
10	0.1	8.0	9.2	9.8	12	12
11	0.1	7.8	7.9	11	12	12
12	0.1	7.8	9.0	12	13	13
13	0.1	8.3	9.4	12	15	15
14	0.1	9.1	12	16	16	15
15	0.1	7.9	9.7	16	13	16
16	0.1	8.3	11	17	20	19
17	0.1	8.2	10	17	17	16
18	0.1	8.6	12	17	18	17
19	0.1	8.1	10	17	14	16
Control	0.1	8.6	10	14	14	13

The growth of most of assays, determined by the absorbance at 600 nm, reached the stationary phase after 3 or 4 days of cultivation (Table 7). The biomass obtained in this work, 11 g/L, is higher than those reported for other species of *Rhodotorula*. Martin et al. (1993) obtained about 7 g/L of biomass by *Rhodotorula* sp, while Shih & Hang (1996) produced 8 g/L of biomass.

The yield of total carotenoids in the present study, expressed as torulene, by *R. mucilaginosa* was more than 170 µg/g yeast dry weight. This result is higher than those obtained by Bhuyan et al. (1985) (146 µg/g) and by Shil & Hang (1996), (130 µg/g).

The results of this study indicate that *R. mucilaginosa* - 137 can grow in medium containing yeast extract and glucose, without supplementation with salts (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) for production of carotenoids. The highest yield of biomass was reached in assays 16 to 19. However, maximum specific carotenoid production occurred when the biomass had lower levels, assays 5 and 8. The maximum values of carotenoid concentration and biomass concentration do not coincide, indicating that they do not have a direct correlation.

### **Optimization of media composition**

The composition of the medium was optimized taking the variable (yeast extract), which positively influenced carotenoid production and glucose that is essential for microorganism growth. The experimental results for two-factor-two-level response surface analysis are shown in Table 8. Three replicates were included at the center of the design, and the total number of test runs for this design was eleven. Four responses were studied for each experiment, carotenoid production (µg/L), specific carotenoid production (µg/g dry cell), biomass (g/L) and protein (%). The response surface methodology was adopted as an efficient way to find an optimum culture medium for carotenoid production by *R. mucilaginosa*-137. The coded level for each substrate concentration is shown in Table 2.

The biomass of *R. mucilaginosa*-137 varied with the conditions tested, at range of 2.5 to 8.0 g/L with maximum at 15 to 20 g/L of glucose and 15 to 17.07 g/L of yeast extract. The specific carotenoid production content varied from 91.0 to 152 µg/g, with maximum production (127 to 152 µg/g) at 7.9 to 10 g/L of glucose and 5 to 10 g/L of yeast extract. These results can be explained by the lower biomass production at this

range. The carotenoid concentration increased from 250 to 745  $\mu\text{g/L}$  with maximum value (730 to 745  $\mu\text{g/L}$ ) at range of 15 to 20 g/L of glucose and 10 to 15 g/L of yeast extract. Protein content of biomass varied from 39 to 68%. The maximum range concentration was at 10 to 15 g/L of yeast extract and 20 to 22 g/L of glucose.

The experimental results presented in Table 8 were used to estimate the main effects of variables and their interaction effects. The regression coefficients and corresponding t values for full quadratic models of these results are presented in Table 9. Analyzing the results shown in Table 9, we can conclude that linear terms of yeast extract and glucose had positive effect, and the quadratic term of yeast extract exerted a significant negative effect on biomass production. On carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ), the linear term of yeast extract had a significant positive effect, and the quadratic term of yeast extract exerted a significant negative effect. The negative effect of nitrogen source quadratic term indicated that yeast extract concentration higher than the experimental level (17.1 g/L) might result in an inhibitory effect on carotenoid production.

Regarding to specific carotenoid production, only the linear terms of yeast extract and glucose exhibited significant negative effect. The negative effect of nitrogen sources on carotenoid production by yeast has been well related (GIL-HWAN et al., 1996; FANG & CHENG, 1993). The glucose was the only term that had significant effect on the protein content.

**Table 8:** 2<sup>2</sup> factorial design values and experimental results obtained by fermentation of *R. mucilaginosa*-137, varying the concentrations of glucose and yeast extract.

Assays	Coded variables			Results			
	Yeast extract (g/L)	Glucose (g/L)	Biomass (g/L)	Carotenoid production (µg/L)	Specific carotenoid production (µg/g)	Residual sugars (g/L)	Protein (%)
1	-1	-1	3.2	488	152	0.3	47
2	1	-1	6.5	679	104	0.5	55
3	-1	1	5.3	609	116	2.6	52
4	1	1	8.0	745	93.1	0.8	68
5	0	-1.41	5.0	637	127	0.4	51
6	0	1.41	7.4	671	91.0	2.2	56
7	-1.41	0	2.5	250	99.5	3.5	39
8	1.41	0	8.0	671	83.6	0.7	55
9	0	0	6.6	702	106	0.6	49
10	0	0	6.5	728	111	0.5	51
11	0	0	6.4	732	114	0.5	52

At 95% significant level



**Table 9:** Regression coefficients and t values of full quadratic equations for the response surfaces of carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ), specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ ), biomass ( $\text{g/L}$ ) and protein (%).

Term	Biomass ( $\text{g/L}$ )		Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ )		Specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ )		Protein (%)	
	Regression Coefficient	t value	Regression Coefficient	t value	Regression Coefficient	t value	Regression Coefficient	t value
	$b_0$	-4.42	113.3	-264.55	75.75	216.9*	46.44	63.27*
$b_1$	0.94*	49.06	120.77*	19.80	-1.78*	-8.01	0.36*	0.64
$b_2$	0.43*	24.19	29.61*	5.06	-9.04*	-8.40	-3.31*	-4.94
$b_{12}$	-0.01	-2.95	-0.55	-1.66	0.25	3.07	0.08	3.24
$b_1^2$	-0.03*	-14.91	-4.47*	-16.13	-0.22	-3.14	-0.2	-0.91
$b_2^2$	-0.01	-4.04	-0.61	-2.19	0.14	1.96	0.11*	5.10

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{22}x_2^2$$

Where  $x_1$ =yeast extract and  $x_2$ =glucose

(\*) at 95% significant level

The full quadratic models of these results were tested for adequacy by the analysis of variance (Table 10 and 11). The model for biomass and protein had satisfactory values of  $R^2$  (0.987 and 0.85), and were significant at 5% level.

The F value of 80.57 (Table 10) for biomass is greater than  $F_{5,5}$  (5.05) within a rejection region having  $\alpha$ -level that is  $p < 0.05$  (Table 9), and there was no lack of fit, thus this model can be used to predict the results in this studied region. Since the biomass had a high value of correlation coefficient (0.98), and presented F model much greater than F table, it was not necessary to adjust the model by ignoring the insignificant effects.

Although the  $MS_{Lr}/MS_{Pe}$  (15.39) is lower than the  $F_{3,2}$  (19.16), showing no lack of fit, the F model (5.81) obtained for protein was a little bit greater than  $F_{5,5}$  (5.05), indicating that this model should be adjusted (Table 10). Since the linear and quadratic terms of yeast extract were not significant on protein (%), another ANOVA table was

obtained (Table 12). The new analysis of variance for protein content had the value of  $R^2$  decreased from 0.85 to 0.82. The F model increased from 5.81 to 10.53 and also  $MS_{Lf}/MS_{Pe}$  decreased from 15.39 to 11.5, showing the new model is better to predict the results.

**Table 10:** Analysis of variance for the regression model of carotenoid production, by yeast, obtained from the response surface experiments.

