

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**“ESTUDOS COM CAROTENÓIDES DE LEVEDURAS DO
GÊNERO *RHODOTORULA*: DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODO ANALÍTICO, INFLUÊNCIA DE INIBIDORES E
CULTIVO EM MEIO ALTERNATIVO A BASE DE CALDO DE
CANA-DE-AÇÚCAR”**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Fábio Marcio Squina, aprovada pela
Comissão Julgadora em 20 de
fevereiro de 2001.

Campinas, 20 de fevereiro de 2.001

Fábio Marcio Squina

Adriana Z. Mercadante
Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Presidente da Banca

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
Orientadora

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos, Campinas – SP, 2001.



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
TIUNICAMP
Sq51e
 V. 7 Ex. 1
 TOMBO BC/ 44481
 PROC. 16.392/01
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 16/05/01
 N.º CPD

CM00156289-2

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

Sq51e

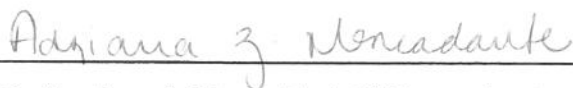
Squina, Fabio Marcio

Estudos com carotenóides de leveduras do gênero *Rhodotorula*: desenvolvimento de método analítico, influência de inibidores e cultivo em meio alternativo a base de caldo de cana-de-açúcar / Fabio Marcio Squina. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

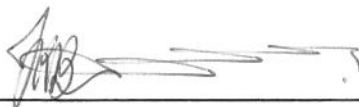
Orientador: Adriana Zerlotti Mercadante
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Carotenóides. 2.*Rhodotorula*. 3.Cromatografia líquida de alta eficiência. 4.Biossíntese. 5.Cana-de-açúcar. I.Mercadante, Adriana Zerlotti. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(orientadora)



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
(membro)

Profa. Dra. Florinda Orsatti Bobbio
(membro)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(membro)

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

À Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira e à Norma Teruko Nago Miya pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos Prof. Dr Paulo A. Bobbio e Profa. Dra. Florinda O. Bobbio pelos valiosos ensinamentos e inúmeras colaborações.

Ao pessoal dos laboratórios de Química de Alimentos, de Toxinas Microbianas, de Termobacteriologia, Geral, de Carotenóides e de Separações Físicas pela ajuda e disponibilização de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos e à Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pela atenção nas correções deste trabalho.

À Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello" pela doação das linhagens de microrganismos.

À Hoffmann-La Roche (Basel, Suíça) pelos padrões de carotenóides.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Científico e Tecnológico (CnPQ) pelo auxílio financeiro, processo 464937100-0 (NV).

À minha querida esposa Patrícia, meus pais, amigos e familiares pelo constante apoio.

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	xv
INTRODUÇÃO GERAL.....	xix
OBJETIVOS.....	xxv

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

RESUMO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DOS CAROTENÓIDES.....	7
3. PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES VIA BIOTECNOLÓGICA.....	11
3.1. Algas.....	13
3.1.1. <i>Dunaliella</i> sp.....	13
3.1.2. <i>Haematococcus</i> sp.....	14
3.2. Fungos.....	15
3.2.1. <i>Blakeslea trispora</i>	17
3.2.2. <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	18
3.2.3. <i>Phaffia rhodozyma</i>	18
3.2.4. <i>Rhodotorula</i> sp.....	21
3.2.4.1. Cultivos em substratos de baixo custo.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

CAPÍTULO 2**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE E ANÁLISE DOS
CAROTENÓIDES DE CINCO LINHAGENS DE *Rhodotorula***

ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
Manutenção das linhagens de microrganismos.....	35
Condições de cultivo.....	35
Análise dos carotenóides.....	36
Extração.....	36
Análise cromatográfica.....	37
Padrões.....	37
Separação por CLAE.....	37
Identificação e quantificação dos carotenóides.....	38
Avaliação.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
Avaliação do método.....	40
Extração.....	40
Separação por CLAE.....	41
Avaliação.....	44
Composição de carotenóides das linhagens de <i>Rhodotorula</i>	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DE NICOTINA E DIFENILAMINA NA COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula glutinis* e *R. rubra*

ABSTRACT.....	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula rubra* e *R. glutinis* EM MEIO À BASE DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR DILUÍDO

RESUMO.....	85
SUMMARY.....	86
1 – INTRODUÇÃO.....	87
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
2.1 – Manutenção das linhagens de microrganismos.....	89
2.2 – Condições de cultivo.....	89
2.3 – Análise de carotenóides.....	90
2.3 – Análise dos dados.....	91
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4 – CONCLUSÃO.....	98
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Principais carotenóides utilizados em alimentos e rações com suas fontes comuns e as principais áreas de aplicação.....	5
TABELA 2. Carotenóides encontrados nos organismos procariotos.....	8
TABELA 3. Microrganismos com potencial para desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides.....	12
TABELA 4. Carotenóides encontrados nos fungos.....	16

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Características dos principais carotenóides de <i>Rhodotorula</i>	46
TABELA 2. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em <i>R. glutinis</i> ..	49
TABELA 3. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em <i>R. rubra</i>	51
TABELA 4. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em <i>R. araucariae</i> , <i>R. lactosa</i> e <i>R. minuta</i>	53

CAPÍTULO 3

TABELA 1. Biomassa seca e total de carotenóides de <i>R. rubra</i> e <i>R. glutinis</i> em função da concentração de difenilamina adicionada ao meio de cultivo.....	66
TABELA 2. Biomassa seca e total de carotenóides de <i>R. rubra</i> e <i>R. glutinis</i> em função da concentração de nicotina adicionada ao meio de cultivo.....	66
TABELA 3. Efeito da adição de difenilamina na composição de carotenóides de <i>R. rubra</i>	68
TABELA 4. Efeito da adição de difenilamina na composição de carotenóides de <i>R. glutinis</i>	69
TABELA 5. Influência da adição de nicotina na composição de carotenóides em <i>R. rubra</i>	73
TABELA 6. Influência da adição de nicotina na composição de carotenóides em <i>R. glutinis</i>	74

CAPÍTULO 4

TABELA 1. Níveis das variáveis avaliadas no cultivo em meio à base de caldo de cana-de-açúcar.....	90
TABELA 2. Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e respostas obtidas para <i>R. rubra</i>	92
TABELA 3. Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e respostas obtidas para <i>R. glutinis</i>	93
TABELA 4. Composição dos principais carotenóides em <i>R. rubra</i>	96
TABELA 5. Composição dos principais carotenóides em <i>R. glutinis</i>	97

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Principais atividades biológicas dos carotenóides.....	4
--	---

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. glutinis</i>	42
FIGURA 2. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> (sem condicionamento da coluna com metanol).....	43
FIGURA 3. Produção dos principais carotenóides por <i>R. glutinis</i>	48

CAPÍTULO 3

FIGURA 1. Via biossintética dos carotenóides de <i>R. glutinis</i>	63
FIGURA 2. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. rubra</i> em cultivo em meio YM.....	70
FIGURA 3. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. rubra</i> em cultivo em meio YM com 5 μ mol de difenilamina.....	71
FIGURA 4. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> em cultivo em meio YM.....	75
FIGURA 5. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> em cultivo em meio YM com 20 mmol de nicotina.....	76
FIGURA 6. Espectro de absorção, obtido pelo detector de arranjo de diodos, e estrutura química do dideidroliscopeno.....	78
FIGURA 7. Espectro de absorção, obtido pelo detector de arranjo de diodos, da xantofila não identificada com faixa de tr entre 4,5 a 4,9.....	79

ANEXOS

ANEXO 1

CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CAROTENÓIDES.....	105
--	-----

ANEXO 2

EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE AS RESPOSTAS ESTUDADAS NO CULTIVO DE <i>R. rubra</i> EM MEIO À BASE DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR DILUÍDO.....	109
---	-----

ANEXO 3

EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE AS RESPOSTAS ESTUDADAS NO CULTIVO DE <i>R. glutinis</i> EM MEIO À BASE DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR DILUÍDO.....	111
--	-----

RESUMO GERAL

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. O interesse pelos carotenóides tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, havendo uma potencial demanda por fontes naturais destes compostos nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética.

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas, porém são poucos os carotenóides que possuem métodos economicamente eficientes de produção. Atualmente, apesar do pequeno número de carotenóides produzidos por biossíntese microbiana, esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para a sua produção.

Os carotenóides em microrganismos estão localizados intracelularmente, portanto além de uma elevada quantidade de carotenóides, os organismos selecionados para o desenvolvimento de processos biotecnológicos devem apresentar outras possibilidades, como o cultivo em resíduos ou substratos de baixo custo, produção de carotenóides com alto valor agregado, ou de outros compostos de interesse comercial, como ácidos graxos insaturados ou polissacarídeos.

A primeira etapa deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia para extração e separação dos carotenóides de *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. araucariae*, *R. minuta* e *R. lactosa*. Dos métodos de extração testados, a utilização de areia tratada como agente abrasivo para o rompimento da parede celular e liberação dos carotenóides, apresentou grande eficiência. A separação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₁₈ Novapack (4 µm, 4,6 x 300 mm). A fase móvel que promoveu a melhor separação dos carotenóides das cinco linhagens em menor tempo foi acetonitrila/ metanol (0,1%

trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, com fluxo de 1 mL/min e mantendo a temperatura da coluna a 29 °C. A quantificação foi realizada por padronização externa.

Os principais carotenóides identificados nestas leveduras foram torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno, nas formas *cis* e *trans*. Outros carotenóides minoritários como 3',4'-dideidro- β,ψ -caroten-16-ol, ζ -caroteno, β -zeacaroteno, neurosporeno, fitoflueno e fitoeno também foram tentativamente identificados.

O total de carotenóides em $\mu\text{g/g}$ de massa seca de leveduras cultivadas em caldo YM (Difco) modificado foi em média para *R. glutinis* de 205 $\mu\text{g/g}$, dos quais 30 μg de torularrodina, 83 μg de toruleno, 31 μg de γ -caroteno e 59 μg de β -caroteno; para *R. rubra* o total em média foi de 144 $\mu\text{g/g}$, dos quais 71 μg de torularrodina, 58 μg de toruleno, 2 μg de γ -caroteno e 13 μg de β -caroteno; para *R. araucariae* o total em média foi de 103 $\mu\text{g/g}$, dos quais 30 μg de torularrodina, 46 μg de toruleno, 4 μg de γ -caroteno e 21 μg de β -caroteno; para *R. lactosa* o total em média foi de 99 $\mu\text{g/g}$, dos quais 22 μg de torularrodina, 54 μg de toruleno, 4 μg de γ -caroteno e 17 μg de β -caroteno; para *R. minuta* o total foi de 104 $\mu\text{g/g}$, dos quais 37 μg de torularrodina, 47 μg de toruleno, 5 μg de γ -caroteno e 14 μg de β -caroteno.

Com objetivo de alterar o perfil de carotenóides ou aumentar a sua produção nas cepas *R. rubra* e *R. glutinis*, foi avaliada a adição dos inibidores de biossíntese difenilamina e nicotina. Estas duas linhagens foram escolhidas por apresentarem a mesma composição qualitativa de carotenóides, mas com diferenças marcantes nas quantidades absolutas dos mesmos. Nas condições estudadas, *R. rubra* apresentou um sensível aumento no total de carotenóides quando adicionaram-se no caldo de cultivo 5 e 10 μmol de difenilamina e 15 e 20 mmol de nicotina. Obteve-se a produção seletiva de licopeno nos cultivos com 20 mmol de nicotina e a produção de um composto tentativamente identificado como

dideidroliscopeno, nunca antes isolado em leveduras. A suplementação do meio de cultivo com difenilamina causou uma significativa diminuição na relação torularrodina/toruleno e acúmulo de β -caroteno a 10 μ mol deste inibidor para as duas cepas.

A última etapa deste estudo foi avaliar a produção de carotenóides em um meio alternativo à base de caldo de cana-de-açúcar. O crescimento das leveduras e a produção de carotenóides foram avaliados em função da composição do meio de cultivo, através de um planejamento estatístico fatorial fracionário 2^{4-1} das variáveis diluição do caldo de cana, quantidade de extrato de levedura, suplementação com peptona e com sais inorgânicos. A quantidade de extrato de levedura adicionada e a suplementação com sais causaram aumento na produção de biomassa, quando estas variáveis passaram para o maior nível. Entretanto, a quantidade de carotenóides por peso seco foi negativamente influenciada, quando estas variáveis estiveram em maiores quantidades no meio. Nos níveis estudados, a diluição do caldo de cana-de-açúcar e a suplementação com peptona tiveram pouca influência no crescimento celular e produção de carotenóides. Deste modo, um cultivo em dois estágios, onde a produção de carotenóides é separada do estágio de crescimento celular poderia ser mais efetivo para a produção de altos níveis de carotenóides e crescimento celular nestas leveduras.

INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Os carotenóides apresentam uma importante função nutricional na dieta de humanos como precursor de vitamina A, sendo que o interesse por estes compostos naturais tem aumentado nos últimos anos devido a outras propriedades biológicas, tais como imunomoduladoras e anticarcinogênicas (Krinsky, 1994) e também, pela tendência contemporânea de se evitar alimentos que contenham aditivos artificiais, incluindo corantes.

Os carotenóides são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Além disso, com o crescimento da piscicultura, o consumo de carotenóides para rações também tem aumentado (Meyers, 1994). A venda anual destes pigmentos está estimada em mais de 800 milhões de dólares (Johnson & Schroeder, 1995). As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química, e a extração a partir de plantas/flores e da microalga *Dunaliella salina*.

A principal via biossintética dos carotenóides é a partir do mevalonato, através da via metabólica geral dos terpenóides. A formação do primeiro caroteno hidrocarboneto de 40 átomos de carbono, o fitoeno, é uma condensação cabeça-cabeça de duas moléculas do intermediário de 20 átomos de carbono, pirofosfato de geranilgeranila, que é formado a partir de condensações cabeça-cauda de quatro unidades isoprenóides ativadas. As rotas biossintéticas que sucedem o fitoeno são bastante variadas, gerando os mais de 600 carotenóides identificados na natureza (Kull & Pfander, 1995; Straub, 1987).

Substâncias químicas que apresentam a habilidade de inibir a biossíntese de carotenóides têm sido há muito tempo utilizadas na identificação das seqüências de reações e elucidação dos mecanismos de reação. Dentre os compostos inibidores utilizados em microrganismos pode-se destacar a

difenilamina que bloqueia a seqüência de reações de dessaturação, e a nicotina que age inibindo as reações da ligação dupla entre o C-1 e C-2 dos carotenóides, como as reações de ciclização (Howes & Batra, 1970; Britton *et al.*, 1977).

A variedade de microrganismos com potencial biotecnológico como fonte natural de carotenóides é limitada e o custo de produção é alto, mas a conotação natural destes bioprodutos faz com que possuam um mercado em potencial, mesmo que carotenóides sintéticos equivalentes existam (Nelis & Leenheer, 1991; Johnson & Schroeder, 1995).

Durante os últimos anos, esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides, podendo-se destacar a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994) e *Dunaliella* (Borowitzka & Borowitzka, 1989); e a produção de astaxantina por *Haematococcus* sp (Johnson e An, 1991) e *Phaffia rhodozyma* (Johnson & Lewis, 1979; Meyer & Preez, 1994; Yamane *et al.*, 1997; Parajó *et al.*, 1998).

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são biotecnologicamente interessantes, pois além de produzir carotenóides, também apresentam um bom rendimento em biomassa, sendo uma fonte em potencial de proteína microbiana (Nelis & Leenheer, 1989; Costa *et al.*, 1987) e lipídios (Yoon & Rhee, 1983; Perrier *et al.*, 1995). Além disso, são capazes de crescer em resíduos da indústria de alimentos como a salmoura produzida na fermentação do repolho (Shinh & Hang, 1996) e o soro de leite (Frengova *et al.*, 1994), assim como em substratos agrícolas de baixo custo (Matelli *et al.*, 1990; Jacob, 1991; Buzzini & Martini, 2000).

Existem vários fatores que dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre a composição quali- e quantitativa de carotenóides. Os carotenóides são altamente reativos e conseqüentemente instáveis, sendo que estruturas muito diferentes e um número grande de carotenóides podem ser encontrados em um único microrganismo.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se mostrado o método de escolha para separação e quantificação de carotenóides, apesar de que a grande maioria dos trabalhos determina o teor de carotenóides de leveduras a partir de dados espectrofotométricos do extrato total de pigmentos (Matelli *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1993; Perrier *et al.*, 1995; Shinh & Hang, 1996; Yamane *et al.*, 1997).

Outra dificuldade reside no fato dos carotenóides estarem localizados intracelularmente nos microrganismos, requisitando o isolamento da biomassa celular para extração dos pigmentos por solventes orgânicos. A rigidez da parede celular de leveduras limita a extratibilidade dos carotenóides, sendo necessários métodos mecânicos (Haard, 1988; Hari *et al.*, 1992; Frengova *et al.*, 1994), químicos (Sedmak *et al.*, 1990) ou enzimáticos (Johnson *et al.*, 1978; Okagbue & Lewis, 1984; Okagbue & Lewis, 1985) para recuperação dos carotenóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borowitzka, L. J. & Borowitzka, M. A.; β -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.
- Britton, G; Brown, D. J. & Goodwin, T. W. The carotenoids of *Flavobacterium* strain R 1560. **Arch. Microbiol.**, v. 113, p. 33-37, 1977.
- Buzzini, P. & Martini, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.**, v. 71, p.41-44, 2000.
- Costa, I.; Matelli, H. L.; Silva, I. M. & Pomeroy, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain. **Biotechnol. Lett.**, v.9, p. 373-375, 1987.

-
- Feofilova, E. P. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 30, p. 143-153, 1994.
- Frengova, G.I.; Simova, E.D.; Pavalova, K.; Beshkova, D.M. & Grigorova, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 888-894, 1994.
- Haard, N. F. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol. Lett.**, v.10, p.609-614, 1988.
- Hari, R. P.K.; Patel, T. & Martin, A. A new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. **J. Ind. Microbiol.**, v. 11, p. 43-51, 1992.
- Howes, C. D. & Batra, P. P. Accumulation of lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in mycobacterium in the presence of nicotine. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 222, p. 174-179, 1970.
- Jacob, K. Enrichment of wheat bran by *Rhodotorula gracilis* through solid-state fermentation. **Folia Microbiol.**, v. 36, p. 86-91, 1991.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J. & Phaff, H. J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 54, p.1155-1158, 1978.
- Johnson, E. A. & Lewis, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 115, p. 173-183, 1979.
- Johnson E. A. & Schroeder, W. A. Microbial carotenoids. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 53, p.119-178. 1995.
- Johnson, A. E. & An, G.H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 11, p. 297-326, 1991.

-
- Krinsky, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v. 66 (5), p. 1003-1010, 1994.
- Kull, D. & Pfander, H. List of New carotenoids. In Britton, G.; Liaaen- Jensen, S, Pfander, H. (eds). **Carotenoids: Isolation and Analysis**, vol 1. Birkhäuser Verlag, Basel pp 13-63, 1995.
- Martin, A.M.; Lu, C. & Patel, T.R. Growth parameter for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 75, p.321-325, 1993.
- Matelli, H. L.; Silva, I. M. & Souza, N. O. & Pomeroy, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnol. Lett.**, v. 12, p.207-208, 1990.
- Meyers S. P. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoids. **Pure Appl. Chem**, v, 66, p. 1069-1976, 1994.
- Meyers, S. P. & du Preez, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 178-183, 1994.
- Nelis, H. J. & De Leenheer, A. P. Microbial production of carotenoids. In Vandamme, J. E. (ed). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 43-80, 1989.
- Nelis, H. J. & De Leenheer, A. P. Microbial sources of carotenoids pigments used in foods and feeds. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 70, p. 181, 191, 1991.
- Okagbue, R, N. & Lewis, M. J. Autolysis of red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. **Biotechnol. Lett.**, v. 6(4), p. 247-250, 1984.
- 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 the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 59, p. 243-255, 1985.
- Parajó, J. C.; Santos, V & Vazquez, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Proc. Biochem.**, v. 33, p. 181-187, 1998.
- Perrier, V.; Dubreucq, E. & Gayzy, P. Fatty acid and carotenoid composition *Rhodotorula* strains. **Arch. Microbiol.**, v. 168, p. 173-179, 1995.
- Sedmak, J. J.; Weerasinghe, D. K.; Jolly, S. O. Extraction and quantification of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Tec.**, v. 4, p. 107-112, 1990.
- Shinh C.T. & Hang, Y.D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 29, p. 570-572. 1996.
- Straub, O. In: Pfander, H. (ed): **Key to Carotenoids**. Birkhäuser Verlag, Basel. 287p. 1987.
- Yamane, Y.; Higashida, K.; Nakashimada, Y.; Karizono, T. & Nishio, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-cultures: kinetic and stoichometric Analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4471-4478, 1997.
- Yoon, S. H. & Rhee, J. S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipids production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 60, p.1281-1285, 1983.

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

1. Desenvolvimento e avaliação de um método para determinação da composição de carotenóides, por CLAE, de leveduras do gênero *Rhodotorula*,
2. Determinação da composição dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis*, *R. rubra*, *R. minuta*, *R. araucariae* e *R. lactosa*,
3. Avaliação das alterações químicas dos carotenóides das leveduras *R. rubra* e *R. glutinis*, sob o efeito de nicotina e difenilamina, visando a obtenção de perfis de carotenóides com maior interesse comercial,
4. Avaliação do potencial destas duas linhagens para produção de carotenóides em meio à base de caldo de cana-de-açúcar, analisando os efeitos da composição do meio de cultivo no crescimento celular e no perfil de carotenóides.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

RESUMO

Devido à tendência de se utilizar insumos naturais, existe um mercado potencial para a aplicação de carotenóides como corantes de alimentos, rações animais, produtos farmacêuticos e cosméticos. Nesta revisão foram abordadas as principais fontes de carotenóides, com ênfase na produção biotecnológica a partir da microalga marinha do gênero *Dunaliella*, da microalga de água doce *Haematococcus* sp, do fungo *Blakeslea trispora* e das leveduras heterobasidiomicetes *Phaffia rhodozyma* e *Rhodotorula* sp.

1. INTRODUÇÃO

Carotenóides são compostos cuja estrutura básica é um tetraterpeno de 40 átomos de carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e com simetria invertida no centro. Mais de 600 carotenóides diferentes isolados de fontes naturais já foram caracterizados (Straub, 1987; Kull & Pfander, 1995).

Esse esqueleto básico pode ser modificado através de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, encurtamento ou extensão da cadeia, isomerização, introdução de substituintes ou combinações destes processos. Os carotenóides são chamados de xantofilas quando ocorrem substituições contendo oxigênio, enquanto os derivados hidrocarbonetos são conhecidos como carotenos.

Os carotenóides apresentam na sua cadeia uma alternância de ligações duplas e simples que geram um sistema de elétrons π que se desloca sobre toda a cadeia poliênica, proporcionando a estas substâncias alta reatividade química e absorção de luz na região do visível. Como consequência, os carotenóides podem facilmente sofrer isomerização e oxidação. Calor, luz e ácidos promovem a isomerização de carotenóides *trans*, sua conformação mais estável e usual na natureza, para a forma *cis*, acarretando ligeira perda da cor e da atividade

biológica. Com isso, várias precauções devem ser tomadas durante o isolamento desses pigmentos, tais como curto tempo de análise, ausência de oxigênio, proteção contra a luz, uso de baixa temperatura e adição de antioxidantes.

Estes pigmentos ocorrem universalmente em tecidos fotossintéticos, onde desempenham a dupla função de proteger a clorofila e o aparelho fotossintético contra a fotodegradação e absorver luz nos comprimentos de onda onde a clorofila não absorve, proporcionando um recolhimento de luz mais extenso.

Além da já reconhecida atividade pró-vitamina A de alguns carotenóides, outras ações independentes desta função têm sido atribuídas a estes compostos, como o fortalecimento do sistema imunológico e diminuição do risco de câncer, de doenças cardiovasculares, de degeneração macular e de formação de catarata. As principais atividades biológicas dos carotenóides estão apresentadas na Figura 1 (Krinsky, 1994).

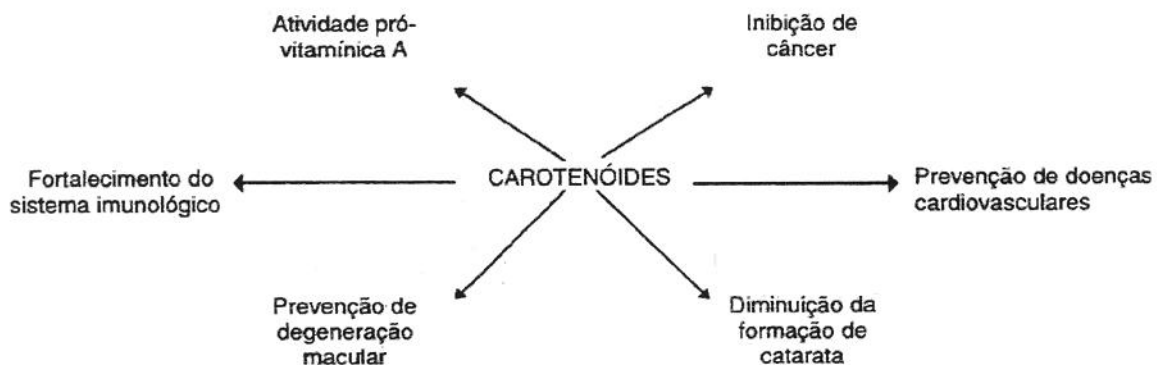


Figura 1. Principais atividades biológicas dos carotenóides.

Os carotenóides são adicionados a alimentos e bebidas com o intuito de compensar a perda de cor durante o processamento e armazenagem, uniformizar a cor e colorir alimentos originalmente incolores. Também são utilizados como

aditivos em rações, com o propósito de promover pigmentação adequada, como por exemplo, o uso de astaxantina para salmão, luteína e zeaxantina para pigmentar a gema do ovo de galinha. Os principais carotenóides com potencial interesse prático estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais carotenóides utilizados em alimentos e rações com suas fontes comuns e as principais áreas de aplicação.

