

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

**ALTERAÇÕES NA BIOSÍNTESE DE
CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS INDUZIDAS
POR AGENTES QUÍMICOS**

Maybi Cristina da Silva
Bacharel em Química
Mestre em Biotecnologia

Prof^a. D^{ra}. Delia Rodriguez-Amaya
Orientadora

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

Campinas-SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38a Silva, Maybi Cristina da
Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras
induzidas por agentes químicos / Maybi Cristina da Silva. –
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Delia Rodriguez-Amaya
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Carotenóides. 2. Levedura. 3. Biossíntese. 4. Ácido
mevalônico. I. Rodriguez-Amaya, Delia. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Delia Rodriguez Amaya
(Orientadora)

Professor Dr. José Roberto Ernandes

Professora Dra. Helena Teixeira Godoy

Professora Dra. Márcia Justino R. Mutton

Professora Dra. Mieko Kimura

Professora Dra. Marisa Padula

Professor Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho

"Viver é um desafio constante.
Sem perceber entramos nas ilusões da realidade superficial,
acreditando nas promessas fáceis de felicidade material e
mergulhamos assim em sonhos fúteis de conforto físico
imaginando estar imunes ao sofrimento.
Mas as ilusões obscurecem nossa lucidez, deturpam situações,
invertem valores,
nos arrastando aos círculos de sofrimento que queríamos evitar.
E chega sempre a hora de descobrir que a vida
é mais do que supúnhamos,
sua sabedoria nos coloca diante da eterna chama da verdade,
que ofusca nossas ilusões, nos forçando a distinguir
o falso do verdadeiro.
Por entre choques da realidade profunda e as lições do dia-a-dia
conquistamos as vantagens da maturidade e entendemos que
Tudo vale a pena."

Luiz Gasparetto

Dedico

Aos meus pais, Julio e Sonia,
e aos meus irmãos, Marisia e Julio
por me apoiarem nos piores momentos e por
sempre me incentivarem na busca pela felicidade.

AGRADECIMENTOS

À Professora Delia B. Rodriguez-Amaya por ter aceitado me orientar sem me conhecer. Por seus ensinamentos, por sua postura e por seu exemplo de conduta que levarei ao longo de minha vida profissional, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca pelas sugestões e correções do trabalho.

Meu especial agradecimento à amiga Iriani Rodrigues Maldonade pela amizade, pelo apoio incondicional durante o decorrer de todas as etapas deste trabalho, pelos ensinamentos, conselhos e pelo alto astral, apesar da distância você foi fundamental.

À Dra. Adilma R. P. Scamparini por ter cedido gentilmente as instalações do Laboratório Geral para execução da parte microbiológica deste trabalho.

À amiga Marcela Colognesi de Sá que muito me ajudou no início das análises, sempre com paciência e otimismo.

Às amigas que trabalharam diretamente comigo no Laboratório de Carotenóides: Patrícia, Cristiane, Ornella, Simara, Rosemary, Lísia, pelo apoio diário, pela ajuda e por terem tornado mais leves as dificuldades do dia-a-dia.

Aos amigos que conquistei na FEA: Márcia, Priscila, Julio, Maria Eugênia, Eliane, Janaína, pelo apoio, pela companhia, pela convivência, pelo apoio e pelos conselhos.

À técnica Karla Nery pelo empenho em sempre me ajudar no que fosse preciso, mas sobretudo por tornar o Laboratório Geral um lugar agradável e divertido para se trabalhar.

À Hana, Débora, e Elza, que ajudaram sempre que precisei

Ao Cosme, pela cooperação.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho

À Fapesp pela bolsa de doutorado.

Ao Pronex pelo apoio financeiro.

A Deus por todos os momentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMO GERAL	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	xx

CAPÍTULO 1: Biossíntese e Produção Microbiana de Carotenóides: Uma Revisão

Bibliográfica	1
1. Introdução	3
2. Biossíntese de Carotenóides	3
2.1. O Caminho biossintético	3
2.2. Clonagem dos genes de enzimas carotenogênicas	10
3. Produção de Carotenóides por Biotecnologia	12
4. Carotenóides em Leveduras	13
5. Fatores que Influenciam a Produção Microbiana de Carotenóides	15
5.1. Efeito da composição do meio de cultivo	15
5.2. Efeito de agentes químicos	16
5.3. Efeito da luz	18
5.4. Efeito da temperatura	19
6. Considerações Finais	19
7. Referências Bibliográficas	20

CAPÍTULO 2: Efeito de β -ionona e de Ácido Acético na Produção de Biomassa e de Carotenóides por Leveduras do Gênero *Rhodotorula*

1. Introdução	28
2. Materiais e Métodos	29
2.1. Leveduras	29
2.2. Condições de cultivo	29
2.2.1. Padronização do inóculo	29
2.2.2. Adição de β -ionona ao meio de cultivo	30
2.2.3. Adição de ácido acético ao meio de cultivo	30
2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual	31

2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides	31
2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência	31
2.4. Análise Estatística dos Dados	32
3. Resultados e Discussão	32
3.1. Crescimento de <i>Rhodotorula glutinis</i> e <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	32
3.2. Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo	34
3.3. Efeito de ácido acético em diferentes concentrações	39
4. Conclusões	41
5. Referências Bibliográficas	42

CAPÍTULO 3: Efeito de β -ionona e Ácido Acético e das Condições de Cultivo na Produção de Carotenóides por Leveduras

	44
1. Introdução	47
2. Materiais e Métodos	48
2.1. Leveduras	48
2.2. Condições de cultivo	48
2.2.1. Adição de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de glicose	48
2.2.2. Adição de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de fonte de nitrogênio	49
2.2.3. Efeito da luz	49
2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual	50
2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides	50
2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência	51
2.4. Análise estatística dos dados	51
3. Resultados e Discussão	51
3.1. Efeito de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de glicose no crescimento das leveduras em duas etapas	51
3.2. Efeito de β -ionona e ácido acético em meio sem glicose no crescimento das leveduras em duas etapas	56

3.3. Efeito de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de nitrogênio no crescimento das leveduras sob luz no crescimento das leveduras	60
3.4. Efeito da exposição à luz no crescimento e na produção de carotenóides em leveduras	64
4. Referências Bibliográficas	67

CAPÍTULO 4: Efeito do Ácido Mevalônico na Produção de Carotenóides por Leveduras

1. Introdução	73
2. Materiais e Métodos	74
2.1. Leveduras	74
2.2. Condições de cultivo	74
2.2.1. Adição de ácido mevalônico em diferentes concentrações ao meio de cultivo	74
2.2.2. Adição de ácido mevalônico ao meio com limitação de nitrogênio exposto à luz	75
2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual	75
2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides	75
2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência	76
2.4. Análise estatística dos dados	76
3. Resultados e Discussão	77
3.1. Efeito do ácido mevalônico na produção de carotenóides em leveduras	77
3.2. Efeito do ácido mevalônico em meio com limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em leveduras sob luz	81
4. Conclusões	85
5. Referências Bibliográficas	86

CAPÍTULO 5: Efeito de Aminoácidos e Difenilamina na Produção de Carotenóides por Leveduras

1. Introdução	90
2. Materiais e Métodos	92

2.1. Leveduras	92
2.2 Condições de cultivo	92
2.2.1. Adição de difenilamina ao meio de cultivo	92
2.2.2. Limitação de fonte de nitrogênio	92
2.2.3. Adição de aminoácidos com e sem limitação de nitrogênio	92
2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual	93
2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides	93
2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência	94
2.4. Análise estatística dos dados	94
3. Resultados e Discussão	94
3.1. Efeito da adição de difenilamina na produção de carotenóides em leveduras	94
3.2. Efeito da limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras	97
3.3. Efeito da adição de mistura de aminoácidos no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras	100
3.4. Efeito da adição individual de aminoácidos no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras	105
4. Conclusões	108
5. Referências Bibliográficas	109

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	34
Tabela 2: Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	34
Tabela 3: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos com β -ionona	35
Tabela 4: Efeito de diferentes concentrações de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	39

Tabela 5: Efeito de diferentes concentrações de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	39
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada em duas etapas com limitação de glicose	52
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivada em duas etapas com limitação de glicose	52
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3: Efeito da adição de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada em duas etapas sem glicose	56
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 4: Efeito da adição de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivada em duas etapas sem glicose	56
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 5: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada em duas etapas com limitação de nitrogênio sob luz	60
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 6: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotula mucilaginosa</i> cultivada em duas etapas com limitação de nitrogênio sob luz	60
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 7: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos em duas etapas com limitação de nitrogênio e sob luz, na presença de β -ionona e de ácido acético	61
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 8: Efeito da exposição à luz na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	64
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 9: Efeito da exposição à luz na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	64
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 10: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos sob luz	64
--------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> no escuro	77
Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> no escuro	77
Tabela 3: Açúcar residual determinado nos sobrenadantes dos cultivos com diferentes concentrações de ácido mevalônico	78
Tabela 4: Produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada em duas etapas, com adição de 0,1% de ácido mevalônico e limitação de nitrogênio	82
Tabela 5: Produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivada em duas etapas, com adição de 0,1% de ácido mevalônico e limitação de nitrogênio	82
Tabela 6: Açúcar residual determinado nos sobrenadantes dos cultivos em duas etapas em meio com limitação de nitrogênio, na presença de 0,1% de ácido mevalônico, sob exposição à luz	83

CAPÍTULO 5

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de difenilamina na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	95
Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de difenilamina na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	95
Tabela 3: Efeito da limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides por <i>R. glutinis</i>	97
Tabela 4: Efeito da limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides por <i>R. mucilaginosa</i>	98
Tabela 5: Açúcar residual determinado nos sobrenadantes dos cultivos em meio com limitação de nitrogênio	98
Tabela 6: Efeito da mistura de aminoácidos e glicose na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	101
Tabela 7: Efeito da mistura de aminoácidos e glicose na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	101

Tabela 8: Açúcar residual determinado no sobrenadante do meio com mistura de aminoácidos e glicose	101
Tabela 9: Efeito da adição de aminoácidos e da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula glutinis</i>	105
Tabela 10: Efeito da adição de aminoácidos e da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	105
Tabela 11: Açúcar residual determinado nos sobrenadantes dos cultivos com aminoácidos e com limitação de nitrogênio	105

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Sumário dos principais estágios de biossíntese de carotenóides	4
Figura 2: Estágios iniciais da biossíntese de carotenóides	5
Figura 3: Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides	6
Figura 4: Formação de carotenóides cíclicos	7
Figura 5: Formação de xantofilas a partir de α -caroteno	8
Figura 6: Formação de xantofilas a partir de β -caroteno	9
Figura 7: Enzimas produzidas pela clonagem de genes do caminho biossintético de carotenóides em plantas e algas	11
Figura 8: Esquema para formação dos carotenóides principais de <i>Rhodotorula glutinis</i> proposto por Simpson et al.	14

CAPÍTULO 2

Figura 1: Curva de crescimento de <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivada em placa de Petri com meio YM e incubada a 30°C por 72h	33
Figura 2: Curva de crescimento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> cultivada em placa de Petri com meio YM e incubada a 30°C por 72h	33
Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona adicionada em diferentes tempos de cultivo	37
Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginosa</i> obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona adicionada em diferentes tempos de cultivo	38

Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE na presença de 0,1% de ácido acético 40

Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE na presença de 0,1% de ácido acético 41

CAPÍTULO 3

Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona e de 0,1% de ácido acético em meio com limitação de glicose 54

Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona e de 0,1% de ácido acético em meio com limitação de glicose 55

Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona e de 0,1% de ácido acético em meio sem glicose 58

Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona e de 0,1% de ácido acético em meio sem glicose 59

Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE na presença de 0,1% de ácido acético em meio com limitação de nitrogênio sob luz 62

Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE na presença de 10^{-3} M de β -ionona e de 0,1% de ácido acético em meio com limitação de nitrogênio sob luz 63

Figura 7: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE sob luz 66

Figura 8: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE sob luz 67

CAPÍTULO 4

Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de *R. glutinis* obtidos por CLAE na presença de 0,2% de ácido mevalônico 79

Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de *R. mucilaginoso* obtidos por CLAE na presença de 0,2% de ácido mevalônico 80

Figura 3: Caminho biossintético de formação do torularrodina a partir de ácido mevalônico 81

Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE na presença de 0,1% de ácido mevalônico sob luz e no escuro	84
Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginoso</i> obtidos por CLAE na presença de 0,1% de ácido mevalônico sob luz e no escuro	85

CAPÍTULO 5

Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE na presença de 60μM de difenilamina	96
Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginoso</i> obtidos por CLAE na presença de 60μM de difenilamina	97
Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE em meio com limitação de nitrogênio	99
Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginoso</i> obtidos por CLAE em meio com limitação de nitrogênio	100
Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE na presença de 10 ⁻² M de misturas dos aminoácidos asparagina + glutamina ou treonina + prolina	103
Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginoso</i> obtidos por CLAE na presença de 10 ⁻² M de misturas dos aminoácidos asparagina + glutamina ou treonina + prolina	104
Figura 7: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. glutinis</i> obtidos por CLAE na presença de 10 ⁻² M de asparagina ou de fenilalanina	107
Figura 8: Cromatogramas dos carotenóides de <i>R. mucilaginoso</i> obtidos por CLAE na presença de 10 ⁻² M de asparagina ou de fenilalanina	108

RESUMO GERAL

Os carotenóides são corantes naturais, alguns são precursores de vitamina A e, recentemente, a estes compostos tem sido atribuído um importante papel na diminuição do risco de várias doenças degenerativas. A produção biotecnológica de carotenóides específicos, utilizando bactérias, fungos e leveduras, vem despertando crescente interesse. O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de vários agentes químicos na biossíntese de carotenóides, a fim de aumentar e dirigir a carotenogênese para a produção de carotenóides de interesse.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a biossíntese de carotenóides e produção biotecnológica de carotenóides. Alguns fatores que podem influenciar a carotenogênese em leveduras foram considerados, tais como a incidência de luz, temperatura e a adição de agentes químicos ao meio de cultivo.