Source	Biomass (g/L)			Protein (%)		
	SS	Df	MS	SS	Df	MS
Regression	32.23	5	6.446	419.84	5	83.97
Residual	0.402	5	0.080	72.25	5	14.45
Lack of fit	0.382	3	0.127	69.25	3	23.08
Pure error	0.020	2	0.010	3.00	2	1.50
Total	32.63	10		492.09	10	
F model		80.57			5.81	
$MS_{Lf}/MS_{Pe}$		12.7			15.39	
$R^2$		0.987			0.85	

SS = Sum of square; Df = Degrees of freedom; MS = Media square;  $MS_{Lf}/MS_{Pe}$  = MS Lack of fit/ MS Pure error;  $F_{5,5} = 5.05$ ;  $F_{3,2} = 19.16$

The model to carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) had a satisfactory value of  $R^2$  (0.89), and was significant at 5% level (Table 11). Although the F value (8.16) obtained for carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) is greater than  $F_{5,5}$  (5.05), the  $MS_{Lf}/MS_{Pe}$  (27.41) is greater than the  $F_{3,2}$  (19.16), showing lack of fit. Since the quadratic terms of glucose and the interactions term of yeast extract and glucose were not significant on carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ), another ANOVA table was obtained (Table 12).

**Table 11:** Analysis of variance for the regression model of carotenoid production obtained from the response surface experiments.

Source	Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ )			Specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ )		
	SS	Df	MS	SS	Df	MS
Regression	186,601.7	5	37,320.3	2,758.33	5	551.66
Residual	22,861.7	5	4,572.3	822.94	5	164.59
Lack of fit	22,319.0	3	7,439.7	789.12	3	263.04
Pure error	542.7	2	271.4	33.82	2	16.91
Total	209,463.4	10		3,581.27	10	
F model		8.16			3.35	
$MS_{L,f}/MS_{Pe}$		27.41			15.55	
$R^2$		0.89			0.77	

SS = Sum of square; Df = Degrees of freedom; MS = Media square;  $MS_{L,f}/MS_{Pe}$  = MS Lack of fit/ MS Pure error;  $F_{5,5} = 5.05$ ;  $F_{3,2} = 19.16$

Adjusting the model and analysis of variance for carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) and ignoring the insignificant effects, it was observed that the new regression obtained was better, however  $R^2$  decreased slightly from 0.89 to 0.88 (Table 12). The F model (17.28) was much greater than  $F_{3,7}$  (4.35), and  $MS_R/MS_r = 17.96$  is lower than  $F_{5,2}$  (19.30), suggesting that the adjustable model could predict the results better than that presented by the complete model.

The F value of 3.35 for specific carotenoid production is shown in Table 11. The correlation coefficient (0.77) had low value. The F value of 3.35 was lower than  $F_{5,5}$  (5.05), indicating that the model should be adjusted. Another table of variance was obtained for specific carotenoid production, trying to adjust the model (Table 12). The analysis of variance demonstrated that the value of  $R^2$  decreased from 0.77 to 0.64, showing that this polynomial model is inadequate for describing the relationships between the response under study and the experimental factors. Moreover, the F model (6.99) obtained was a little bit higher than  $F_{2,8}$  (4.46), which confirmed that this model

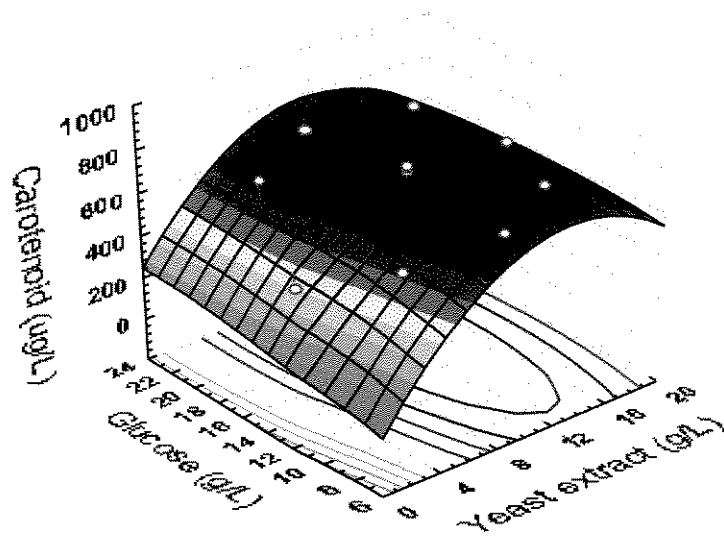
could not be used to predict the experimental values for specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ ).

**Table 12:** Analysis of variance for the regression model obtained from the response surface experiments, after ignoring the insignificant effects.

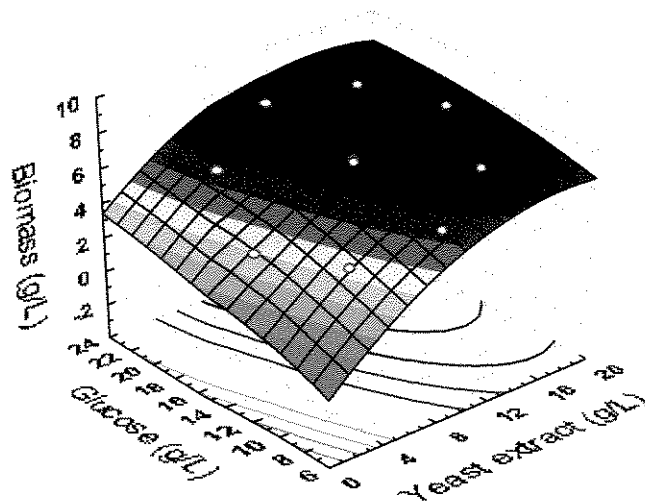
Source	Carotenoid production			Specific carotenoid			Protein (%)		
	( $\mu\text{g/L}$ )			production ( $\mu\text{g/g}$ )					
	SS	Df	MS	SS	Df	MS	SS	Df	MS
Regression	184,546.8	3	61,515.6	2,278.09	2	1,139.04	402.82	3	134.27
Residual	24,916.6	7	3,559.51	1,303.18	8	162.90	89.27	7	12.75
Lack of fit	24,373.9	5	4,874.78	1,269.36	6	211.56	86.27	5	17.25
Pure error	542.7	2	271.4	33.82	2	16.91	3.00	2	1.50
Total	209,463.4	10		3,581.27	10		492.09	10	
F model		17.28			6.99			10.53	
$MS_{L_f}/MS_{P_e}$		17.96			12.51			11.5	
$R^2$		0.88			0.64			0.82	

SS = Sum of square; Df = Degrees of freedom; MS = Media square;  $MS_{L_f}/MS_{P_e}$  = MS Lack of fit/ MS Pure error;  $F_{5,2} = 19.30$ ;  $F_{3,7} = 4.35$ ;  $F_{6,2} = 19.33$ ;  $F_{2,8} = 4.46$ ;  $F_{5,5} = 5.05$ ;  $F_{3,2} = 19.16$

Figures 2 and 3 show the response surface diagram of carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) and biomass ( $\text{g/L}$ ), respectively. Figure 2 shows that the carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ) was more sensitive to yeast extract changes than to changes in glucose concentration in the region studied. The highest values for carotenoid occurred at about 12 to 16  $\text{g/L}$  of yeast extract. Figure 3 describes the effects of yeast extract and glucose concentration on biomass production ( $\text{g/L}$ ). The surface showed that the biomass was affected by independent variables, yeast extract and glucose. Substantial biomass of *R. mucilaginosa* could be obtained by increasing the concentrations of glucose and yeast extract.



**Figure 2:** Response surface diagram describes the effects of yeast extract and glucose concentrations on carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ ).



**Figure 3:** Response surface diagram describes the effects of yeast extract and glucose concentrations on biomass production (g/L).

## CONCLUSIONS

This study showed that yeast extract and glucose could be used for biomass and carotenoid production, using the second-order polynomial equation. The results indicated that carotenoid concentrations, biomass and protein content depend on medium composition. The carotenoid production had maximum value of 745  $\mu\text{g/L}$  at 15 g/L of yeast extract and 20 g/L of glucose. The biomass of *R. mucilaginosa*-137 varied with the conditions tested, at range of 2.5 to 8.0 g/L with maximum at 15 to 20 g/L of glucose and 15 to 17.07 g/L of yeast extract. Comparing to the control assay, which produced about 340  $\mu\text{g/L}$  carotenoid production and 6.2 g/L of biomass in the YM medium, we could conclude that the carotenoid production and biomass had their production increased.