Carotenóide	Fontes não microbianas	Fontes microbianas	Usos
β-caroteno	cenoura síntese	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Dunaliella salina</i>	corante para alimentos
licopeno	tomate	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Streptomyces chrestomyceticus</i> subsp. <i>rubescens</i>	corante para alimentos
luteína	alfafa, milho, plantas verdes, flores	<i>Spongicoccum excentricum</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	ração para aves
zeaxantina	idem luteína	<i>Flavobacterium</i> sp.	ração para aves
cantaxantina	crustáceos penas de pássaros síntese	<i>Cantharellus cinnabarinus</i> <i>Brevibacterium</i> KY-43 13 <i>Rhodococcus maris</i> (<i>Mycobacterium brevicale</i>) <i>Corynebacterium michiganense</i> (mutante)	ração para aves e peixes
astaxantina	crustáceos penas de pássaros flores de <i>Adonis annua</i> síntese (Roche)	<i>Mycobacterium lacticola</i> <i>Brevibacterium</i> 103 <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Peniophora</i> sp.	ração para peixes
rodoxantina	folhas do outono <i>Tilapia</i>	<i>Pseudomonas extorquens</i>	
capsantina	páprica		corante para alimentos ração para aves
bixina	urucum		corante para alimentos ração para aves
crocetina	açafrão		corante para alimentos
β-apo-8'-carotenal	síntese		ração para aves
etil β-apo-8'-carotenoato	síntese		ração para aves
citraxantina	síntese		ração para aves

Adaptado de Nelis & Leenheer (1991).

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas. A venda anual destes pigmentos está estimada em

mais de 800 milhões de dólares ao ano. O preço aproximado de mercado para esta substância na forma de pó dispersível e estabilizado contendo de 5 a 10% de carotenóide ativo varia de US\$ 600 a US\$ 2500 (Britton *et al.*, 1995).

A síntese química tem proporcionado a obtenção de carotenóides a baixo custo. Contudo, pode-se citar como desvantagens a necessidade de desenvolvimento de novas rotas de síntese para cada novo carotenóide de interesse, a dificuldade em produzir carotenóides mais complexos, formação de misturas de isômeros, além da questão da poluição ambiental causada pelos resíduos gerados nestes processos (Ausich, 1997). Novos processos têm sido propostos para a síntese total de carotenóides opticamente ativos, com os microrganismos atuando como biocatalisadores (Leuenberger, 1985).

A produção biotecnológica de carotenóides apresenta vários motivos que tornam este tipo de abordagem bastante atrativa. Pode-se destacar a grande diversidade biológica para produção destes pigmentos, sendo que o conhecimento do processo metabólico de um carotenóide pode ser aplicável a outros carotenóides, a formação de compostos naturais estéreo-específicos e também, por apresentarem outras possibilidades comerciais como produção de biomassa para rações animais, produção de ácidos graxos ou reciclagem de resíduos (Ausich, 1997; Nelis & De Leenheer, 1989; Johnson & Schroeder, 1995). Uma das grandes desvantagens é que os carotenóides nos microrganismos estão localizados intracelularmente, o que requisita o isolamento da biomassa celular e eventualmente a lise da parede celular para a recuperação dos pigmentos.

Existem grandes perspectivas no uso de técnicas de recombinação de DNA para o melhoramento de linhagens produtoras de carotenóides. A recombinação dos genes relacionados na biossíntese de carotenóides de microrganismos, a partir de espécies de *Erwinia* e *Agrobacterium aurantiacum*, tem possibilitado a obtenção de linhagens capazes de produzir altas quantidades de carotenóides, em cepas de *Escherichia coli* e de *Candida utilis* (Misawa & Shimada, 1998; Yokoyama, *et al.*, 1998; Sandmann *et al.*, 1999).

2. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DOS CAROTENÓIDES

Os avanços recentes no entendimento da filogenia natural e a necessidade de identificação de novas fontes potenciais de carotenóides industrialmente importantes colocaram em evidência a grande variedade de carotenóides nos vários grupos de organismos.

Ao longo da evolução, os carotenóides foram inicialmente sintetizados por bactérias anoxigênicas fototrópicas, caracterizadas pelo baixo conteúdo de neurosporeno. Com o aumento do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na atmosfera, os carotenóides também foram sendo sintetizados por procariotos oxigênicos fototrópicos (cianobactérias), e podem ter desempenhado um papel rudimentar na seleção de espécies reativas com o oxigênio (Johnson & Schroeder, 1995).

Os carotenóides são conhecidos por serem produzidos nas eubactérias fototrópicas, esporadicamente em bactérias heterotróficas e em apenas um grupo de halobactérias, não sendo encontrados em procarióticos anaeróbicos (Tabela 2) (Johnson & Schroeder, 1995).

Tabela 2. Carotenóides encontrados nos organismos procariotos.

Grupo filogenético	Carotenóides representativos
A. Eubacteria	
<u>Bactérias fototrópicas anoxigênicas</u>	neurosporeno, licopeno, espiriloxantina, esferoideno, hidróxi-esferoideno
<u>Bactéria sulfurosas verdes</u>	
<i>Chlorobium</i>	clorobacteno, β -isorenierateno, isorenierateno
<u>Bactéria não sulfurosas verdes</u>	
<i>Chloroflexus</i>	β -caroteno, hidróxi- γ , β -caroteno-glucosídeo equinenona, 4-ceto- γ , β -caroteno
<i>Herpetosiphon</i>	mixobacteno
<i>Thermomicrobium roseum</i>	toruleno, 3,4-dideidroxi-licopeno
<u>Cyanobacteria</u>	
<i>Synechococcus</i>	β -caroteno, equinenona, cantaxantina, 3-hidróxi-equinenona zeaxantina, criptoxantina, caloxantina, nostoxantina mixoxantofilas glicosídicas, oscilaxantina
<u>Prochlorophytes</u>	β -caroteno, zeaxantina, criptoxantina, equinenona
<u>Proteobacterias</u>	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	rodobacterioxantina
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	β caroteno, equinenona, β -criptoxantina, 3-hidróxi-equinenona cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina, astaxantina
<i>Myxococcus</i>	mixobacteno glicosídico, 4-ceto-toruleno, γ -caroteno, licopeno
<i>Sligmatella</i>	mixobacteno e derivados esterificados
<i>Sorangium</i>	γ -caroteno, carotenóides glicosídeos e derivados esterificados
<i>Chondromyces</i>	γ -caroteno, carotenóides glicosídeos e derivados esterificados
<i>Bradyrhizobium</i>	cantaxantina, espiriloxantina
<i>Pseudomonas</i>	rodoxantina, nostoxantina, decaprenoxantina
<i>Xanthomonas</i>	ésteres arilpolienóicos
<u>Spirochetes</u>	
<i>Spirochaeta</i>	1',2'-diidro-1'-hidróxi-toruleno 4-ceto-1',2'-diidro-1'-hidróxi-toruleno
<u>Bacteroides – Flavobacterium - Cytophaga</u>	
<i>Flavobacterium</i>	zeaxantina, β -caroteno, C ₄₅ e C ₅₀ carotenóides,
<i>Flexibacter</i>	flexirubina, cloroflexirubina, flexixantina, dióxi-flexixantina
<i>Cytophaga</i>	zeaxantina, flexirubina, cloroflexirubina, flexixantina, dióxi-flexixantina
<i>Saprospira</i>	saproxantina

Tabela 2. Carotenóides encontrados nos organismos procariotos (continuação).

Grupo filogenético	Carotenóides representativos
<u>Deinococcus-Thermus</u>	
Deinococcus	β -caroteno, ceto-carotenóides
Thermus	
<i>T. thermophilus</i>	fitoeno, licopeno, derivados de γ -caroteno β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina termo-criptoxantinas, termo-bis-zeaxantinas termo-zeaxantinas
<u>Bactérias gram positivas</u>	
Streptomyces	leporoteno e derivados hidróxi
<i>S. medrolani</i>	isorenierateno e seus 3- e 3'- hidróxi derivados
<i>S. griseus</i>	licopeno
<i>S. chrestomyceticus</i> subsp. <i>rubescens</i>	licopeno
Nocardia	licopeno, γ -caroteno, 4-ceto- γ -caroteno, carotenóides glicosídeos
Corynebacterium	C ₄₅ e C ₅₀ carotenóides, glicosídeos de decaprenoxantina
Brevibacterium	cantaxantina, β -caroteno, astaxantina
Mycobacterium	isorenierateno, β -caroteno e carotenóides glicosídeos (fleioxantofila)
Micrococcus	sarcinaxantina mono e di-glicosídeos, cantaxantina, equinenona, β -caroteno
Bacillus	β -caroteno, C ₅₀ carotenóides, tetraidro-bacterioruberina
Staphylococcus	C ₃₀ apocarotenóides
<i>S. aureus</i>	fitoflueno, 7,8,11,12-tetraidro-licopeno, neurospeno, 4,4'-diapofitoeno
Sarcina	licopeno, β -caroteno, zeaxantina, C ₅₀ -carotenóides
Enterococcus	C ₃₀ apocarotenóides
<i>E. faecium</i>	15-cis-4,4'-diaponeurospeno, diaponeurospeno-4-al e derivados esterificados 4,4'-diaponeurospeno
Erwinia	β -caroteno, β -criptoxantina e zeaxantina
B. Archaeobacteria	
Halobacterium	β -caroteno, C ₅₀ xantofilas derivados da bacterioruberina acíclica, bacteriorodopsina

Adaptado de Jonhson & Schroeder (1995).

Nas algas os carotenóides se originaram a partir de endossimbiose adquirida durante a evolução. As diferentes classes de algas adquiriram cloroplastos de procariotos simbióticos ou algas eucariotas simbióticas (Johnson &

Nas algas os carotenóides se originaram a partir de endossimbiose adquirida durante a evolução. As diferentes classes de algas adquiriram cloroplastos de procariotos simbióticos ou algas eucariotas simbióticas (Johnson & Schroeder, 1995). As algas eucarióticas produzem xantofilas que estão usualmente associadas à clorofila atuando como pigmento acessório. Nos organismos super produtores, os carotenóides também se acumulam fora do fotossistema (Johnson & Schroeder, 1995).

Os cloroplastos em plantas terrestres foram adquiridos por endossimbioses estáveis de cianobactérias. Durante a evolução, modificações consideráveis ocorreram no genoma dos cloroplastos através de transferência de genes para o núcleo hospedeiro e perda de genes não essenciais a partir dos cloroplastos (Johnson & Schroeder, 1995). Os principais carotenóides encontrados nas folhas são o β -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina, sendo também encontradas menores quantidade de α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina e anteraxantina (Goodwin, 1980). Estes pigmentos têm sua cor mascarada pelo verde, sendo revelados com a degradação da clorofila, tal como nas folhas de outono.

Em contraste com as folhas, tecidos não fotossintéticos apresentam uma complexa e variável composição de carotenóides (Goodwin, 1980). Basicamente, os carotenóides estão localizados nas flores amarelo-alaranjadas (girassol), nas frutas (caju, maracujá, goiaba, mamão, tomate, laranja, abricó) e nas raízes alaranjadas, como a cenoura e alguns tipos de batata doce e mandioca (Goodwin, 1980).

Os fungos e os animais compartilham a mesma história evolucionária, a qual é independente das plantas, evidenciada pelas similaridades em nível molecular e celular. Justificando assim, a escolha de leveduras e outros fungos como sistemas modelos para o entendimento dos processos metabólicos relacionados com os carotenóides nos eucariontes (Johnson & Schroeder, 1995).

Os carotenóides ocorrem apenas esporadicamente nos fungos, sendo desconhecidas espécies produtoras de α -caroteno, criptoxantina e neoxantina. A origem evolucionária dos carotenóides nos fungos ainda não foi esclarecida. Os fungos podem ter adquirido a habilidade de produzir carotenóides pela endossimbiose de bactérias, cloroplastos de algas ou por transferência lateral de genes de bactérias (Johnson & Schroeder, 1995).

3. PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR VIA BIOTECNOLÓGICA

Apesar da grande diversidade biológica de organismos capazes de sintetizar carotenóides, são poucos os microrganismos utilizados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides. Pode-se destacar a produção de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (Feofilova, 1994) e pelas microalgas verdes marinhas do gênero *Dunaliella* (Borowitzka & Borowitzka, 1989); e a produção de astaxantina pela microalga de água doce *Haematococcus* sp (Johnson & An, 1991) e pela levedura heterobasidiomicete *Phaffia rhodozyma* (Johnson & Lewis, 1979; Gu *et al.*, 1997; Parajó *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 1997; Rubinstein *et al.*, 1998). Os carotenóides produzidos a partir de *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Phaffia rhodozyma* já estão sendo comercializados (Johnson & Schroeder, 1995).

Na Tabela 3 estão apresentados os principais microrganismos com potencial biotecnológico, bem como os principais carotenóides encontrados em cada espécie.

Tabela 3. Microrganismos com potencial para desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides.

Espécies	Carotenóides produzidos
1. Fontes de carotenos	
A. Fungos	
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula</i> , <i>Rhodospiridium</i> sp.	toruleno e β -caroteno
B. Bactérias não-fotossintéticas	
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> subsp. <i>rubescens</i>	licopeno
2. Fontes de xantofilas	
A. Algas verdes	
<i>Spongiococcum excentricum</i>	luteína
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	luteína
B. Fungos	
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	torularrodina
C. Bactérias não-fotossintéticas	
<i>Flavobacterium</i> sp.	zeaxantina
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> var. <i>aurantioideus</i>	xantofilas não identificadas
<i>Mycobacterium phlei</i>	xantofilas
3. Fontes de ceto-carotenóides monocíclicos	
A. Bactérias não-fotossintéticas	
<i>Deinococcus radiophilus-radiodurans</i>	derivados 4-ceto do γ -caroteno
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	derivados 4-ceto do γ -caroteno
4. Fontes de ceto-carotenóides bicíclicos	
A. Cianobactéria	
<i>Anabaena variabilis</i>	cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	cantaxantina
B. Algas verdes (em deficiência de nitrogênio)	
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	cantaxantina
<i>Haematococcus pluvialis</i>	astaxantina

Tabela 3. Microrganismos com potencial para desenvolvimento de processo biotecnológicos para produção de carotenóides (continuação).

Espécies	Carotenóides produzidos
4. Fontes de cetocarotenóides bicíclicos	
C. Fungos/leveduras	
<i>Phaffia rhodozyma</i>	astaxantina
D. Bactérias não-fotossintéticas	
<i>Brevibacterium</i> KY-4313	cantaxantina
<i>Rhodococcus maris</i> /	
<i>Mycobacteriumn brevicaie</i> 32-MCT	cantaxantina
<i>Mycobacterium lacticola</i>	astaxantina
<i>Brevibacterium</i> 103	astaxantina
5. Fontes de retro-carotenóides	
<i>Pseudomonas extorquens</i>	rodoxantina

Adaptado de Nelis & Leenheer (1989).

3.1. Algas

As microalgas verdes são grandes produtoras naturais de carotenóides, produzindo cerca de 2 a 20 mg/g de células secas. A principal classe de interesse industrial é a *Chlorophyceae*, cujos organismos acumulam geralmente carotenóides similares aos encontrados em plantas superiores como α -caroteno, β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina, sendo que algumas espécies acumulam astaxantina. A aparência vermelha de algumas algas verdes se deve ao aparecimento de carotenóides secundários sintetizados usualmente sob condições nutricionais especiais ou ambientais de estresse (Johnson & Schroeder, 1995).

3.1.1. *Dunaliella sp*

A tecnologia de produção de β -caroteno pela alga *Dunaliella sp* é bem estabelecida, com alguns processos comerciais existentes em Israel (Rich, 1978), Austrália (Borowitzka & Borowitzka, 1988) e Estados Unidos (Klausner, 1986).

Esta alga unicelular não apresenta parede celular e produz altos níveis de β -caroteno. Para *Dunaliella salina*, as condições de estresse que favorecem o acúmulo de β -caroteno são a alta intensidade de luz, temperatura e salinidade, deficiência de nitrogênio e fósforo, podendo produzir mais de 14% de seu peso seco em carotenóides (Borowitzka & Borowitzka, 1989).

Usualmente, os processos em larga escala são feitos ao ar livre, em locais de produção de sal. Entretanto, a variação de fatores ambientais, tais como temperatura, intensidade de luz e índice pluviométrico, pode afetar a salinidade e o pH, influenciando a produção de carotenóides em locais abertos (Borowitzka & Borowitzka, 1989).

D. salina caracteristicamente produz uma mistura de isômeros *cis*- e *trans*-do β -caroteno, apresentando cerca de 10% de 15-*cis*- β -caroteno, 41% de 9-*cis*- β -caroteno, 42% de *trans*- β -caroteno e 6% de outros isômeros (Bem-Amotz *et al.*, 1982).

Nesta alga, os carotenóides produzidos atuam como protetor solar para a clorofila e o DNA celular e, possivelmente, a alta produção de β -caroteno seja uma maneira do organismo de diminuir a alta quantidade de carbono que é assimilada por continuada fotossíntese em condições limitadas de crescimento (Borowitzka & Borowitzka, 1989).

3.1.2. *Haematococcus sp*

A demanda de astaxantina para piscicultura é a principal razão para a intensa investigação de fontes naturais desta xantofila (Meyers, 1994), já existindo patentes para produção destes pigmentos a partir de *Haematococcus pluvialis* (Johnson & An, 1991; Johnson & Schroeder, 1995).

Os carotenóides presentes em *Haematococcus sp* são (3S,3'S)-astaxantina, α - e β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e outros em

menores quantidades como anteraxantina, zeaxantina, equinenona e cantaxantina (Renstrom *et al.*, 1981).

Dependendo do método de cultivo, *Haematococcus pluvialis* pode sintetizar níveis elevados de (3S, 3'S)-astaxantina, por volta de 0,5 a 2% de massa seca, o que tem estimulado o desenvolvimento tecnológico para sua utilização em larga escala (Droop, 1955; Goodwin & Jamikorn, 1954).

Em linhas gerais, segundo Johnson & An (1991), a cultura desta alga ocorre em ambientes fechados, que possibilita um maior controle das condições de cultivo e de contaminações, ou também em locais abertos. O cultivo, que pode ser sob condições autotróficas ou heterotróficas, deve ser sob agitação e pH do meio mantido a 7,3 com fluxo constante de CO₂. O crescimento se completa em 5 dias, quando as células são induzidas ao encistamento através da privação de nutrientes e de aumento da salinidade do meio, alcançando altos níveis de produção de astaxantina.

A luz é conhecida por estimular a carotenogênese nesta alga, aumentando cerca de sete vezes a produção de astaxantina em relação a cultivos sem presença da luz (Droop, 1955).

A produção de astaxantina por *Haematococcus* apresenta alguns problemas como a contaminação dos tanques e a dificuldade na liberação de pigmentos das formas encistadas para produção de rações ou aditivos (Johnson & An, 1991).

3.2. Fungos

Os principais carotenóides encontrados neste grupo de organismos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Carotenóides encontrados em fungos.

Grupo filogenético	Carotenóides representativos
Mixomicota	
Mixomicetes	γ -caroteno, β -caroteno, 3,4-dideidro-licopeno, neurosporaxantina
Eumicota	
<u>Mastigomicotina</u>	
Chitridiomycetes	γ -caroteno, licopeno, β -caroteno
Oomicetes	não identificado
<u>Zigomicotina</u>	
Zigomicetes	β -caroteno
<u>Ascomycotina</u>	
Hemiascomycetes	não identificado
Plectomycetes	γ -caroteno, β -caroteno, licopeno
Pirenomicetes	γ -caroteno, β -caroteno, licopeno, toruleno, licoxantina, neurosporaxantina
Discomycetes	β -caroteno, γ -caroteno, 3,4-dideidrolicopeno, toruleno, filipsiaxantina, aleuriaxantina, plectaniaxantina
Loculoascomycetes	não identificado
<u>Basidiomycotina</u>	
Ustilaginomicetes	licopeno, β -caroteno
Himenomicetes	γ -caroteno, β -caroteno, criptoxantina, cantaxantina, astaxantina
Gasteromicetes	γ -caroteno, β -caroteno
Teliomicetes	β -zeacaroteno, γ -caroteno, β -caroteno, toruleno, criptoxantina
leveduras basidiomicetes	β -caroteno, toruleno, torularrodina β -caroteno, equinenona, 3-hidróxi-3'-dideidro- β , ϵ -caroten-4-ona, astaxantina
<u>Deuteromicotina</u>	γ -caroteno, β -caroteno, toruleno

Adaptado de Jonhson & Schroeder (1995).

3.2.1. *Blakeslea trispora*

Processos fermentativos em larga escala do fungo *Blakeslea trispora* podem produzir β -caroteno em grande quantidade, cerca de 17 mg/g de peso seco. Este fungo heterotático apresenta linhagens sexualmente opostas, designadas de (+) e (-), sendo que o co-cultivo destas cepas induzem uma maior produção de carotenóides, de 5 a 17 vezes, do que qualquer uma das cepas cultivadas em separado (Ciegler, 1965).

Este fenômeno de bioindução da produção de carotenóides também ocorre quando se adiciona o hormônio ácido trispórico, que controla o desenvolvimento sexual e reprodução deste organismo (Feofilova, 1994). Outras substâncias são capazes de estimular a síntese de carotenóides nestes fungos, como por exemplo, β -ionona, retinol, derivados fenólicos como o veratrol e o dimetilftalato.

De acordo com Feofilova, o rendimento chega a ser de 3 g/L, utilizando linhagens selecionadas em meio a base de milho e soja, vitamina B₁, óleo de girassol e β -ionona (apud Feofilova, 1994). A desvantagem deste método de produção inclui o alto custo do meio de cultura, que não é facilmente disponível, e a presença de duas cepas no processo biotecnológico (Feofilova, 1994).

Tentativas visando reduzir o custo do meio de cultivo baseiam-se na utilização de dejetos industriais, como resíduos do processamento de carnes e gordura, ou de meios a base de cevada e farinha de arroz, segundo Gavrilov (apud Feofilova, 1994).

A produção de licopeno neste fungo parece ser dependente do pH, sendo que em pH neutro a levemente alcalino ocorre uma maior formação deste carotenóide (Ciegler, 1965). Relatos em rendimentos de licopeno de 0,7 g/L de

caldo de cultivo utilizando inibidores de biossíntese são reportados na literatura (Ninet & Renaut, 1979).

3.2.2. *Phycomyces blakesleeanus*

Este organismo apresenta características similares às descritas para *Blakeslea trispora*. Em condições laboratoriais, a produção da cepa selvagem é de 0,040 mg de β -caroteno e das cepas superprodutoras por volta de 25 mg/g peso seco. O peso de micélio seco por litro de meio de cultura é 10 g, mas pode chegar a 40 g em alguns resíduos industriais. A carotenogênese é menor em culturas sob agitação, sendo que cultivos de superfície em meio sólido são mais produtivos (Cerdeira-Olmedo, 1989).

Este fungo é muito utilizado como modelo biológico para estudo da biossíntese de carotenóides pela facilidade de produzir mutantes defectivos em vários estágios de síntese de β -caroteno (Cerdeira-Olmedo, 1989).

3.2.3. *Phaffia rhodozyma*

A levedura *Phaffia rhodozyma* é isolada de nichos bastante específicos, em árvores vidoeiros (*Betula*) que crescem em locais de alta latitude. De acordo com Schroeder & Johnson (1995 a), a carotenogênese em *P. rhodozyma* atua como um mecanismo de sobrevivência contra o efeito deletério de espécies derivadas de $^1\text{O}_2$ caracteristicamente produzidas pelo vidoeiro para se proteger contra micróbios e parasitas.

Esta levedura é deficiente em enzimas, como catalase e peroxidases, envolvidas na detoxicação de espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 e $\text{OH}^\bullet$. Os carotenóides localizados no citosol, em glóbulos lipídicos e em regiões membranosas da levedura devem compensar a falta destas enzimas, atuando como uma excelente forma de defesa contra a peroxidação de lipídeos na levedura (Schroeder & Johnson, 1995 b).

A principal propriedade que distingue *Phaffia* das outras leveduras heterobasidiomicetes é a produção de (3*R*,3'*R*)-astaxantina como principal carotenóide. Outros carotenóides minoritários como β -caroteno, 3-hidróxi-equinenona, 3-hidróxi-3',4'-dideidro- β , ψ -caroten-4-ona e foenicoxantina, também são encontrados nesta levedura (Andrewes & Starr, 1976).

De maneira geral, cepas selvagens apresentam conteúdo de astaxantina de 300 μ g/g de peso seco, rendimento de (3*R*,3'*R*)-astaxantina de 5 mg/L de cultura e o total de biomassa de 16 g/L (Nelis & Leenheer, 1991). O conteúdo de astaxantina pode variar de 40 a 95% do total de carotenóides dependendo da cepa e das condições de cultivo (Johnson & An, 1991).

Estas leveduras são geralmente cultivadas em fermentadores com controle de alimentação e pH, com aeração vigorosa para obtenção de alto rendimento de carotenóides e de massa celular (Yamane *et al.*, 1997). A produção de carotenóides neste fungo é induzida por baixa intensidade de luz e inibida por alta intensidade de luz (An e Johnson, 1990).

A cultura de *Phaffia rhodozyma* em fermentadores é de custo elevado se comparado com outros processos fermentativos, por serem necessárias baixas temperaturas de cultivo, já que este organismo apresenta temperatura ótima de crescimento a 22,5 °C (Johnson & Lewis, 1979).

A configuração da astaxantina encontrada neste fungo, (3*R*,3'*R*), é oposta a da comumente encontrada na natureza (3*S*,3'*S*), o que poderia gerar relutância para produção biotecnológica deste pigmento. Porém, estudos mostraram que esta configuração também é encontrada em pequenas quantidades na natureza e também pode ser assimilada por outros organismos (Renstrom *et al.*, 1980; Renstrom *et al.*, 1981; Shiedt *et al.*, 1981; Foss *et al.* 1987).

Enzimas produzidas por *Bacillus circulans* digerem parcialmente a parede celular de *P. rhodozyma*. As enzimas hidrolíticas envolvidas são β -(1-3)-glucanase, β -(1-6)-glucanase, α -(1-3)-glucanase, xylanase e quitinase (Johnson

et. al., 1978). O cultivo misto destas duas linhagens pode ser uma alternativa interessante para o desenvolvimento de um processo enzimático em larga escala, para a posterior utilização de carotenóides de *Phaffia rhodozyma* em rações para animais (Okagbue & Lewis, 1985).

Uma curta exposição ao $^1\text{O}_2$ durante a etapa de preparação do inóculo, resulta numa população de leveduras que produzem uma maior quantidade de astaxantina no escuro (Schroeder & Johnson, 1995 b). A utilização de H_2O_2 no processo de cultivo, em concentração abaixo de 1 mmol/L, promoveu um aumento na concentração de carotenóides em relação ao cultivo controle (Santopietro *et. al.*, 1998).

A produção de mutantes destas leveduras tem como objetivo a seleção de cepas com maiores quantidades de pigmentos, que apresentem crescimento ótimo a temperaturas acima de 25 °C. A utilização de agentes mutagênicos como etilmetil sulfonato e N-metil-N'-nitroguanidina, apesar da inespecificidade deste tipo de abordagem, tem sido amplamente utilizada (Johnson & Schroeder, 1995). Altos níveis de carotenóides (1,1 mg/g de peso seco) e altos rendimentos de biomassa (44 g/L de caldo), foram alcançados utilizando linhagem mutante sob condições otimizadas (An *et al.*, 1996).