O Capítulo 2 descreve os efeitos de β -ionona e de ácido acético, adicionados individualmente ou combinados ao meio de cultivo “Yeast and Malt”, nos teores de carotenóides produzidos por *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Foram construídas curvas de crescimento que mostraram que ambas as leveduras necessitavam de 48 horas de cultivo para atingirem a fase estacionária de crescimento. β -ionona inibiu o crescimento e a carotenogênese em ambas leveduras, sendo que quanto mais tarde a adição for feita, menor o grau de inibição. A presença de β -ionona diminuiu a proporção de toruleno e de β -caroteno nas duas leveduras. A adição de ácido acético não afetou o crescimento e a produção de carotenóides em ambas as leveduras, mas aumentou a proporção de β -caroteno em *R. mucilaginosa*.

No Capítulo 3 foram avaliados os efeitos de β -ionona e ácido acético, a incidência de luz, ausência ou limitação de glicose e limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides de *R. glutinis* e de *R. mucilaginosa*. Em meio com limitação de glicose, a β -ionona inibiu o crescimento em ambas as leveduras, sendo a inibição mais intensa em *R. glutinis* que em *R. mucilaginosa*. A produção de carotenóides em *R. glutinis* foi inibida por β -ionona e estimulada por ácido acético, sendo predominante o efeito de inibição por β -ionona na presença de uma mistura de ambos. Em *R. mucilaginosa*, ambos agentes químicos estimularam a produção de carotenóides, com aumento na proporção de toruleno na presença

de ácido acético. O crescimento e a carotenogênese de ambas as leveduras foram estimulados pela presença de β -ionona e de ácido acético em meio sem glicose, com aumento da proporção de torularrodina e de carotenóides minoritários em *R. mucilaginosa*, na presença de β -ionona. Em *R. glutinis* houve diminuição de toruleno e de β -caroteno na presença de ácido acético. Sob limitação de nitrogênio, houve estímulo no crescimento de ambas as leveduras. A adição de ácido acético diminuiu o crescimento de *R. glutinis* e estimulou a produção de carotenóides, mantendo o perfil qualitativo. A presença de β -ionona reprimiu totalmente a carotenogênese. Em *R. mucilaginosa*, β -ionona e ácido acético aumentaram a proporção de toruleno, com pequeno aumento de β -caroteno. A luz não afetou o crescimento e a produção de carotenóides, o perfil qualitativo dos carotenóides sendo mantido.

O Capítulo 4 demonstra o efeito de ácido mevalônico no crescimento e na carotenogênese das leveduras do gênero *Rhodotorula*, utilizando diferentes concentrações deste agente químico em meio YM e cultivos com limitação de nitrogênio sob luz. Os resultados revelaram que o ácido mevalônico não teve efeito no crescimento mas estimulou a produção de carotenóides em ambas as leveduras, sendo este efeito mais marcante em *R. mucilaginosa*, com expressivo aumento de toruleno. Sob limitação de nitrogênio, tanto sob luz quanto no escuro, a presença de 0,1% de ácido mevalônico diminuiu a biomassa em *R. glutinis* e aumentou em *R. mucilaginosa*. A carotenogênese aumentou, com maiores proporções de toruleno e de β -caroteno em *R. glutinis*.

O Capítulo 5 mostra o cultivo das leveduras na presença de difenilamina, de misturas de aminoácidos (asparagina e glutamina), (treonina e prolina), e de asparagina e fenilalanina, adicionadas individualmente, e da limitação de nitrogênio. A difenilamina não afetou o crescimento, mas provocou inibição da produção de carotenóides em ambas as leveduras. Em *R. mucilaginosa*, houve aumento na proporção de β -caroteno. A limitação de nitrogênio diminuiu a produção de biomassa e dobrou a de carotenóides em ambas as leveduras, sendo mantido o perfil qualitativo dos carotenóides. As misturas de aminoácidos avaliadas diminuíram o crescimento e produção de carotenóides nas duas leveduras, com aumento na proporção de torularrodina. A adição individual de aminoácidos, entretanto, não teve efeito no crescimento das leveduras, mas asparagina estimulou a carotenogênese em *R. glutinis*. Em *R. mucilaginosa*, asparagina e fenilalanina não tiveram efeito na produção total de carotenóides, mas diminuíram o teor de toruleno.

GENERAL ABSTRACT

Carotenoids are natural colorants, some are precursors of vitamin A and, recently, these compounds have been attributed an important role in reducing the risk of various degenerative diseases. The biotechnological production of specific carotenoids, utilizing bacteria, fungi and yeasts, have attracted increasing interest. The present work had the objective of studying the effects of various chemical agents on the biosynthesis of carotenoids, with the aim of increasing and directing carotenogenesis to the production of carotenoids of interest.

Chapter 1 presents a bibliographic review of carotenoid biosynthesis and the biotechnological production of carotenoids. Some factors that influence carotenogenesis in yeasts were considered, such as incidence of light, temperature and the addition of chemical agents to the cultivation medium.

Chapter 2 shows the effects of β -ionone and acetic acid, added individually or in combination to the culture medium Yeast Malt, on the amount of carotenoids produced by *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The growth curves were constructed, demonstrating that both yeasts required 48 hours to reach the stationary phase of growth. β -ionone inhibited growth and carotenogenesis in both yeasts, the degree of inhibition being lower the later the addition is made. The presence of β -ionone reduced the proportions of torulene and β -carotene in the two yeasts. The addition of acetic acid did not affect growth and the production of carotenoids in both yeasts, but raised the proportion of β -carotene in *R. mucilaginosa*.

In Chapter 3, the effects of β -ionone and acetic acid, incidence of light, absence or limitation of glucose and limitation of nitrogen on the growth and the production of carotenoids in *R. glutinis* and *R. mucilaginosa* were studied. In the medium with limited glucose, β -ionone inhibited the growth of both yeasts, the inhibition being more intense in *R. glutinis* than in *R. mucilaginosa*. The production of carotenoids in *R. glutinis* was inhibited by β -ionone and stimulated by acetic acid, the inhibiting effect of β -ionone predominating in the presence of a mixture of the two. In *R. mucilaginosa*, both agents stimulated the production of carotenoids, with an increase in the proportion of torulene in the presence of acetic acid. Growth and carotenogenesis in both yeasts were enhanced by the presence of β -ionone and

acetic acid in the medium without glucose, with an increase in the proportion of torularhodin and the minor carotenoids in *R. mucilaginosa*, in the presence of β -ionone. In *R. glutinis*, there was a decrease in torulene and β -carotene in the presence of acetic acid. Under the limitation of nitrogen, there was an increase in the growth of both yeasts. The addition of acetic acid reduced the growth of *R. glutinis* and stimulated the production of carotenoids, maintaining the qualitative pattern. The presence of β -ionone totally repressed carotenogenesis. In *R. mucilaginosa*, β -ionone and acetic acid raised the proportion of torulene, with a small increase in β -carotene. Light did not affect growth and production of carotenoids, the qualitative pattern of the carotenoids being maintained.

Chapter 4 demonstrates the effect of mevalonic acid on the growth and carotenogenesis of yeast of the genus *Rhodotorula*, utilizing different concentrations of this chemical agent in the medium YM and in cultures with nitrogen limitation under light. The results showed that mevalonic acid did not have any effect on growth but stimulated the production of carotenoids in both yeasts, the effect being more pronounced in *R. mucilaginosa*, with a marked increase in torulene. Under nitrogen limitation, with light or in the dark, the presence of 0.1% mevalonic acid decreased the biomass in *R. glutinis* and increased it in *R. mucilaginosa*. Carotenogenesis increased, with higher proportions of torulene and β -carotene in *R. glutinis*.

Chapter 5 shows the cultivation of yeasts in the presence of diphenylamine, mixtures of amino acids (asparagine and glutamina, threonine and proline), and asparagine and phenylalanine added individually, in medium with limited nitrogen. Diphenylamine did not affect growth, but provoked the inhibition of the production of carotenoids in both yeasts. In *R. mucilaginosa*, there was an increase in the proportion of β -carotene. The nitrogen limitation decreased the production of biomass and doubled that of carotenoids in both yeasts, the qualitative pattern being maintained. The mixtures of amino acids evaluated reduced the growth and the production of carotenoids in both yeasts, with an increase in the proportion of torularhodin. The individual addition of amino acids, however, did not have an effect on the growth of the yeasts, but asparagine stimulated carotenogenesis in *R. glutinis*. In *R. mucilaginosa*, asparagine and phenylalanine did not affect the total production of carotenoids, but decreased the level of torulene.

INTRODUÇÃO GERAL

Os carotenóides são corantes naturais biossintetizados em plantas e em microrganismos. São tetraterpenóides hidrocarbonetos ou derivados oxigenados, denominados carotenos e xantofilas, respectivamente.

Estes compostos são responsáveis pelas cores atraentes exibidas por frutas, flores, raízes, peixes e crustáceos. A cor de um alimento depende dos carotenóides presentes, da concentração e do seu estado físico. Os carotenóides são encontrados em alimentos de origem vegetal cuja composição é complexa devido à presença de precursores biossintéticos e derivados dos principais carotenóides. Alimentos de origem animal, como gema de ovo e peixe, também apresentam carotenóides, mas em menor número e concentração, sendo estes provenientes da dieta.

O uso de carotenóides como corantes alimentícios apresenta vantagens porque são de origem natural, são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos, não são corrosivos e nem são afetados por substâncias redutoras. As desvantagens estão relacionadas com o alto custo comparado aos corantes sintéticos, a limitada faixa de coloração, a susceptibilidade à degradação oxidativa, a limitada solubilidade em óleo e insolubilidade em água. Estes últimos dois problemas, porém, já foram solucionados tecnologicamente.

Sendo lipofílicos, insolúveis em água e capazes de ligar com superfícies hidrofóbicas, os carotenóides são encontrados na natureza como soluções oleosas, dispersões coloidais, ou complexos com proteínas. São, portanto, comercializados como suspensões oleosas para alimentos na base de óleo ou como emulsões coloidais dispersíveis em alimentos na base de água.

A importância de carotenóides em alimentos vai além de seu papel como corante. Em se tratando de nutrição humana, a vitamina A é proveniente de alimentos de origem animal e as pró-vitaminas A de alimentos de origem vegetal, que possuem carotenóides passíveis de serem biologicamente transformados em vitamina A. Estruturalmente, a vitamina A é a metade da molécula de β -caroteno com uma molécula adicional de água. Para um carotenóide apresentar atividade pró-vitáminica A é necessário que a molécula seja constituída de um anel β não substituído e de uma cadeia poliênica de onze carbonos. Das mais de 600 estruturas de carotenóides conhecidas, pouco mais de 10% são pró-vitaminas A. Em países menos desenvolvidos, a deficiência de vitamina A é um dos problemas mais sérios de saúde pública.

Em nível mundial, cerca de 60% da vitamina A alimentar vêm das pró-vitaminas A; esta porcentagem aumenta para 80% nos países em desenvolvimento. Esses precursores têm a vantagem adicional de não serem convertidos em vitamina A quando o corpo humano não necessita, evitando assim, potencial toxicidade causada por vitamina A em excesso.

Nos últimos vinte anos as evidências científicas dão importância aos carotenóides não apenas pela ampla aplicação como corantes de alimentos e como precursores de vitamina A, mas também pelos efeitos benéficos para a saúde humana na diminuição de riscos de doenças degenerativas e fortalecimento do sistema imunológico. Entre as doenças contra as quais os carotenóides podem atuar estão os vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular.