For carotenoid production, the better model to predict the results was obtained after ignoring the insignificant effects was:  $Y (\mu\text{g/L}) = -42.0 + 109.0 X_1 - 4.3 X_1^2 + 5.9 X_2$

The equation that described biomass production was:  $B (\text{g/L}) = -4.42 + 0.94 X_1 + 0.43 X_2 - 0.01 X_1 X_2 - 0.03 X_1^2 - 0.01 X_2^2$

The specific carotenoid production had maximum production (127 to 152  $\mu\text{g/g}$ ) at 7.9 to 10 g/L of glucose and 5 to 10 g/L of yeast extract. However, the model obtained was inadequate to describe the relation between the response and the independent variables (yeast extract and glucose), in the studied region. The protein content obtained in this work varied from 39 to 68% agreed with those reported in the literature. The better model for protein was obtained after ignoring the insignificant effects. The equation that better described the protein content, in the region studied, was:  $P (\%) = 53.9 + 1.17 X_1 - 2.67 X_2 + 0.11 X_2^2$

Where:  $X_1$  = Yeast extract (g/L);  $X_2$  = Glucose (g/L);  $Y$  = Carotenoid production ( $\mu\text{g/L}$ );  $B$  = Biomass (g/L);  $C$  = Specific carotenoid production ( $\mu\text{g/g}$ );  $P$  = Protein (%)

## REFERENCES

AN, GIL-HWA; BIELICH, J.; AUERBACH, R.; JOHNSON, E. A. Isolation and characterization of carotenoid hyper producing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology**, 9:70-73, 1991.

BARROS, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora Unicamp. São Paulo-Brazil, pp. 133-165, 1996.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **STATISTICS for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building**. Wiley and Sons, New York, p. 653, 1978.

BHUYAN, J. U.; RAHMAN, M.; AHMAD, K. Studies on nutritive value of pigment-producing yeast *Rhodotorula*. **Journal of Bangladesh Academy of Sciences**, 9:65-70, 1985.

COSTA, I.; MARTELLI, H. L., DA SILVA, I. M.; POMEROY, D. Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula* strain. **Biotechnology Letters**, 9:373-375, 1987.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

FANG, T. J.; CHENG, Y. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 75:466-469, 1993.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, 17:1001-1006, 1995.

GIL-HWA, AN; CJOI, E.; RHEE, S. Medium optimization for cultivation of carotenoids hyper producing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FOIC. **Journal of Fermentation Bioengineering**, **5**:515-518, 1996.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, **120**:1339-1343, 1974.

JOHNSON, E. A. CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonoids and crustaceans. **Journal of Fishing Research Board of Canada**, **34**:2417-2421, 1977.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, **115**:173-183, 1979.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Science**, **59**:1777-1782, 1980.

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **76**:321-325, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, **31**:426-428, 1959.

NELIS, H. J.; DELEENHEER, A. P. Microbial sources of carotenoid pigment used in foods and feeds: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, **70**:181-191, 1991.



RAITSINA, G. I.; EVDOKIMOVA, G. A. The production of feed yeast from peat. IN: Fuchsman, C. H.; Peat (Eds.); **Industrial Chemistry and Technology**, p.113-120. Academic Press New York, 1980.

REED, G. Microbial biomass, single cell protein, and other microbial products. IN: Reed, G. (Ed.), **Prescott and Dunn's Industrial Microbiology** (4<sup>th</sup> edition), 1982.

RODRIGUEZ-AMAYA, B. D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, D. C.: International Life Science Institute Prece, p. 64 1999.

SHIL, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lebensmittl Wissenebe Technologie**, 29:570-572, 1996.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O.; PHAFF, H. J. Carotenoid pigments of yeast, p. 493-515. IN Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Eds.), **The Yeasts**, vol. 2. Academic Press, New York, 1971.

## **CAPÍTULO 5**

# **OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula glutinis***

# OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula glutinis*

IRIANI RODRIGUES MALDONADE; DÉLIA B. RODRIGUEZ-AMAYA; ADILMA  
REGINA PIPPA SCAMPARINI

Departamento de Ciência de Alimentos-FEA-Universidade Estadual de Campinas, CP  
6121, Campinas-SP, Cep 13083-970, Brasil

## RESUMO

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar a produção de *Rhodotorula glutinis*. As variáveis que tiveram influência significativa na produção de carotenóides foram pH inicial, extrato de levedura e glicose. A glicose foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, enquanto que os sais de sulfato e fosfato não tiveram efeito significativo. Através do planejamento fatorial completo  $2^3$  com três pontos centrais, observou-se que na produção de carotenóides, apenas a glicose teve efeito positivo significativo. Na produção específica de carotenóides, o pH inicial, glicose e extrato de levedura tiveram efeito positivo. A máxima concentração de carotenóides obtida foi de 1.269  $\mu\text{g/L}$  com pH inicial 4, 4 g/L de extrato de levedura e 17 g/L de glicose. Na produção específica de carotenóides, a máxima concentração foi de 337  $\mu\text{g/g}$  com pH inicial 4, a 4 g/L de extrato de levedura e 7 g/L de glicose. O crescimento celular foi afetado pelo pH inicial, concentração de extrato de levedura e glicose. Entretanto, o modelo matemático referente a biomassa não apresentou uma regressão satisfatória, devendo ser utilizado apenas para estabelecer tendência da resposta.

**Palavras-chave:** Carotenóides, levedura, fermentação, superfície de resposta, *Rhodotorula glutinis*

**OPTIMIZATION OF MEDIUM COMPOSITION FOR CAROTENOID  
PRODUCTION BY *Rhodotorula glutinis***

**ABSTRACT**

Response surface designs and statistical analysis were used to optimize the carotenoid production of the yeast *Rhodotorula glutinis*. The variables that had most influence on carotenoid production were initial pH, yeast extract and glucose. The most important variable in terms of enhancing carotenoid formation was glucose, while magnesium sulfate and potassium phosphate had no influence. The carotenoid production was described by second order polynomial equation. Analysis of the 2<sup>3</sup> factorial design surfaces showed that after 5 days of cultivation at 25°C, the maximum carotenoid concentration of 1,269 µg/L with initial pH 4, 4 g/L of yeast extract and 17 g/L de glucose. The maximum specific carotenoid production was 337 µg/g with initial pH 4, 4 g/L of yeast extract and 7 g/L of glucose. Moreover, carotenoid production in µg per liter was more sensitive to changes in yeast extract than to changes in glucose concentrations, in the vicinity of the optimum point of carotenoid production. The growth of the microorganism was affected by initial pH and concentration of yeast extract and glucose. However, the model obtained from the experimental designs had not a good correlation and because of that should be used only to study the tendency of response.

**Key words:** Carotenoids, yeast, fermentation, response surface, *Rhodotorula glutinis*

## 1 - INTRODUÇÃO

O interesse por carotenóides têm aumentado nos últimos anos, devido a crescente demanda destes compostos nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticas e de ração. Também a procura por compostos com conotação “natural” têm resultado num aumento de pesquisas referentes a produção de carotenóides por via fermentativa. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de carotenóides, visa um aumento do rendimento da concentração de carotenóide assim como a redução de custos relativos ao processo, através da utilização de substratos de baixo custo.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas como produtoras de carotenóides (HARI et al., 1992; DE MIGUEL et al., 1997), com concentrações variando de 10 a 100  $\mu\text{g/g}$  de biomassa seca. Devido a um rendimento celular alto, também podem ser utilizadas como fonte de proteína (NELIS & DELEENHEER, 1991) na formulação de rações para peixes e aves (MOCANU, et al., 1997).

Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes, podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração, e luminosidade (HAYMAN et al., 1974). Sacarose e glicose são as fontes de carbono mais comumente utilizadas na fermentação por *Rhodotorula* sp. De acordo com Buzzini & Martini (2000), o uso de glicose ocasionou maior rendimento da produção específica de carotenóides (1.000  $\mu\text{g/g}$ ). O uso de extrato de leveduras suplementado com sais propiciou maior acúmulo de carotenóides (acima de 2.000  $\mu\text{g/g}$  de biomassa) e de biomassa (17 g/L).