Processos utilizando meios de baixo custo mostram-se bastante atrativos para produção de astaxantina. Com este intuito, meios a base de cana-de-açúcar (Fontana *et al.*, 1997), melaço de cana ou de beterraba (Haard, 1988), suco de uva (Meyers & DuPreez, 1994) e meio a base de xilose, obtido através da hidrólise ácida de dejetos sólidos agro-industriais (Parajó *et al.*, 1998) foram avaliados.

Considerável progresso tem sido obtido por algumas indústrias na utilização desta levedura como fonte de pigmentação e de outros nutrientes para a aquacultura, havendo várias patentes no mundo a respeito da síntese de carotenóides a partir de *P. rhodozyma*. Em Milwaukee, (Wisconsin, Estados Unidos), a empresa "Universal Bioventures" vem comercializando um produto de

leveduras com pelo menos 4 mg/g de astaxantina em peso seco (Johnson & Schroeder, 1995).

3.2.4. *Rhodotorula sp*

Várias leveduras avermelhadas heterobasidiomicetes dos gêneros *Rhodotorula* e *Rhodospiridium* são conhecidas como produtoras de carotenóides (Hari *et al.*, 1992; Perrier *et al.*, 1995; De Miguel *et al.*, 1997).

De maneira geral, o conteúdo total de carotenóides em diferentes cepas de *Rhodotorula* pode variar de 10 µg a 100 µg/g de massa seca. Com exceção do β-caroteno presente em todas as cepas, vários outros carotenóides como toruleno, torularrodina, β-zeacaroteno, γ-caroteno, plectanixantina e β-carotenona podem ser encontrados dependendo da linhagem (Perrier *et al.*, 1995).

Estas leveduras se mostram interessantes para o desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides, pois apresentam um bom rendimento em biomassa, como também são uma potencial fonte microbiana de proteínas (Nelis & De Leenheer, 1989) e de lipídios (Yoon & Rhee, 1983; Perrier *et al.*, 1995). A biomassa celular pode ser usada na preparação de rações para aves (Mocanu *et al.*, 1997).

O conteúdo de carotenóides e lipídios pode variar tanto qualitativamente como quantitativamente dependendo da cepa de *Rhodotorula* e das condições de cultivo. Estas leveduras produzem cerca de 18% de lipídios com presença dos ácidos graxos linoleico, linolênico e araquidônico (Perrier *et al.*, 1995), além de esteróides (Choe & Kim, 1997) e polissacarídeos que são excretados no meio de cultivo (Frengova *et al.*, 1997).

De acordo com Tada & Shiroishi (1982), o conteúdo de carotenóides de células de *R. minuta* sob iluminação contínua aumentou linearmente até alcançar um platô, sendo que a taxa de aumento foi dependente da intensidade de luz. Durante o processo pode-se identificar duas fases, um evento fotoquímico inicial

dependente da luz, onde a exposição da luz foi efetiva até a $-1,5^{\circ}\text{C}$, seguido por um evento bioquímico que era dependente da temperatura, mas independente da luz.

Em *R. glutinis*, o efeito da temperatura sob a carotenogênese é determinado pela concentração enzimática e não pela sua atividade. Este efeito estaria possivelmente relacionado com os níveis de transcrição e tradução, ou com a natureza lábil de alguma enzima envolvida (Hayman *et al.*, 1974).

3.2.4.1. Cultivos em substratos de baixo custo

As leveduras do gênero *Rhodotorula* apresentam uma grande versatilidade com respeito aos requerimentos nutritivos, podendo crescer em resíduos industriais e dejetos de alimentos processados (Nelis & De Leenheer, 1989).

Vários meios à base de subprodutos agro-industriais de baixo custo, como mosto de uva, xarope de glicose, melaço de beterraba, extrato de farinha de soja e extrato de farinha e milho, foram testados quanto ao seu potencial para o cultivo destas leveduras. Dentre os meios avaliados, o resíduo de uva (mosto) diluído e suplementado com sais propiciou o maior acúmulo de carotenóides, alcançando níveis de $1000\text{ }\mu\text{g}$ de carotenóides/g massa seca (Buzzini & Martini, 2000).

De acordo com Matelli *et al.* (1990), caldo de cana-de-açúcar diluído e suplementado com sais e extrato de leveduras, utilizado como substrato para o cultivo de *R. glutinis*, propiciou a produção de maiores quantidades de carotenóides (até $2500\text{ }\mu\text{g/g}$ massa seca) e de biomassa (17 g/L) comparado com dados da literatura (Costa *et al.*, 1987). Foi sugerido um favorecimento do crescimento celular e síntese de carotenóides por algum componente da cana-de-açúcar (Matelli *et al.*, 1990).

R. glutinis foi co-cultivada com *Lactobacillus helveticus* em meio à base de ultrafiltrado de soro de queijo, com a finalidade de otimizar o processo de

produção de carotenóides neste meio de baixo custo. Neste co-cultivo ocorre formação de ácido láctico a partir da galactose, e de glicose a partir da lactose por ação das enzimas bacterianas, estimulando a produção de carotenóides pela levedura, que é incapaz de utilizar a lactose como fonte de carbono (Frengova *et al.*, 1994). Segundo Frengova *et al.* (1997), as vitaminas e aminoácidos produzidos pela levedura também favorecem o crescimento bacteriano.

A quantidade relativa de cada carotenóide produzida por *R. glutinis*, no co-cultivo em meio a base de soro de leite, foi dependente da temperatura de cultivo. A torularrodina foi produzida sempre em maiores quantidades que os outros pigmentos, com total de carotenóides de 280 µg/g massa celular seca. Durante o processo fermentativo, a síntese de exopolissacarídeos correlacionou-se positivamente com a síntese de massa celular (Frengova *et al.*, 1995, 1997).

Cepas de *R. rubra* cultivada em salmoura produzida pela fermentação do repolho, produto este com elevada demanda bioquímica de oxigênio, produziram mais de 1000 µg de carotenóides/L em 48 horas (Shinh & Hang, 1996).

O cultivo da linhagem *R. rubra* em hidrolisado de turfa diluído e suplementado com 5 g/L de caldo YM, em condições de pH, temperatura e agitação otimizadas, produziu um total de carotenóides de 1256 µg de carotenóides por grama de massa celular seca (Martin *et al.*, 1993).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, G. H.; Kim, C. H.; Choi, E. & Rhee, S. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FO1C. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 82, p. 515-518, 1996.
- An, G. H. & Johnson, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*, **Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serot.**, v. 57, p.191-202, 1990.
- Andrewes, A. G. & Starr, M. P. (3*R*, 3'*R*)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Phytochem.**, v. 15, p. 1009-1013, 1976.
- Ausich, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by Biotechnology. **Pure Appl. Chem.**, v. 69, p. 2169- 2173, 1997.
- Bem-Amotz, A.; Katz, A. & Avron, M. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). **J. Phycol.**, v. 18, p. 529-537, 1982.
- Borowitzka, L. J. & Borowitzka, M. A. β -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.
- Borowitzka, M. A. & Borowitzka L. J. *Dunaliella* In: Borowitzka, M. A. & Borowitzka L. J. (eds). **Microalgal Biotechnology**, Cambridge University Press, Cambridge, p.27-58, 1988.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Carotenoids Today and Challenges for the Future. In Britton, G.; Liaaen- Jensen, S. & Pfander, H. (eds). **Carotenoids: Isolation and Analysis**, vol 1. Birkhäuser Verlag, Basel, p. 1-11, 1995.

- Buzzini, P. & Martini, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.**, 71, p.41-44, 2000.
- Cerdá-Olmedo, E. Production of Carotenoids with Fungi. In Vandamme, J. E. (ed). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 27-42, 1989.
- Choe, K. O. & Kim, I. G. Correlation of biosynthesis of sterol and carotene by yeast of *Rhodotorula* genus. **Choson Minjujuui Inmin Konghwahagwon Tongbo**, v. 2, p. 48-50, 1997.
- Ciegler, A. Microbial carotenogenesis. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 7, p. 1-34, 1965.
- Costa, I.; Matelli, H. L.; Silva, I. M. & Pomeroy, D. Production of β -caroteno by *Rhodotorula* strain. **Biotechnol. Lett.**, v.9, p. 373-375, 1987.
- De Miguel, T.; Calo, P.; Diaz, A. & Villa, T. G. The genus *Rhodospiridium*: a potencial source of β -caroteno. **Microbiol.**, v. 13, p. 67-70, 1997.
- Droop, M. R. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. **Nature**, v. 172, p. 42-46, 1955.
- Feofilova, E. P. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 30, p. 143-153, 1994.
- Frengova, G.I.; Simova, E.D.; Pavalova, K.; Beshkova, D.M. & Grigorova, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 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 ultrafiltrate. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, p. 1001-1008, 1995.

- Frengova, G.; Simova, E. & Beshkova, D. Carotene protein and exopolysaccharide production by co-culture of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 272–277, 1997.
- Fontana J. D.; Chocial, M.B.; Baron, M.; Guimaraes, M.; Maraschin, M., Ulhoa C.; Florencio., J. A. & Bonfin, T. M. B. Asthaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-cost culture media and yeast cell lysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 63-65, p. 305-314, 1997.
- Foss, P.; Renstrom, B. & Liaaen-Jensen, S. Natural occurrence of enantiomeric and meso astaxanthin. VII. Crustaceans including zooplankton. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 85, p.313-316, 1987.
- Goodwin, T. W. Nature and distribution of carotenoids. **Food Chem.**, v. 5, p. 3-13, 1980.
- Goodwin, T. W. & Jamikorn, M. Studies in carotenogenesis II. Carotenoid synthesis in alga *Haematococcus pluvialis*. **Biochem. J.**, v. 57, p. 376-399, 1954.
- Gu, W.-L.; An, G. H. & Jonhson, E. A. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*, **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.19, p.114-117, 1997.
- Haard, N. F. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol. Lett.**, v.10, p.609-614, 1988.
- Hari, R. P.K.; Patel, T. & Martin, A. A new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. **J. Ind. Microbiol.**, v. 11, p. 43-51, 1992.
- Hayman, E. P.; Yokoyama, H., Chichester, C. & Simpson, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **J. Bacteriol.**, v. 120, p. 1339-1343, 1974.

-
- Jonhson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J. & Phaff, H. J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the Basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 54, p.1155-1158, 1978.
- Jonhson, E. A. & Lewis, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 115, p. 173-183, 1979.
- Johnson E. A. & Schroeder, W. A. Microbial carotenoids. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 53, p.119-178. 1995.
- Johnson, A.E. & An, G.H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 11, p. 297-326, 1991.
- Klausner, A. Algaculture: food for thought. **Biotechnol.**, v. 4, p. 947-953, 1986.
- Krinsky, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.
- Kull, D. & Pfander, H. List of New carotenoids. In Britton, G.; Liaaen- Jensen, S. & Pfander, H. (eds). **Carotenoids: Isolation and Analysis**, vol 1. Birkhäuser Verlag, Basel, p. 13-63, 1995.
- Leuenberger, H. G. W. Microbiologically Catalyzed Reaction Steps in the Field of Vitamin and Carotenoid Synthesis. In: Tramper, L. J.; van der Plas, J. C. & Linko, P. (eds). **Biocatalysis in Organic Syntheses**, Elsevier, Amsterdam, p.99-152, 1985.
- Martin, A.M.; Lu, C. & Patel, T.R. Growth parameter for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat Extracts. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 75, p.321-325, 1993.
- Matelli, H. L.; Silva, I. M.; Souza, N. O. & Pomeroy, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnol. Lett.**, v. 12, p.207-208, 1990.

-
- Meyers, S. P. & du Preez, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 178-183, 1994.
- Meyers, S. P. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoids. **Pure Appl. Chem**, v, 66, p. 1069-1976, 1994.
- Misawa, N. & Shimada, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenoic bacteria and yeasts. **J. Biotechnol.**, v. 59, p. 169-181, 1998.
- 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. **Roum. Biotechnol. Lett.**, v. 2, p.55-60, 1997.
- Nelis, H. J. & De Leenheer, A. P. Microbial Production of Carotenoids. In Vandamme, J. E. (ed). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 43-80, 1989.
- Nelis, H. J. & De Leenheer, A. P. Microbial sources of carotenoids pigments used in foods and feeds. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 70, p. 181, 191, 1991.
- Ninet, L. & Renaut, J. Carotenoids. In: Peppler, H. J. & Pealman, D. (eds). **Microbial Technology**, Academic Press, New York, v. 1 (2^oed), p. 528-544, 1979.
- 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 the yeast *Phaffia rhodozyma*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 59, p. 243-255, 1985.
- Parajó, J. C.; Santos, V & Vazquez, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Proc. Biochem.**, v. 33, p. 181-187, 1998.

- Perrier, V.; Dubreucq, E. & Gayzy, P. Fatty acid and carotenoid composition *Rhodotorula* strains. **Arch. Microbiol.**, v. 168, p. 173-179, 1995.
- Rich, V. Israel's place in the sun. **Nature**, v.275, p.581-582, 1978.
- Renstrom, B.; Borch, G.; Skulberg, O. Aareskjold, K.; Liaaen-Jensen, S.; Vechi, M.; Leuenberger, F. J.; Muller, R. K, & Mayer, H. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. I. Ex Lobster eggs (*Homarus gammarus*). **Helv. Chim. Acta**, v. 63, p. 711-722, 1980.
- Renstrom, B.; Borch, G. & Liaaen-Jensen, S. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. IV. Ex shrimps (*Pandalus borealis*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 69, p. 621-623, 1981.
- Rubinstein, L.; Altamirando, A.; Santoprieto, L. D. & Baigorff, M. Isolation and characteristics of *Phaffia rhodozyma* mutants, **Folia Microbiol.**, v. 43, p.626-630, 1998.
- Sandmann, G.; Albrecht, M., Schnurr, G.; Knorzer, O. & Boger, P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v.17, p. 233-237, 1999.
- Santopietro L. M. D., Spencer, J. F. J.; Spencer, D. M. & Sineriz, F. Effects of oxidative stress on the production of carotenoid pigments by *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*). **Folia Microbiol.**, v. 43, p. 173-176, 1998.
- Schroeder, W.A. & Johnson E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against oxygen damage. **J. Ind. Microbiol.**, v. 14, p. 502-507, 1995 (a).
- Schroeder, W.A. & Johnson E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 18374-18379, 1995 (b).

-
- Shiedt, K.; Leuenberger, F. J. & Vecchi, M. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin. V. *Ex wild salmon (Salm salar and Onchorynchus)*. **Helv. Chim. Acta**, v. 64, p. 449-452, 1981.
- Shinh C.T. & Hang, Y.D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 29, p. 570-572. 1996.
- Straub, O. In: Pfander, H. (ed): **Key to Carotenoids**. Birkhäuser Verlag, Basel. 287p. 1987.
- Tada, M. & Shiroishi, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* I. Photocontrol of carotenoid production. **Plant Cell Physiol.**, v. 23, p. 541-547, 1982.
- Yamane, Y.; Higashida, K.; Nakashimada, Y.; Karizono, T. & Nishio, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-cultures: kinetic and stoichiometric Analysis. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 63, p. 4471-4478, 1997.
- Yokoyama, A.; Shizuri, Y. & Misawa, N. Production of new carotenoids, astaxanthin glucosides by *Escherichia coli* transformants carrying carotenoids biosynthetic genes. **Tetraedron Lett.**, v.39, p. 3709-3712, 1998.
- Yoon, S. H. & Rhee, J. S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipids production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 60, p.1281-1285, 1983.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE E ANÁLISE DOS CAROTENÓIDES DE CINCO LINHAGENS DE *Rhodotorula*

Em preparação para submissão à revista *Química Nova*.

ABSTRACT

A method for extraction and HPLC separation of carotenoids from five *Rhodotorula* strains, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. araucariae* e *R. lactosa* and *R. rubra*, was developed. The mechanical disruption of the yeast cell wall, with fine treated sand, showed to be more efficient than the chemical disruption with dimethylsulfoxide. The carotenoids were separated and quantified on a C₁₈ Novapack column with acetonitrile/methanol (0.1% triethylamine)/ethyl acetate (75:15:10) as mobile phase, at flow rate of 1.0 mL/min. In all strains, the major carotenoids found were torularhodin, torulene, γ -carotene and β -carotene, other minor carotenoids were tentatively identified as 3',4'-dideidro- β,ψ -caroten-16-ol, ζ -carotene, β -zeacarotene, neurosporene, and phytoene.

INTRODUÇÃO

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Estes compostos têm sido utilizados amplamente como corantes, nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética.

O interesse por carotenóides tem aumentado nos últimos anos devido à sua comprovada atividade de vitamina A e pela evidência de suas outras propriedades biológicas, tais como imunomoduladores, prevenção da degeneração macular e doenças cardiovasculares e anticarcinogênicos¹. Além disso, o mercado de corantes naturais tem se mostrado bastante promissor, devido a tendência em se evitar alimentos que contenham aditivos artificiais. Os carotenóides também são utilizados como fonte de pigmentação de peixes e crustáceos, sendo que este é, atualmente, o setor agrícola de maior crescimento^{2,3}.

Existem vários fatores que dificultam a obtenção de dados confiáveis sobre a composição quali- e quantitativa de carotenóides. Por apresentarem um longo sistema de ligações duplas conjugadas com elétrons π deslocalizados, os carotenóides são altamente reativos e conseqüentemente instáveis. Além disso, um número variado de carotenóides com estruturas muito diferentes podem ser encontrados em um único microrganismo. Devido a estas razões, a análise cromatográfica deste tipo de amostra é considerada bastante complexa ⁴.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem se mostrado o método de escolha para separação e quantificação de carotenóides. Entretanto, uma das dificuldades neste tipo de análise é que o detector de UV-visível responde diferencialmente para cada composto, havendo a necessidade de construir curvas padrão para os principais carotenóides. Como existem poucos padrões de carotenóides disponíveis comercialmente, não são raros os trabalhos que determinaram o teor de carotenóides apenas a partir de medida espectrofotométrica do extrato total de linhagens de *Rhodotorula* ^{5, 6, 7, 8, 9}.

A separação dos carotenóides utilizando cromatografia em coluna aberta seguida de quantificação pelos espectros na região do visível foram utilizados em alguns trabalhos ^{10, 11, 12}. Alguns estudos mais recentes com carotenóides de *Rhodotorula* além de estimar o total de carotenóides espectrofotometricamente, determinam as porcentagens relativas dos principais pigmentos por CLAE ^{13, 14, 15, 16}. São raros os trabalhos onde os principais carotenóides destas leveduras são determinados por CLAE através de padronização externa ¹⁷.

Outra dificuldade encontrada é devido ao fato dos carotenóides nos microrganismos estarem localizados intracelularmente, requisitando o isolamento da biomassa celular para extração dos pigmentos por solventes orgânicos. A rigidez da parede celular de leveduras limita a extratibilidade dos carotenóides, sendo necessários métodos mecânicos ^{13, 18, 19}, químicos ²⁰ ou enzimáticos ^{21, 22} para recuperação dos carotenóides.

Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento e a avaliação de um método analítico para a determinação da composição de carotenóides, por CLAE, de leveduras do gênero *Rhodotorula*. O método desenvolvido foi utilizado para determinar a composição de carotenóides de cinco linhagens deste gênero.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção das linhagens de microrganismos

As linhagens da levedura *Rhodotorula glutinis* (CCT 2186), *R. minuta* (CCT 2187), *R. araucariae* (CCT 2123) e *R. lactosa* (CCT 2057) foram gentilmente cedidas pela Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello". A linhagem de *R. rubra* foi obtida da coleção do Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Todas as cepas foram mantidas por repiques mensais em meios inclinados em tubos de ensaio contendo meio YM (Difco).

Condições de cultivo

Para preparação do inóculo, frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL meio líquido YM, inoculados com uma alçada das culturas em meio sólido, foram incubados a 150 rpm sob temperatura de 28 °C durante 24 h.

Para cada linhagem em estudo, frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 100 mL de meio YM acrescidos de 10 g/L de glicose foram inoculados com a suspensão de leveduras, descrita acima, correspondendo a 10% do volume total do cultivo. Estes frascos foram incubados à temperatura de 28 °C a 150 rpm de agitação sob iluminação intensa com lâmpada fluorescente (Psychrotherm, New Brunswick).

Após 5 dias, a massa celular de cada cultivo foi removida por centrifugação à velocidade de 3000 rpm por 15 min em centrífuga (Sorval). Para eliminação de eventuais interferentes, a biomassa foi novamente ressuspensa em água destilada e centrifugada por mais duas vezes. As amostras de massa celular de leveduras foram congeladas, liofilizadas, pesadas e mantidas sob atmosfera de nitrogênio a -18 °C, até análise.

Análise dos carotenóides

Extração

Com intuito de romper a parede celular das leveduras, testou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e o uso de areia tratada, como descrito a seguir.

Utilizou-se a metodologia descrita por Sedmak *et al.*²⁰ com algumas modificações. As leveduras liofilizadas (50 mg) foram agitadas em Vortex por 1 min com 2,5 mL de DMSO a 55 °C, em tubos de vidro. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de um solvente mais apolar e os tubos foram novamente agitados por 1 min e centrifugado a 3000 rpm por 5 min, para separação das fases. Este procedimento foi repetido, cerca de 6 vezes, até extração exaustiva dos carotenóides. As fases apolares foram reunidas e o extrato foi lavado com água destilada em funil de separação. Como solvente mais apolar testou-se éter etílico⁹, acetato de etila e éter etílico/acetato de etila (1:1).

O tratamento da areia foi realizado no próprio laboratório e consistiu em destruição da matéria orgânica com HCl 50% sob aquecimento, lavagem até pH neutro, secagem, separação dos grãos de diâmetro de 0,5 mm a 1,0 mm e eliminação de metais com auxílio de um ímã. Para extração dos carotenóides, quantidades iguais de levedura seca e areia (250 mg) foram trituradas em gral e pistilo. Os carotenóides foram exaustivamente extraídos (cerca de 4 vezes) com um total de 50 mL de acetato de etila, seguido de filtração em funil de filtro sinterizado.

Nos dois métodos, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo ($T < 35^{\circ}\text{C}$) e levado até completa evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio.

Análise cromatográfica

Padrões

Os padrões de γ -caroteno, β -caroteno, torularrodina, licopeno e 3',4'-dideidro-1',2'-diidro- β,ψ -caroten-1-ol foram gentilmente cedidos pela Hoffmann-La Roche (Basel, Suíça).

O toruleno foi purificado a partir do extrato de carotenóides obtido de *R. glutinis* usando areia tratada como agente abrasivo (3 g da biomassa liofilizada de leveduras) como descrito acima. Após evaporação do solvente, o extrato foi aplicado em coluna aberta de óxido de alumínio neutro (grau III). A primeira fração (fração 1), contendo carotenos, foi eluída com éter de petróleo, a segunda fração (fração 2), também contendo carotenos, foi recolhida com éter etílico/éter de petróleo (1:10), sendo que a terceira fração (fração 3), contendo xantofilas monoidroxiladas, foi eluída com acetona. Uma última fração, fração 4, contendo xantofilas mais polares ficou aderida na cabeça da coluna e com a extrusão da fase estacionária, o pigmento aderido foi eluído com acetato de etila. Cada fração foi posteriormente analisada por CLAE.

A fração 2 foi separada por cromatografia em camada delgada (CCD) de MgO/Kieselguhr (1:1) em 4 zonas, utilizando como fase móvel acetona/éter de petróleo (1:1). A banda correspondente ao toruleno, de cor salmão e R_f 0,1, foi raspada e o pigmento eluído com éter etílico. Verificou-se por CLAE que a pureza deste caroteno foi de 95%.

Separação por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, sistema quaternário de bombeamento de solventes (Waters),

injetor "Rheodyne" com alça de amostra de 20 μ L, desgaseificador "on line" e sistema de aquisição e processamento de dados Millenium (Waters). A separação foi realizada em coluna C₁₈ Novapack (4 μ m, 4,6 x 300 mm), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna mantida a 29 °C.

Após vários testes com combinações de acetonitrila, metanol, tetrahidrofurano, diclorometano e acetato de etila, a composição da fase móvel utilizada para separação dos carotenóides foi 100% metanol (0,1% trietilamina) de 0 até 3,5 min, passando para acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (88:10:2) em 30 s, e mantendo esta proporção até o final da análise (fase móvel 1). Posteriormente, a fase móvel foi modificada para acetonitrila/ metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções (fase móvel 2). Os espectros foram adquiridos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 460 nm.

Todos os solventes utilizados foram grau cromatográfico e previamente filtrados em sistema Millipore de filtração a vácuo, com membrana para solvente orgânico de 0,45 μ m. Todas as amostras também foram filtradas em membrana de polietileno com 0,22 μ m de poro.

Identificação e quantificação dos carotenóides

Para identificação dos carotenóides, utilizou-se informações provenientes do comportamento cromatográfico desses pigmentos nos diferentes sistemas cromatográficos, comprimentos de onda máximos de absorção ^{23, 24} e co-cromatografia com padrões.

Os pigmentos foram quantificados por padronização externa. As curvas foram construídas para o toruleno (de 6,8 a 86,4 μ g/ml), torularrodina (de 3,2 a 40,5 μ g/ml), β -caroteno (de 6,6 a 84,8 μ g/ml) e γ -caroteno (de 3,3 a 42,2 μ g/ml),

sendo um ponto da curva verificado diariamente. Uma xantofila minoritária, 3',4'-dideidro- β , ψ -caroten-16-ol, foi quantificada usando a curva padrão do toruleno.

O total de carotenóides foi determinado espectrofotometricamente (Beckman, DU-70) a partir do extrato bruto de leveduras, utilizando os coeficientes de extinção do toruleno e do β -caroteno²³ em éter de petróleo.

Avaliação

A precisão entre injeções foi verificada através de cinco injeções do mesmo extrato. A precisão entre duas extrações da mesma amostra, injetada em duplicata, também foi avaliada para todas as cepas.

Determinou-se a recuperação de β -caroteno nas quantidades de 5,7 μ g e 11,5 μ g e de torularrodina nos níveis de 5,6 μ g e 11,2 μ g, adicionando-se os padrões a amostras de concentração conhecida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do método

Extração

O DMSO mostrou-se bastante eficiente para baixas quantidades de amostra. Entretanto, quando maiores quantidades de levedura foram utilizadas, houve a formação de uma interface pigmentada e insolúvel, indicativa de extração incompleta. Este (problema) inconveniente já havia sido previamente relatado ²⁰. No presente estudo, a utilização de éter etílico/acetato de etila (1:1) como solvente extrator mostrou maior eficiência e facilitou as etapas subseqüentes de centrifugação e lavagem.