A estrutura de um carotenóide é decisiva para as suas propriedades e funções. Sabe-se que o licopeno (acíclico) é mais efetivo como antioxidante que β -caroteno (bicíclico), que é a pró-vitamina A mais potente. Os carotenóides implicados na prevenção de degeneração macular são a luteína e a zeaxantina.

Os carotenóides em formulações comerciais são de dois tipos: extratos naturais e carotenóides sintéticos idênticos aos naturais. Os extratos naturais estão sujeitos a flutuações na composição qualitativa e quantitativa devido ao clima ou a região de cultivo, ao estado de maturação na colheita e perdas devidas às condições pós-colheita. Além disso, as fontes vegetais também produzem baixas concentrações de pigmentos, dificultando a extração.

A produção e comercialização de carotenóides sintéticos idênticos aos naturais estão sob o domínio de países desenvolvidos e sua tecnologia é complexa e cara. A conotação sintética vai contra a presente ênfase dada aos produtos naturais.

Mais recentemente, processos de fermentação utilizando microrganismos vêm sendo pesquisados para a produção de carotenóides. As vantagens são as seguintes: (1) os microrganismos têm a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para sua produção; (2) os carotenóides produzidos são considerados substâncias naturais; (3) a produção se dá em pequeno espaço não estando sujeita às condições ambientais como o clima, (4) existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóides de maior importância.

A biossíntese de carotenóides pode ser dirigida ou regulada por certos agentes químicos de maneira a produzir carotenóides específicos. Isso pode representar uma abordagem viável antes da aplicação da técnica de Engenharia Genética para a produção de

carotenóides. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes compostos (β -ionona, ácido mevalônico, ácido acético, difenilamina e alguns aminoácidos) no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras do gênero *Rhodotorula*. Dentro do objetivo foi feita ainda uma avaliação da influência de alterações nas condições de cultivo como limitação de fonte de carbono e de nitrogênio, mudança de temperatura e aplicação de luz no teor dos carotenóides majoritários. A composição qualitativa dos carotenóides foi também avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

CAPÍTULO 1

BIOSSÍNTESE E PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENÓIDES: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

RESUMO

Os carotenóides são corantes naturais biossintetizados por plantas, algas, bactérias, leveduras e fungos. O caminho biossintético encontra-se elucidado e os trabalhos de biossintese atualmente, procuram esclarecer os mecanismos de regulação biossintética. A produção biotecnológica de carotenóides tem sido investigada devido a crescente demanda comercial destes compostos. Entre os principais microrganismos estudados destacam-se *Phaffia rhodozyma*, *Dunaliella sp*, *Haematococcus pluvialis* e *Rhodotorula glutinis* para a produção de β -caroteno e de astaxantina. A biossintese de carotenóides pode ser dirigida ou regulada pela presença de certos agentes químicos no meio de cultivo. Alguns estudos focalizam a utilização de linhagens melhoradas e a manipulação das condições de cultivo, com o uso de precursores ou inibidores do caminho biossintético, tanto para minimizar os custos de produção quanto para a obtenção de pigmentos de interesse.

Palavras-chave: Carotenóides, biossintese, biotecnologia, produção microbiana.

ABSTRACT

Carotenoids are natural colorants biosynthesized by plants, algae, bacteria, yeasts and molds. The biosynthetic pathway has been elucidated and studies on biosynthesis presently seek to clarify the mechanisms involved in the regulation of the biosynthesis. The biotechnological production of carotenoids has been investigated due to the increasing commercial demand for these compounds. Among the principal microorganisms are *Phaffia rhodozyma*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* and *Rhodotorula glutinis* for the production of β -carotene and of astaxanthin. The biosynthesis of carotenoids can be directed or regulated by the presence of certain chemical agents in the culture medium. Some studies focalize the utilization of improved strains and manipulation of the culture conditions, with the use of precursors and inhibitors of the biosynthetic pathways, to minimize costs of production as well as obtaining the pigments of interest.

Key words: carotenoids, biosynthesis, biotechnology, microbial production

1. INTRODUÇÃO

Estruturalmente, os carotenóides são geralmente tetraterpenóides de quarenta carbonos compostos de oito unidades de isoprenóides (5C) ligadas de tal forma que a molécula seja invertida no centro. O esqueleto básico é linear e simétrico, podendo ser ciclizado em uma ou em ambas as terminações, formando anéis de seis átomos de carbono. A ciclização e outras modificações como hidrogenação, desidrogenação, migração de uma dupla ligação, diminuição ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes com oxigênio ou uma combinação destes processos resultam em uma grande variedade de estruturas. Os carotenóides que contêm em sua estrutura somente átomos de carbono e hidrogênio são classificados como carotenos enquanto que os que contêm, além de carbono e hidrogênio, átomos de oxigênio são classificados como xantofilas. O sistema de duplas ligações conjugadas é o cromóforo que absorve luz e é responsável pela coloração que estes compostos conferem aos alimentos.

2. BIOSÍNTESE DE CAROTENÓIDES

2.1. O caminho biossintético

O caminho biossintético tem sido constantemente revisado e de acordo com Britton [9] pode ser dividido em 5 etapas: estágios iniciais, formação de fitoeno, dessaturação, ciclização e formação de xantofilas, como descrito na Figura 1.

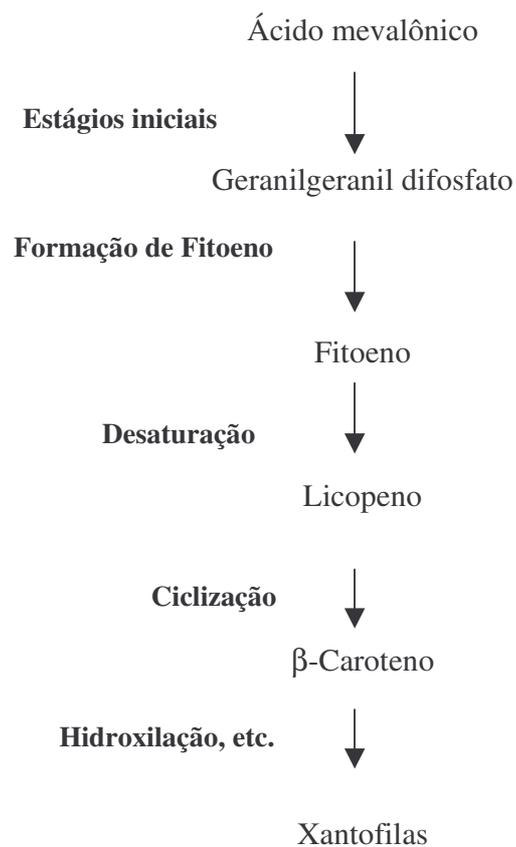


Figura 1: Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenóides

As reações iniciais [9, 19] são comuns para a biossíntese de todas as classes de terpenóides e resultam na formação de um composto de vinte carbonos, o geranylgeranyl difosfato (GGPP) como descrito na Figura 2.

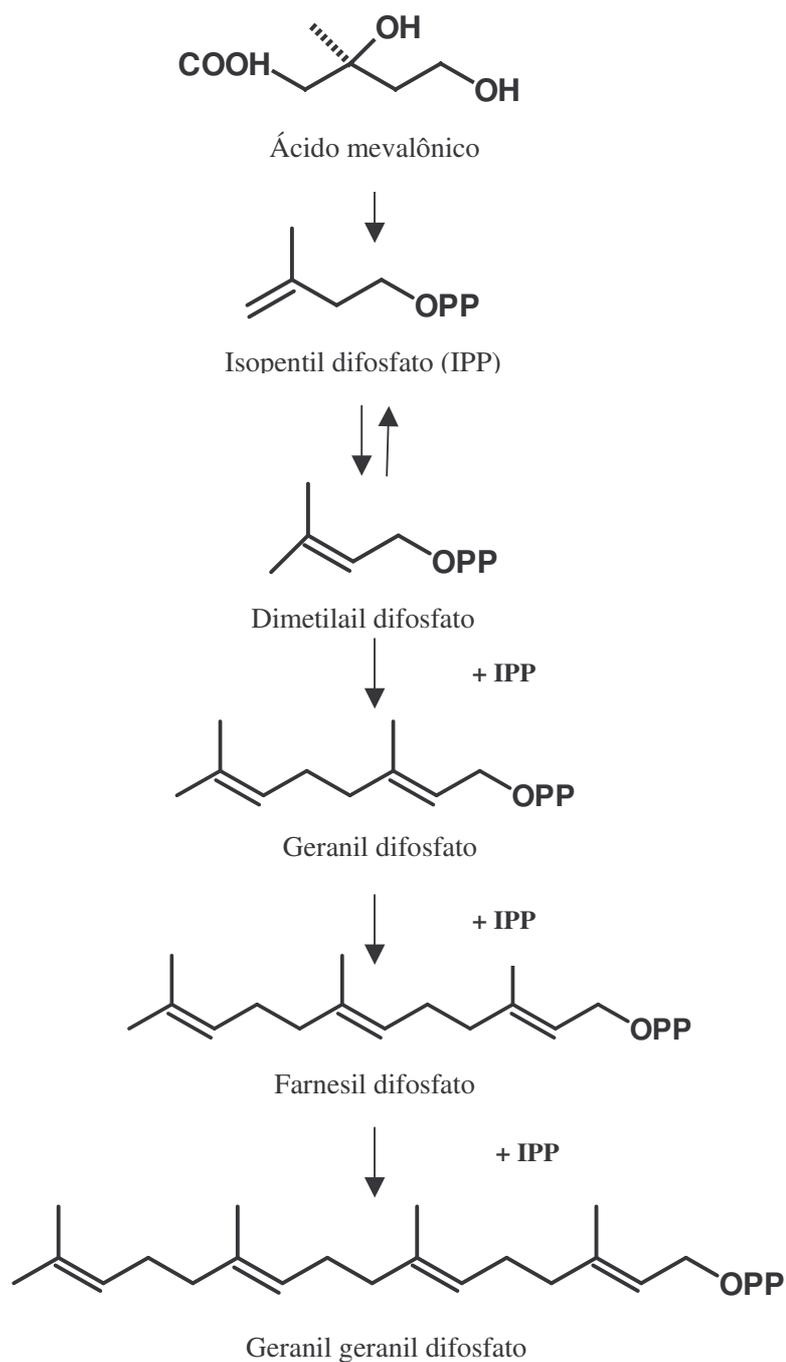


Figura 2: Estágios iniciais da biossíntese de carotenóides

Inicialmente o ácido mevalônico é convertido em isopentil difosfato que sofre isomerização para formar o dimetilail difosfato que é a base para a alongação da cadeia. Sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato levam a formação do geranyl difosfato (dez carbonos), farnesil difosfato (quinze carbonos) e geranylgeranyl difosfato (vinte carbonos).

A reação chave para a carotenogênese é a dimerização de duas moléculas de geranylgeranildifosfato para formar o fitoeno, que é o primeiro carotenóide com quarenta carbonos. Segue uma série de desaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno e, finalmente, licopeno (Figura 3).