A metodologia clássica de estudar uma variável por vez, fixando as outras variáveis, muitas vezes é um método ineficiente. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada neste trabalho por ser mais efetiva nas análises das respostas. Além de diminuir os números de ensaios, este método estuda os efeitos das interações entre as variáveis e determina um modelo matemático, o que permite a otimização da produção. O objetivo deste trabalho foi de otimizar a composição do meio de produção de carotenóides por *R. glutinis*, a fim de aproveitar melhor os componentes do meio.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 – Condições de cultivo**

A cultura selecionada foi transferida para tubos inclinados, contendo o meio YM ágar (2,0% de glicose, peptona; 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de extrato de malte, 2,0% de ágar) e após o crescimento foram armazenados a 4°C.

As culturas também foram preservadas em óleo mineral, que consistiu no crescimento da linhagem em tubos inclinados de YM ágar por 24 horas, com recobrimento por óleo mineral estéril e manutenção a 4°C.

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio YM. Após a esterilização, estes frascos foram inoculados com alça de níquel-cromo da cultura em tubos de ensaio, e mantidos a 25°C por 72 horas e 200 rpm.

Os ensaios foram realizados em shaker de 500 mL, contendo 200 mL de meio de fermentação. A composição do meio variou de acordo com os planejamentos experimentais, descritos nos itens 2.5. Cada frasco de erlenmeyer foi inoculado com 10% (v/v) do inóculo e incubados a 200 rpm, 25°C por 120 horas, sem iluminação.

### **2.2 - Determinação do crescimento celular**

As células foram obtidas após o término da fermentação, através da centrifugação do caldo fermentado a 11.000 x g a 5°C por 20 minutos. A massa celular foi quantificada através da secagem em estufa até peso constante. As células foram secas em liofilizador.

### **2.3 - Determinação de açúcares redutores totais e proteínas**

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método de DNS (MILLER,1959). O teor de proteína foi determinado pelo método Kjeldahl, utilizando o fator 6,25.

### **2.4 - Determinação de Carotenóides**

As células de leveduras, após centrifugação, foram trituradas em almofariz juntamente com solvente acetona e hiflosupercel (celite). Em seguida, o extrato foi filtrado à vácuo até que o solvente ficasse incolor e o resíduo sem coloração (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Os carotenóides foram transferidos da acetona para éter de petróleo aos poucos, em funil de separação. Após três ou quatro lavagens com água destilada, a solução de carotenóides foi transferida para um frasco de erlenmeyer contendo sulfato de sódio anidro. Após trinta minutos o extrato foi concentrado em rotavapor à 35°C e, o volume foi ajustado em balão volumétrico com éter de petróleo. A absorvância da amostra foi medida em espectrofotômetro BECKMAN, modelo DU 640. A concentração total de carotenóides foi estimada através do valor medido da máxima absorvância a 448 nm, utilizando a fórmula descrita por Davies (1976). O coeficiente de absorvância utilizado foi referente ao  $\beta$ -caroteno (2592), pelo fato deste ser o carotenóide predominante na amostra. Os resultados da concentração de carotenóides foram expressos em termos de produção de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) e em produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ ). A produção de carotenóides representa a concentração total de carotenóides ( $\mu\text{g}$ ) (DAVIES, 1976) presentes em 1 litro de meio fermentado. A produção específica de carotenóides representa a concentração total de carotenóides ( $\mu\text{g}$ ) em relação a biomassa de levedura obtida em 1 litro de meio fermentado.

## 2.5 - Delineamento Experimental para Estudar a Influência dos Componentes do Meio de Produção de Carotenóides

### 2.5.1 - Planejamento fatorial incompleto

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura, foi utilizado um planejamento fatorial  $2^{5-1}$ , com 4 replicatas no ponto central. As variáveis avaliadas foram extrato de levedura, glicose, pH inicial,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $NH_4H_2PO_4$ , baseado em dados apresentados na literatura. Os níveis das variáveis foram -1, 0, +1, conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1:** Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial incompleto  $2^{5-1}$ .

Variáveis	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
pH inicial	$X_1$	4,0	5,0	6,0
Glicose (g/L)	$X_2$	10	25	40
Extrato de levedura (g/L)	$X_3$	5,0	10	15
$NH_4H_2PO_4$ (g/L)	$X_4$	0	4,0	8,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	$X_5$	0	0,5	1,0

O delineamento do planejamento fatorial incompleto está descrito na Tabela 3.

### 2.5.2 - Planejamento fatorial completo para otimizar a produção de carotenóides

Foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com 6 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, segundo Box & Wetz, 1973. Neste experimento, foram realizados 17 ensaios, sendo oito fatoriais, seis axiais e três pontos centrais. Os pontos centrais servem para estimar o erro experimental e determinar a precisão da equação polinomial (Cochran & Cox, 1964).



A Tabela 2 apresenta os valores codificados e reais do delineamento experimental central composto, para três variáveis independentes e cinco níveis de variação. Os valores reais correspondentes a estes níveis aparecem na Tabela 4, cujos valores foram calculados de acordo com a seguinte equação:  $x_i = (X_i - Y) / X_i - X_{i-1}$

Onde:  $x_i$  = valor codificado da variável  $X_i$ ,

$X_i$  = valor real da variável,

$Y$  = valor real da variável no ponto central,

Esse delineamento apresenta ainda dois níveis de variáveis axiais codificados como  $-\alpha$  e  $+\alpha$ . O valor de  $\alpha$  é função do número de variáveis independentes, sendo definida pela seguinte equação:  $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$

A faixa de variações entre o limite inferior e o superior de cada variável, foi estabelecida a partir dos resultados obtidos no delineamento do item 2.5.1. As variáveis independentes otimizadas foram pH inicial, extrato de levedura e glicose. As respostas ou variáveis dependentes estudadas foram: produção de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ), produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ ), biomassa ( $\text{g/L}$ ), e proteína (%).

**Tabela 2:** Níveis das variáveis independentes do planejamento completo  $2^3$ , com 3 replicatas no ponto central.

Variáveis	Símbolo	Níveis				
		-1,68	-1,00	0	+1,00	+1,68
pH inicial	$X_1$	3,32	4	5	6	6,68
Glicose (g/L)	$X_2$	3,6	7	12	17	20,4
Extrato de levedura (g/L)	$X_3$	1,28	4	8	12	14,72

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Planejamento Fatorial Incompleto $2^{5-1}$

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial incompleto  $2^{5-1}$  estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Efeito das variáveis da composição do meio na produção de carotenóides.

Ensaio	Variáveis independentes*					Respostas			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	Carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )	Produção específica de Carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )	Biomassa (g/L)	Proteína (%)
01	-1	-1	-1	-1	+1	1.140	164	6,9	47
02	+1	-1	-1	-1	-1	1.027	205	5,0	40
03	-1	+1	-1	-1	-1	473	43	11,0	23
04	+1	+1	-1	-1	+1	534	58	9,3	24
05	-1	-1	+1	-1	-1	1.012	169	6,0	48
06	+1	-1	+1	-1	+1	828	164	5,0	64
07	-1	+1	+1	-1	+1	396	37	10,7	28
08	+1	+1	+1	-1	-1	293	32	9,2	32
09	-1	-1	-1	+1	-1	690	198	3,5	38
10	+1	-1	-1	+1	+1	982	220	4,4	58
11	-1	+1	-1	+1	+1	757	76	10,0	33
12	+1	+1	-1	+1	-1	512	69	7,4	38
13	-1	-1	+1	+1	+1	987	145	6,8	60
14	+1	-1	+1	+1	-1	809	164	4,2	54
15	-1	+1	+1	+1	-1	663	67	9,9	323
16	+1	+1	+1	+1	+1	260	48	5,4	68
17	0	0	0	0	0	603	67	8,9	40
18	0	0	0	0	0	555	62	9,0	40
19	0	0	0	0	0	550	60	9,2	41
20	0	0	0	0	0	517	57	9,1	40
Controle			YM			785	111	7,1	45

\* X<sub>1</sub>=pH inicial, X<sub>2</sub>=Glicose (g/L), X<sub>3</sub>=Extrato de levedura (g/L), X<sub>4</sub>= NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/L), X<sub>5</sub>= MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L)

Através dos resultados apresentados na Tabela 3, na faixa de concentração investigada, verifica-se que a produção de carotenóides aumenta com a diminuição das concentrações de glicose e extrato de levedura, ou seja, o aumento das concentrações de glicose e extrato de levedura, diminui a produção de carotenóides. Este fato pode ser melhor observado na Tabela 4, onde os efeitos das variáveis estão representados.