A utilização de DMSO para liberação dos pigmentos das leveduras tem sido descrita em trabalhos envolvendo linhagens de *Rhodotorula rubra* ⁹, *Rhodotorula glutinis* ¹⁶ e *Phaffia rhodozyma* ²⁵, sendo considerado como método rápido e reprodutível ²⁰. De fato, no presente trabalho o método empregando DMSO foi utilizado com sucesso para extração dos carotenóides de *R. glutinis* e *R. rubra*, entretanto, não foi eficiente para extração exaustiva dos pigmentos de *R. minuta*. Além do que, o uso de solvente a 55 °C para o rompimento das leveduras pode ser crítico, tratando-se de compostos com alta instabilidade como os carotenóides.

A trituração da biomassa seca de leveduras com areia tratada promoveu a extração exaustiva de até 2 g de amostra seca com acetato de etila, sem necessidade de aquecimento, e foi eficiente para todas as cepas estudadas. Comparativamente, este método propiciou a extração de maiores quantidades de carotenóides, utilizando menores quantidades de solvente e foi o escolhido para a análise subseqüente das diferentes cepas. São raros os trabalhos que utilizam este tipo de método para extração de carotenóides de leveduras ¹⁹.

Separação por CLAE

A separação dos carotenóides na fase móvel 1 ocorreu em 60 minutos, além de serem necessários mais 15 minutos para acondicionamento da coluna. Por outro lado, a fase móvel 2 apresentou separação similar em 40 minutos de corrida (Figura 1).

Cabe ressaltar que é necessário adicionar no mínimo 80% de metanol na composição da fase móvel para eluição da torularrodina. Como mostra a Figura 2, não houve eluição deste carotenóide utilizando a fase móvel 2 sem acondicionamento da coluna com metanol. Possivelmente, a formação de pontes de hidrogênio entre o grupo carboxílico da torularrodina e o metanol, justifique tal comportamento cromatográfico.

Recentemente, os carotenóides de *Rhodotorula glutinis* foram separados por CLAE em coluna de C₁₈ ^{8, 13, 16, 17}, porém em apenas um trabalho o cromatograma foi apresentado¹⁷. Em estudo com cepa de *R. rubra* ¹⁸, apesar de não identificar nenhum pigmento, foi apresentado um cromatograma parcial de CLAE, além do espectro de massas e UV/visível do principal pigmento produzido por esta linhagem de levedura.

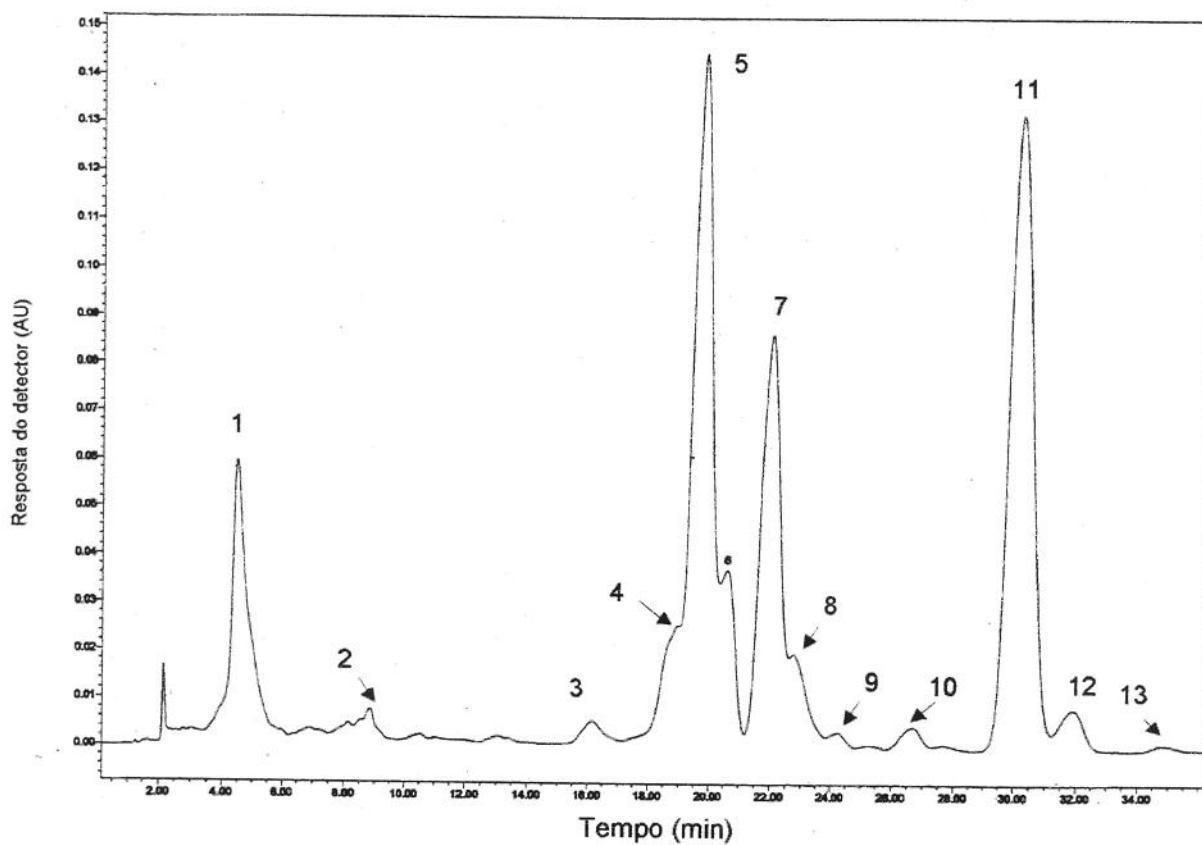


Figura 1. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. glutinis*. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4μm, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C.

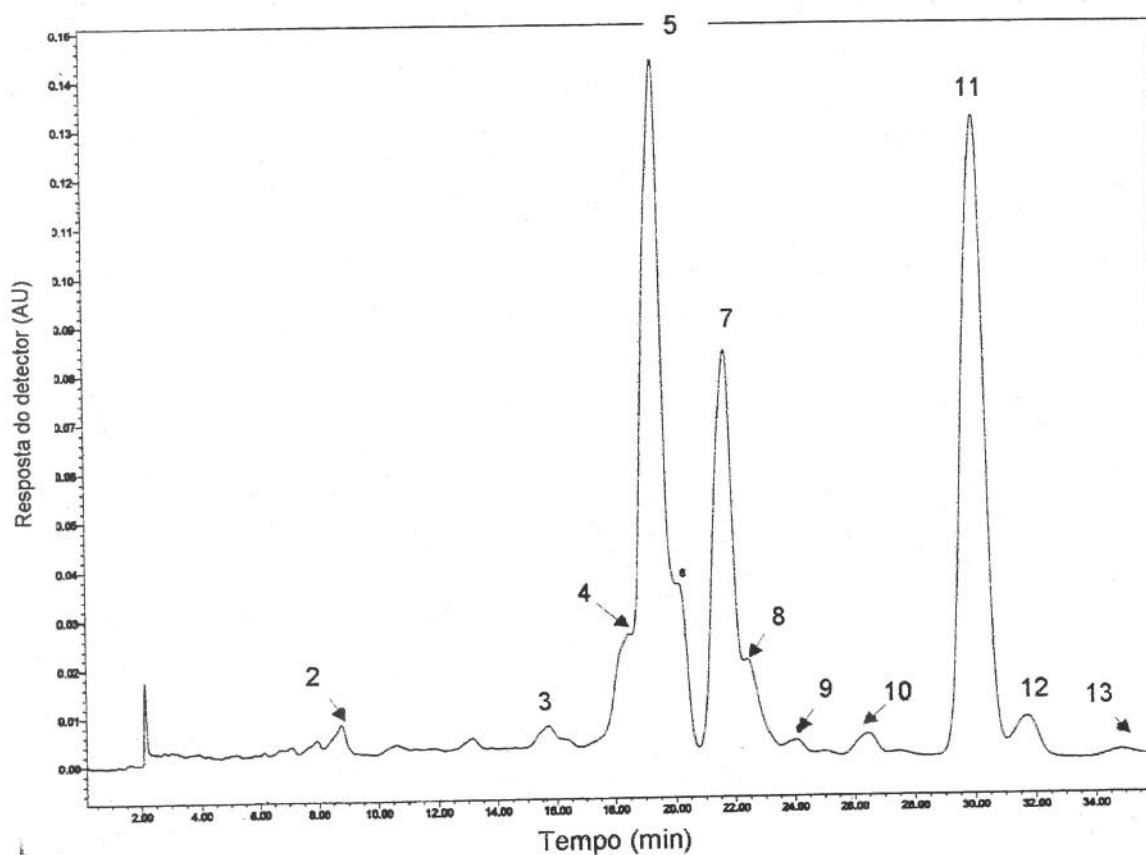


Figura 2. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. glutinis*. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4μm, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10) (sem condicionamento com metanol), fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C.

Avaliação

O coeficiente de variação (CV) entre injeções foi de 0,9% para torularrodina, 1,9% para 16-hidróxi-toruleno, 1,0% para toruleno, 1,5% para γ -caroteno e 0,7% para β -caroteno. Como esperado, o coeficiente de variação entre extrações foi maior, sendo 3,5% para torularrodina, 1,1% para 16-hidróxi-toruleno, 6,2% para toruleno, 4,3% para γ -caroteno e 4,5% para β -caroteno.

A recuperação do β -caroteno foi de 96% no nível de menor concentração e 97% no nível de maior concentração. A recuperação da torularrodina foi de 94% no nível de menor concentração e de 83% no nível de maior concentração.

Os valores de CV estão bem abaixo dos relatados na literatura para carotenóides de frutas ^{26 - 28}, cenoura ²⁹ e vegetais ³⁰; e a recuperação de β -caroteno está na faixa descrita ²⁶. Portanto, o método desenvolvido foi exato e reprodutível.

Composição de carotenóides das linhagens de *Rhodotorula*

O perfil de carotenóides foi semelhante para as cinco cepas, apresentando como carotenóides majoritários β -caroteno, toruleno e torularrodina. A Figura 1 apresenta o cromatograma de *R. glutinis*, sendo que a identidade dos picos e algumas características encontram-se na Tabela 1. A eluição em fase normal, na coluna de alumina, confirmou a identificação apresentada na Tabela 1.

O carotenóide correspondente ao pico 2 que eluiu que próximo ao padrão de 3',4'-dideidro-1',2'-diidro- β,ψ -caroten-1-ol, apresentou espectro de absorção no UV/visível similar ao do toruleno, sugerindo duas possibilidades de identificação presuntiva: 3',4'-dideidro- β,ψ -caroten-3-ol ou 3',4'-dideidro- β,ψ -caroten-16-ol. Como este último carotenóide já havia sido identificado em *R. aurantiaca* e *R. muscilaginosa* (linhagem selvagem e mutante)³¹, o carotenóide correspondente ao pico 2 foi tentativamente identificado como 3',4'-dideidro- β,ψ -caroten-16-ol (16-hidróxi-toruleno) no presente trabalho.

É interessante ressaltar a presença de isômeros *cis* de todos os carotenóides em todas as linhagens analisadas. Apesar da forma *trans* possuir maior estabilidade, a presença de isômeros *cis* pode ser justificada pelo cultivo ter sido realizado sob intensa iluminação, uma vez que é amplamente conhecido que a luz é um dos principais catalisadores na reação de isomerização de carotenóides.

Os carotenóides principais torularrodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno detectados neste trabalho são característicos deste gênero³². Os carotenóides minoritários detectados no presente trabalho ζ -caroteno, β -zeacaroteno, neurosporeno e fitoeno são intermediários da via biossintética¹⁰.

Entretanto, Perrier *et al.*⁸, em estudos com leveduras do gênero *Rhodotorula*, identificaram tentativamente, além dos carotenóides principais (exceção de γ -caroteno), plectanixantina e β -carotenona.

Tabela 1. Características dos principais carotenóides de *Rhodotorula*.

nº do pico ^a	carotenóides	t _r (minutos) ^b	λ max (nm) ^c	% II/III
1	torularrodina	4,0 - 4,6	387, (465), 492, 524	21
2	16-hidróxi-toruleno	8,8 - 9,2	381, (460), 487, 520	31
3	não identificado	15,9 - 16,6	374, (450), 476, 506	29
4	neurosporeno	18,3 - 18,9	415, 442, 471	130
5	toruleno	19,6 - 20,4	381, (460), 488, 521	54
6	cis-toruleno	20,5 - 22,0	378, (456), 482, 513	36
7	γ-caroteno	21,9 - 23,0	(436), 464, 493	60
8	cis-γ-caroteno	22,4 - 23,6	350, (432), 460, 488	50
9	ζ-caroteno	24,5 - 25,9	376, 398, 422	100
10	zeacaroteno	26,9 - 28,3	(406), 430, 456	57
11	β-caroteno	30,2 - 31,6	(430), 454, 481	25
12	cis-β-caroteno	31,9 - 33,3	340, (423), 448, 471	86
13	fitoeno	35,0 - 36,0	(275), 287, 302	0

^a Numeração de acordo com o cromatograma da Figura 1.

^b Faixa de 10 corridas.

^c Solvente acetonitrila/ metanol/ acetato de etila (75:15:10), parênteses refere-se a ombro espectral.

A produção dos principais carotenóides de *R. glutinis* em incubador rotativo durante 5 dias está apresentada na Figura 3. Pode-se observar que γ -caroteno se manteve constante a partir do segundo dia, enquanto que a concentração do β -caroteno, toruleno e torularrodina aumentaram consideravelmente após o terceiro dia, confirmando o γ -caroteno como ponto de ramificação da biossíntese de carotenóides destas leveduras^{10, 11}. O crescimento celular atingiu o máximo no segundo dia de cultivo.

A composição dos carotenóides de seis cultivos de *R. glutinis* está apresentada na Tabela 2. Nos cultivos 5 e 6, as quantidades dos principais carotenóides de *R. glutinis* foram menores do que nos cultivos 1, 2, 3 e 4. A utilização de diferentes lotes de caldo YM foi, possivelmente, a causa destas diferenças.

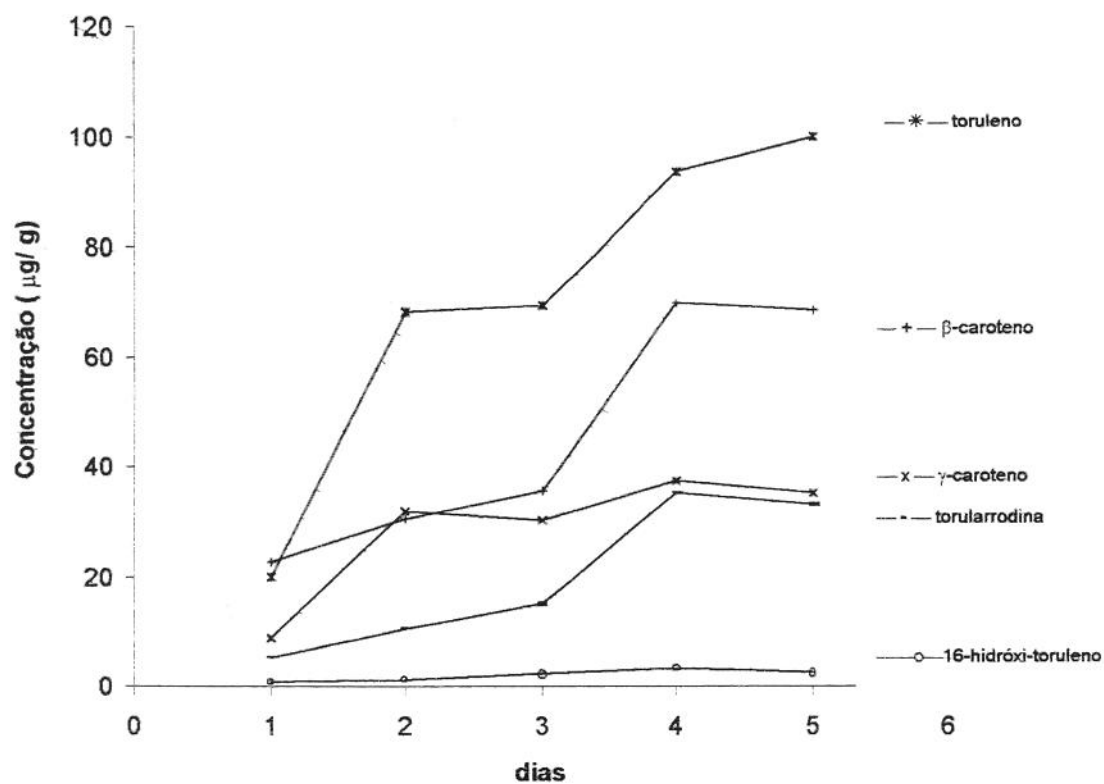


Figura 3. Produção dos principais carotenóides por *R. glutinis*.

Tabela 2. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em *R. glutinis*.

Carotenóides	Cultivos					
	1 ^{a c}	2 ^{a c}	3 ^{b c}	4 ^{b c}	5 ^{b d}	6 ^{b d}
torularrodina	33,2 $\pm$ 1,6	33,1 $\pm$ 0,3	26,0 $\pm$ 3,5	23,9 $\pm$ 1,3	24,2	35,1
16-hidróxi-toruleno	2,6 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,3	2,5	2,8
toruleno + neurosporeno	111,6 $\pm$ 4,2	99,7 $\pm$ 2,7	108,1 $\pm$ 7,5	109,5 $\pm$ 8,9	30,9	43,2
γ -caroteno	34,1 $\pm$ 1,2	35,1 $\pm$ 1,6	48,5 $\pm$ 4,0	39,8 $\pm$ 2,0	10,3	15,5
β -caroteno	69,9 $\pm$ 0,6	68,2 $\pm$ 1,1	66,4 $\pm$ 3,8	62,6 $\pm$ 2,0	39,3	49,0
total _{CLAE}	251,3 $\pm$ 7,7	238,6 $\pm$ 5,9	251,7 $\pm$ 19,5	238,5 $\pm$ 14,6	107,2	145,6
total _{coef. toruleno}	-	-	224,2 $\pm$ 12,6	223,3 $\pm$ 9,7	101,0	119,8
total _{coef. β caroteno}	-	-	266,5 $\pm$ 14,5	262,7 $\pm$ 8,5	126,9	151,2

^a Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 1.

^b Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 2.

^c Cultivos extraídos e injetados em duplicata.

^d Cultivo extraído e injetado uma única vez.

-: não determinado.

O total de carotenóides assim como as quantidades relativas dos pigmentos individuais podem variar em função da cepa e das inúmeras variáveis do processo de cultivo. As porcentagens de torularrodina (de 10 a 24%), toruleno (de 29 a 44%), γ -caroteno (de 10 a 17%) e β -caroteno (de 26 a 37%) em *R. glutinis*, obtidas no presente estudo apresentaram concordância com outros estudos utilizando meios de cultivo de leveduras comuns em laboratórios de microbiologia, que apresentaram para os respectivos carotenóides citados teores variando de 24 a 29%, 27 a 37%, 9 a 12% e 15 a 27% ^{10, 12}.

São encontrados na literatura dois tipos de perfis de carotenóides para *R. glutinis*, com altos níveis de torularrodina, acima de 55% ^{12, 13, 14, 15, 16}, ou com níveis deste pigmento abaixo de 40% ^{10, 11, 12, 17}, sendo que Nan *et al.* ¹⁷, obtiveram níveis de 2% deste pigmento.

O total de carotenóides da *R. glutinis* foi próximo ao obtido por Simpson *et al.* ¹⁰ utilizando substratos microbiológicos (235,2 e 256,7 $\mu\text{g/g}$) e também ao total reportado por Frengova *et al.* ¹⁵ em soro de leite (248,0 $\mu\text{g/g}$). Porém, o total produzido por esta cepa no presente estudo foi menor que o obtido por Peterson *et al.* ¹² (332,0 e 494,0 $\mu\text{g/g}$) e maiores que os obtidos por Perrier *et al.* ⁸ (70 $\mu\text{g/g}$) e Nan *et al.* ¹⁷ (79,5 $\mu\text{g/g}$), também utilizando meios comuns de cultivo de leveduras.

A Tabela 3 apresenta a composição para *R. rubra*, cujos resultados foram concordantes para as porcentagens dos pigmentos torularrodina (49%) , toruleno (40%), γ -caroteno (2%) e β -caroteno (8%) com o estudo de Peterson *et al.* ¹² que apresentou, respectivamente, 49%, 28%, 9% e 15%. O total de pigmentos por peso seco obtido no presente trabalho foi próximo aos totais obtidos de linhagens de *R. rubra* cultivadas em salmoura produzida na fermentação do repolho (130 e 100 $\mu\text{g/g}$) ⁵, em melaço (146 $\mu\text{g/g}$) ³³ e em substratos comercialmente disponíveis (187,7 $\mu\text{g/g}$) ¹².

Tabela 3. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em *R. rubra*.

Carotenóides	Cultivo 1 ^{a,c}	Cultivo 2 ^{b,c}	Cultivo 3 ^{b,c}	Cultivo 4 ^{b,d}
torularrodina	82,1 $\pm$ 3,2	75,2 $\pm$ 3,7	63,3 $\pm$ 7,8	67,7
16-hidróxi-toruleno	2,6 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,4	1,8
toruleno + neurosporeno	74,5 $\pm$ 1,6	87,2 $\pm$ 2,7	40,9 $\pm$ 5,0	58,1
γ -caroteno	2,1 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,3	1,4
β -caroteno	12,0 $\pm$ 0,6	13,3 $\pm$ 0,2	15,9 $\pm$ 1,9	11,4
total _{CLAE}	173,3 $\pm$ 5,5	182,0 $\pm$ 7,4	123,5 $\pm$ 14,9	139,5
total _{coef. toruleno}	-	208,3 $\pm$ 1,5	110,6	117,5
total _{coef. β caroteno}	-	206,8 $\pm$ 1,1	128,1	131,2

^a Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 1.

^b Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 2.

^c Cultivos extraídos e injetados em duplicata.

^d Cultivo extraído e injetado uma única vez.

-: não determinado.

A composição de carotenóides de um cultivo de *R. minuta* e de dois cultivos de *R. lactosa* e de *R. araucariae* está apresentada na Tabela 4.

Em relação a *R. minuta*, as porcentagens relativas obtidas neste trabalho para torularrodina (34%) , toruleno (46%), γ -caroteno (5%) e β -caroteno (14%), foram similares às relatadas previamente por Peterson *et al.*¹² (38%, 41%, 7% e 14% para os respectivos carotenóides). O total de carotenóides obtido para esta cepa no presente trabalho (104 $\mu\text{g/g}$) foi próximo ao reportado por Peterson *et al.*¹², de 93,4 $\mu\text{g/g}$ de massa seca, para a mesma espécie de levedura. Porém, o total de carotenóides obtido no presente trabalho foi maior e o conteúdo de β -caroteno menor (14 $\mu\text{g/g}$), que os teores relatados por Perrier *et al.*⁸, de 40 $\mu\text{g/g}$ e 25 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, respectivamente.

A quantidade de β -caroteno de *R. araucariae* obtida no presente estudo foi próxima da determinada por Perrier *et al.*⁸ (30 $\mu\text{g/g}$ peso seco), entretanto obtivemos o dobro do total de carotenóides em comparação com este estudo.

A cepa *R. lactosa* avaliada no presente trabalho apresentou cerca de um terço do conteúdo de β -caroteno e um total de carotenóides um pouco superior aos teores encontrados por Perrier *et al.*⁸ de 55 e 75 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. O valor do total de carotenóides desta levedura cultivada em soro de leite foi de 86,7 $\mu\text{g/g}$ de células secas¹³, resultado bastante próximo ao apresentado neste trabalho (Tabela 4).

Tabela 4. Composição de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) em *R. araucariae*, *R. lactosa* e *R. minuta*.

Carotenóides	<i>R. araucariae</i>		<i>R. lactosa</i>		<i>R. minuta</i>
	Cultivo 1 ^{a c}	Cultivo 2 ^{b c}	Cultivo 1 ^{a c}	Cultivo 2 ^{b c}	Cultivo 1 ^{a c}
torularrodina	27,6 $\pm$ 0,5	31,5 $\pm$ 24	21,1 $\pm$ 0,9	23,8 $\pm$ 0,3	35,6 $\pm$ 0,8
16-hidróxi-toruleno	1,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1
toruleno + neurosporeno	43,3 $\pm$ 4,6	49,3 $\pm$ 1,4	51,0 $\pm$ 2,4	56,8 $\pm$ 2,1	47,4 $\pm$ 4,7
γ -caroteno	2,5 $\pm$ 0,0	6,2 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1
β -caroteno	17,3 $\pm$ 0,8	24,6 $\pm$ 0,5	15,9 $\pm$ 0,3	17,5 $\pm$ 0,2	14,2 $\pm$ 1,7
total _{CLAE}	91,7 $\pm$ 6,1	113,2 $\pm$ 4,7	91,4 $\pm$ 3,6	105,8 $\pm$ 2,9	103,7 $\pm$ 7,4
total _{coef. toruleno}	-	127,7 $\pm$ 1,6	-	104,8 $\pm$ 2,5	-
total _{coef. β caroteno}	-	140,4 $\pm$ 1,1	-	109,6 $\pm$ 1,1	-

^a Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 1.

^b Separação cromatográfica utilizando a fase móvel 2.

^c Cultivos extraídos e injetados em duplicata.

-: não determinado.

Das cepas avaliadas, *R. glutinis* foi a que apresentou a maior quantidade de carotenóides por peso seco, vindo a *R. rubra* em seguida. As cepas apresentaram diferenças quantitativas marcantes para os principais pigmentos. A porcentagem dos pigmentos individuais variou em média para a torularrodina de 15% em *R. glutinis* até 47% em *R. rubra*, para o toruleno de 40% em *R. glutinis* até 55% em *R. lactosa*, para o γ -caroteno de 1% na *R. rubra* até 15% em *R. glutinis* e para o β -caroteno de 8% em *R. rubra* até 30% em média em *R. glutinis*.

Os resultados demonstraram que, além do método de análise ser preciso, os cultivos foram bem controlados e reproduzidos, uma vez que a diferença do total de carotenóides entre cultivos foi de cerca de 5% (cultivos 1 a 4) e 15% (cultivos 5 e 6) de *R. glutinis*, 15% para os quatro cultivos de *R. rubra* (em diferentes lotes de meios), 10% nos cultivos de *R. araucariae* e 7% em *R. lactosa*. Todos os pigmentos quantificados apresentaram-se ao redor da média com um intervalo de confiança de 90%.