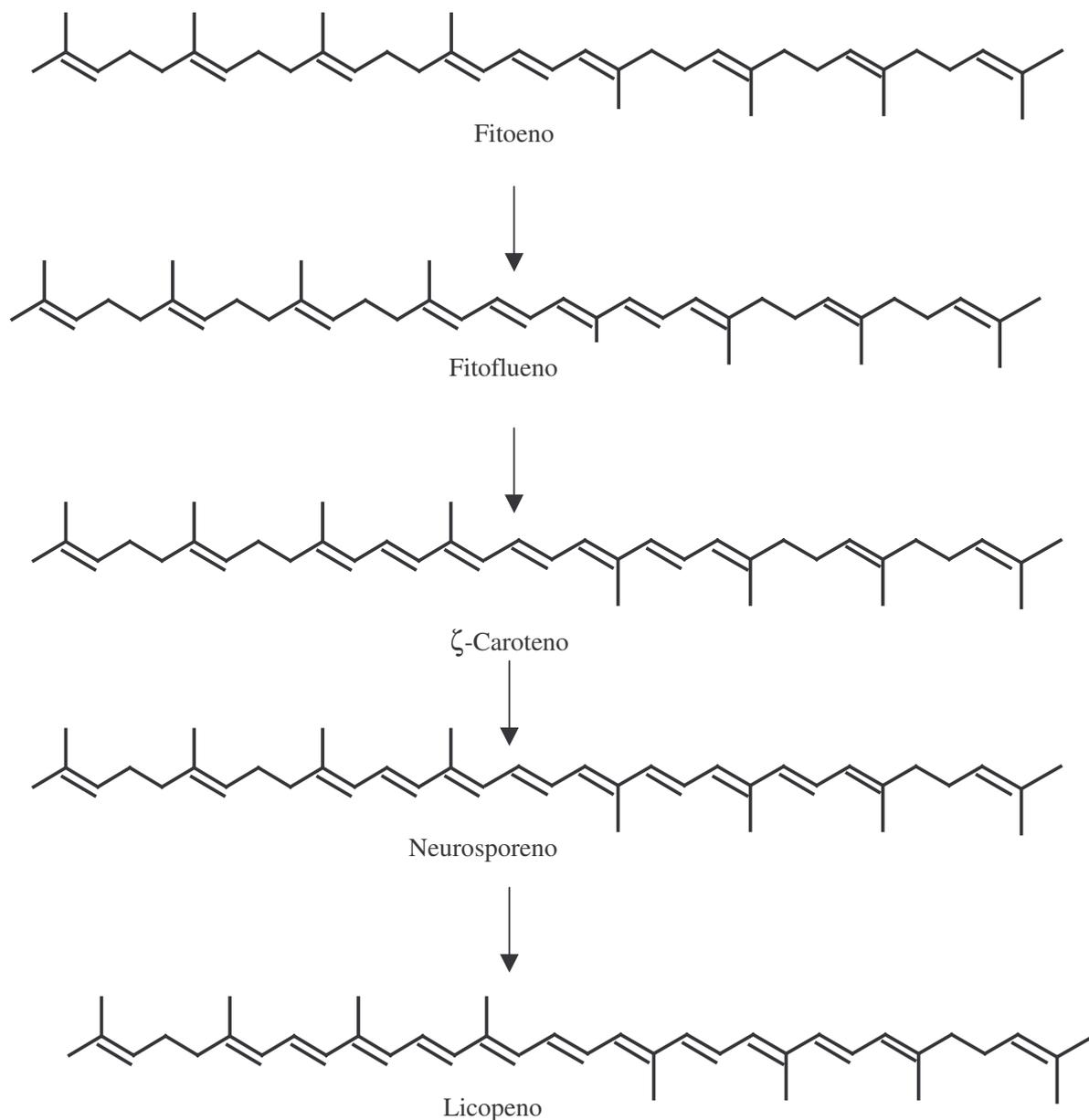


Figura 3: Estágios intermediários da biossíntese de carotenóides

A ciclização pode acontecer a partir de neurosporeno ou de licopeno (Figura 4). O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β -zeacaroteno ou o anel ϵ de α -zeacaroteno. Estes dois carotenóides são transformados em γ -caroteno e δ -caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de duplas ligações conjugadas. O licopeno pode ser também ciclizado em uma das extremidades, gerando γ -caroteno ou δ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -caroteno e α -caroteno (bicíclicos), respectivamente (Figura 4).

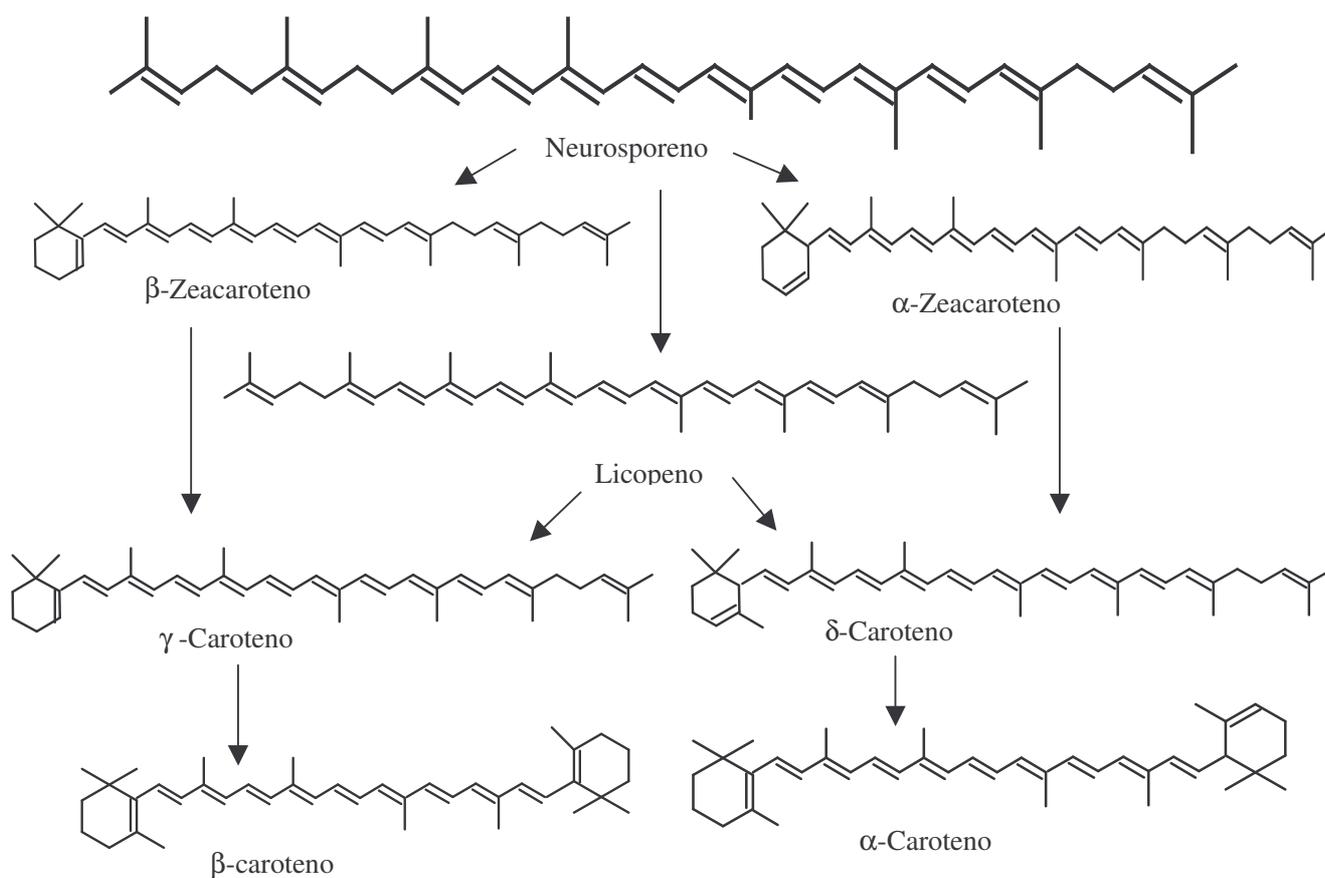


Figura 4: Formação de carotenóides cíclicos

Nos passos finais da biossíntese ocorre a introdução de substituintes como hidroxila, gerando as xantofilas (Figuras 5 e 6). Zeinoxantina, α -criptoxantina (monohidroxiladas) e luteína (dihidroxilada) são formadas por hidroxilação de α -caroteno. β -criptoxantina e

zeaxantina são derivados hidroxilados de β -caroteno enquanto que a violaxantina é formada pela epoxidação da zeaxantina.