**Tabela 4:** Estimativa dos efeitos das variáveis testadas no planejamento fatorial  $2^{5-1}$  com 3 pontos centrais, para a produção de carotenóides.

Fontes de variações	Efeitos estimados			
	Biomassa	Produção específica de carotenóides	Produção de carotenóides	Proteína
X <sub>1</sub>	-1,75*	7,68*	-108,79*	8,38*
X <sub>2</sub>	3,77*	-125,10*	-448,11*	-16,31*
X <sub>3</sub>	0,04	-25,76*	-108,33*	10,73*
X <sub>4</sub>	-1,35*	14,52*	-5,44	9,59*
X <sub>5</sub>	0,22*	-4,49	50,74	9,61*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,80*	-11,74*	-63,16*	2,65*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,44*	-10,14*	-107,74*	3,86*
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	-0,23*	-3,64	-24,44	4,73*
X <sub>1</sub> X <sub>5</sub>	-0,81*	9,56*	-59,81*	2,78*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-0,66*	10,38*	-57,86*	-0,10
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	-0,52*	8,17*	129,44*	6,54*
X <sub>2</sub> X <sub>5</sub>	-0,75*	6,32	-49,09	-2,66*
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	0,37*	-9,04*	52,86	1,15*
X <sub>3</sub> X <sub>5</sub>	-0,72*	-5,11	-126,86*	3,89*
X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	0,03	2,08	27,24	4,55*

\* Significância em 95%.

X<sub>1</sub>=pH inicial, X<sub>2</sub>=Glicose (g/L), X<sub>3</sub>=Extrato de levedura (g/L), X<sub>4</sub>=NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/L), X<sub>5</sub>=MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L)

Observa-se que a glicose foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, seguida pelo pH e extrato de levedura. Estas três variáveis tiveram efeito negativo significativo no intervalo de confiança de 95%, o que significa que quando a concentração destas variáveis aumentaram do nível -1 para o +1, houve diminuição na produção de carotenóides. Portanto, para otimizar a produção específica de carotenóides, deve-se diminuir as concentrações da glicose e extrato de levedura, assim como a faixa de pH estudada. Os sais adicionados não apresentaram influência significativa na produção de carotenóides, indicando que estas duas variáveis podem ser excluídas do processo fermentativo.

Na Tabela 4 pode-se observar que na produção específica de carotenóides o pH, a glicose, extrato de leveduras e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  tiveram influência significativa no intervalo de confiança estudado. Entretanto, a glicose e extrato de levedura tiveram efeito negativo, enquanto que o pH e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  tiveram efeito positivo. A faixa das concentrações de glicose e extrato de levedura devem ser diminuídas, a fim de melhorar a produção específica de carotenóides.

Na produção de biomassa, verifica-se que somente o extrato de levedura não teve efeito significativo no intervalo de confiança de 95%. Como o objetivo principal deste trabalho foi de incrementar a produção de carotenóides, o planejamento fatorial completo para otimização da produção de carotenóides foi baseado nos resultados apresentados da resposta de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ). Portanto, as variáveis utilizadas para a otimização da produção de carotenóides foram: glicose, extrato de levedura e pH inicial. Considerando os resultados para a produção de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ), a faixa de pH inicial foi ligeiramente diminuída, assim como as faixas das concentrações de extrato de levedura e glicose.

### 3.2 Planejamento Completo 2<sup>3</sup> com 6 Pontos Axiais e 3 Pontos Centrais

Os resultados experimentais do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> obtidos para otimizar a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis*, estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Efeito da composição do meio de produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis*.

Ensaio	Variáveis Independentes(*)			Respostas			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Produção de Carotenóides (µg/L)	Produção específica de Carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)	Proteína (%)
01	4	7	4	395	337	1,2	41
02	6	7	4	771	128	6,0	37
03	4	17	4	1.269	237	5,1	21
04	6	17	4	1.136	89	12,7	21
05	4	7	12	915	197	4,6	46
06	6	7	12	979	122	8,0	44
07	4	17	12	1.013	96	10,6	38
08	6	17	12	680	87	7,8	43
09	3,32	12	8	831	145	5,7	39
10	6,68	12	8	895	55	16,1	39
11	5	3,6	8	657	116	5,6	41
12	5	20,4	8	835	123	6,8	26
13	5	12	1,28	863	217	4,0	51
14	5	12	14,72	834	122	6,8	50
15	5	12	8	955	122	7,8	46
16	5	12	8	915	122	7,5	44
17	5	12	8	934	136	6,8	42

(\*) X<sub>1</sub> = pH inicial; X<sub>2</sub> = glicose (g/L); X<sub>3</sub> = extrato de levedura (g/L)

As análises de variância (ANOVA) correspondentes aos modelos completos e ajustados estão apresentados nas Tabelas 7, 8, 9 e 10, enquanto os modelos de regressão ajustados e a significância das variáveis independentes são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6:** Efeito da significância das variáveis independentes nos modelos completos das respostas obtidas experimentalmente.

Efeito das Variáveis Independentes	Níveis de significância (p<0,05)			
	Carotenóides	Produção específica de carotenóides	Biomassa	Proteína
<b>Intercepto</b>	0,0015*	0,0014*	0,0014*	0,0008*
<b>Linear</b>				
X <sub>1</sub>	N.S.	0,0026*	0,0035*	N.S.
X <sub>2</sub>	0,0297*	0,0128*	0,0093*	0,0128*
X <sub>3</sub>	N.S.	0,0045*	0,0275*	0,0265*
<b>Quadrático</b>				
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	N.S.	N.S.	0,0154*	0,0487*
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,0144*	N.S.	N.S.	0,0181*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	N.S.	0,0118*	0,0305*	N.S.
<b>Interações</b>				
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,0038*	0,0314*	N.S.	N.S.
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,0117*	0,0070*	0,0138*	N.S.
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,0015*	N.S.	N.S.	0,0457*

**Observações gerais:**

X<sub>1</sub> = pH inicial; X<sub>2</sub> = glicose (g/L); X<sub>3</sub> = extrato de levedura (g/L); (\*) = significativo a nível de confiança de 95%; N.S. = não significativo.

### 3.2.1 Produção de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )

De acordo com a análise de significância (Tabela 6), observa-se que a produção de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) foi influenciada significativamente pelos efeitos lineares e quadráticos da glicose; interação da glicose vs pH inicial; interação entre glicose vs extrato de levedura; e interação entre pH inicial vs extrato de levedura.

A análise da variância (ANOVA) e a equação correspondente ao modelo completo da concentração de carotenóides em  $\mu\text{g}$  por litro de meio fermentado apresentam-se na Tabela 7. O coeficiente de correlação  $R^2 = 0,924$  mostra um ótimo ajuste entre o modelo e os dados experimentais. A regressão correspondente é significativa ( $F_c = 9,45$  e  $F_t = 3,68$ ), satisfazendo as exigências estabelecidas por BOX & WETZ (1973) no sentido da razão  $QM_R/QM_f$  ser três a quatro vezes o valor de  $F_t$ . Porém, os resíduos apresentam evidência de falta de ajuste ( $F_c = 22,9$  e  $F_t = 19,3$ ), uma vez que  $F_c$  é maior do que  $F_t$ .

A partir dos modelos completos, os coeficientes não significativos dos termos quadráticos do pH e extrato de levedura foram eliminados, obtendo-se os modelos ajustados (Tabela 7). As análises de variância, correspondentes aos modelos ajustados apresentaram pequena diminuição no valor do coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,920$ ), mostrando ainda adequado ajuste aos dados experimentais. O ajuste do modelo evidenciou melhoria notável na significância da regressão ( $F_c = 15,0$  e  $F_t = 3,2$ ) e falta de ajuste dos resíduos não significativo ( $F_c = 17,0$  e  $F_t = 19,3$ ), indicando que o modelo ajustado é mais adequado para prever a resposta de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) na região estudada.