O coeficiente de extinção do β -caroteno ($E^{1\%}_{450\text{ nm}} = 2592$)²³ parece ser mais apropriado para a estimativa do total de carotenóides, já que com o coeficiente de extinção do toruleno, obtiveram-se valores de total de carotenóides menores que os obtidos por CLAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krinsky, N. I.; *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 1003
2. Meyers S. P.; *Pure Appl. Chem.* **1994**, 66, 1069.
3. Johnson E. A.; Schroeder, W.A.; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1995**, 53, 119.
4. Kester, A. S.; *J. Chromatog.* **1984**, 310, 372.
5. Shih C.T.; Hang, Y.D.; *Lebensm. Wiss. Technol.* **1996**, 29, 570.
6. Martelli, H. L.; Silva, I. M.; Souza, N. O.; Pomeroy, D.; *Biotechnol. Lett.* **1990**, 12, 207.
7. Matelli. H.; Silva, I. M. *Meth. Enzymol.* **1993**, 214, 386.
8. Perrier, V.; Dubreucq, E.; Gayzy, P.; *Arch. Microbiol.* **1995**, 168, 173.
9. Martin, A.M.; Lu, C.; Patel, T.R.; *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, 75, 321.
10. Simpson, K. L.; Nakayama, T. O. M.; Chichester, C. O.; *J. Bacteriol.* **1964**, 88, 1688.
11. Hayman, E. P.; Yokoyama, H.; Chichester, C.; Simpson, K. L.; *J. Bacteriol.* **1974**, 120 1339.
12. Peterson, W. J.; Lecce, E. E.; Bell, T. A.; Etchells, J. L.; *J. Bacteriol.* **1958**, 75, 586.
13. Frengova, G. I.; Simova, E. D; Pavalova, K.; Beshkova, D. M.; Grigorova, D.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 44, 888.
14. Frengova, G. I.; Simova, E. D.; Beshkova, D. M.; *Biotechnol. Lett.* **1995**, 17 1001.
15. Frengova, G.; Simova, E.; Beshkova, D.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 18, 272.
16. Buzzini, P.; Martini, A.; *Biores. Technol.* **2000**, 71, 41.
17. Nan, H. S.; Cho, S. Y.; Rhee, J. S.; *J. Chromatog.* **1988**, 448, 445.
18. Hari, R. P. K.; Patel, T.; Martin, A.; *J. Ind. Microbiol.* **1992**, 11, 43.
19. Haard, N. F.; *Biotechnol. Lett.* **1988**, 10, 609.

-
20. Sedmak, J. J.; Weerasinghe, D. K.; Jolly, S. O.; *Biotechnol. Tec.* **1990**, 4, 107.
 21. Johnson, E. A.; Villa, T. G.; Lewis, M. J.; Phaff, H. J.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, 35, 1155.
 22. Okagbue, R. N.; Lewis, M. J.; *Biotechnol Lett.* **1984**, 6, 247.
 23. Davies, B. H.; *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*; Academic Press; New York, 1976; p.31.
 24. Britton, G. In: *Carotenoids*; Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Ed.; Birkhäuser; Basel, 1995; p.13.
 25. Parajó, J. C.; Santos, V.; Vazquez, M.; *Proc. Biochem.* **1998**, 33, 181.
 26. Assunção, R. B.; Mercadante, A. Z.; (em preparação), **2000**
 27. Hamano, P. S. & Mercadante, A. Z. ; *Food Comp. Anal.* **2000**, (submetido)
 28. Mercadante, A. Z.; Rodriguez-Amaya, D. B. & Britton, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 120.
 29. Bushway, R. J.; Wilson, A. M.; *Can. Inst. Food. Sci. Technol.* **1982**, 15, 165.
 30. Scott, K. J.; Finglas, P. M.; Seale, R.; Hart, D. J.; Froidmont-Görtz, I.; *Food Chem.* **1996**, 57, 85.
 31. Bonaly, R.; Malenge, J. P.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1968**, 164, 306.
 32. Simpson, K. L.; Chichester, C. O.; Phaff, H. J. In: *The Yeast*; Rose, A. H.; Harrison, J. S. Ed.; Academic Press; New York, 1971; p. 493.
 33. Bhuyan, J. U.; Rahman, M.; Ahmad, K.; *J. Banglad. Acad. Sci.* **1985**, 9, 67.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DE NICOTINA E DIFENILAMINA NA COMPOSIÇÃO DE CAROTENÓIDES DE *Rhodotorula* *glutinis* e *R. rubra*

Em preparação para submissão à revista *Brazilian Archives of Biology and Technology*.

ABSTRACT

Carotenoids are ubiquitous natural colored compounds that possess varied functions and actions in all kind of organisms. The carotenoids play important roles for human beings such as the well-known vitamin A activity, enhancement of the immune response, and decreased risk of cataracts, age-related macular degeneration and cancer. There is a biotechnological interest on the genus *Rhodotorula* because of its ability to synthesize carotenoids such as torularhodin, torulene and β -carotene. In order to obtain commercial interesting carotenoid profiles, the effect of supplementation of diphenylamine and nicotine in *R. rubra* and *R. glutinis* medium cultures was studied. Fermentation experiments were carried out in flasks with YM broth supplemented with 10g/L of glucose, incubated in shaker at 150 rpm for 5 days, at 28°C under fluorescent illumination. The carotenoids were extracted with ethyl acetate by physical disruption and analyzed by HPLC on a reversed-phase column. On sub-inhibitory levels, both inhibitors presented no effect on the yeast growth for both strains. *R. rubra* produced more carotenoids when 5 and 10 μ mol of diphenylamine, and 15 and 20 mmol of nicotine were added in the broth. In both strains, the supplementation of diphenylamine in the culture medium caused significant reduction of the torularhodin/torulene ratio and at 10 μ mol of this inhibitor an accumulation of β -carotene occurred. The culture supplementation with nicotine produced a selective biosynthesis of lycopene and the formation of a minor carotenoid identified as didehydrolycopene, which has not been previously found in *Rhodotorula*.

INTRODUÇÃO

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química e a extração a partir de plantas. Atualmente, a produção de carotenóides por via biotecnológica é pequena, devido ao alto custo deste tipo de abordagem. A conotação natural dos processos biotecnológicos e a possibilidade de síntese de compostos estéreo-específicos fazem com que exista um mercado em potencial para este tipo de fonte de pigmentos. A demanda por carotenóides com estrutura mais complexa pode futuramente ser suprida por via biotecnológica.

A principal via biossintética dos carotenóides é a partir do mevalonato, pela via metabólica geral dos terpenóides. A formação do primeiro caroteno hidrocarboneto de 40 átomos de carbono, o fitoeno, é uma condensação cabeça-cabeça de duas moléculas do intermediário de 20 átomos de carbono, pirofosfato de geranilgeranila, que é formado a partir de condensações cabeça-cauda de quatro unidades isoprenóides ativadas.

A maioria dos carotenóides é derivada do fitoeno, que possui três ligações duplas conjugadas (d.l.c.), através de três reações de desidrogenação resultando na formação de neurosporeno (nove d.l.c.). O neurosporeno pode ciclizar tanto para α -zeacaroteno como para β -zeacaroteno, ou ainda sofrer dessaturações para formação de licopeno (onze d.l.c.) a partir do qual a cadeia é ciclizada para formar o γ -caroteno (Britton, 1998).

Em *Rhodotorula glutinis* podem ocorrer as duas vias de ciclização, tendo tanto o licopeno como o β -zeacaroteno com precursores. O licopeno não é encontrado nestas leveduras em condições normais de crescimento porque a atividade enzimática para ciclização do neurosporeno é maior que a sua atividade de desidrogenação do neurosporeno (Hayman *et al.*, 1974).

A principal via de biossíntese de carotenóides em *R. glutinis* foi primeiramente proposta por Simpson *et al.* (1964) (Figura 1). Apesar do torularrodinaldeído, ter sido isolado em *R. mucilaginoso* e *R. aurantiaca* uma única vez (Bonaly & Malenge, 1968), este carotenóide foi sugerido como intermediário, por analogia com outros processos metabólicos (Britton, 1998).

Substâncias químicas que apresentam a habilidade de inibir vias biossintéticas têm sido há muito tempo utilizadas na identificação da seqüência de reações e elucidação dos mecanismos de reação. De maneira geral, os inibidores de biossíntese podem atuar por vários mecanismos como inibição direta do sítio ativo, efeito alostérico (reversível ou irreversível), alteração na regulação da expressão gênica, bloqueio de processos essenciais ou na disponibilidade de cofatores, entre outros (Britton, 1998).

A difenilamina bloqueia a seqüência de reações de dessaturação em microrganismos levando ao acúmulo de fitoeno, acompanhado de outros carotenóides saturados normalmente ausentes (Britton *et al.*, 1977). A nicotina age inibindo as reações da ligação dupla entre o C-1 e C-2 dos carotenóides, como as reações de ciclização (Howes & Batra, 1970; Britton *et al.*, 1977). A hidrogenação entre C-1 e C-2, que possivelmente apresenta mecanismo de reação similar à reação de hidratação, também pode ser suscetível à inibição por nicotina e 2-(4-clorofeniltio)-triethylamina (CFTA) (Britton *et al.*, 1977).

São raros os estudos sobre a utilização de inibidores específicos da biossíntese de carotenóides em linhagens de *Rhodotorula*. A carotenogênese em *R. glutinis* foi estudada utilizando o inibidor de reações de ciclização CFTA (Hayman *et al.*, 1974), e os inibidores de desidrogenação metilheptanona, β -ionona (Simpson *et al.*, 1964) e difenilamina (Hayman *et al.*, 1974). Em *R. muscilaginosa*, a composição de carotenóides foi avaliada em cultivos contendo difenilamina e outros compostos como etanol, isopropanol e cloranfenicol em concentrações sub-inibitórias (Margalith & Meydav, 1968). A suplementação de nicotina no cultivo de leveduras do gênero *Rhodotorula* ainda não foi relatada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações químicas dos carotenóides das leveduras heterobasidiomicetes *R. rubra* e *R. glutinis*, sob o efeito de nicotina e difenilamina em concentrações sub-inibitórias, visando a obtenção de perfis de carotenóides com maior interesse comercial.

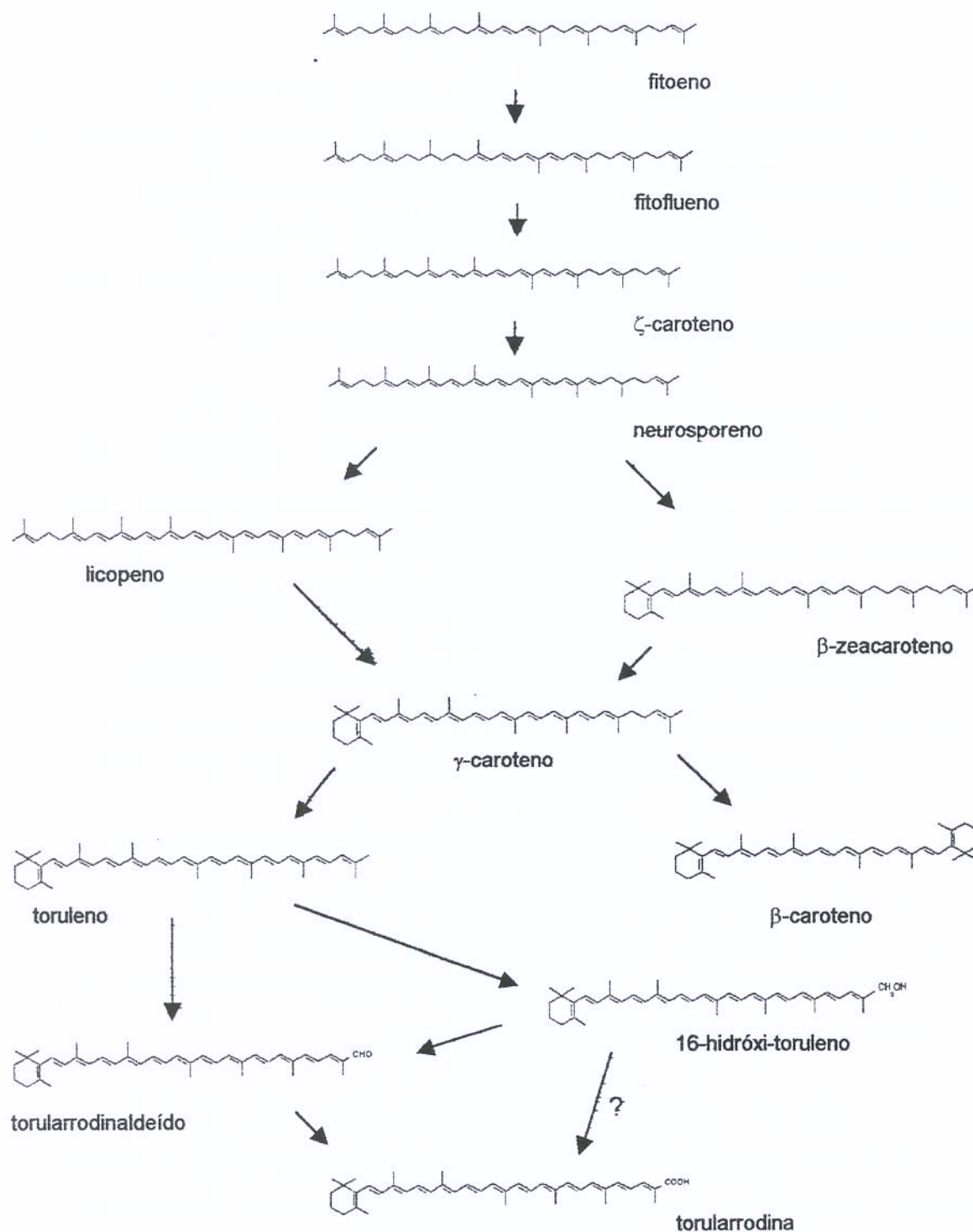


FIGURA 1. Via biossintética dos carotenóides de *R. glutinis*. Adaptado de Simpson *et al.* (1964); Bonaly & Malenge (1968) e Hayman *et al.* (1974) e com exceção da etapa destacada com “?”.

MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem de levedura *Rhodotorula glutinis* (CCT 2186) foi gentilmente cedida pela Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello” e a linhagem de *R. rubra* foi obtida da coleção do Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Estas duas linhagens foram escolhidas por apresentarem a mesma composição qualitativa de carotenóides, mas com diferenças marcantes nas quantidades absolutas dos mesmos.

As cepas foram mantidas por repiques mensais em meios inclinados em tubos de ensaio contendo meio YM (Difco). Frascos Erlenmeyer (1000 mL), contendo 100 mL de meio líquido YM (Difco), foram inoculados com uma quantidade de leveduras de 1×10^7 células obtidas da cultura em meio sólido, e foram incubados a 150 rpm sob temperatura de 28°C durante 24 horas.

Para cada linhagem, frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 100 mL de meio YM acrescido de 10g/L de glicose foram inoculados com a suspensão de leveduras descrita acima, correspondendo a 10% do volume total do cultivo.

As concentrações de nicotina utilizadas no meio de cultivo foram de 5, 10, 15 e 20 mM, e para a difenilamina foram de 1, 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µM. Segundo Britton (1998), estas seriam as concentrações recomendadas para estudos em microrganismos, sendo também as utilizadas em estudos anteriores em *Phaffia rhodozyma* (Santopietro & Kula, 1998).

As culturas com inibidores e os controles (sem adição de inibidores) foram incubados à temperatura de 28°C a 150 rpm de agitação sob iluminação com lâmpada fluorescente em incubador rotativo (Psychrotherm, New Brunswick) por cinco dias. A separação da biomassa, extração e análise dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência foram executados segundo a metodologia descrita por Squina *et al.* (2001). Os carotenóides dideidroliscopeno, fitoflueno e neurosporeno foram expressos como licopeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente foram determinadas as concentrações de inibidores capazes de alterar a biossíntese dos carotenóides, mas que não causassem efeitos deletérios sobre o crescimento das leveduras.

Concentrações acima de 10 μmol de difenilamina causaram uma diminuição no crescimento das leveduras (Tabela 1), sendo que nas concentrações de 50 e 100 μmol o crescimento foi totalmente inibido nas duas linhagens estudadas. Para *R. muscilaginosa* a difenilamina em concentrações sub-inibitórias (5 μmol) não inibiu o crescimento celular (Margalith & Meydav, 1968), sendo que em *Phaffia rhodozyma* somente concentrações acima de 60 μmol desta substância inibiram o crescimento da levedura (Santopietro & Kula, 1998).

A nicotina praticamente não afetou o crescimento das leveduras nas condições estudadas (Tabela 2). Em *P. rhodozyma*, este inibidor também praticamente não apresentou efeito deletério (Girard *et al.*, 1994; Santopietro & Kula, 1998).

O total de carotenóides de *R. rubra* foi maior nos cultivos com nicotina e difenilamina em comparação com o controle, sendo que o total de carotenóides por peso seco de leveduras foi sensivelmente maior para a cepa *R. rubra* com 5 e 10 μmol de difenilamina no meio de cultivo (Tabela 2).

O aumento da produção de carotenóides também foi observado em outros estudos com inibidores em *Phaffia rhodozyma* (Santopietro & Kula, 1998) e em *Dunaliella bardawil* (Shaish *et al.*, 1990). Segundo Britton (1998), não é incomum a inibição de uma reação em particular ser acompanhada por um efeito estimulatório na biossíntese de carotenóides como um todo. O aumento do total de carotenóides causado por inibidores deve-se ao relaxamento do "feedback" negativo causado pelos produtos finais (Bejarano & Cerda-Olmedo, 1989; Clarke *et al.*, 1983; Fan *et al.*, 1995).

TABELA 1. Biomassa seca e total de carotenóides de *R. rubra* e *R. glutinis* em função da concentração de difenilamina adicionada ao meio de cultivo.

Cepas		Difenilamina					
		Controle	1 μmol	5 μmol	10 μmol	15 μmol	25 μmol
<i>R. glutinis</i>	biomassa (g/L)	10,0	10,2	10,0	9,2	9,0	4,2
	total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)*	126,9	121,6	79,2	48,0	-	-
<i>R. rubra</i>	biomassa (g/L)	8,9	8,4	8,2	6,0	5,0	3,5
	total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)*	128,1	120,1	172,5	158,6	55,3	-

-: Não houve produção de carotenóides.

* coeficiente do β -caroteno.

TABELA 2. Biomassa seca e total de carotenóides de *R. rubra* e *R. glutinis* em função da concentração de nicotina adicionada ao meio de cultivo.

Cepas		Nicotina				
		Controle	5 mmol	10 mmol	15 mmol	20 mmol
<i>R. glutinis</i>	biomassa (g/L)	10,2	10,1	9,7	8,3	8,6
	total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)*	151,2	128,1	120,4	92,6	120,4
<i>R. rubra</i>	biomassa (g/L)	8,4	8,3	7,5	7,0	6,8
	total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$)*	131,2	117,3	123,5	151,2	150,4

* coeficiente do β -caroteno.

Porém, este efeito estimulatório na produção de carotenóides, por peso seco de leveduras, dos dois inibidores não foi observado no presente trabalho para *R. glutinis* (Tabelas 1 e 2). Resultados semelhantes, com inibidores de desidrogenação, também foram relatados para *R. glutinis* por Simpson *et al.*, (1964) e em *R. mucilaginosa* por Margalith & Meydav (1968).

Os efeitos na composição de carotenóides da adição de difenilamina ao meio de cultivo estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. A Figura 2 mostra o cromatograma de *R. rubra* em cultivo controle e o da Figura 3 o cultivo desta mesma cepa em meio com 5 μ mol de difenilamina, concentração esta que causou maiores alterações no perfil de carotenóides.

Tabela 3. Efeito da adição de difenilamina na composição de carotenóides de *R. rubra*.

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de massa seca)				
	controle ^a	1 μmol^b	5 μmol^a	10 μmol^b	15 μmol^b
torularrodina(1)	63,3 $\pm$ 7,8	47,2	35,7 $\pm$ 12,2	24,1	1,5
16-hidróxi-toruleno	2,2 $\pm$ 0,4	1,7	2,6 $\pm$ 0,1	5,8	0,8
toruleno + neurosporeno (2)	40,9 $\pm$ 5,0	40,8	69,9 $\pm$ 17,7	18,2	3,3
γ -caroteno	1,2 $\pm$ 0,3	1,1	6,1 $\pm$ 1,3	13,2	3,4
β -caroteno	15,9 $\pm$ 1,9	15,9	38,8 $\pm$ 4,2	52,5	12,3
fitoeno ^c	1,0	1,9	2,3	3,6	7,1
relação _{1/2}	1,5	1,15	0,4	1,3	0,5
total _{CLAE}	123,5 $\pm$ 14,9	106,7	153,2 $\pm$ 35,6	114,3	21,3
total _{β-caroteno}	128,1 $\pm$ 22,9	120,1	172,5 $\pm$ 28,6	158,6	55,3

^a Cultivos extraídos e injetados em duplicata.

^b Cultivo extraído e injetado uma única vez.

^c Proporção de fitoeno em relação ao cultivo controle considerado 1.

Tabela 4. Efeito da adição de difenilamina na composição de carotenóides de *R. glutinis*.

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de massa seca)			
	controle ^a	1 μmol^a	5 μmol^a	10 μmol^a
torularrodina (1)	24,2	19,2	8,4	1,6
16-hidróxi-toruleno	2,5	2,1	1,9	0,6
toruleno + neurosporeno (2)	30,9	31,6	17,6	4,8
γ -caroteno	10,3	11,1	11,6	4,5
β -caroteno	39,3	39,0	21,5	9,2
fitoeno ^b	1,0	1,2	1,6	2,1
relação _{1/2}	0,8	0,6	0,5	0,3
total CLAE	107,0	103,1	61,0	20,7
total β -caroteno	126,9	121,6	79,2	47,6

^a Cultivo extraído e injetado uma única vez.

^b Proporção de fitoeno em relação ao cultivo controle considerado 1.

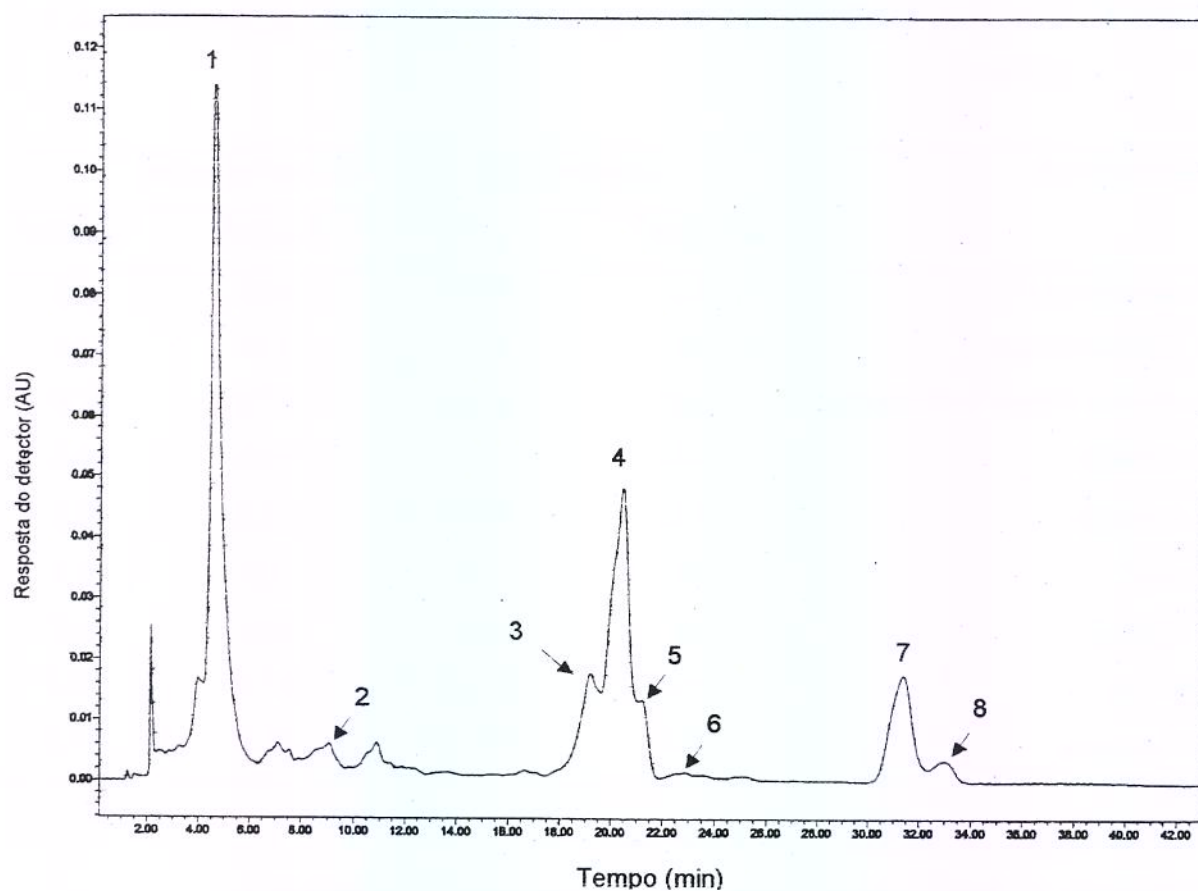


Figura 2. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. rubra* em cultivo em caldo YM. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μm, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C. Processados em 480 nm. Identidade dos picos: (1) torularrodina, (2) hidróxi-toruleno, (3) neurosporeno + toruleno, (4) toruleno, (5) *cis*-toruleno, (6) γ-caroteno, (7) β-caroteno, (8) *cis*-β-caroteno.