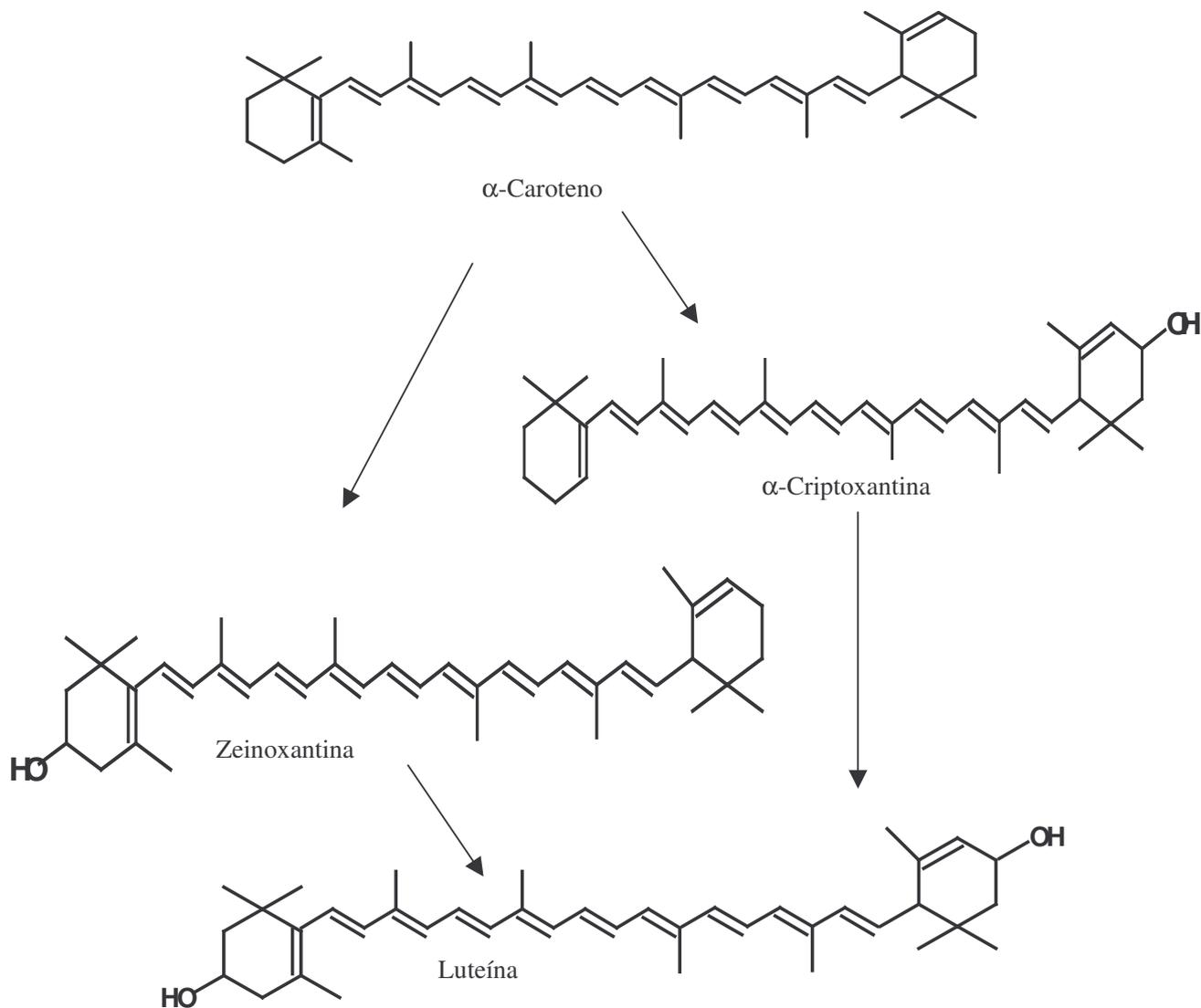


Figura 5: Formação de xantofilas a partir de α -caroteno

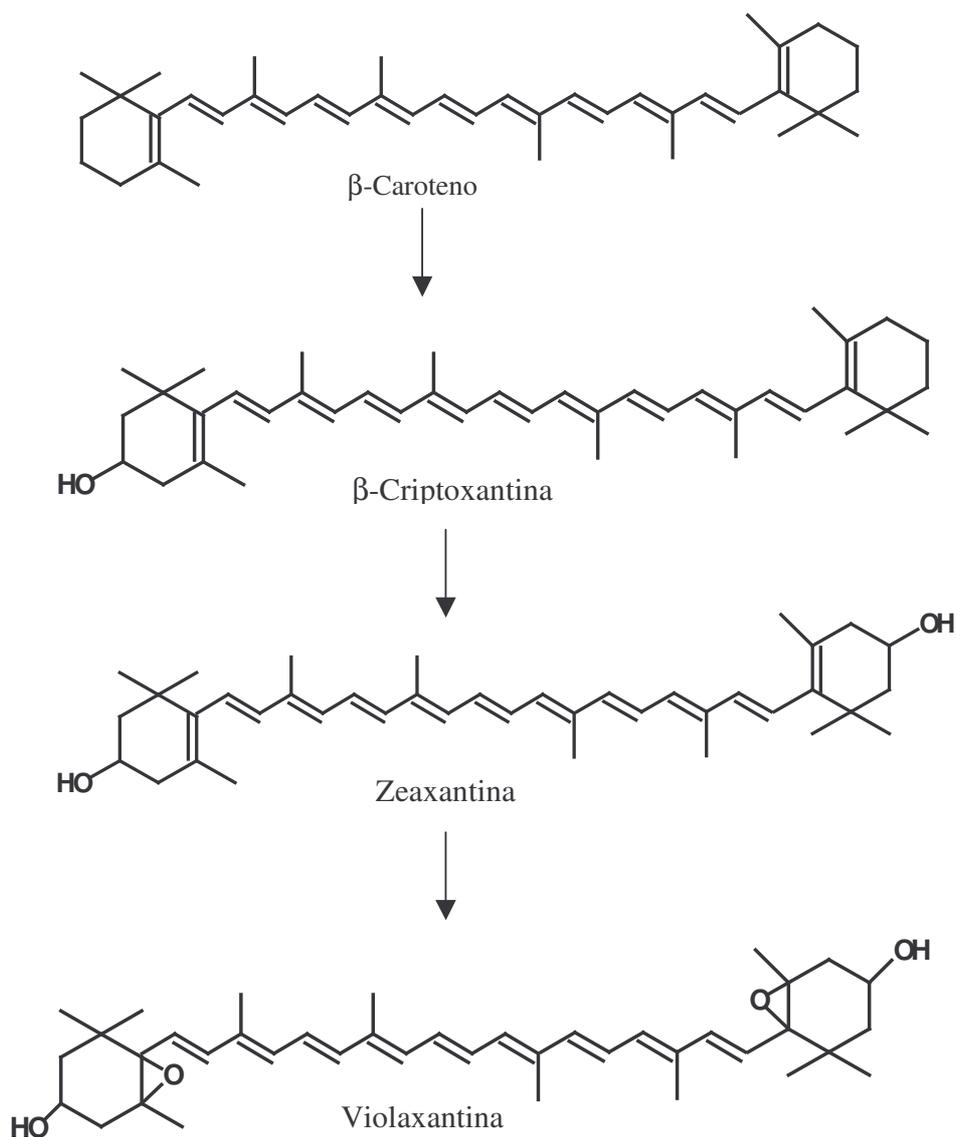


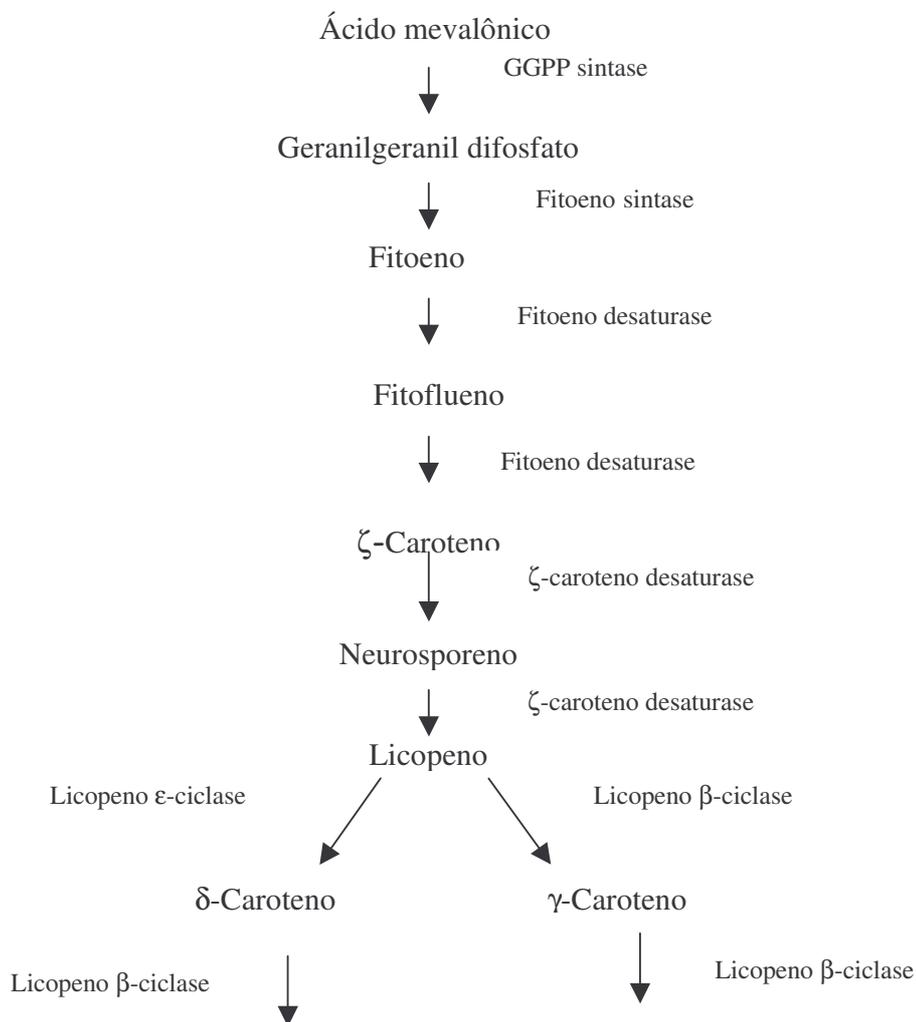
Figura 6: Formação de xantofilas a partir de β -caroteno

Os vários passos na biossíntese de carotenóides foram postulados há várias décadas através de análises bioquímicas padronizadas, utilizando precursores marcados, inibidores específicos e caracterização de mutantes. Entretanto, a falta de ensaios *in vitro* com enzimas envolvidas na conversão do fitoeno aos carotenos e xantofilas predominantes, retardou a confirmação definitiva do caminho biossintético. Esta demora foi devido ao fato de tratar-se

de enzimas da membrana, que são muito lábeis durante a purificação, tornando seu isolamento uma tarefa complicada [34].

2.2. Clonagem dos genes de enzimas carotenogênicas

Estudos recentes conseguiram a clonagem de enzimas carotenogênicas de vários organismos: bactérias, cianobactérias, fungos, algas e plantas [10, 34, 29]. Os genes para praticamente todas as enzimas, desde as etapas iniciais até a formação de xantofilas, já foram clonados (Figura 7). Assim, o caminho biossintético proposto ao longo dos anos está definitivamente comprovado.



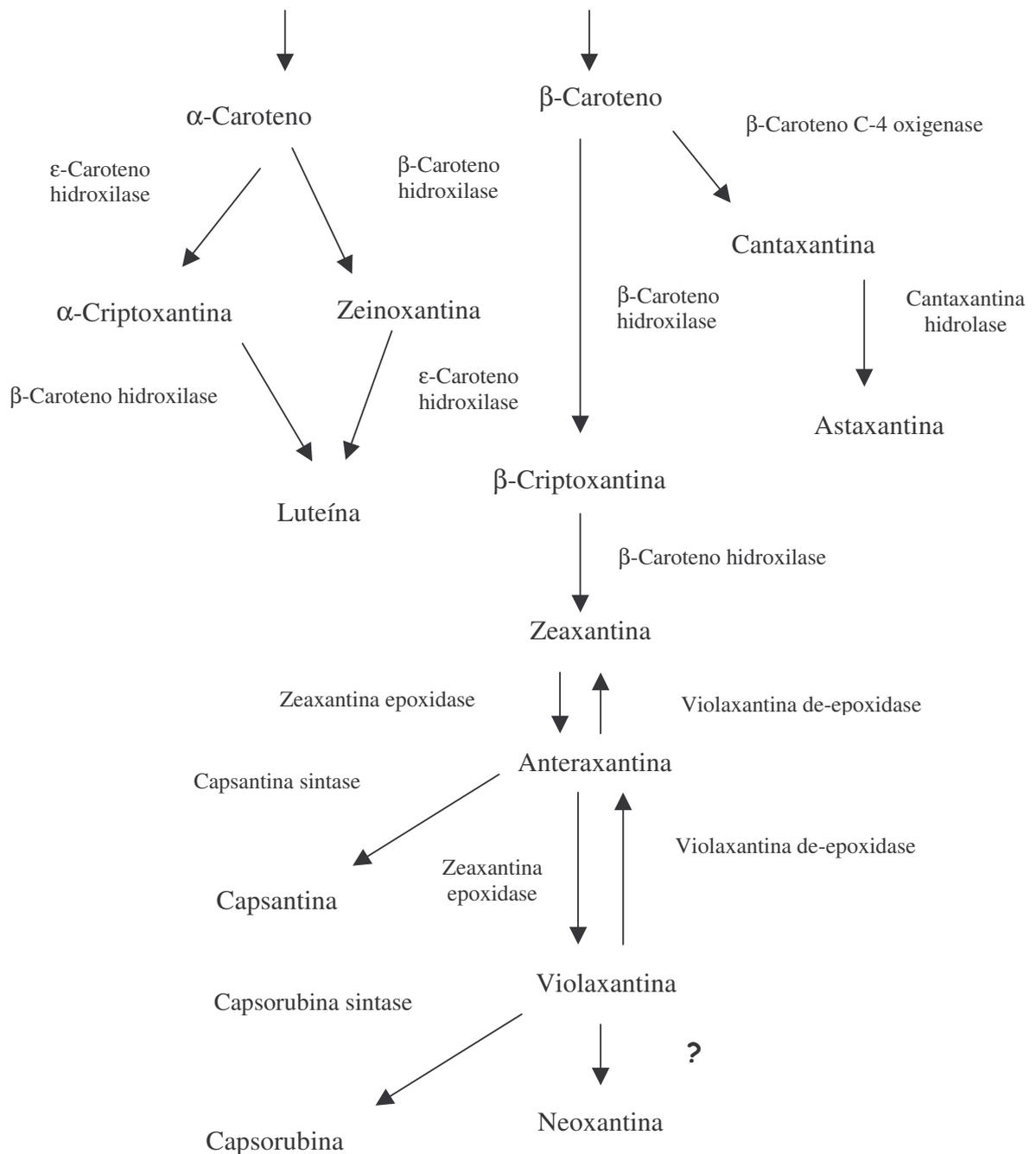


Figura 7: Enzimas produzidas pela clonagem dos genes do caminho biossintético de carotenóides em plantas e algas [34]

A clonagem de genes carotenogênicos tem sido de grande importância para entender os mecanismos moleculares que levam a biossíntese de carotenóides. Além disso, a clonagem de genes de bactérias carotenogênicas tem aumentado o potencial para a produção biotecnológica

de diferentes carotenóides. Os genes clonados vêm sendo utilizados para a produção de carotenóides em bactérias e leveduras não carotenogênicas [3, 6, 16, 38, 42].

3. PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR BIOTECNOLOGIA

A produção biotecnológica de carotenóides para a aplicação industrial, através de microrganismos, tem sido assunto de destaque nos últimos anos. As vantagens são as seguintes:

- Os microrganismos têm a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para sua produção.
- Os carotenóides produzidos são considerados substâncias naturais.
- A produção se dá em pequeno espaço, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo.
- Existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóides de maior importância.

Uma variedade de carotenóides, com estruturas específicas, pode ser obtida a partir da exploração do reino microbiano. A produção de carotenóides através de microrganismos constitui hoje uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos de origem natural em escala industrial. Já existe a produção comercial de β -caroteno através da microalga *Dunaliella salina* [3, 7].

Microrganismos como a microalga *Haematococcus* e a levedura *P. rhodozyma* têm sido estudados para a produção de astaxantina [1, 2, 8, 15, 32], pigmento principal de crustáceos e peixes como truta e salmão. A maioria dos estudos busca otimizar as condições de cultivo, que influenciam diretamente o crescimento dos microrganismos e a produção de carotenóides, sendo que as condições ótimas para ambos muitas vezes não coincidem.

Estudos com *Phaffia rhodozyma* demonstraram que o oxigênio desempenha um importante papel na biossíntese de astaxantina e que alta concentração de glicose inibe o crescimento [44]. Maiores níveis de astaxantina foram obtidos quando as células foram iluminadas durante a fase de crescimento exponencial com a produção máxima obtida sob iluminação contínua de intensidade moderada [41].

Recentes desenvolvimentos em Biologia Molecular de biossíntese de carotenóides, a partir de organismos que sintetizam diferentes carotenóides, têm fornecido uma variedade de

genes que estão sendo empregados para a expressão em diferentes hospedeiros. Esta estratégia, entretanto, depende da especificidade do substrato da enzima e torna necessária uma caracterização bioquímica detalhada para a escolha apropriada dos genes que serão utilizados [16, 44].

O uso da tecnologia de DNA recombinante pode aumentar a produtividade incluindo, entre as estratégias, a introdução de genes que codificam enzimas envolvidas no caminho biossintético isoprenóide em hospedeiros não carotenogênicos [3, 56]. Entretanto, a simples aplicação destas técnicas para aumentar a produção de carotenóides provavelmente não levará ao desenvolvimento de um processo viável. Há necessidade de se desenvolver estratégias para a produção de carotenóides específicos e de hospedeiros que sejam capazes de suportar a superprodução de carotenóides combinada com produção de biomassa de baixo custo.

4. CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS

Espécies de vários grupos taxonômicos – bactérias fotossintéticas e não-fotossintéticas [11, 12, 30], fungos [30] e leveduras[35] – são produtoras de carotenóides. Entre as leveduras, *Rhodotorula* [13, 14, 26, 27], *Rhodospiridium* [43], *Sporobolomyces* [35], e *Phaffia* [2, 15, 39, 41, 50] são capazes de produzir carotenóides. O tipo e a concentração dos vários pigmentos formados dependem das espécies de microrganismos e das condições de cultivo. As espécies *Rhodotorula* e *Rhodospiridium* produzem principalmente β -caroteno e toruleno [18, 43] e *P. rhodozyma* é produtora de astaxantina [2, 23, 39]. As leveduras são capazes de biossintetizar carotenóides a partir de substratos contendo mono e dissacarídeos e em substratos naturais como o melão [32], soro de leite [27] e suco de uva [39].

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são capazes de sintetizar carotenóides intracelularmente, além de outras substâncias ativas exocelularmente. Ainda que a biossíntese de carotenóides por leveduras seja bem conhecida, seu uso industrial ainda é restrito devido à pouca informação disponível sobre os mecanismos de regulação biossintética e também à ausência de estudos dirigidos, tanto para o aumento da biomassa quanto para produção dos carotenóides [13, 14, 26].

Considerando as estruturas dos carotenóides identificados em *R. glutinis*, Simpson *et al.* [53] propuseram a via biossintética dos carotenóides principais mostrados na Figura 8.

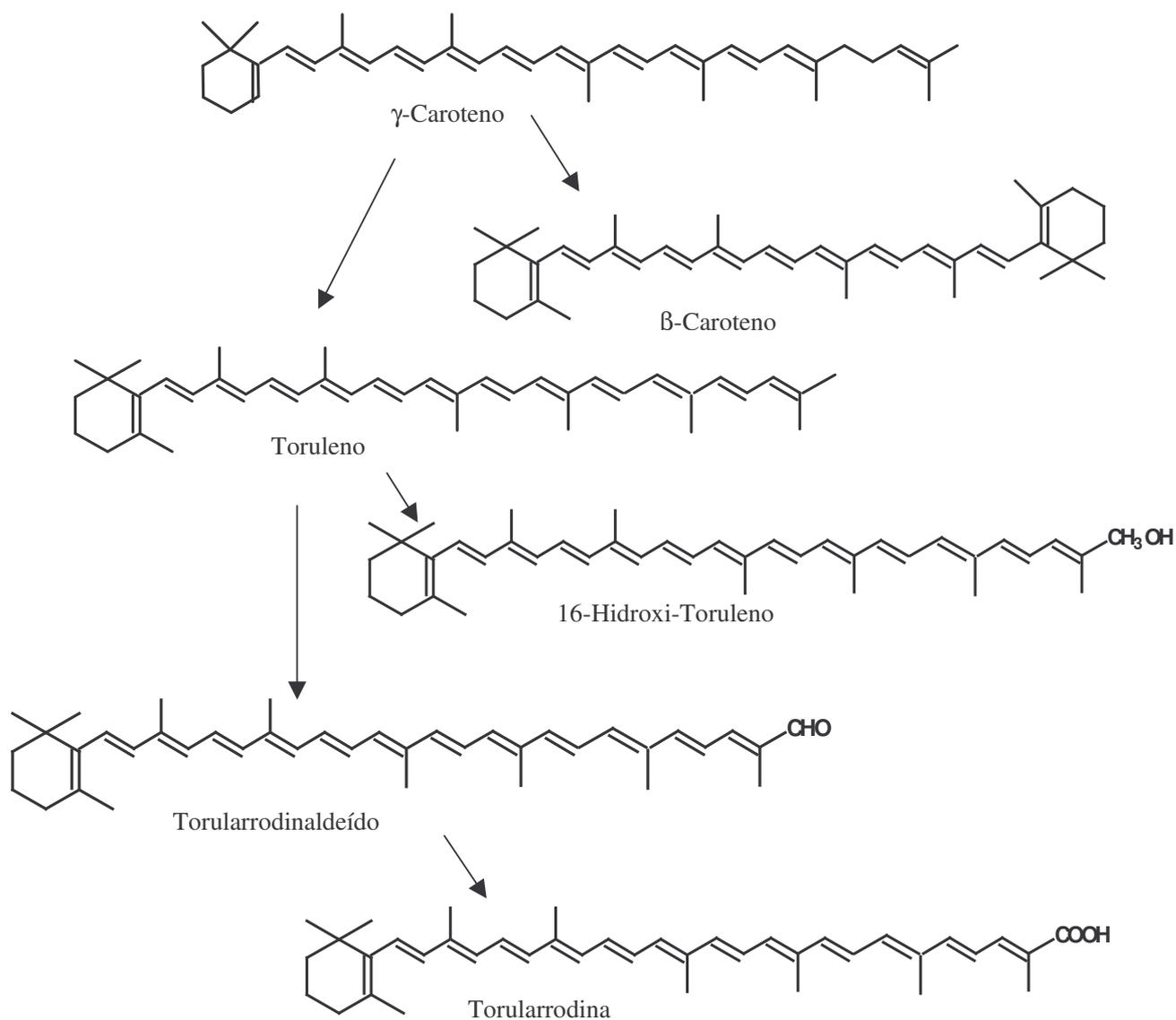


Figura 8: Esquema para formação dos carotenóides principais de *Rhodotorula glutinis* proposto por Simpson *et al.* [53]

Leveduras comestíveis como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* não são capazes de sintetizar carotenóides, porém, apresentam ergosterol como principal isoprenóide. O caminho biossintético para o ergosterol abrange o farnesil pirofosfato, o que torna possível direcionar o fluxo de carbono para a produção de carotenóides através da introdução de genes carotenogênicos pela técnica de DNA recombinante [48, 49].

Recentemente, carotenóides têm sido produzidos por bactérias e leveduras não carotenogênicas através da técnica de DNA recombinante, na tentativa de expressar os genes para a biossíntese de carotenóides estruturalmente diferentes como o licopeno, β -caroteno e zeaxantina em *Escherichia coli* [49, 56].

5. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENÓIDES

5.1. Efeito da composição do meio de cultivo

A produção biotecnológica de carotenóides atualmente é uma área de intensa investigação devido à possibilidade da obtenção de compostos de origem natural em escala industrial. Entretanto, entre as limitações para o desenvolvimento e para otimização da produção comercial de carotenóides está a baixa produção por linhagens selvagens e a pouca informação sobre os mecanismos de regulação da carotenogênese microbiana [13].

Diante destas dificuldades, vários pesquisadores vêm tentando aumentar a produção de carotenóides através do melhoramento das linhagens e da manipulação das condições de fermentação [4, 5, 13, 20]. Outro aspecto importante na produção biotecnológica de carotenóides é o custo de produção e uma tendência dos trabalhos nesta área tem sido a otimização do meio de cultivo com aplicação de fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo [14, 24, 25, 31].

A otimização dos processos de produção está baseada em três aspectos principais: o efeito de fatores ambientais como temperatura, aeração, pH, iluminação, agitação; otimização da composição de cultivo; e a seleção de linhagens de microrganismos que suportem bem a carotenogênese [28, 31, 47, 50].

A disponibilidade de fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultivo é importante para o crescimento do microrganismo e para a carotenogênese. Nos últimos dez anos, a maioria dos trabalhos envolvendo a produção de carotenóides por via fermentativa tem utilizado fontes alternativas de carbono, como hidrolisados industriais ricos em xilose, glicose, celobiose, amido de milho, melação, sacarose e nitrogênio como farinha de soja e proteína de colágeno. A preferência por estas fontes é devido à facilidade da obtenção de soluções não

refinadas desses açúcares, em larga escala, além da diminuição do custo de produção devido à utilização de resíduos industriais [13, 22, 24].

Mudanças na biossíntese de carotenóides causadas por alterações nas condições de cultivo de *R. glutinis* foram investigadas por Sakaki *et al.* [46]. Eles observaram maior produção de torularrodina em células crescidas em lactato comparadas àquelas crescidas em glicose, sugerindo que a diferença na fonte de carbono levou a uma mudança no sistema de biossíntese de carotenóides nessa levedura.

Além das fontes de carbono, uma grande variedade de fontes de nitrogênio vem sendo utilizada em estudos de otimização da produção de carotenóides pelos mais diversos microrganismos. Em geral boas fontes de nitrogênio são amônia, glutamina e asparagina. A regulação de nitrogênio tem amplo significado em microbiologia industrial uma vez que afeta a síntese de enzimas envolvidas nos metabolismos primários e secundários, e pode afetar a produção de carotenóides [22, 28, 31, 47].

Borowitzka & Borowitzka [8] verificaram que o acúmulo de β -caroteno em *Dunaliella* é aumentado pela limitação de nitrogênio. Eles postularam que a limitação de nutrientes não apenas leva a um aumento na biossíntese de carotenóides como também tem efeito sobre o metabolismo de proteínas. Baixas quantidades de fontes apropriadas de nitrogênio induzem a um aumento na biomassa em *P. rhodozyma* [25].

Uma outra tendência nos estudos de meios alternativos para melhorar a biossíntese de carotenóides por leveduras é baseada na co-fermentação de dois diferentes microrganismos, associada à síntese extracelular de substâncias bio-ativas, como álcoois e polissacarídeos [20, 26, 52].

5.2. Efeito de agentes químicos

Alguns pesquisadores estudaram o efeito de alguns inibidores na biossíntese de carotenóides. Um trabalho com linhagens mutantes de *Phycomyces blakeleeanus*, foi realizado com o objetivo de estudar melhor o caminho biossintético de carotenóides, bem como o seu controle [36]. Este estudo possibilitou verificar os efeitos de agentes químicos como difenilamina, dimetilsulfóxido, estreptomicina, e β -ionona na biossíntese de carotenóides. Os resultados mostraram que em alguns pontos do caminho biossintético, há efeitos de inibição ou estímulo, resultando na diminuição ou no aumento de certos carotenóides específicos de acordo com o agente utilizado. Isso significa que a biossíntese de carotenóides pode ser

dirigida ou regulada por certos agentes químicos, de maneira a produzir carotenóides específicos.

Cohen-Bazire e Stainer [17] observaram um acúmulo de fitoeno em *Rhodospirillum rubrum* pelo uso de 70 μ M de difenilamina. Outro estudo demonstrou que a inibição da produção de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* por difenilamina é associada ao acúmulo de β -caroteno e diminuição de cantaxantina [21,51].

Ainda que β -ionona estimule a carotenogênese em *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora*, Lewis *et al.* [37] observaram estímulo na formação de β -caroteno em *P. rhodozyma*, sendo que β -ionona inibiu claramente a formação de xantofilas pelo bloqueio da síntese de astaxantina ao nível de β -caroteno.

Shaish *et al.* [51] também utilizaram inibidores para estudar a biossíntese de β -caroteno, utilizando a alga *D. bardawil*, e concluíram que inibidores de ciclase como nicotina, [2-(4-metilfenoxi) trietilamina] (MPTA) e [2-(4-clorofenil) trietilamina] (CPTA) inibiram o crescimento e são tóxicos à *Dunaliella*, não podendo ser usados diretamente para estudos sobre a biossíntese de β -caroteno.

Hayman *et al.* [33] estudaram o efeito de [2-(4-clorofenil) trietilamina] (CPTA) sobre a síntese de carotenóides em *R. glutinis*. Eles observaram que células tratadas com esse agente químico acumulavam licopeno com inibição da formação de β -caroteno, mas o nível de γ -caroteno permanecia o mesmo, uma vez que este pode ser convertido em toruleno e em torularrodina. Ainda que tenha sido demonstrado que torularrodina é produzida quando a levedura é submetida a um estresse oxidativo, sua significância biológica não estava muito clara [53]. Nas leveduras, os níveis de γ -caroteno e de β -zeacaroteno são relativamente altos e o γ -caroteno, uma vez formado, pode ser transformado em outros carotenóides sem outra ciclização [33].

Calo *et al.* [15] estudaram o efeito de ácido mevalônico na produção de astaxantina e de outros carotenóides de interesse biotecnológico por *P. rhodozyma* e demonstraram que existe uma relação direta entre a concentração de ácido mevalônico e a biossíntese de astaxantina, com um expressivo aumento na produção desse carotenóide.

Meyer e du Preez [40] investigaram o efeito de ácido acético sobre a síntese de carotenóides em *Phaffia* com o intuito de verificar se o ácido, atuando como precursor de acetil-coA, poderia aumentar a produção de astaxantina. Eles verificaram que as células de

Phaffia deveriam permanecer na fase estacionária por um período maior para ocasionar um aumento na produção de astaxantina. A produção deste carotenóide é menor na presença de ácido acético do que em açúcar, o que indica que o ácido acético não é tão eficientemente utilizado para a produção de astaxantina ou que a célula gasta uma energia extra para manter o pH intracelular, o que prejudica a produção de pigmentos.