**Tabela 7:** Modelo de regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondente a resposta de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ )

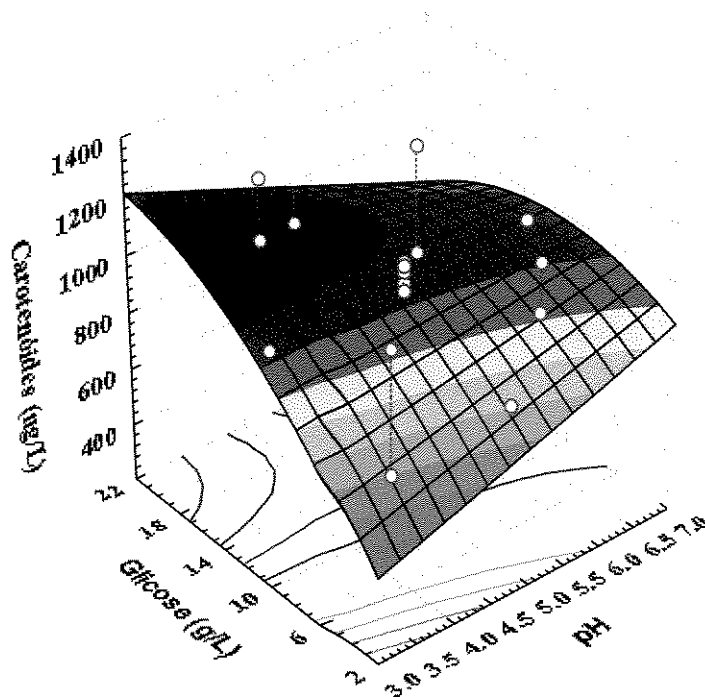
<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO COMPLETO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,924					
$Y = -2696,0 + 475,07 X_1 + 251,52 X_2 + 199,60 X_3 - 6,94 X_1^2 - 1,94 X_2^2 - 0,75 X_3^2 - 22,65 X_1X_2 - 16,00 X_1X_3 - 9,01 X_2X_3$					
<b>Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	553.679,5	9	61.519,9	9,45	3,68
Resíduo	45.583,1	7	6.511,9		
Falta de Ajuste	44.801,9	5	8.960,4	22,9	19,3
Erro Puro	781,2	2	390,6		
Total	599.262,6	16			
% de Variância Explicada = 92,4%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,8%					
<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO AJUSTADO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,921					
$Y = -2468,13 + 405,72 X_1 + 247,37 X_2 + 187,52 X_3 - 1,77 X_2^2 - 22,65 X_1X_2 - 16,00 X_1X_3 - 9,01 X_2X_3$					
<b>Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	551.899,3	7	78.842,7	15,0	3,2
Resíduo	47.363,3	9	5.262,6		
Falta de Ajuste	46.582,1	7	6.654,6	17,0	19,3
Erro Puro	781,2	2	390,6		
Total	599.262,6	16			
% de Variância Explicada = 92,1%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,8%					

**Observações gerais:**

**Negrito** = significância a 5% de probabilidade;  $X_1$  = pH inicial;  $X_2$  = glicose (g/L);  $X_3$  = extrato de levedura (g/L); **SQ** = soma dos quadrados; **GL** = graus de liberdade; **QM** = quadrado médio; **Fc** = F calculado; **Ft** = F tabelar;  $QM_R/QM_f = QM_{regressão}/QM_{resíduo}$ .



A Figura 1 apresenta o diagrama de superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado que mostra a variação da concentração de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ) em função das variáveis independentes.



**Figura 1:** Diagrama de superfície de resposta do efeito do pH inicial e concentração de glicose (g/L) na concentração de carotenóides ( $\mu\text{g/L}$ ).

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta ao modelo ajustado, que estabelece a variação da concentração de glicose em função do pH, para concentração de extrato de levedura fixa (8g/L). Observa-se que maiores valores da concentração de carotenóides foram obtidos com valores de concentrações de glicose maiores que 12 g/L. A variação de pH inicial exerceu pequena influência na produção de carotenóides. Entretanto, Shih & Hang (1996) observaram que o pH inicial do meio de fermentação afetou significativamente a produção de carotenóides por *Rhodotorula rubra*, onde na faixa de pH de 3,4 a 4,5, houve inibição do crescimento celular assim como da produção de carotenóides.

### 3.2.2 Produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ )

Na Tabela 6, verifica-se que a produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ ) foi influenciada pelo efeito linear do pH inicial; pelo efeito linear da glicose; pelo efeito linear do extrato de levedura; pelo efeito quadrático do extrato de levedura; pela interação entre pH inicial e glicose; e pela interação entre pH inicial e extrato de levedura.

A análise de variância (ANOVA), do modelo de regressão completa para produção específica de carotenóides, apresentou coeficiente de correlação razoável  $R^2 = 0,855$  (Tabela 8), porém, a regressão não é altamente significativa ( $F_c = 4,6$  e  $F_t = 3,6$ ), pois não satisfaz as exigências estabelecidas por Box & Wetz (1973) no sentido da razão  $QM_R/QM_r$  ser três a quatro vezes o valor de  $F_t$ ; portanto, esse fato não autoriza o uso do modelo com fins preditivos.

A partir do modelo completo, eliminaram-se os coeficientes não significativos, obtendo-se o modelo ajustado (Tabela 8). Após ajuste do modelo, observa-se um incremento na significância da regressão ( $F_c = 9,5$  e  $F_t = 3,2$ ); e o coeficiente de correlação apresentou pequena diminuição ( $R^2 = 0,85$ ), explicando variação de 85,1% do total de 99,8%. Embora os resíduos apresentem falta de ajuste, ele pode ser utilizado para fins preditivos na região estudada.

**Tabela 8:** Modelo de regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondente a resposta da produção específica de carotenóides ( $\mu\text{g/g}$ ).

<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA – MODELO COMPLETO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,855					
$Y = 1041,0 - 125,25 X_1 - 24,22 X_2 - 73,28 X_3 - 2,45 X_1^2 - 0,18 X_2^2 - 1,39 X_3^2 + 3,18 X_1X_2 + 8,53 X_1X_3 + 0,02 X_2X_3$					
<b>Varição</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	63.420,2	9	7.046,7	4,6	3,6
Resíduo	10.661,5	7	1.523,1		
Falta de Ajuste	10.528,6	5	2.105,7	31,7	19,3
Erro Puro	132,9	2	66,4		
Total	74.081,7	16			
% de Variância Explicada = 85,5%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,8%					
<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA – MODELO AJUSTADO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,851					
$Y = 1074,74 - 149,78 X_1 - 19,75 X_2 - 72,60 X_3 + 1,36 X_3^2 + 3,18 X_1X_2 + 8,53 X_1X_3$					
<b>Varição</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	63.014,8	6	10.502,5	9,5	3,2
Resíduo	11.066,9	10	1.106,7		
Falta de Ajuste	10.934,0	8	1.366,7	20,6	19,4
Erro Puro	132,9	2	66,44		
Total	74.081,7	16			
% de Variância Explicada = 85,1%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,8%					
<b>Observações gerais:</b>					
<b>Negrito</b> = significância a 5% de probabilidade; $X_1$ = pH inicial; $X_2$ = glicose (g/L); $X_3$ = extrato de levedura (g/L); <b>SQ</b> = soma dos quadrados; <b>GL</b> = graus de liberdade; <b>QM</b> = quadrado médio; <b>Fc</b> = F calculado; <b>Ft</b> = F tabelar; $QM_R/QM_r = QM_{regressão}/QM_{resíduo}$ .					

A produção específica de carotenóides obtida neste trabalho variou de 86,57 a 337,43  $\mu\text{g/g}$  (Tabela 5). Frengova et al. (1994) determinaram que a máxima concentração para *Rhodotorula glutinis* de 268  $\mu\text{g/g}$  de célula seca, que está dentro da faixa de concentração determinada neste trabalho.