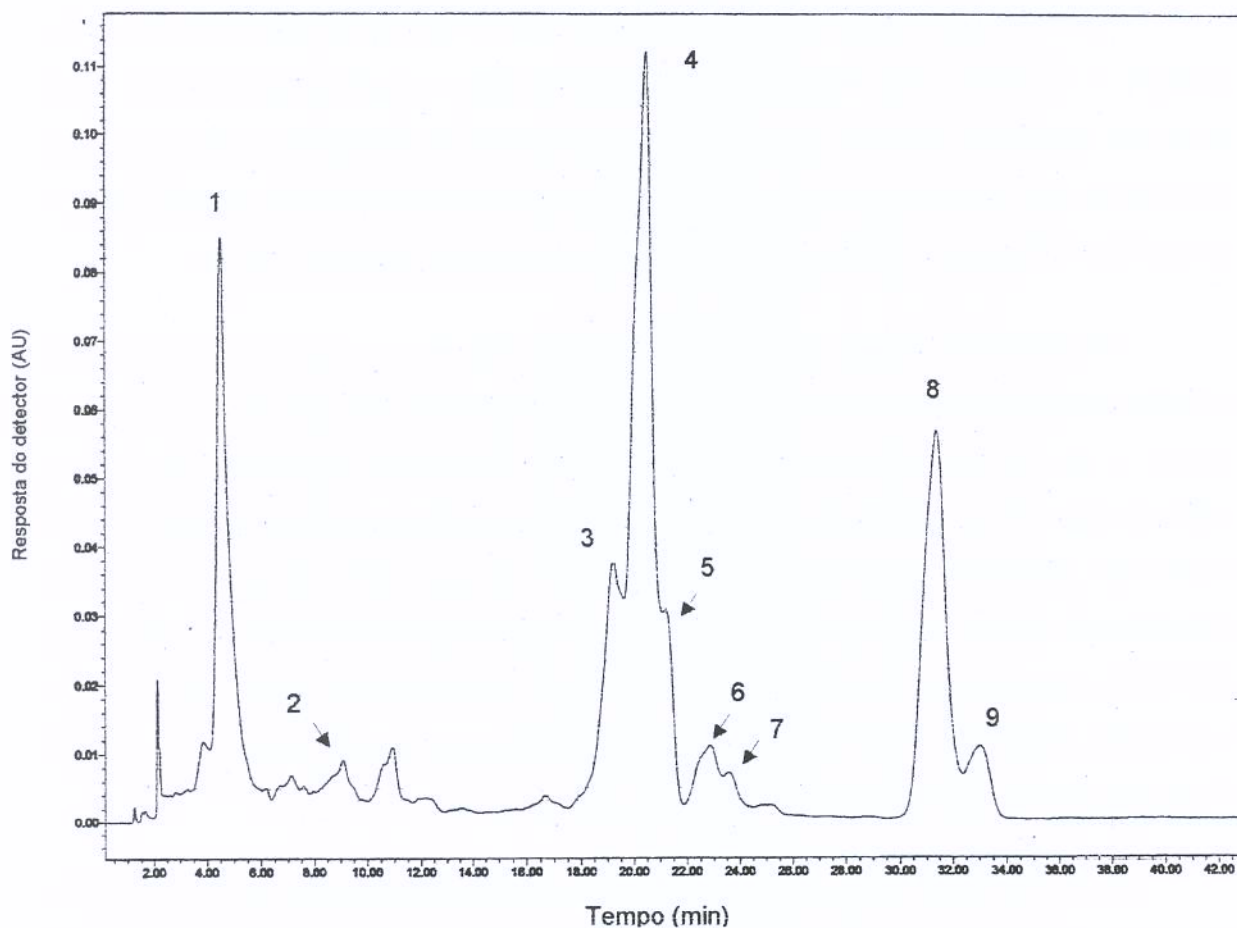


Figura 3. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. rubra* em cultivo em caldo YM com 5 μ mol de difenilamina. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna de 29°C. Processados em 480 nm. Identidade dos picos: (1) torularrodina, (2) hidróxi-toruleno, (3) neurosporeno + toruleno, (4) toruleno, (5) *cis*-toruleno, (6) γ -caroteno, (7) *cis*- γ -caroteno, (8) β -caroteno, (9) *cis*- β -caroteno.

Pode-se evidenciar um favorecimento da produção de β -caroteno em *R. glutinis* e *R. rubra* em concentrações de difenilamina acima de 5 μ mol. Esta sensível mudança na via metabólica favorecendo o fechamento do anel em detrimento da desidrogenação, já foi descrita anteriormente em *R. muscilaginosa* (Margalith & Meydav, 1968) e *Dictyococcus cinnabarinus* (Sassu, 1972).

No presente estudo, utilizando 5 μ mol de difenilamina no meio de cultivo, a relação torularrodina/toruleno baixou do cultivo controle de 1,5 para 0,4 em *R. rubra*, e de 0,8 para 0,5 em *R. glutinis*. Esta ocorrência é importante, pois a utilização de biomassa de *R. muscilaginosa* como suplementação de ração com o intuito de pigmentar a gema de ovo, resultou na produção de gema com cor indesejável, violeta (Schawarz & Margalith, 1965). Segundo Margalith & Mayday (1968), a redução do conteúdo de torularrodina pode resolver este problema de coloração indesejável na gema de ovo, possibilitando uso dos carotenóides de *Rhodotorula* em ração de aves.

A composição dos carotenóides dos cultivos das leveduras com nicotina estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. As Figuras 4 e 5 apresentam os cromatogramas dos cultivos controle e com 20 mmol de nicotina de *R. glutinis*, respectivamente.

Como esperado, observou-se nas duas cepas um acúmulo de fitoeno nos cultivos com difenilamina e nicotina em comparação com os cultivos sem inibidor (Tabelas 3, 4, 5 e 6).

Tabela 5. Influência da adição de nicotina na composição de carotenóides em *R. rubra*.

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de massa seca)				
	controle ^a	5 mmol ^a	10 mmol ^a	15 mmol ^a	20 mmol ^a
torularrodina	67,7	67,4	48,0	39,8	15,5
16-hidróxi-toruleno	1,8	0,4	0,3	0,3	-
dideidrolícopeno	-	-	3,4	6,5	6,5
licopeno	-	0,8	36,2	88,6	93,8
neurosporeno	-	-	-	-	1,6
toruleno+neurosporeno	58,1	49,1	18,2	6,2	-
γ -caroteno	0,5	1,0	1,3	1,8	4,6
β -caroteno	11,4	-	-	-	-
fitoeno ^b	nd	nd	nd	nd	nd
total _{CLAE}	139,5	118,7	107,4	143,2	124,8
total _{coef. β-caroteno}	131,2	117,3	123,5	151,2	140,4

^a Cultivo extraído e injetado uma única vez.

^b Proporção de fitoeno em relação ao cultivo controle considerado 1.

-: não houve produção.

nd: não determinado.

Tabela 6. Influência da adição de nicotina na composição de carotenóides em *R. glutinis*.

Carotenóides	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de massa seca)				
	controle ^a	5 mmol ^a	10 mmol ^a	15 mmol ^a	20 mmol ^a
torularrodina e xantofila	35,1	32,2	14,8	7,5	4,1 ^c
16-hidróxi-toruleno	2,8	1,1	0,7	0,4	-
dideidrolícopeno	-	1,3	2,7	0,7	0,9
licopeno	-	41,3	74,0	61,3	79,3
neurosporeno	-	-	-	5,7	7,9
toruleno + neurosporeno	43,2	25,5	14,0	-	-
γ -caroteno	15,5	8,7	5,2	1,6	0,9
ζ -caroteno	d	d	d	5,1	7,5
fitoflueno	d	d	d	1,7	2,4
β -caroteno	49,0	0,3	-	-	-
fitoeno ^b	1,0	1,2	1,4	3,1	5,1
total CLAE	145,6	110,5	111,5	84,0	103,2
total coef. β caroteno	151,2	128,1	120,4	92,6	120,4

^a Cultivo extraído e injetado uma única vez.

^b Proporção de fitoeno em relação ao cultivo controle considerado 1.

^c Principal componente foi a xantofila com λ_{max} (430), 458, 483.

^d abaixo de 0,5 $\mu\text{g/g}$.

-: não houve produção.

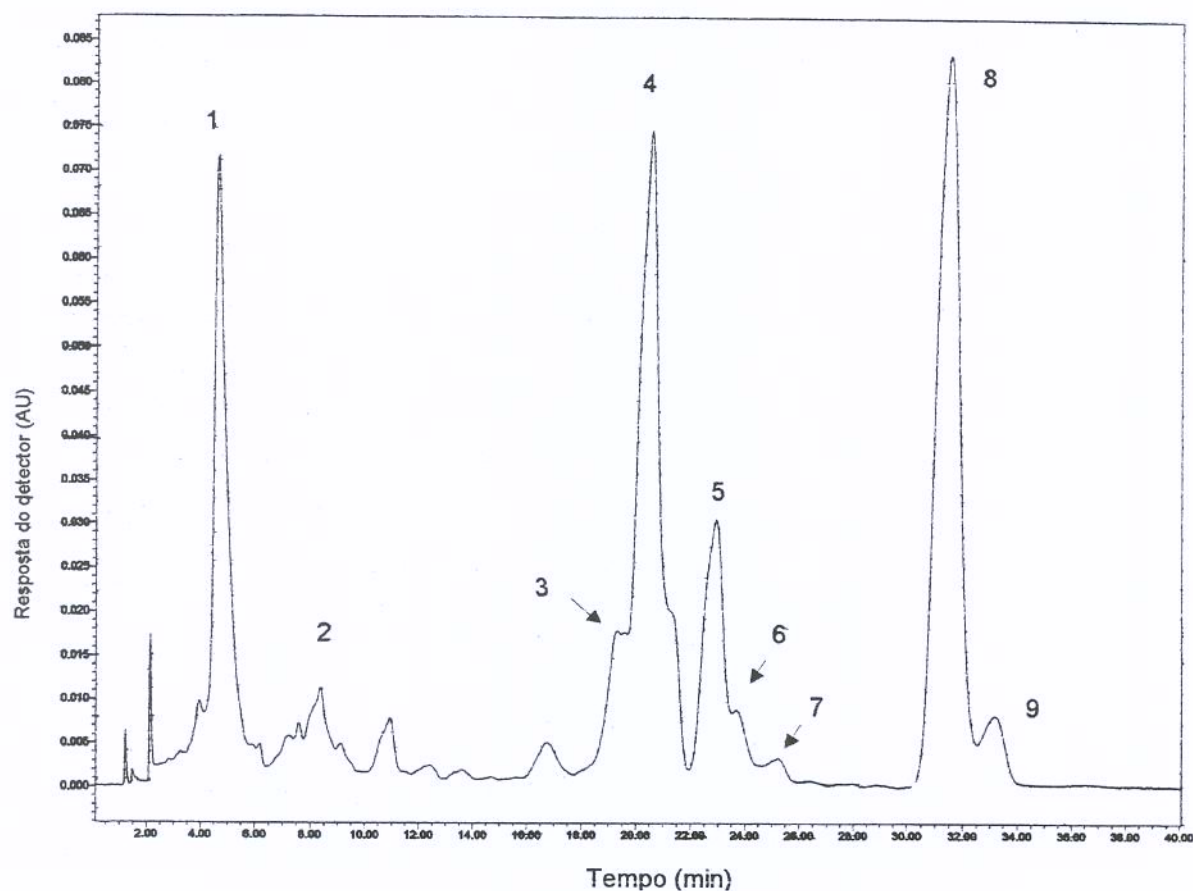


Figura 4. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. glutinis* em cultivo em caldo YM. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C. Processados em 480 nm. Identidade dos picos: (1) torularrodina, (2) hidróxi-toruleno, (3) neurosporeno + toruleno, (4) toruleno, (5) γ -caroteno, (6) *cis*- γ -caroteno, (7) ζ caroteno, (8) β -caroteno, (9) *cis*- β -caroteno.

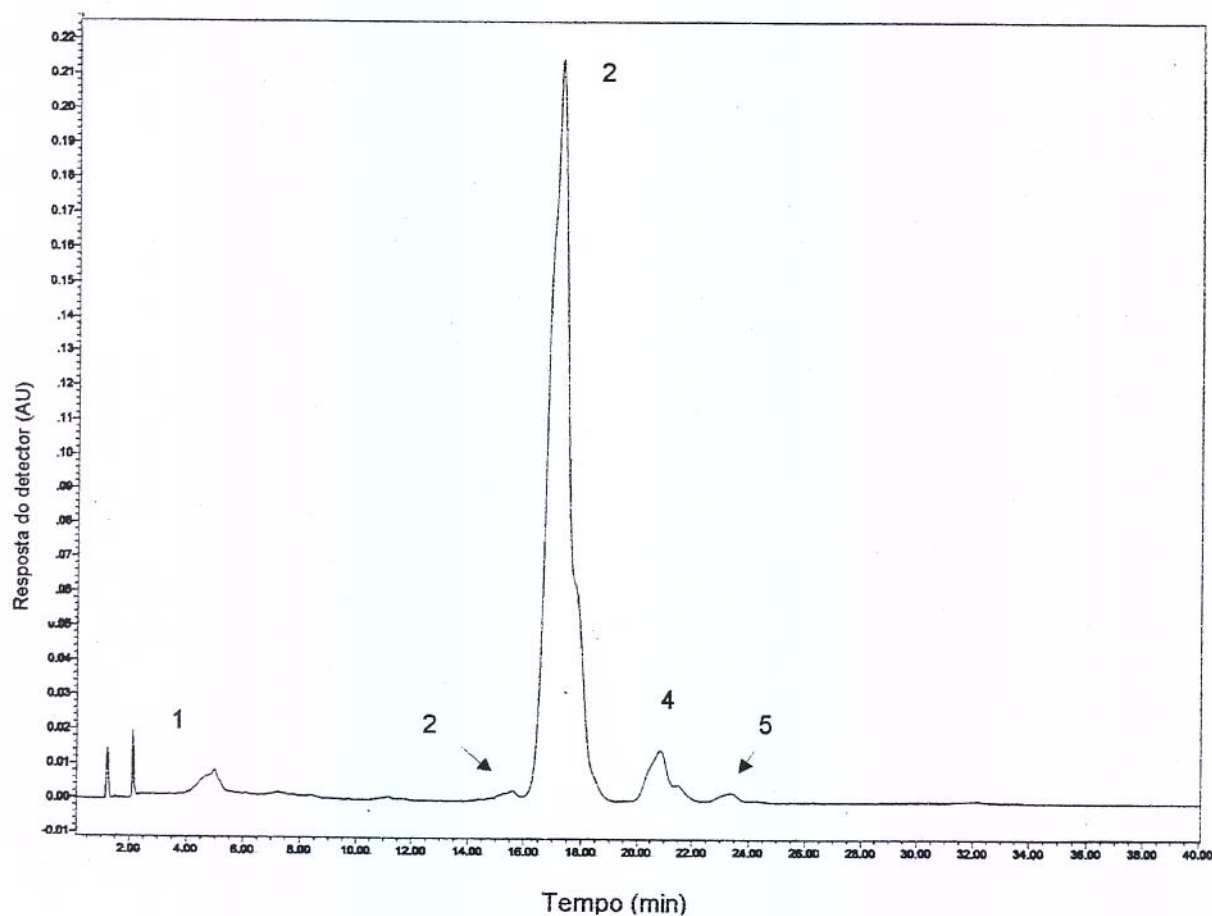


Figura 5. Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides de *R. glutinis* em cultivo em caldo YM com 20 mmol de nicotina. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4μm, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C. Processados em 480 nm. Identidade dos picos: (1) torularrodina e xantofila (não identificada), (2) dideidrolipoceno, (3) licopeno, (4) neurosporeno, (5) ζ-caroteno.

Obteve-se produção parcialmente seletiva de licopeno por *R. rubra* (75%) e *R. glutinis* (77%) nos cultivos suplementados com 20mmol de nicotina, baseado nas porcentagens de Área dos cromatogramas em CLAE obtidos no $\lambda_{\max}$ de cada carotenóides.

O acúmulo de licopeno nos cultivos contendo nicotina e a presença de β -zeacaroteno nos cultivos sem inibidor comprovou a existência das duas vias de ciclização nestas leveduras (Figura 1), como relatado anteriormente por Hayman *et al.* (1974).

Nos cultivos com nicotina, além do licopeno (11 d.l.c.), houve formação de pequena quantidade do caroteno tentativamente identificado como dideidrolipoceno (13 d.l.c.), cujo espectro de absorção obtido no detector de arranjo de diodos está na Figura 6. Este é o primeiro relato de sua presença neste tipo de cultura. A ausência de intermediários com número maior de ligações duplas conjugada que treze, indica que possivelmente um grupo terminal ψ estaria sendo reservado para a ciclização e formação do toruleno.

O intermediário álcool (pico 2 da Figura 2) foi detectado no presente trabalho, assim como em outros estudos prévios com leveduras do gênero *Rhodotorula* (Bonaly & Malenge, 1968). Entretanto, no presente estudo o torularrodinaldeído não foi detectado, pois nenhum dos picos minoritários apresentou espectro na região do visível com $\lambda_{\max}$ próximo de 508 nm.

Em *R. glutinis*, no cultivo com 20 mmol de nicotina, também ocorreu o acúmulo de uma xantofila que co-eluiu com a torularrodina e cujo espectro de absorção obtido no detector de arranjo de diodos está na Figura 7.

Como mostraram os dados das Tabelas 3 a 6, estes inibidores, em baixas concentrações, podem ser utilizados para aumentar a produção e alterar a composição de carotenóides, inclusive induzindo a produção seletiva de licopeno.

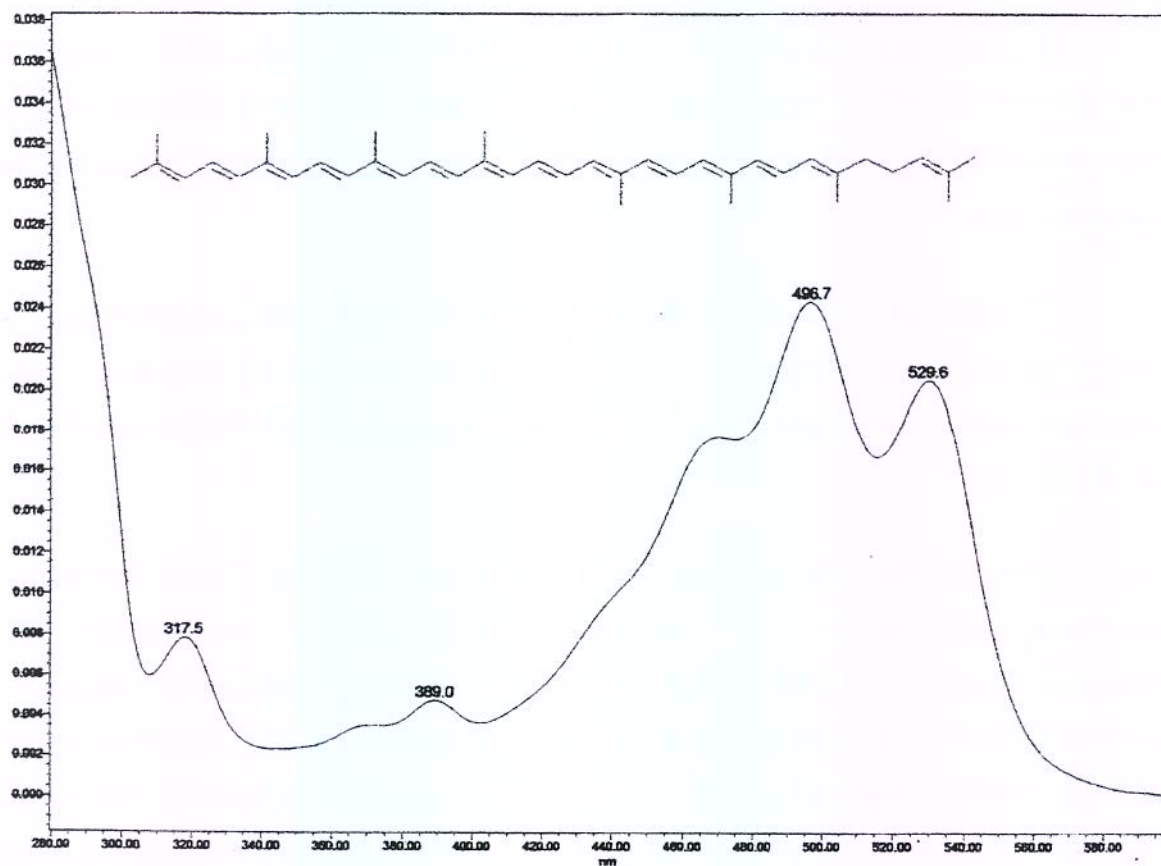


Figura 6. Espectro de absorção, obtido pelo detector de arranjo de diodos, e estrutura química do dideidrolipope. Solvente: acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10)

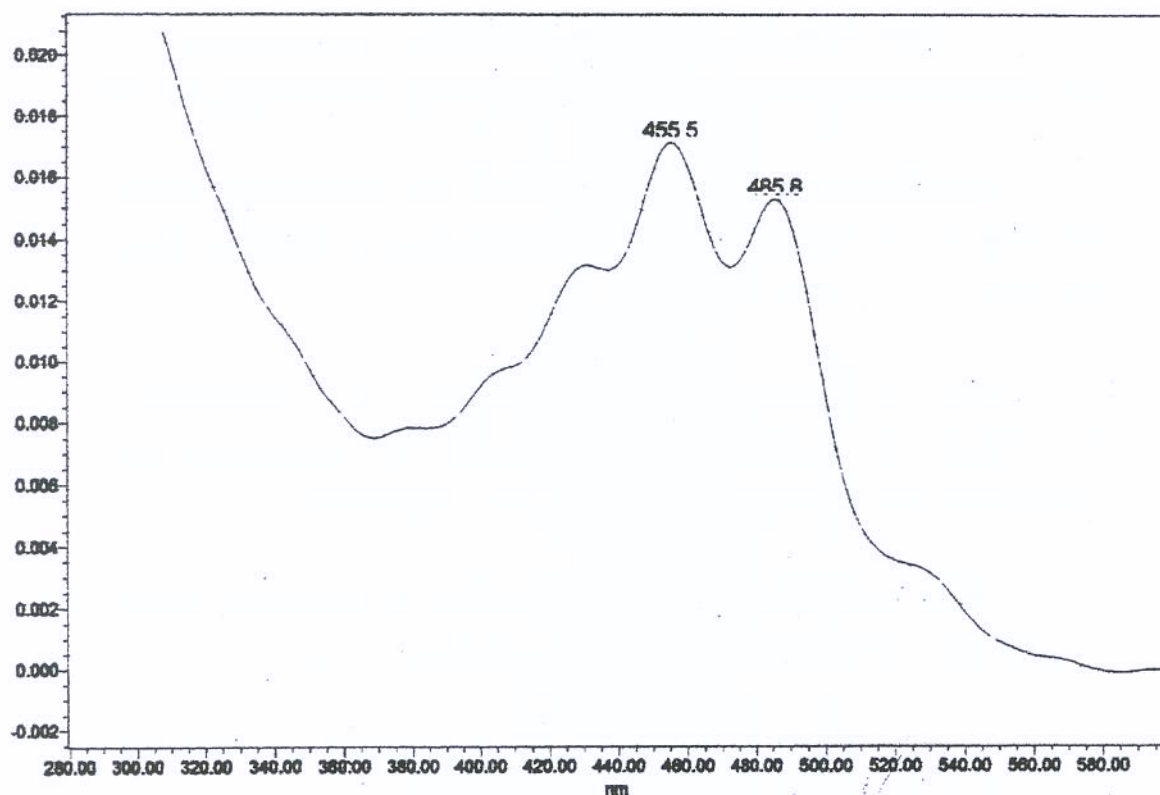


Figura 7. Espectro de absorção, obtido pelo detector de arranjo de diodos, da xantofila não identificada com t_r na faixa de 4,5 a 4,9. Solvente: acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bejarano, E. & Cerda-Olmedo, E. (1989), Inhibition of phytoene dehydrogenation and activation of carotenogenesis in *Phycomices*. *Phytochem.*, **28**, 1623-1623.
- Bonaly, R. & Malenge, J. P. (1968), Biosynthese des carotenoides cycliques chez *Rhodotorula muscilaginosa* et *Rhodotorula aurantica*. *Biochim. Biophys.*, **164**, 306-316.
- Britton, G; Singh, R. K.; Malhotra, H. C.; Goodwin, T. W. & Bem-Aziz, A. (1977), Biosynthesis of 1,2-dihydrocarotenoids in *Rhodopseudomonas viridis*: experiments with inhibitors. *Phytochem.*, **16**, 1561-1566.
- Britton, G. (1998), Biosynthesis. In Carotenoids, ed. G. Britton; S. Liaaen- Jensen & H. Pfander. Birjhäuser Verlag, Basel, vol. 3, pp. 13-147.
- Clarke, I. E.; De La Concha, A.; Murillo, F. J.; Sandmann, G.; Skrone, E. J. & Bramley, P. M. (1983), The effect of diphenylamine on carotenogenesis in *Phycomices blakesleeanus*. *Phytochem.*, **22**, 435-439.
- Fan, L.; Vonshak, A.; Gabbay, R.; Hirshberg, J.; Cohen, Z. & Boussiba, S. (1995), The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1519-1524.
- Girard, P.; Falconnier, B.; Bricout, J. & Vladescu, B. (1994), β -carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 183-191.
- Hayman, E. P.; Yokoyama, H.; Chichester, C. & Simpson, K. L. (1974), Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.*, **120**, 1339-1343.
- Howes, C. D. & Batra, P. P. (1970), Accumulation of lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in mycobacterium in the presence of nicotine. *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 174-179.

-
- Margalith, P. & Meydav, S. (1968), Some observation on the carotenogenesis in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Phytochem.*, **7**, 765-768.
- Santopietro, L. M. D. & Kula, M. R. (1998). Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. *Yeast*, **14**, 1007-1016.
- Sassu, O. G. (1972), Effect of diphenylamine on carotenoid synthesis in *Dictyococcus cinnabarinus*. *Phytochem.*, **11**, 3195-3198.
- Schwarz, Y. & Margalith, P. (1965). Production of egg yolk coloring material by fermentation process. *Appl. Microbiol.*, **13**, 876-81.
- Shaish, A.; Avron, M. & Amortz, B. (1990), Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil*. *Plant Cell Physiol.*, **31**, 689-696.
- Simpson, K. L.; Nakayama, T. O. M. & Chichester, C. O. (1964). Biosynthesis of yeast carotenoides. *J. Bacteriol.*, **88**, 1688-1694.
- Squina, F.M.; Pereira, J.L. & Mercadante, A.Z. (2001). Desenvolvimento de método analítico por CLAE e análise dos carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. Em preparação para submissão à revista *Química Nova*.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rhodotorula rubra* e *R. glutinis* EM MEIO À BASE DE CALDO DE CANA-DE- AÇÚCAR DILUÍDO

Em preparação para submissão à revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

RESUMO

O caldo de cana-de-açúcar foi utilizado como principal substrato para o cultivo de *Rhodotorula rubra* e *R. glutinis*. O crescimento das leveduras e a produção de carotenóides foram avaliados em função da composição do meio de cultivo através de um planejamento estatístico fatorial (2^{4-1}) das variáveis: diluição do caldo de cana (1:5 ou 1:10), quantidade de extrato de levedura (10g/L ou 50g/L), suplementação com peptona (ausência ou 10g/L) e suplementação com sais inorgânicos (ausência ou suplementação com 5,3 g/L de NH_4SO_4 , 5,5 g/L de KH_2PO_4 , 3,7 g/L de Na_2HPO_4 e 0,5 g/L de MgSO_4). As leveduras foram cultivadas em “shaker” a 200 rpm à temperatura ambiente por quatro dias. Os carotenóides foram extraídos com acetato de etila por ruptura mecânica das células e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa. Em todos os experimentos os principais carotenóides encontrados foram torularrodina, toruleno, β -caroteno e γ -caroteno. A quantidade de extrato de levedura adicionada e a suplementação com sais causaram aumento na produção de biomassa, quando estas variáveis passaram para o maior nível. Entretanto, a quantidade de carotenóides por peso seco foi negativamente influenciada, quando estas variáveis estiveram em maiores quantidades no meio. Em geral, o acúmulo de carotenóides foi acompanhado por menor crescimento celular. Um cultivo em dois estágios, inicialmente estimulando o crescimento celular, com uma alta quantidade de fonte de nitrogênio, seguido de um segundo estágio com baixo conteúdo de nitrogênio induzindo a produção de carotenóides, possivelmente proporcionaria a obtenção de maior rendimento.