5.3. Efeito da luz

Atualmente alguns pesquisadores têm estudado o efeito da luz e a função exercida pelos carotenóides biossintetizados em fungos e bactérias não fotossintéticos e sugerem que os carotenóides protegem contra espécies de oxigênio produzidas pela incidência de luz durante o cultivo. Alguns trabalhos demonstram que algumas leveduras biossintetizam carotenóides contra os danos causados pela luz [45, 52, 54].

O efeito da iluminação na produção de carotenóides por leveduras foi amplamente estudado por Tada e Shiroishi [55]. Eles observaram que a luz não afetou o crescimento de *R. minuta*, mas aumentou a produção de carotenóides. Também concluíram que as enzimas afetadas pela luz são aquelas envolvidas na síntese do fitoeno e não aquelas que convertem fitoeno em outros carotenóides.

Em *R. glutinis*, β -caroteno e torularrodina são sintetizados como produtos finais. Sakaki *et al.* [45] constataram que a torularrodina desempenha um papel importante contra os danos oxidativos causados pela luz, sendo esta uma função importante porque esta levedura é amplamente distribuída no solo. Os estudos comprovaram que a luz diminui o crescimento de *R. glutinis* e provocou um aumento na quantidade de carotenóides biossintetizados, em particular, torularrodina, cuja produção aumentava quanto maior o tempo de exposição à luz [45].

Steiger *et al.* [54] estudaram o efeito da luz na produção de carotenóides em cianobactérias do gênero *Synechocystis*, que produzem β -caroteno e zeaxantina. Eles concluíram que os carotenóides eram a primeira linha de defesa contra o estresse causado pela luz e que forte intensidade luminosa regulava o sistema de síntese e aumentava a produção de carotenóides.

Resultados semelhantes foram obtidos por Schoefs *et al.* [52] em *Haematococcus*. A quantidade de astaxantina produzida sob luz foi maior que a quantidade de β -caroteno,

indicando que em condição de estresse, a síntese é retomada para a manutenção do teor de astaxantina.

5.4. Efeito da temperatura

A temperatura de cultivo exerce influência direta no crescimento e no metabolismo de microrganismos, com importância essencial na formação de carotenóides em leveduras. De acordo com Simpson *et al.* [53] dependendo da especificidade do microrganismo haveria variações nas quantidades dos carotenóides produzidos, com mudanças nas proporções dos pigmentos individuais.

Estudos com leveduras do gênero *Rhodotorula* foram conduzidos em temperaturas variando de 4°C a 35°C, sendo 30°C a temperatura ótima de cultivo [4, 27, 33]. De acordo com Hayman *et al.* [33], o efeito da temperatura de cultivo na biossíntese de carotenóides parecia ser controlado pela concentração das enzimas β -caroteno-sintase e toruleno-sintase.

Frengova *et al.* [27] verificaram o efeito da temperatura na proporção dos carotenóides sintetizados no cultivo de *R. glutinis* e observaram que temperaturas de 20°C e 25°C exerceram influência favorável à síntese de β -caroteno, enquanto que a 35°C, torularrodina correspondeu a 78% dos carotenóides sintetizados, com diminuição de toruleno e de β -caroteno. A 5°C, a concentração de β -caroteno correspondeu a 64% do total.

Bhosale e Gadre [4] também investigaram o efeito da temperatura no cultivo de *R. glutinis* a 20°C e 30°C e verificaram um teor de 90% de β -caroteno no cultivo a 20°C. Este aumento também foi observado quando a temperatura de cultivo, inicialmente de 30°C, foi diminuída para 20°C. *Rhodotorula spp* tem sido estudada com relação à temperatura de cultivo por vários autores [14, 27]. Porém, nestes estudos foram utilizadas linhagens que produziam baixa quantidade de β -caroteno. O estudo de Bhosale e Gadre [4] demonstrou pela primeira vez um aumento expressivo da produção de β -caroteno através da manipulação da temperatura de cultivo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais seqüências envolvidas no caminho biossintético de carotenóides já estão bem estabelecidas e atualmente os genes carotenogênicos têm sido identificados e isolados.

Entretanto, pouco se sabe sobre a regulação da carotenogênese em microrganismos, o que tornam necessários estudos sobre os mecanismos de regulação biossintética para aumentar a produção destes pigmentos.

As pesquisas vêm enfocando a seleção de linhagens de microrganismos que produzam uma variedade de carotenóides, com amplo destaque para a produção comercial de β -caroteno e de astaxantina. O fato de, ainda hoje, ser maior o custo da biossíntese microbiana que o custo da síntese química, reforça a tendência em pesquisas para aumentar o rendimento e reduzir os custos de produção.

Estudos para aumentar a produção microbiana de carotenóides baseados na aplicação de engenharia genética, com clonagem de genes carotenogênicos; otimização das metodologias de fermentação; mutagênese; e aplicação de agentes químicos; combinados com alterações nas condições de cultivo, podem minimizar os custos além de direcionar a biossíntese para a obtenção de carotenóides de maior interesse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREWS, A.G.; PHAFF, H.J.; STARR, M.P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochem.** 15: 1003-1007, 1976.
2. AN, G.H., SCHUMAN, D.B., JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* with increased astaxanthin content. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 116-124, 1989.
3. AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.** 69: 2169-2173, 1997.
4. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by *Rhodotorula glutinis*. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 349-353, 2002.
5. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 12-16, 2001.
6. BOHNE, F.; LINDEN, H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biochem. Biophys. Acta** 1579: 26-34, 2002.
7. BOROWITZKA, M.A. Products for microalgae. **Infofish-Int.** 5: 21-26, 1993.

8. BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (1988). Micro-algal Biotechnology, Edited by M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka Cambridge University Press; **FEBS Lett.** 238: 222-223.
9. BRITTON, G., in: KRINSKY, N.I.; MATHEUS-ROTH, M.M.; TAYLOR, R.F. (1989), (Eds) Carotenoids Chemistry and Biology, Plenum Press, New York, pp. 167-184.
10. BRITTON, G. The biosynthesis of carotenoids: A progress report. **Pure Appl. Chem.** 63: 101-108, 1991.
11. BRITTON, G.; BROWN, D.J.; GOODWIN, T.W.; LEUENBERGER, F.J.; SCHOCHER, A. The carotenoids of *Flavobacterium* strain R1560. **J. Arch. Microbiol.** 113: 33-37, 1977.
12. BRITTON, G.; SINGH, R.K.; GOODWIN, T.W.; BEN-AZIZ, A. The carotenoids of *Rhodospirillum rubrum* (Rhodospirillaceae) and the effect of diphenylamine on the carotenoid composition. **Phytochem.** 14: 2427-2433, 1975.
13. BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 24: 41-45, 2000.
14. BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.** 71: 41-44, 1999.
15. CALO, P.; MIGUEL, T.; VELÁZQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Mevalonic acid increases *trans*-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Lett.** 17: 575-578, 1995.
16. CHAMOVITZ, D.; MISAWA, N.; SANDMANN, G.; GRANTT, E.; HIRSCHBERG, J. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. **FEBS Lett.** 296: 305-310, 1992.
17. COHEN-BAZIRE, G.; STAINER, R.Y. Inhibition of carotenoid synthesis in photosynthetic bacteria. **Nature** 181: 250-252, 1958.
18. COSTA, I.; MARTELLI, H.L.; DA SILVA, I. M.; POMEROY, D. Production of β -carotene by *Rhodotorula* strain. **Biotechnol. Lett.** 9: 373-375, 1987.

19. DAVIES, B.H.; TAYLOR, R.F. Carotenoid biosynthesis – the early steps. **Pure Appl. Chem.** 47: 211-221, 1976.
20. ECHAVARRI-ERASUN, C.; JOHNSON, E.A.; Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by fungus *Epicoccum nigrum*. **FEMS Yeast Res.** 4: 511-519, 2004.
21. FAN, L. VONSHAK, A.; GABBAY, R.; HIRSHBERG, J.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. **Plant Cell Physiol.** 36: 1519-1524, 1995.
22. FANG, T.J.; CHENG, Y.S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **J. Ferm. Bioeng.** 75: 466-469, 1993.
23. FANG, T.J.; CHIOU, T-Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **J. Ind. Microbiol.** 16: 175-181, 1996.
24. FONTANA, J.D.; CZECHUGA, B.; BONFIM, T.M.B.; CHOCIAL, B.H.; OLIVEIRA, M.F.; GUIMARÃES, M.F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Biores. Technol.** 58: 121-125, 1996.
25. FONTANA, J.D.; GUIMARÃES, M.F.; MARTINS, N.T.; FONTANA, C.A.; BARON, M. Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low-cost media. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 57: 413-422, 1996.
26. FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; BESHKOVA, D. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 18: 272-277, 1997.
27. FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnol. Bioeng.** 44: 88-894, 1994.
28. GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J.E.; BARBOTIN, J.N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enz. Microbiol. Technol.** 33: 629-634, 2003.
29. GOODWIN, T.W. Biosynthesis of carotenoids: An Overview in: **Meth. Enzymol.** 1993. Academic Press, vol 214, pp. 330-340.

30. GOODWIN, T.W. Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. **Prog. Ind. Microbiol.** 11: 29-88, 1972.
31. GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Proc. Biochem.** 33: 385-391, 1998.
32. HAARD, N. Astaxanthin formation by yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnol. Lett.** 10: 609-614, 1988.
33. HAYMAN, E.P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K.L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **J. Bacteriol.** 120: 1339-1343, 1974.
34. HIRSCHBERG, J.; COHEN, M.; HARKER, M.; LOTAN, T.; MANN, V.; PECKER, I. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. **Pure Appl. Chem.** 69: 2151-2158, 1997.
35. KVASNIKOV, E.I.; GRINBERG, T.A.; VASKIVNJUK, V.T.; NARGONAJA, S.S.; SUDENKO, V.I.; STELOKOVA, I.F. Yeasts synthesising carotenoids. **Izv. ANSSR Biologicheskaja.** 4: 565-575, 1978.
36. LEE, T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KARASAWA, I.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Chemical alteration of carotenoid biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus* and mutants. **Appl. Microbiol.** 30: 988-993, 1975.
37. LEWIS, M.J.; RAGOT, N.; BERLANT, M.C.; MIRANDA, M. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2944-2945, 1990.
38. LOTAN, T.; HIRSCHBERG, J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of gene encoding β -C-4-oxygenase that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett.** 364: 125-128, 1995.
39. MEYER, P.S.; DU PREEZ, J.C. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 10: 178-183, 1994.
40. MEYER, P.; DU PREEZ, J.C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Lett.** 15: 919-924, 1993.
41. MEYER, P.; DU PREEZ, J. Photo-regulated astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants. **Appl. Microbiol.** 17: 24-31, 1994.
42. MISAWA, N.; SHIMADA, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. **J. Biotechnol.** 59: 169-181, 1998.

43. NEWEL, S.Y.; HUNTER, I.L. *Rhodospiridium diovatum* sp. Perfect form of *Asporogenous* yeast. **J. Bacteriol.** 104: 503-508, 1970.
44. REYNDERS, M.B.; RAWLINGS, D.E.; HARRISON, S.T.L. Demonstration of the crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and feed-batch cultivation. **Biotechnol. Lett.** 18: 649-654, 1996.
45. SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; TADA, A.; MIKI, W.; KOMEMUSHI, S. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 294-297, 2001.
46. SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K-Y; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. **J. Biosci. Bioeng.** 89: 203-205, 2000.
47. SANCHEZ, S.; DEMAINE, A.L. Metabolic regulation of fermentation process. **Enz. Microbiol. Technol.** 31: 895-906, 2002.
48. SANDMANN, G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. **Trends Plant Sci.** 6: 14-17, 2001.
49. 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.** 17: 233-237, 1999.
50. SANPIETRO, L.M.D.; KULA, M.-R. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. **Yeast** 14:1007-1016, 1998.
51. SHAISH, A.; AVRON, M.; BEN-AMOTZ, A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil*. **Plant Cell Physiol.** 31: 689-696, 1990.
52. SCHOEFS, B.; RMIKI, N.; RACHADI, J.; LEMOINE, Y. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and active synthesis of fatty acids. **FEBS Lett.** 500: 125-128, 2001.
53. SIMPSON, K.L.; NAKAYAMA, T.O.M.; CHICHESTER, C.O. Biosynthesis of yeast carotenoids. **J. Bacteriol.** 88: 1688-1694, 1964.
54. STEIGER, S.; SCHAFER, L.; SANDMANN, G. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **J. Photobiol. Biol.** 52: 14-18, 1999.

55. TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* I. Photocontrol of carotenoid production. **Plant Cell Physiol.** 23: 541-547, 1982.
56. YOKOYAMA, A.; SHIZURI, Y.; MISAWA, N. Production of new carotenoids, astaxanthin glucosides, by *Escherichia coli* transformants carrying carotenoid biosynthetic genes. **Tetraed. Lett.** 39: 3709-3712, 1998.