### 3.2.3 Biomassa (g/L)

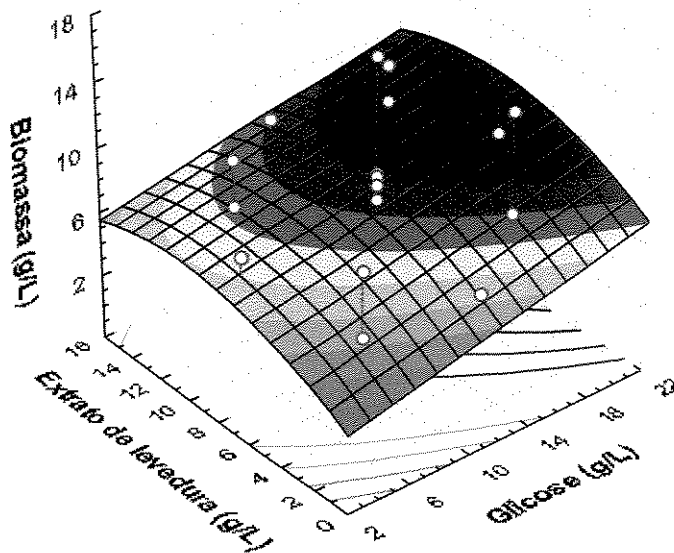
Através da análise de significância (Tabela 6), observa-se que a concentração de biomassa celular (g/L) foi influenciada significativamente pelos efeitos linear e quadrático do pH inicial; pelo efeito linear da glicose; pelos efeitos linear e quadrático do extrato de levedura; pela interação entre pH inicial e extrato de levedura. Neste caso, a variável de maior influência foi o pH.

Na Tabela 9, apresenta-se a análise de variância (ANOVA) e a equação correspondente ao modelo completo da biomassa obtidas em função dos resultados experimentais. Como observado, o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,850$  mostra ajuste razoável aos dados experimentais. O resíduo apresenta evidência de falta de ajuste ( $F_c = 22,0$  e  $F_t = 19,30$ ) e a regressão não é altamente significativa ( $F_c = 4,42$  e  $F_t = 3,6$ ), descartando-se as possibilidades de uso com fins preditivos (Box & Wetz, 1973).

O ajuste do modelo evidenciou pequena melhoria na significância da regressão e diminuição não significativa no coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,807$ ). Entretanto, a regressão ainda não satisfaz as exigências de Box e Wetz (1973), onde o valor da razão  $QM_R/QM_I$  deva ser no mínimo de três a quatro vezes o valor de  $F_t$ ; esta condição não é satisfeita em nosso caso. Como esta equação apresenta regressão não altamente significativa, considera-se conveniente apenas utilizá-la para estabelecer tendência de variação da resposta, em função das variáveis independentes na região estudadas, e não para prever valores de biomassa.

**Tabela 9:** Modelo de regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondente a resposta de biomassa (g/L).

<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO COMPLETO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,850					
$Y = -8,81 - 5,36 X_1 + 1,48 X_2 + 3,20 X_3 + 1,15 X_1^2 - 0,02 X_2^2 - 0,05 X_3^2 - 0,09 X_1X_2 - 0,36 X_1X_3 - 0,03 X_2X_3$					
<b>Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	158,7	9	17,6	4,4	3,6
Resíduo	27,9	7	3,98		
Falta de Ajuste	27,4	5	5,48	22,0	19,3
Erro Puro	0,5	2	0,25		
Total	186,6	16			
% de Variância Explicada = 85,0%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,7%					
<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO AJUSTADO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,807					
$Y = 6,45 - 7,97 X_1 + 0,27 X_2 + 2,66 X_3 + 1,31 X_1^2 - 0,04 X_3^2 - 0,36 X_1X_3$					
<b>Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	150,67	6	25,11	7,0	3,4
Resíduo	35,93	10	3,59		
Falta de Ajuste	35,46	8	4,43	18,8	19,4
Erro Puro	0,47	2	0,235		
Total	186,60	16			
% de Variância Explicada = 80,7%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,7%					
<b>Observações gerais:</b>					
<b>Negrito</b> = significância a 5% de probabilidade; $X_1$ = pH inicial; $X_2$ = glicose (g/L); $X_3$ = extrato de levedura (g/L); <b>SQ</b> = soma dos quadrados; <b>GL</b> = graus de liberdade; <b>QM</b> = quadrado médio; <b>Fc</b> = F calculado; <b>Ft</b> = F tabelar; $QM_R/QM_I = QM_{regressão}/QM_{resíduo}$ .					



**Figura 2:** Efeito da variação da concentração de glicose (g/L) e concentração de extrato de levedura (g/L) na produção de biomassa (g/L).

Na Figura 2 observa-se que a tendência da produção da biomassa situa-se entre 8 a 12 g/L de extrato de levedura e concentrações de glicose acima de 16 g/L, na faixa de concentração estudada com valor de pH fixo (pH=5). O uso de extrato de leveduras e glicose para melhorar o crescimento de leveduras foi vastamente estudado por Johnson & Lewis (1979) e Fang & Cheng (1993). Gil-Hawn et al. (1996) obteve concentrações de biomassa de 12 g/L, quando utilizou extrato de leveduras de 4 g/L e glicose de 25 g/L.

Estudos realizados por Martin et al. (1993) indicaram que o crescimento celular de *Rhodotorula rubra* é afetado pelo pH inicial de fermentação, assim como pela concentração da fonte de carbono. Entretanto, Frengova et al. (1994) observaram que o aumento da concentração da fonte de carbono de 3,9 para 7,1% (p/v), resultou num aumento não significativo de 27 g/L para 30 g/L de biomassa de *Rhodotorula glutinis*. De acordo com a Tabela 5, a concentração de biomassa variou de 1,17 a 16,15 g/L, dependendo das condições de cultivo.

### 3.2.4 Proteína (%)

Através da análise de significância (Tabela 6), observa-se que o teor de proteínas foi influenciado significativamente pelos efeitos lineares e quadráticos da glicose; efeito linear do extrato de levedura; efeito quadrático do pH inicial; interação da glicose vs extrato de levedura.

De acordo com os dados experimentais (Tabela 5), estabeleceu-se o modelo completo de regressão para o teor de proteína. Observa-se, através das análises de variância (Tabela 10), que o coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,823$ ) mostrou bom ajuste aos dados experimentais. Entretanto, a regressão correspondente não foi altamente significativa, no intervalo de confiança estudado, ( $F_c = 3,6$ ;  $F_t = 3,6$ ).

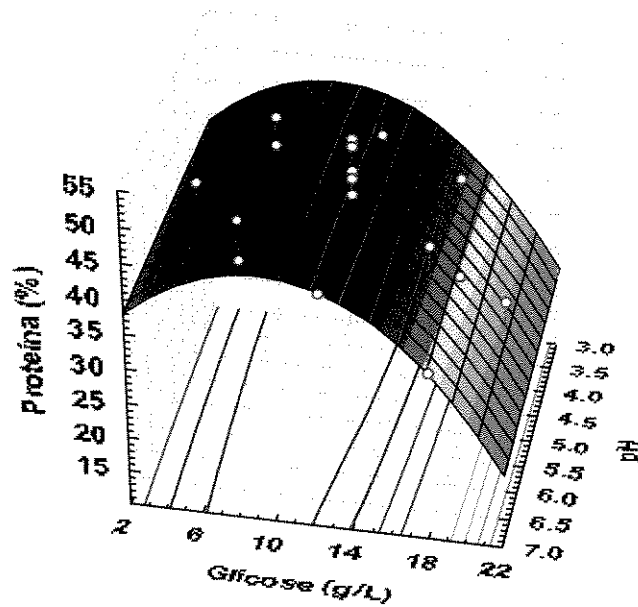
O ajuste do modelo mostrou ligeira diminuição no coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,79$ ). Embora a regressão teve o seu valor aumentado, ainda assim, não é altamente significativo ( $F_c = 8,4$ ;  $F_t = 3,2$ ). Consequentemente, esta equação deve ser apenas utilizada para estudar a tendência do modelo, e não para prever valores, na região estudada.