SUMMARY

PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY *Rhodotorula rubra* AND *R. glutinis* IN MEDIUM WITH DILUTED SUGAR CANE JUICE. Sugar cane juice, an abundant agricultural product in Brazil, was investigated as main substrate for culture of *Rhodotorula rubra* and *R. glutinis*. In order to evaluate the yeast growth and carotenoid production, an experimental factorial design (2^{41}) was used for the following variables: sugar cane juice dilution (1:10 or 1:5), concentration of yeast extract (10g/L or 50g/L), absence or 10g/L of peptone, and absence or supplementation with inorganic salts solution (NH_4SO_4 5.3g/L, KH_2PO_4 5.5g/L, Na_2HPO_4 3.7g/L, MgSO_4 0.5 g/L). The yeasts were incubated in shaker at 200 rpm at room temperature during four days. The carotenoids were extracted with ethyl acetate by physical disruption and analyzed by HPLC on a reverse-phase column. In all experiments, the major carotenoids found were torularhodin, torulene, β -carotene and γ -carotene. Although the yeast growth was stimulated by a higher content of yeast extract and peptone, the accumulation of carotenoids was inhibited by higher level of these variables in the culture medium. In general, the higher carotenoids production was accomplished by lower cell growth. The results suggested that a two stages feeding culture, initially with high amounts of nitrogen source to enhance the cell growth, and a second stage with low nitrogen content for higher carotenoid accumulation, could improve the carotenoids production by the strains under investigation.

1 – INTRODUÇÃO

Os carotenóides compõem um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Os carotenóides apresentam uma importante função nutricional na dieta de humanos como precursor de vitamina A, sendo que o interesse por estes compostos naturais tem aumentado nos últimos anos devido a outras propriedades biológicas, tais como imunomoduladoras e anticarcinogênicas [14]; e também pela tendência atual de se evitar alimentos que contenham aditivos artificiais, incluindo corantes.

Os carotenóides são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Além disso, com o crescimento da piscicultura, o consumo de carotenóides para rações também tem aumentado [16]. A venda anual destes pigmentos está estimada em mais de 800 milhões de dólares [13], sendo que o preço aproximado de mercado na forma de pó dispersível e estabilizado contendo de 5 a 10% de carotenóide ativo pode variar de US\$ 600 a US\$ 2500 por quilo dependendo do pigmento [3].

As principais fontes industriais de carotenóides são a síntese química, e a extração a partir de plantas/flores (urucum, tomate, “marigold”) e da microalga *Dunaliella salina*. Para adição em alimentos, os carotenóides sintéticos β -caroteno, cantaxantina e β -apo-carotenal, e também bixina/norbixina proveniente de urucum são comercializados a baixo custo no Brasil.

Contudo, os processos de síntese química apresentam algumas desvantagens como a necessidade de desenvolvimento de novas rotas de síntese para cada novo carotenóide, a dificuldade na síntese de carotenóides mais complexos, a produção de misturas de esteroisômeros com produção de alguns isômeros não presentes na natureza, além da questão da poluição ambiental causada pelos resíduos gerados nestes processos [1].

A produção de carotenóides por processos biotecnológicos apresenta como vantagens a grande diversidade biológica para produção destes pigmentos, sendo que o conhecimento do processo metabólico de um carotenóide pode ser aplicado a outros carotenóides; a possibilidade de produção de compostos naturais estéreo-específicos; a capacidade de alguns microrganismos, de produzirem pigmentos a partir de substratos de baixo custo; e também, a possibilidade de utilizar ferramentas de biologia molecular para desenvolvimento de sistemas biológicos para produção de carotenóides [1, 18].

Durante os últimos anos, esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides, podendo-se destacar a produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* [7] e *Dunaliella* [2]; e a produção de astaxantina por *Haematococcus sp* [12] e *Phaffia rhodozyma* [11, 20].

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são interessantes, pois além de produzir carotenóides, também apresentam um bom rendimento em biomassa e são uma potencial fonte microbiana de proteínas [5,17] e lipídios [19, 24]. Além disso, são capazes de crescer em resíduos da indústria de alimentos como a salmoura produzida na fermentação do repolho [21] e o soro de leite [8-10], assim como em substratos agrícolas de baixo custo [4, 15].

O caldo de cana-de-açúcar é um produto agrícola abundante no Brasil, com composição média de 200 g/L de sacarose, 4 g/L de proteínas, 2,5 g/L de cinzas e total de sólidos de 230 g/L. O cultivo da levedura *R. glutinis*, em caldo de cana-de-açúcar diluído e suplementado, produziu quantidades de carotenóides e biomassa maiores que os obtidos pela mesma cepa em substratos microbiológicos convencionais [15].

A pesquisa no desenvolvimento de processos biotecnológicos para produção de carotenóides é justificada pela crescente demanda por fontes naturais destes pigmentos, que deve aumentar ainda mais com a descoberta de

novos carotenóides biologicamente ativos e com um melhor conhecimento dos mecanismos pelos quais estas substâncias previnem doenças.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de duas linhagens de *Rhodotorula* para produção de carotenóides em meio à base de caldo de cana-de-açúcar, analisando os efeitos da composição do meio de cultivo no crescimento das leveduras e na composição de carotenóides.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Manutenção das linhagens de microrganismos

A linhagem de levedura *Rhodotorula glutinis* (CCT 2186) foi gentilmente cedida pela Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello”. A linhagem de *R. rubra* foi obtida da coleção do Laboratório de Toxinas Microbianas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. As cepas foram mantidas por repiques mensais em meios inclinados em tubos de ensaio contendo meio YM (Difco). Estas duas linhagens foram escolhidas por terem produzido maior teor de carotenóides totais dentre as cepas testadas previamente [22]. Além disso, estas linhagens apresentaram a mesma composição qualitativa de carotenóides, mas com diferenças marcantes nas quantidades absolutas dos mesmos [22].

2.2 – Condições de cultivo

Frascos Erlenmeyer (1000mL) contendo 100mL de meio líquido YM (Difco) foram inoculados com 1×10^7 leveduras provenientes de meio inclinado com 3 dias de cultivo. Esta cultura, após 24 horas de incubação a 150 rpm e 28°C, foi utilizada como inóculo para os cultivos em caldo de cana-de-açúcar.

Foram preparados oito tipos de meios diferentes, gerando uma matriz de planejamento fatorial (2^{4-1}) das quatro variáveis referentes à composição do meio

de cultivo: diluição do caldo de cana-de-açúcar, quantidade de extrato de levedura, suplementação com peptona e sais. A composição de sais adicionada (5,3 g/L de NH_4SO_4 , 5,5 g/L de KH_2PO_4 , 3,7 g/L de Na_2HPO_4 e 0,5 g/L de MgSO_4) de acordo com Matteli *et al.* [15]. Os níveis utilizados destas variáveis estão apresentados na *Tabela 1*.

TABELA 1. Níveis das variáveis avaliadas no cultivo em meio à base de caldo de cana-de-açúcar.

Variáveis independentes	Níveis	
	-1	+1
X_1 diluição do caldo de cana-de-açúcar	1:10	1:5
X_2 extrato de levedura	10g/L	50g/L
X_3 peptona	0	10g/L
X_4 adição de sais	0	sim

O pH do meio de cultivo não foi acertado, pois a variação entre o pH dos meios foi pequena, na faixa de 6,2 e 6,4, com exceção do meio 7 com pH 6,7. Os meios de cultura foram autoclavados e inoculados com 5 mL da suspensão de leveduras descrita acima. Estas culturas foram incubadas à temperatura ambiente ($31 \pm 2^\circ\text{C}$) a 200 rpm de agitação sob iluminação com duas lâmpadas fluorescente de 20 W.

Após 96 horas, a massa celular de cada cultivo foi removida por centrifugação. Para eliminação de eventuais interferentes, a biomassa foi novamente ressuspensa em água destilada e centrifugada por mais três vezes.

2.3 – Análise de carotenóides

A extração dos carotenóides e subsequente análise por cromatografia líquida de alta eficiência seguiram a metodologia descrita por Squina *et al.* [22].

2.4 – Análise dos dados

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, com o auxílio do software Statistica 5.0, para determinação dos efeitos principais lineares das quatro variáveis independentes da composição do meio de cultivo mencionado anteriormente.

As respostas dos oito experimentos foram avaliadas quanto ao crescimento de biomassa em meio líquido (g/L), à produção de carotenóides por massa seca ($\mu\text{g/g}$) e no meio de cultivo ($\mu\text{g/L}$ de meio), bem como quanto à quantidade individual dos carotenóides por massa seca de levedura ($\mu\text{g/g}$).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A matriz de planejamento utilizada com as respostas quanto à produção de biomassa e de carotenóides de *R. rubra* e *R. glutinis* está apresentada nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2. Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e respostas obtidas para *R. rubra*.

Ensaio	Variáveis independentes				Variáveis Dependentes				
	X_1	X_2	X_3	X_4	Biomassa (g)	Total _{CLAE} (μg/g)	Total _{β-caroteno} ^a (μg/g)	Total _{CLAE} (μg/L)	Total _{β-caroteno} ^a (μg/L)
1	-1	-1	-1	-1	4,9	316,6	321,0	1540,5	1562,1
2	1	-1	-1	1	11,0	60,0	88,3	662,7	975,6
3	-1	1	-1	1	12,2	102,3	125,5	1243,3	1525,0
4	1	1	-1	-1	15,1	115,2	176,2	1739,5	2661,4
5	-1	-1	1	1	10,6	122,3	134,7	1299,7	1431,4
6	1	-1	1	-1	4,4	426,6	465,5	1879,7	2051,0
7	-1	1	1	-1	12,1	151,3	162,5	1825,2	1961,3
8	1	1	1	1	13,3	87,8	108,8	1171,0	1451,0

^a Calculado a partir de coeficiente de extinção do β-caroteno, em éter de petróleo [6].

TABELA 3. Matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e respostas obtidas para *R. glutinis*.

Ensaio	Variáveis independentes				Variáveis Dependentes				
	X_1	X_2	X_3	X_4	Biomassa (g)	Total _{CLAE} (µg/g)	Total _{β-caroteno} ^a (µg/L)	Total _{CLAE} (µg/g)	Total _{β-caroteno} ^a (µg/L)
1	-1	-1	-1	-1	6,3	144,0	179,5	913,5	1138,6
2	1	-1	-1	1	14,4	79,5	97,2	1147,8	1403,9
3	-1	1	-1	1	13,4	189,2	193,4	2537,4	2594,6
4	1	1	-1	-1	15,0	116,3	145,1	1741,7	2173,2
5	-1	-1	1	1	12,0	167,2	188,3	2011,2	2265,1
6	1	-1	1	-1	6,7	197,2	223,2	1321,0	1495,3
7	-1	1	1	-1	13,4	174,7	168,1	2344,9	2256,3
8	1	1	1	1	14,5	124,6	142,1	1805,0	2058,6

^a Calculado a partir de coeficiente de extinção do β-caroteno, em éter de petróleo [6].

A quantidade de extrato de levedura adicionada e a suplementação com sais causaram um importante aumento na produção de biomassa quando estas variáveis passaram para o maior nível. O aumento da biomassa causado por estas variáveis em relação à média foi, respectivamente, de 52% e 25% para *R. rubra* e de 35% e 26% para *R. glutinis*.

Entretanto, a quantidade de carotenóides por massa seca das leveduras foi negativamente influenciada, quando as variáveis extrato de levedura e suplementação com sais passaram do nível menor para o maior. Em relação à média, houve uma diminuição no total de carotenóides por massa seca de cerca de 65% com o aumento da quantidade de extrato de levedura e de cerca de 85% com suplementação de sais para a cepa *R. rubra*. Este mesmo efeito também foi observado em *R. glutinis*, mas em menor significância.

Quanto ao acúmulo de carotenóides por litro de meio de cultivo, pode-se destacar uma diminuição de 40% em relação à média com a suplementação com sais em *R. rubra*. Em *R. glutinis* houve um aumento pouco significativo (15%) no total de carotenóides por litro com a suplementação com sais no meio.

Para a *R. glutinis*, houve um aumento na produção de carotenóides por litro de meio de cerca de 40% em relação à média, com o aumento da quantidade de extrato de levedura no meio. Este aumento relacionado ao extrato de levedura foi também observado em *R. rubra*, mas em menor intensidade.

Em ambas as cepas a presença de peptona causou, em relação à média, um aumento de cerca 20% no total de carotenóides por peso seco e um aumento de cerca de 10% no total de carotenóides por litro de meio, sem inibir o crescimento das leveduras.

O efeito da diluição do caldo de cana-de-açúcar foi pouco expressivo para o crescimento celular como para a produção de carotenóides, sendo que apesar

da maior produção de carotenóides por peso seco ter ocorrido com esta variável no maior nível (meio 6), possivelmente ela pode ser mantida no menor nível sem diminuir o rendimento geral.

A composição dos principais carotenóides de *R. rubra* e *R. glutinis* está apresentada nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Pode-se observar uma significativa variação nas quantidades individuais de alguns pigmentos.

A cepa *R. rubra* mostrou-se bastante suscetível ao acúmulo de torularrodina ou toruleno dependendo da composição do meio de cultivo, a torularrodina variou de 80% no ensaio 5 a 29% no ensaio 2, e o toruleno variou de 53% no ensaio 2 a 9% no ensaio 5. Apesar disso, a produção seletiva de torularrodina e diminuição de toruleno nesta linhagem não puderam ser relacionadas ao efeito das variáveis extrato de levedura, suplementação com sais e peptona. A diluição do caldo de cana-de-açúcar quando passou do nível menor (1:10) para o maior (1:5), proporcionou em *R. rubra* um aumento em relação à média por peso seco, 55% de toruleno e uma diminuição de 30% na quantidade de torulorrodina. Não foi observada influência dos parâmetros de cultivo para o acúmulo de β -caroteno nesta cepa.

Em *R. glutinis*, a torularrodina variou de 5% no ensaio 8 para 16% no ensaio 1, o toruleno de 26% no ensaio 2 a 46% nos ensaios 3 e 7, e o β -caroteno que na maioria dos ensaios apresentou quantidade relativa de 33 a 40%, no ensaio 2 produziu 50% deste caroteno. Porém, os resultados nesta cepa não possibilitaram evidenciar se o acúmulo de algum carotenóide em particular foi causado pela variação dos parâmetros de cultivo.

TABELA 4. Composição dos principais carotenóides em *R. rubra*.

Ensaio	Concentração (µg/g)				Total _{CLAE}
	torularrodina	toruleno	γ-caroteno	β-caroteno	
1	209,1 (66%)	94,6 (30%)	5,1 (2%)	3,5 (2%)	316,6
2	17,4 (29%)	31,9 (53%)	2,4 (4%)	8,0 (13%)	60,0
3	77,9 (76%)	15,8 (15%)	0,6 (0%)	6,4 (6%)	102,3
4	59,8 (51%)	52,2 (45%)	2,9 (2%)	6,3 (3%)	115,2
5	98,1 (80%)	10,5 (9%)	0,3 (0%)	5,1 (4%)	122,3
6	257,2 (60%)	157,1 (37%)	5,9 (2%)	4,1 (2%)	426,6
7	104,5 (69%)	39,8 (26%)	0,6 (0%)	5,1 (3%)	151,3
8	29,4 (35%)	43,7 (50%)	1,8 (2%)	12,5 (14%)	87,8

Entre parênteses está apresentada a porcentagem relativa de cada carotenóide.

TABELA 5. Composição dos principais carotenóides em *R. glutinis*.

Ensaio	Concentração (µg/g)				
	torularrodina	toruleno	γ-caroteno	β-caroteno	Total _{CLAE}
1	22,5 (16%)	49,6 (34%)	20,5 (14%)	47,4 (33%)	144,0
2	11,3 (14%)	20,6 (26%)	6,5 (8%)	40,4 (50%)	79,5
3	24,0 (12%)	86,3 (46%)	8,5 (5%)	70,0 (37%)	189,2
4	8,4 (7%)	39,3 (34%)	20,0 (17%)	44,5 (38%)	116,3
5	21,6 (13%)	68,7 (41%)	9,5 (5%)	65,1 (39%)	167,2
6	20,3 (10%)	71,8 (36%)	25,2 (13%)	78,1 (40%)	197,2
7	17,1 (10%)	80,8 (46%)	16,7 (10%)	59,3 (34%)	174,7
8	6,8 (5%)	49,9 (40%)	21,8 (17%)	44,5 (36%)	124,6

Entre parênteses está apresentada a porcentagem relativa de cada carotenóide

Neste estudo, pudemos observar altos níveis de biomassa nos ensaios 4 e 8, porém o acúmulo de carotenóides ocorreu em detrimento do crescimento celular, evidenciado no ensaio 6 para ambas as cepas e também, no ensaio 1 para *R. rubra*. A produção de carotenóides deve sofrer um aumento pela repressão do metabolismo primário e como consequência disto o crescimento celular é provavelmente prejudicado.

Um cultivo em dois estágios onde a produção de carotenóides é separada do estágio de crescimento celular foi descrito anteriormente para *R. glutinis* [15] e *Phaffia rhodozyma* [23], possibilitando a obtenção de altos níveis de crescimento celular e produção de carotenóides.

Devido às divergências encontradas nos efeitos das variáveis avaliadas quanto à produção de biomassa e acúmulo de carotenóides por massa seca, a utilização de um processo de cultivo de duas fases seria uma interessante alternativa. Possivelmente, altos níveis de produção de carotenóides poderiam ser obtidos utilizando inicialmente um meio capaz de promover um alto crescimento celular (com alto nível protéico), sendo que após as leveduras alcançarem a fase estacionária, estas seriam submetidas a baixos níveis de fonte protéica, induzindo o acúmulo de carotenóides.

4 – CONCLUSÃO

O meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar mostrou ser adequado para o crescimento celular e produção de carotenóides de leveduras do gênero *Rhodotorula*. A realização de um sistema de alimentação em dois estágios, onde inicialmente o crescimento celular é estimulado por uma baixa relação carbono/nitrogênio (C/N), seguido de um segundo estágio com uma alta relação C/N, possivelmente induziria o acúmulo de altas quantidades de carotenóides nestas leveduras. Não foi possível evidenciar a produção seletiva de algum carotenóide em particular através da variação dos parâmetros de cultivo.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by Biotechnology. **Pure Appl. Chem.**, v.69, p.2169- 2173, 1997.
- [2] BOROWITZKA, L.J. & BOROWITZKA, M.A. β -Carotene Production with Algae. In: Vandamme, J. E. (Ed.). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, New York: Elsevier Applied Science, 1989. Cap.2, p.15-26.

-
- [3] BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S. & PFANDER, H. Carotenoids Today and Challenges for the Future. In Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (Eds.). **Carotenoids: Isolation and Analysis**, Basel: Birkhäuser Verlag, 1995. Cap 1, p. 1-11.
- [4] BUZZINI, P. & MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.**, v.71, p.41-44, 2000.
- [5] COSTA, I.; MATELLI, H.L.; SILVA, I.M.E & POMEROY, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain. **Biotechnol. Lett.**, v.9, p.373-375, 1987.
- [6] DAVIES, B.H. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. In: Goodwin (Ed.). **Carotenoids**, New York: Academic Press, 1976. Cap 2, p. 38-165.
- [7] FEOFILOVA, E. P. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v.30, p.143-153, 1994.
- [8] FRENGOVA, G.I.; SIMOVA, E.D.; PAVALOVA, K.; BESHKOVA, D.M. & GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnol. Bioeng.**, v.44, p.888-894, 1994.
- [9] 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 ultrafiltrate. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, p.1001-1008, 1995.
- [10] FRENGOVA, G.; SIMOVA, E. & BESHKOVA, D. Carotene, protein and exopolysaccharide production by co-culture of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p.272-277, 1997.
- [11] FONTANA J. D.; CHOCIAL, M.B.; BARON, M.; GUIMARAES, M.; MARASCHIN, M.; ULHOA C.; FLORENCIO., J.A. & BONFIN, T.M.B. Asthaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-

- cost culture media and yeast cell lysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.63-65, p.305-314, 1997.
- [12] JOHNSON, A.E. & AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 11, p.297-326, 1991.
- [13] JOHNSON E.A. & SCHROEDER, W.A. Microbial carotenoids. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v.53, p.119-178. 1995.
- [14] KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v.66, p.1003-1010, 1994.
- [15] MATELLI, H.L.; SILVA, I.M.; SOUZA, N.O. & POMEROY, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnol. Lett.**, v.12, p.207-208, 1990.
- [16] MEYERS S.P. Developments in world aquaculture, feed formulation, and role of carotenoids. **Pure Appl. Chem**, v, 66, p.1069-1976, 1994.
- [17] NELIS, H.J. & DE LEENHEER, A.P. Microbial production of carotenoids. In Vandamme, J. E. (Ed). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, New York: Elsevier Applied Science, 1988. Cap. 4, p.27-42, 1989.
- [18] NELIS, H.J. & DE LEENHEER, A.P. Microbial sources of carotenoids pigments used in foods and feeds. **J. Appl. Bacteriol.**, v.70, p.181-191, 1991.
- [19] PERRIER, V.; DUBREUCQ, E. & GAYZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Arch. Microbiol.**, v.168, p.173-179, 1995.

-
- [20] PARAJÓ, J.C.; SANTOS, V. & VAZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Proc. Biochem.**, v.33, p.181-187, 1998.
- [21] SHINH, C.T. & HANG, Y.D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut Brine. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.29, p.570-572. 1996.
- [22] SQUINA, F.M.; PEREIRA, J.L.; MERCADANTE, A.Z. Desenvolvimento de método analítico por CLAE e análise dos carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Em preparação para submissão à revista Química Nova**, 2001.
- [23] YAMANE, Y.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KARIZONO, T. & NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.4471-4478, 1997.
- [24] YOON, S.H.E. & RHEE, J.S. Lipid from yeast fermentation: effects of cultural conditions on lipids production and its characteristics of *Rhodotorula glutinis*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.60, p.1281-1285, 1983.

ANEXOS

ANEXO 1

CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE CAROTENÓIDES

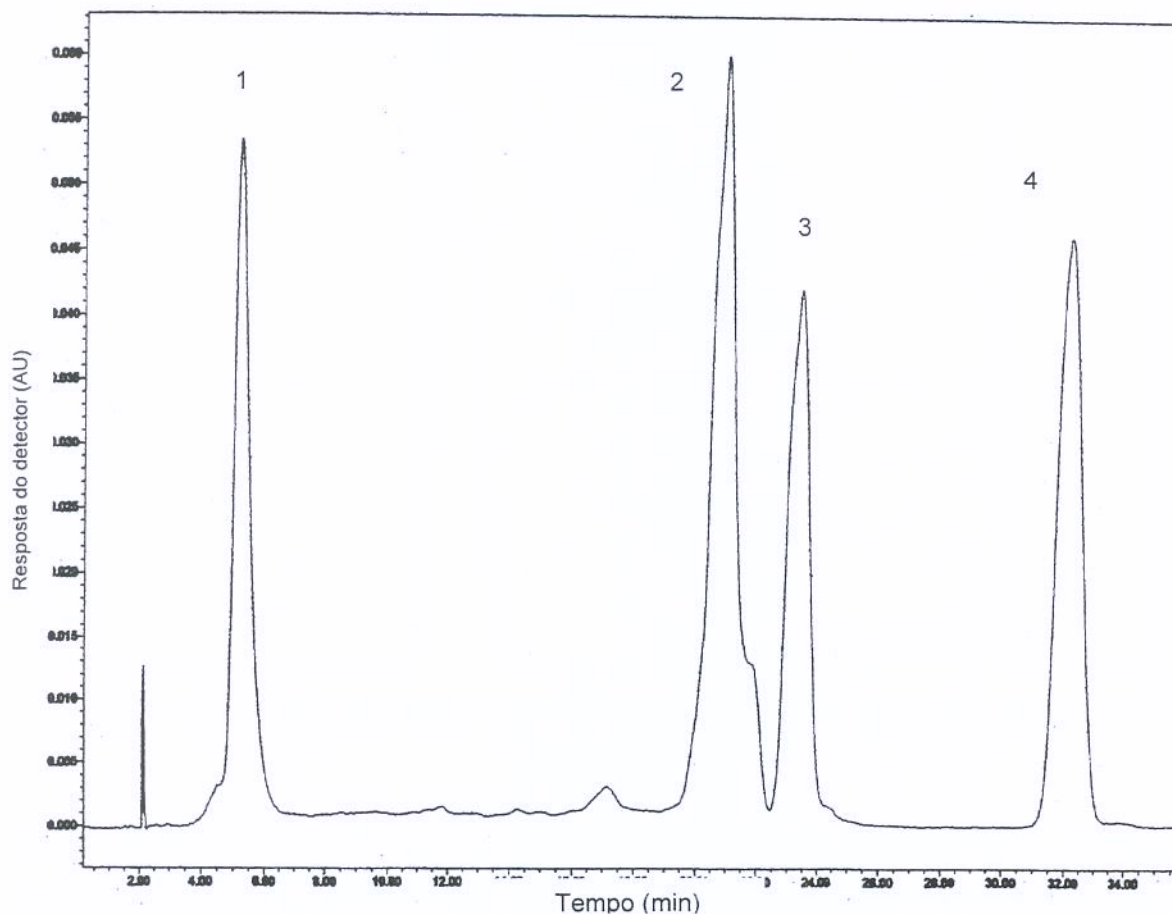


Figura 1. Cromatograma, obtido por CLAE, dos padrões de carotenóides (1) torularrodina, (2) toruleno, (3) γ -caroteno, (4) β -caroteno. Processado em 480 nm. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C.

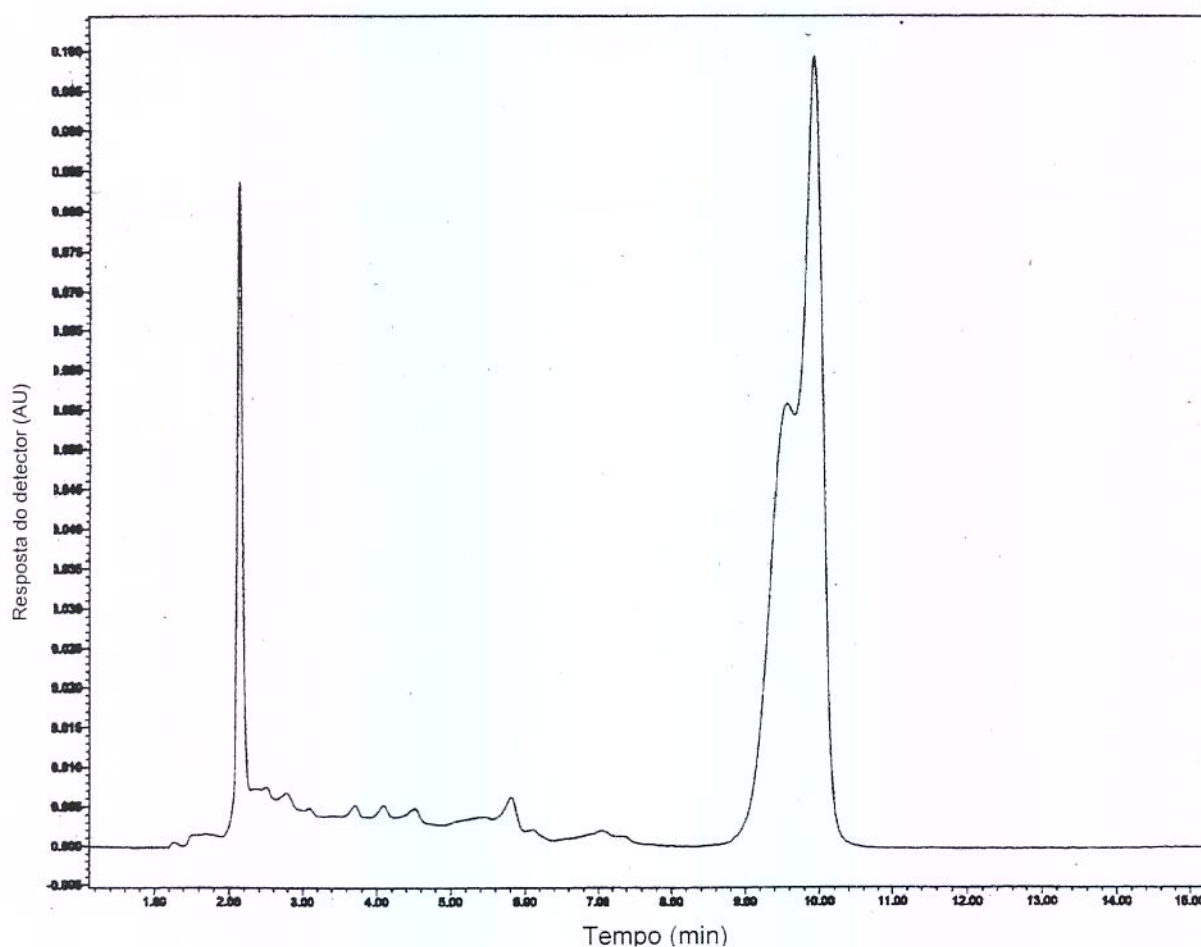


Figura 2. Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de 3',4'-dideidro-1',2'-diidro- β,ψ -caroten-1-ol. Processado em 480 nm. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C.

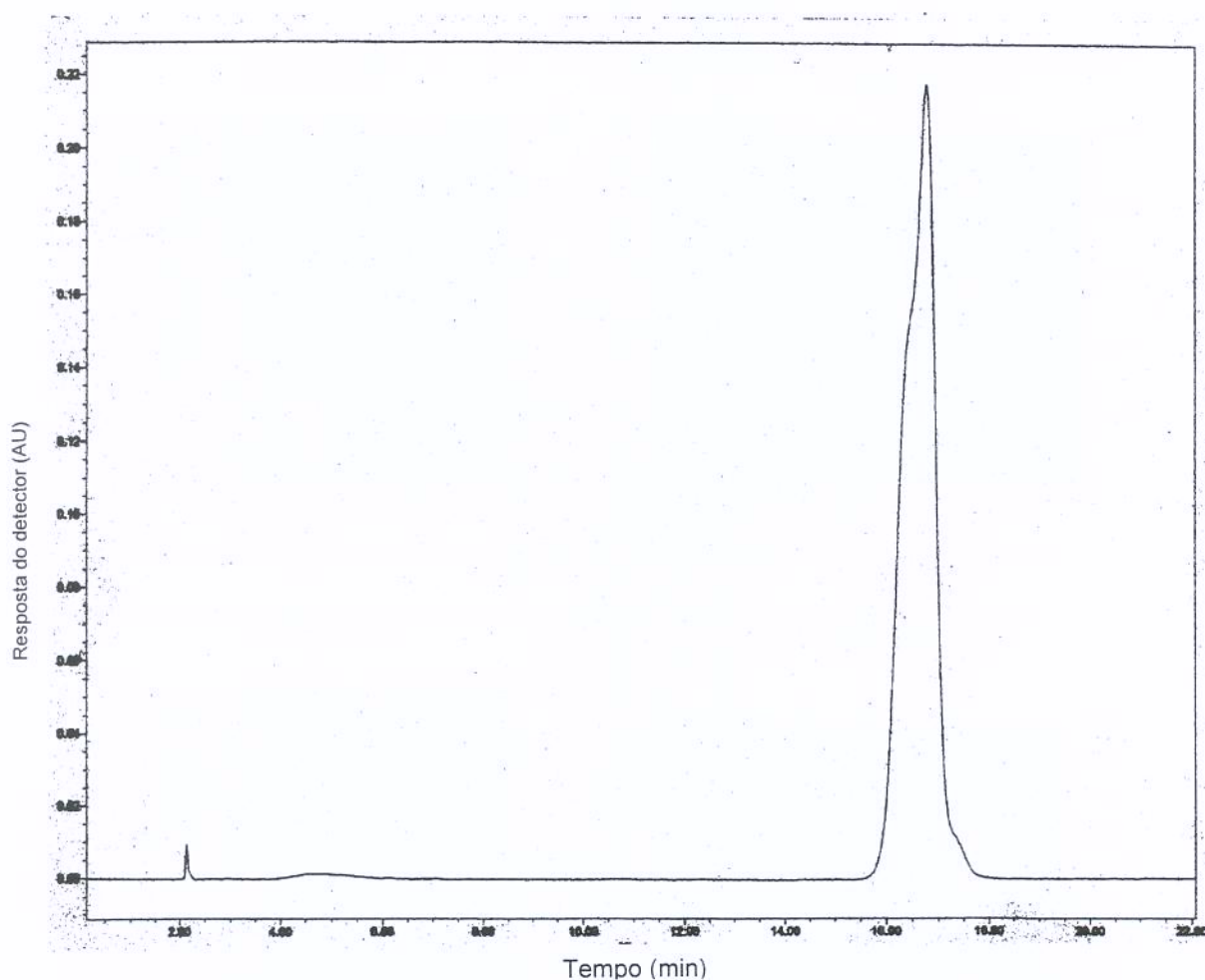


Figura 3. Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de licopeno. Processado em 480 nm. Condições: coluna Novapack C₁₈ (4 μ m, 4.6 x 300 mm), fase móvel acetonitrila/metanol (0,1% trietilamina)/acetato de etila (75:15:10), condicionando a coluna por 1 minuto com metanol (0,1% trietilamina) entre as injeções, fluxo de 1 ml/min e temperatura da coluna de 29°C.

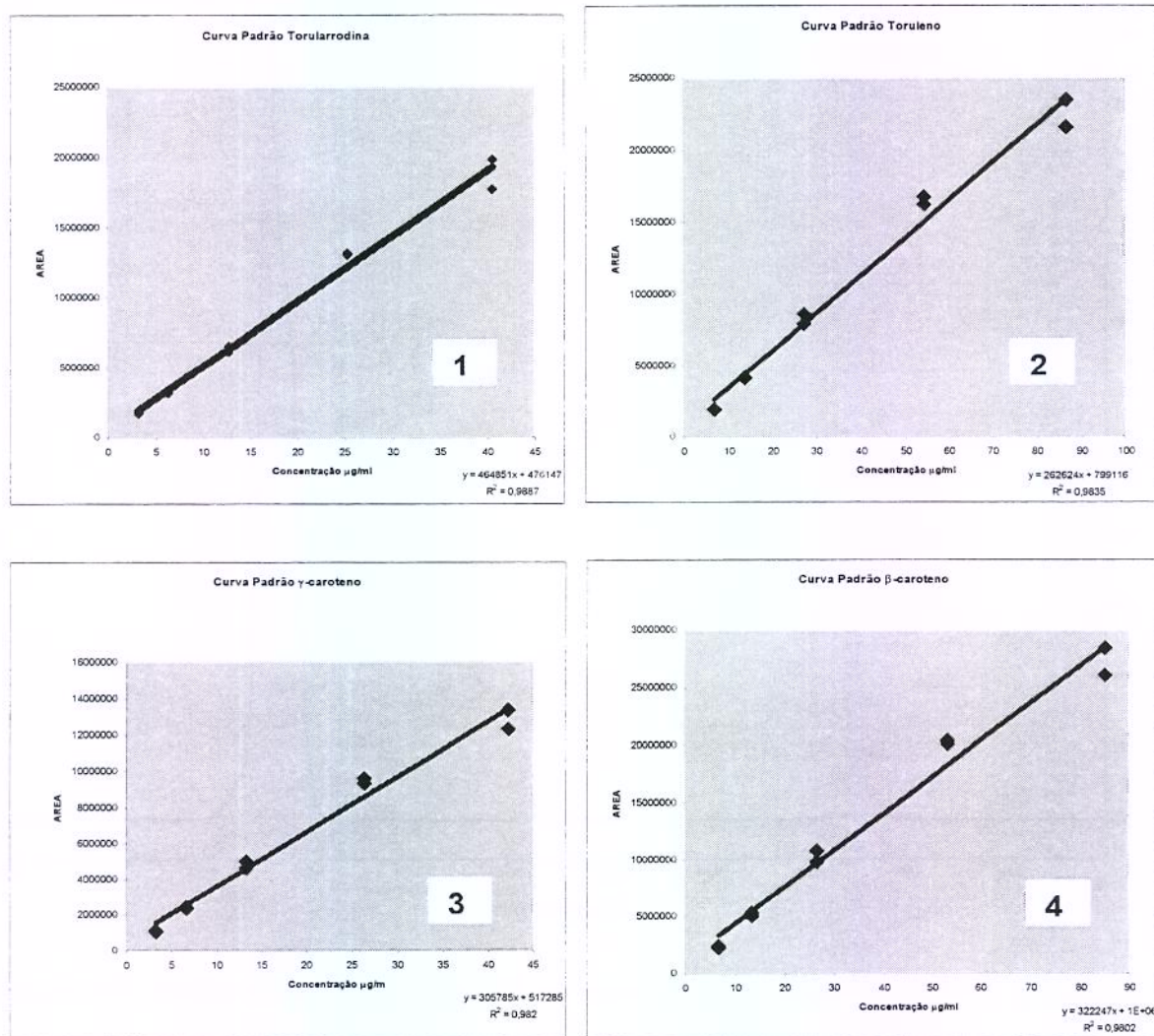


Figura 4. Curvas dos padrões carotenóides (1) torularrodina, (2) toruleno, (3) γ-caroteno.

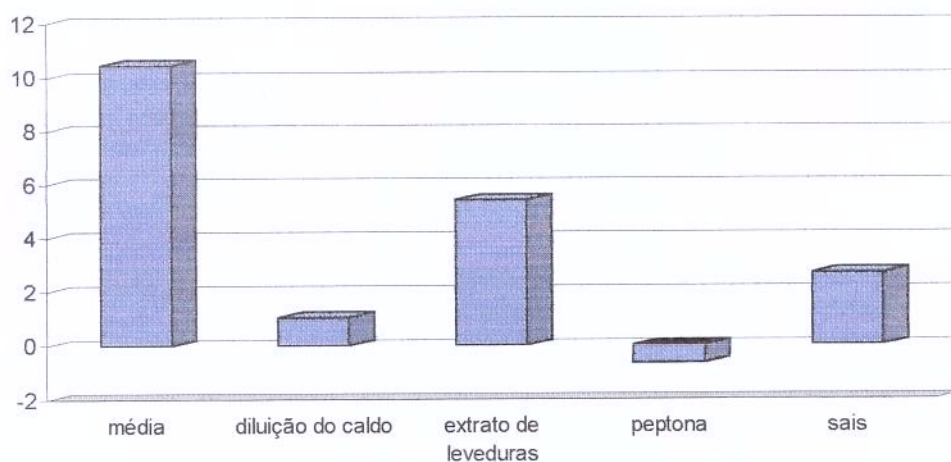
ANEXO 2**EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE AS RESPOSTAS ESTUDADAS NO CULTIVO DE *R. rubra* EM MEIO À BASE DE CALDO DE CANA DE AÇÚCAR DILUÍDO**

Figura 1. Efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa (g).

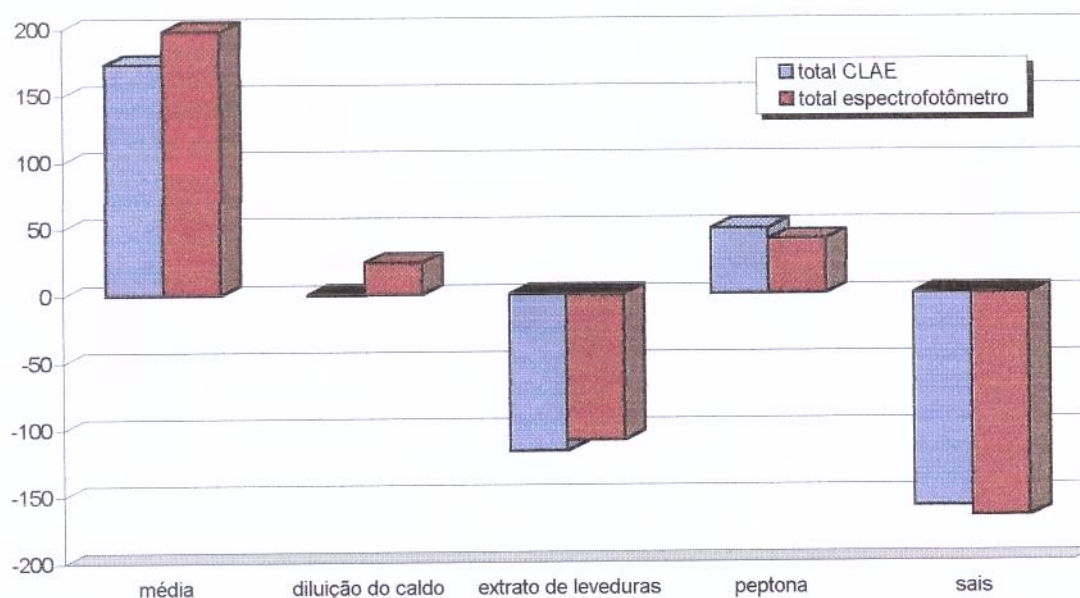


Figura 2. Efeitos das variáveis independentes sobre o total de carotenóides por peso seco de leveduras (µg/g).

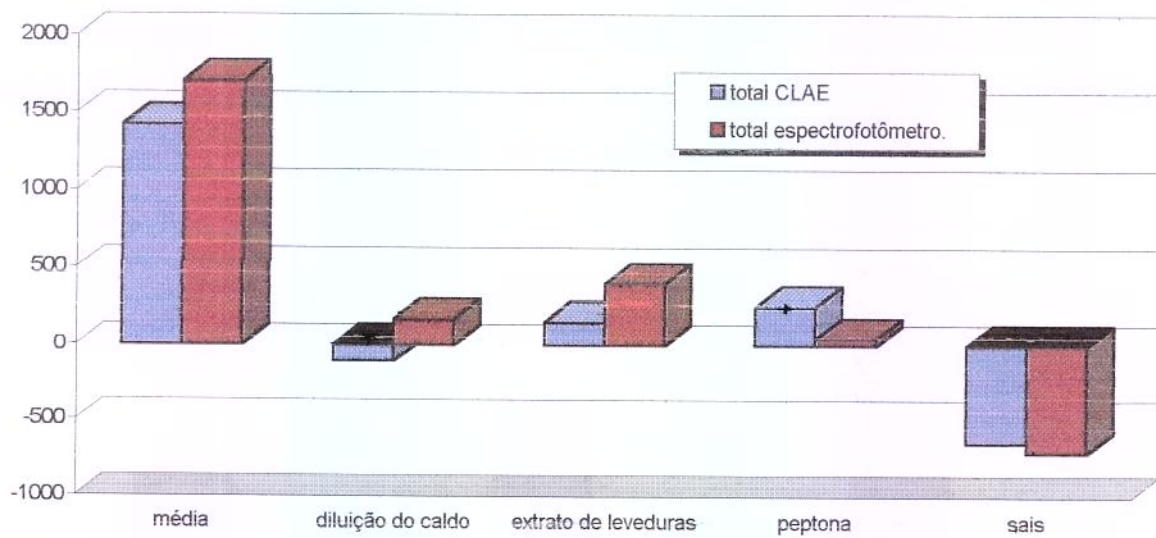


Figura 3. Efeitos das variáveis independentes sobre o total de carotenóides em meio líquido de cultivo ($\mu\text{g/L}$).

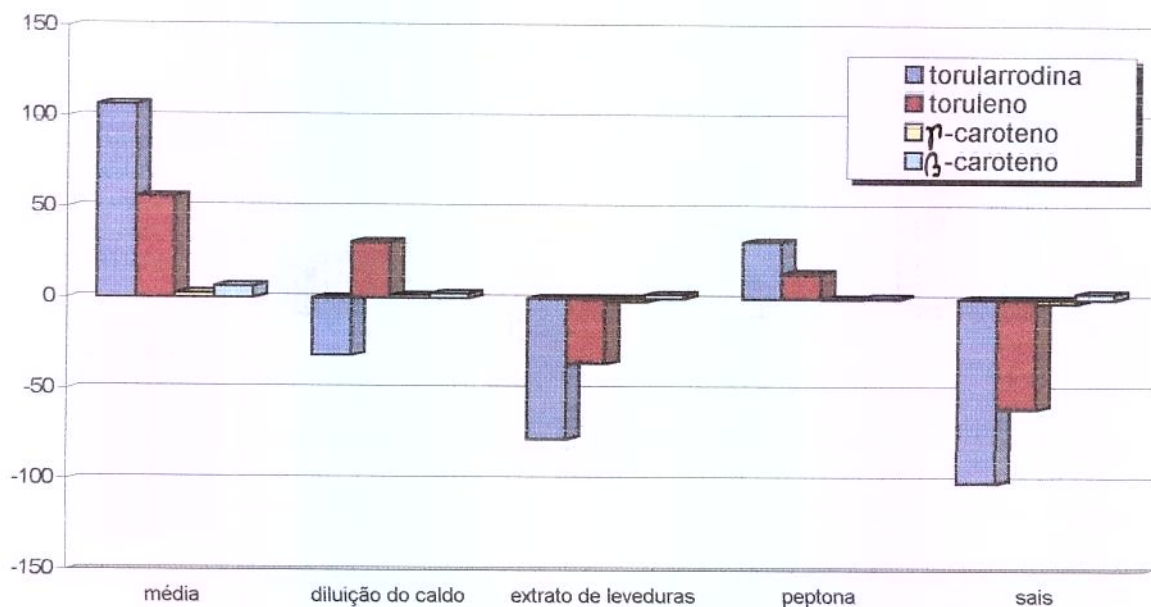


Figura 4. Efeitos das variáveis independentes sobre as quantidades dos principais carotenóides ($\mu\text{g/g}$).

ANEXO 3

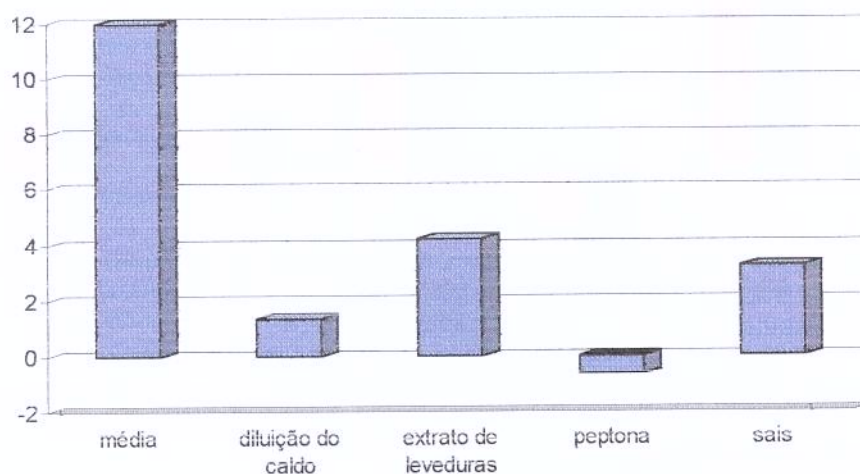
EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES SOBRE AS RESPOSTAS
ESTUDADAS NO CULTIVO DE *R. glutinis* EM MEIO À BASE DE CALDO DE
CANA DE AÇÚCAR DILUÍDO

Figura 1. Efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa (g)

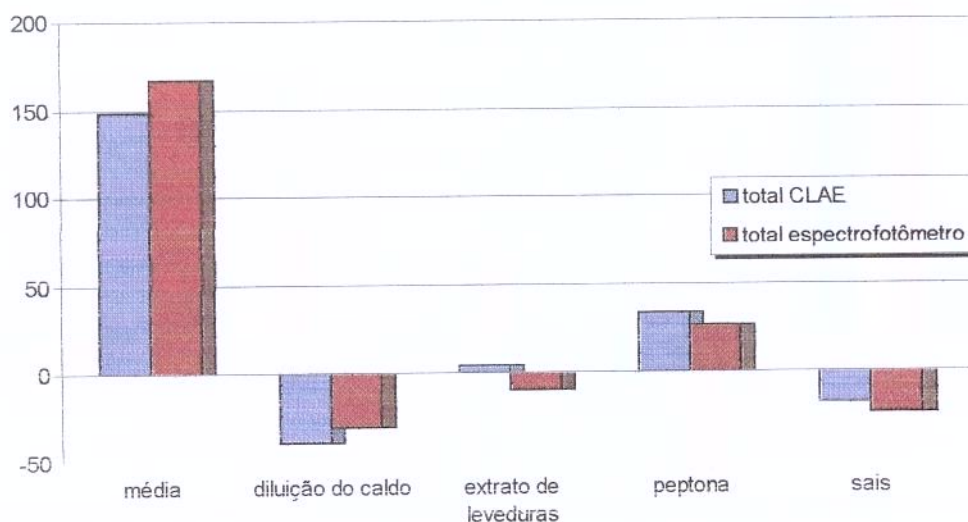


Figura 2. Efeitos das variáveis independentes sobre o total de carotenóides por peso seco de leveduras (µg/g).

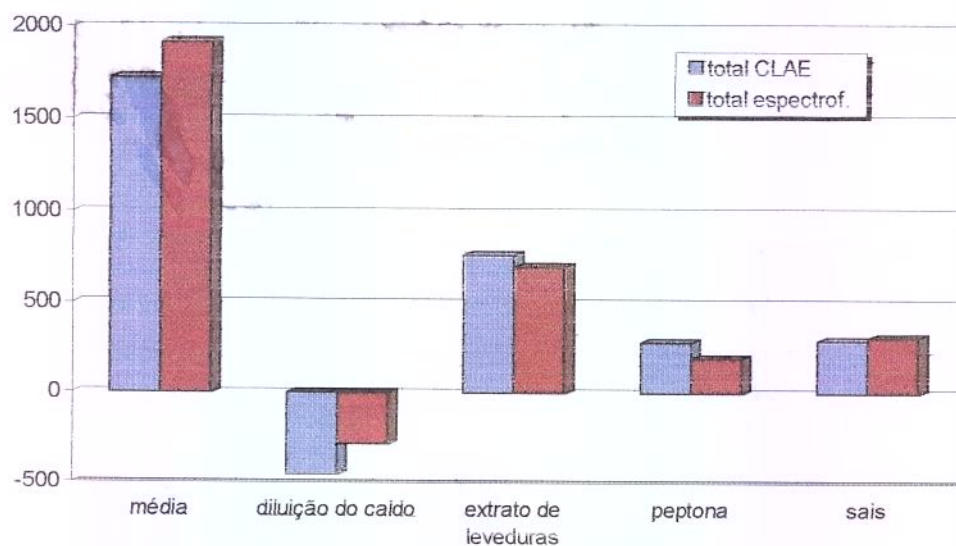


Figura 3. Efeitos das variáveis independentes sobre o total de carotenóides em meio líquido de cultivo ($\mu\text{g/L}$).

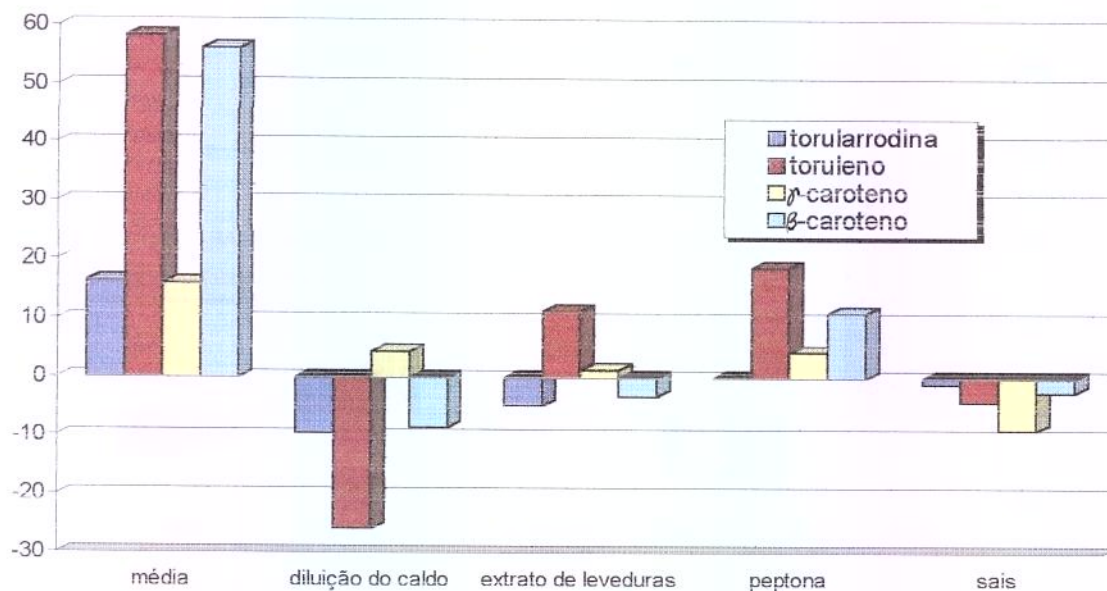


Figura 4. Efeitos das variáveis independentes sobre as quantidades dos principais carotenóides ($\mu\text{g/g}$).