A Figura 3 apresenta o diagrama de superfície de resposta correspondente aos modelos ajustados para obtenção do teor de proteína em função da concentração de glicose e pH inicial e com concentração de extrato de levedura fixa no ponto central.

**Tabela 10:** Modelo de regressão, análise de variância para os modelos completos e ajustados correspondente à resposta de proteínas.

<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO COMPLETO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,823					
$Y = -3,16 + 23,63 X_1 + 0,83 X_2 - 3,49 X_3 - 2,84 X_1^2 - 0,19 X_2^2 + 0,08 X_3^2 + 0,26 X_1X_2 + 0,19 X_1X_3 + 0,17 X_2X_3$					
<b>Varição</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	1.054,8	9	117,2	3,6	3,6
Resíduo	226,8	7	32,4		
Falta de Ajuste	217,3	5	43,46	9,1	19,3
Erro Puro	9,5	2	4,75		
Total	1.281,7	16			
% de Variância Explicada = 82,3%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,2%					
<b>ANÁLISE DE VARIÂNCIA - MODELO AJUSTADO</b>					
Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) = 0,793					
$Y = 40,11 + 1,82 X_2 - 1,20 X_3 - 0,03 X_1^2 - 0,18 X_2^2 + 0,17 X_2X_3$					
<b>Varição</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
Regressão	1.016,9	5	203,4	8,4	3,2
Resíduo	264,8	11	24,1		
Falta de Ajuste	255,3	9	28,4	6,0	19,3
Erro Puro	9,5	2	4,75		
Total	1.281,7	16			
% de Variância Explicada = 79,3%					
% Máxima de Variância Explicável = 99,2%					
<b>Observações gerais:</b>					
<b>Negrito</b> = significância a 5% de probabilidade; $X_1$ = pH inicial; $X_2$ = glicose (g/L); $X_3$ = extrato de levedura (g/L); <b>SQ</b> = soma dos quadrados; <b>GL</b> = graus de liberdade; <b>QM</b> = quadrado médio; <b>Fc</b> = F calculado; <b>Ft</b> = F tabelar; $QM_R/QM_F = QM_{regressão}/QM_{resíduo}$ .					





**Figura 3:** Diagrama da superfície de resposta do efeito da variação de pH inicial e glicose (g/L) na variação de teores de proteína celular (%).

A Figura 3 mostra o efeito da variação da concentração de glicose e pH inicial no teor de proteína celular, para concentração de extrato de levedura fixa (8 g/L). Nota-se que o pH inicial do meio de fermentação não exerceu nenhum efeito na variação dos teores de proteínas na célula, ao contrário do que ocorreu com a concentração de glicose, cuja melhor concentração mostrou tendência para concentrações entre 6 e 13 g/L.

#### 4 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados do planejamento fatorial incompleto  $2^{5-1}$ , concluiu-se que apenas o pH inicial e as concentrações de glicose e extrato de levedura tiveram influência na produção de carotenóides. Após a otimização do meio utilizando planejamento completo, observou-se que a máxima produção de carotenóides obtida foi de 1.269  $\mu\text{g/L}$  com pH inicial 4, 4 g/L de extrato de levedura e 17 g/L de glicose. Comparando os resultados obtidos pelo planejamento completo com o meio de controle (785  $\mu\text{g/L}$ ), conclui-se que a produção de carotenóides teve um aumento significativo de 38%.

Concluiu-se que o modelo ajustado foi mais adequado do que o modelo completo, para prever a resposta da produção de carotenóides na região estudada, representado pela equação:  $Y$  ( $\mu\text{g/L}$ ) =  $-2468,13 + 405,72 X_1 + 247,37 X_2 + 187,52 X_3 - 1,77 X_2^2 - 22,65 X_1X_2 - 16,00 X_1X_3 - 9,01 X_2X_3$

Para a produção de biomassa, o modelo ajustado apesar de ter apresentado uma melhoria na regressão, ainda não satisfaz às exigências de Box & Wetz (1973). Portanto, a equação deste modelo determinada neste trabalho, deve apenas ser utilizada para estabelecer uma tendência da resposta na região estudada, representada pela equação:

$$B$$
 (g/L) =  $6,45 - 7,97 X_1 + 0,27 X_2 + 2,66 X_3 + 1,31 X_1^2 - 0,04 X_3^2 - 0,36 X_1X_3$

Na produção específica de carotenóides, a máxima concentração foi de 337  $\mu\text{g/g}$  com pH inicial 4, a 4 g/L de extrato de levedura e 7 g/L de glicose. O modelo ajustado foi o melhor para prever as respostas na região estudada, sendo  $C$  ( $\mu\text{g/g}$ ) =  $1074,74 - 149,78 X_1 - 19,75 X_2 - 72,60 X_3 + 1,36 X_3^2 + 3,18 X_1X_2 + 8,53 X_1X_3$

O teor de proteína obtido neste trabalho variou de 22,9 a 67,7% em relação a biomassa celular. Porém, nas condições estudadas, o modelo ajustado não apresentou uma regressão satisfatória, e um coeficiente de correlação baixo ( $R^2 = 0,79$ ). Portanto, este modelo deve ser utilizado apenas para estudar a tendência das dos teores de

proteínas, nas condições estudadas, representado pela equação:  $P (\%) = 40,11 + 1,82 X_2 - 1,20 X_3 - 0,03 X_1^2 - 0,18 X_2^2 + 0,17 X_2X_3$

**Onde:** **Y** = produção de carotenóides (µg/L); **B** = Biomassa (g/L); **C** = Produção específica de carotenóides (µg/g); **P** = Proteína (%)

## 5 - BIBLIOGRAFIA

BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function, University of Wisconsin. **Technical Report**, 9, 1973.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresearch Technology**, 71:41-44, 2000.

COCHARAN, B. Y.; COX, G. M. **Experimental Designs**. 2<sup>nd</sup> edition New York: John Wiley, 1964.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T.W.(ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

DE MIGUEL, T.; CALO, P.; DIAZ, A.; VILLA, T. G. The genus *Rhodospiridium*: a potential source of β-carotene. **Microbiology**, 9:373-375, 1997.

FANG, T. J.; CHENG, Y-S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 75:466-469, 1993.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, **44**:888-894, 1994.

GIL-HAWN, A.; KIM, C.; CHOI, E.; RHEE, S. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FO1C. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **82**:515-518, 1996.

HARI, R. P. K.; PATEL, T.; MARTIN, A. M. Studies on a new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. **Journal of Industrial Microbiology**, **11**:43-51, 1992.

HAYMAN, E.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, **120**:1339-1343, 1974.

JACOB, Z. Enrichment of wheat bran by *Rhodotorula gracilis* through solid-state fermentation. **Folia Microbiology**, **36**:86-91, 1991.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetics Microbiology**, **115**:173-183, 1979.

MATELLI, H. L.; DE SILVA, I. M.; SOUZA, N. O.; POMEROY, D. Production of  $\beta$ -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnology Letters**, **12**:207-208, 1990.

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **76**:321-325, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, **31**:426-428, 1959.

MOCANU, E.; TALOS, D.; PANAITESCO, M.; CONTREA, A.; TRIF, A.; CAPRITA, R.; BOGDAN, G.; MANU, C. Studies on the metabolic role of *Rhodotorula rubra* 120r carotenoid pigment, used as a fodder additive concentrate, in laying hens nutrition. **Biotechnology Letters**, 2:55-60, 1997.

NELIS, H.J.; DELEENHEER, A. P. Microbial sources of carotenoids pigment used in foods and feeds: a review. **Journal Applied Bacteriology**, 70:181-191, 1991.

REED, G. Microbial biomass, single cell protein, and other microbial products, 541-592. In Reed, G. (edition), **Prescott and Dunn's Industrial Microbiology** (4a edição). Avi publishing company, Westport, CT (1982).

RODRIGUEZ-AMAYA, B. D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, D. C.: International Life Science Institute Prece, p. 64, 1999.

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lebensm.-Wiss. U.- Technology**, 29:570-572, 1996.