CAPÍTULO 2

Efeito de β -ionona e de Ácido Acético na Produção de Biomassa e Carotenóides por Leveduras do Gênero *Rhodotorula*

Artigo a ser enviado para publicação

Efeito de β -ionona e Ácido Acético na Produção de Carotenóides por Leveduras do Gênero *Rhodotorula*

MAYBI C. DA SILVA⁽¹⁾, JOSÉ R. ERNANDES⁽²⁾, DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA⁽¹⁾

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.⁽¹⁾

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.⁽²⁾

RESUMO

Entre as leveduras carotenogênicas, destacam-se as do gênero *Rhodotorula*, sendo que o crescimento e a produção de carotenóides podem ser influenciados pelas condições de cultivo. A produção de carotenóides específicos pode ser dirigida ou regulada pela adição de certos agentes químicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de carotenóides em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*. O meio utilizado foi o “Yeast and Malt” e os cultivos foram realizados em agitador rotatório a 140 rpm e 30°C. A produção de biomassa foi determinada por peso seco. Os carotenóides totais foram quantificados por espectrofotometria de absorção na região visível e o perfil qualitativo obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Inicialmente, foram construídas curvas de crescimento para ambas as leveduras, que demonstraram que até 48 horas de cultivo o crescimento encontrava-se na fase exponencial. A adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo ocasionou inibição no crescimento e na produção de carotenóides em ambas as leveduras, com diminuição na proporção de toruleno e de β -caroteno em relação a torularrodina. A inibição foi menor quanto mais tardia a adição de β -ionona no meio de cultivo. O ácido acético não teve efeito no crescimento e na produção de carotenóides em ambas as leveduras. Entretanto, enquanto em *R. glutinis* as proporções relativas dos carotenóides foram mantidas, em *R. mucilaginosa*, houve expressivo aumento na proporção de β -caroteno.

Palavras-chave: Carotenóides, *Rhodotorula*, β -ionona, Ácido acético.

ABSTRACT

Among the carotenogenic yeasts are those of the genus *Rhodotorula*, the growth and carotenoid production of which can be influenced by the culture conditions. The production of specific carotenoids can be directed or regulated by the addition of chemical agents. The objective of the present work was to evaluate the effect of β -ionone and of acetic acid in the production of carotenoids in *R. glutinis* and *R. mucilaginosa*. The culture medium used was yeast malt and cultivation was carried out in a shaker at 140 rpm and 30°C. The biomass production was determined by the dry weight. The total carotenoid was quantified spectrometrically in the visible region and the qualitative pattern was obtained by high performance liquid chromatography. Initially the growth curves of both yeasts were constructed, which demonstrated that up to 48 hours, growth was in the exponential phase. The addition of β -ionone at different times during cultivation inhibited growth and carotenoid production in both yeasts, with the reduction of the proportion of torulene and β -carotene in relation to torularrhodin. Inhibition was lower the later β -ionone was added to the culture medium. Acetic acid did not affect growth and carotenoid production in both yeasts. However, while the relative proportions of the carotenoids was maintained in *R. glutinis*, there was a marked increase in the proportion of β -ionone in *R. mucilaginosa*.

Key words: carotenoids, *Rhodotorula*, β -ionone, acetic acid

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são corantes naturais biossintetizados por microrganismos que incluem algas e leveduras. São benéficos à saúde humana pela prevenção de doenças degenerativas, como câncer e degeneração macular, e pela atividade pró-vitáminica A exercida por carotenóides que possuem anéis de β -ionona não substituídos e cadeia poliênica de no mínimo onze carbonos [2, 7, 13].

Industrialmente, há grande interesse no uso de astaxantina como corante de ração no cultivo de peixes, como salmão e truta, e de β -caroteno como precursor de vitamina A [9, 10, 14]. A produção microbiana tem despertado o interesse de pesquisadores não apenas pela

possibilidade de aumentar a produção como pela oportunidade de escolher as linhagens e as condições de cultivo para favorecer a produção de um pigmento de interesse [1, 3, 4].

A adição de certos agentes químicos ao meio de cultivo pode regular ou dirigir a biossíntese para a produção de carotenóides específicos. Por exemplo, β -ionona estimulou a produção de β -caroteno, com bloqueio na produção de xantofilas, em *Phaffia rhodozyma* [9] e em *Phycomyces blakesleeanus* [8].

O efeito do acetato como precursor de carotenóides em *R. glutinis* e *R. rubra* foi investigado por Disch e Rohmer [6], que verificaram que este quando presente no meio de cultivo atuaria na formação de acetil-coA, precursor no caminho biossintético de carotenóides. Meyer e Du Preez [10] também observaram que o ácido acético atua como precursor de acetil-coA, aumentando a produção de carotenóides em *P. rhodozyma*.

No presente trabalho foram investigados os efeitos de β -ionona e de ácido acético no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras do gênero *Rhodotorula*.

2. MATERIAIS MÉTODOS

2.1. Leveduras

Foram utilizadas neste estudo *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em meio “Yeast and Malt” (YM) sólido preparado com 3g/L de extrato de levedo, 3g/L de extrato de malte, 5g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20g/L de agar, com repiques mensais.

2.2. Condições de cultivo

2.2.1. Padronização do inóculo

Por causa das variações inicialmente observadas tanto na biomassa como no conteúdo de carotenóides, foi feita a padronização do inóculo. Devido ao fato das leveduras estudadas apresentarem intensa pigmentação, o método escolhido foi o descrito por Miles e Misra [11], o qual utiliza diluições sucessivas e plaqueamento pelo método da gota com a contagem de colônias em diferentes tempos de cultivo. Foram obtidas curvas de crescimento (ufc/mL x tempo), visando estabelecer o melhor período do cultivo para a adição de agentes químicos sem inibição de crescimento.

O inóculo foi preparado a partir de uma placa de Petri contendo células viáveis, com a retirada de uma alçada homogênea e bem carregada. As células foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 500mL, contendo 200mL de YM, e incubadas em agitador rotatório a 30°C, 200 rpm, por aproximadamente 48 horas até atingir 10^8 ufc/mL. Após este procedimento, 20 mL do inóculo foram transferidos para o meio de produção.

O crescimento das leveduras foi feito em meio líquido YM (preparado como descrito anteriormente sem o agar), sob agitação de 140rpm a 30°C. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer de 500mL com aletas. Para melhorar a aeração, foram utilizados tampões de espuma em substituição aos tradicionais tampões de algodão. O pH do meio foi ajustado em 6,0.

2.2.2. Adição de β -ionona ao meio de cultivo

O efeito de β -ionona foi avaliado em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, com a adição deste agente químico sendo feita inicialmente em diferentes tempos de cultivo. Uma solução etanólica de β -ionona na concentração de 10^{-3} M foi preparada, segundo Lewis *et al.* [9]. Nos experimentos realizados, a esterilização de β -ionona não pôde ser feita em autoclave. A opção adotada foi a adição asséptica de uma solução etanólica filtrada. Após a transferência de 20mL do inóculo líquido para os frascos erlenmeyer contendo 200mL de YM, β -ionona foi adicionada nos tempos 0, 30, 50 e 70 horas de cultivo. A incubação foi feita em agitador rotatório a 30°C e 140 rpm por 84 horas. Os frascos controle foram preparados com a adição da mesma quantidade de etanol.

2.2.3 Adição de ácido acético ao meio de cultivo

O ácido acético foi adicionado diretamente ao meio de cultivo através de uma solução 1M para uma concentração final de 0,05 e 0,1% desta substância. Alíquotas de 20mL de células viáveis foram transferidas para frascos erlenmeyer com 200mL de YM. A incubação foi feita em agitador rotatório a 30°C, 140 rpm, por 136 horas. Os frascos controle foram preparados com YM sem adição do ácido.

2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual

Após o período de fermentação, os 200mL de meio de cultivo foram divididos em duas alíquotas de 100mL para a quantificação da biomassa e dos carotenóides totais. Estas alíquotas foram centrifugadas a 10.000rpm, por 20 minutos, a 5°C para separação do sobrenadante. A biomassa foi determinada através da secagem das células, em estufa a 100°C, até peso constante. Para a determinação dos carotenóides as células foram armazenadas, por um período máximo de uma semana, em frascos plásticos no congelador (-20°C) até a realização das análises.

A concentração de glicose residual foi medida nos sobrenadantes das amostras através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller [12].

2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides

O conteúdo total de carotenóides foi determinado em duplicata de acordo com os procedimentos descritos por Rodriguez-Amaya [15]. As amostras armazenadas em congelador foram descongeladas em temperatura ambiente. Os carotenóides foram extraídos através da trituração em almofariz com hiflosupercel e acetona gelada. A filtração foi realizada em filtro sinterizado (porosidade 3; 20-30µm) e o resíduo sólido foi transferido novamente para o almofariz e re-extraído sucessivas vezes até que o resíduo se tornasse incolor (geralmente três vezes). Em seguida foi feita uma partição para éter de petróleo. A água residual foi removida com sulfato de sódio anidro e a solução de carotenóides foi concentrada em evaporador rotativo (temperatura inferior a 35°C).

A quantificação do carotenóide total foi feita no espectrofotômetro Beckman DU 640 através da fórmula fornecida por Davies [5], usando o valor de absorvidade igual a 3240, que é o coeficiente de absorção do toruleno em éter de petróleo. A produção de carotenóides foi expressa em µg/L (conteúdo total de carotenóides em µg por litro de meio de cultivo) e a produção específica em µg/g (conteúdo total de carotenóides em µg em relação à massa celular seca em g).

2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato concentrado, obtido como descrito na seção anterior, foi seco sob corrente de nitrogênio. A amostra foi re-dissolvida em 1mL de acetona grau CLAE e injetada

imediatamente no cromatógrafo. Um sistema constituído de uma bomba quaternária (Waters modelo 600) com degaseificador na linha, injetor manual e detector com arranjo de diodos (Waters modelo 996), controlado por um software Millenium (versão 3.2), foi utilizado para análise cromatográfica. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo (maxplot). Para identificação, os espectros de absorção foram analisados em termos de λ_{max} e estrutura espectral fina, expressa pela %III/II, que é a razão entre a altura do pico de absorção de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico do meio (II), o mínimo dos dois picos tomado como linha de base.

Todas as análises foram feitas utilizando uma coluna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS2, 3 μ m, 4,6 x 150mm). A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol e acetato de etila em gradiente linear de 65% de acetonitrila e 35% de metanol a 65% de acetonitrila, 19% de metanol e 16% de acetato de etila, em 4 minutos, a última proporção sendo mantida até o final da corrida (30 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 20°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. O fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20 μ L.

2.4. Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa e de carotenóides, e de açúcar residual foi feito através da ANOVA e da aplicação do teste de Tukey, utilizando pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento de *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*

As curvas de crescimento *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, construídas por meio do logaritmo de unidades formadoras de colônia (ufc) x tempo de crescimento, são apresentadas nas Figuras 1 e 2.

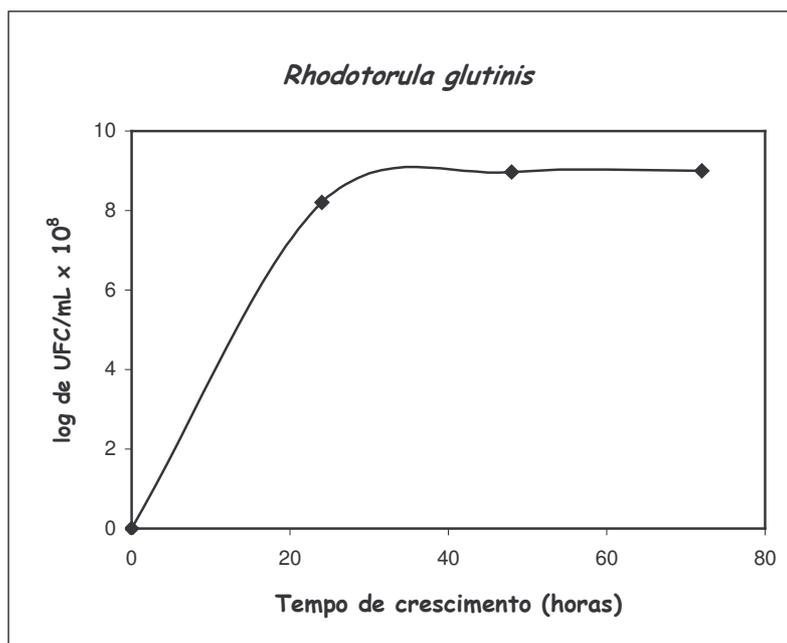


Figura 1: Curva de crescimento de *Rhodotorula glutinis* cultivada em placa de Petri com meio YM e incubada a 30°C por 72 horas.

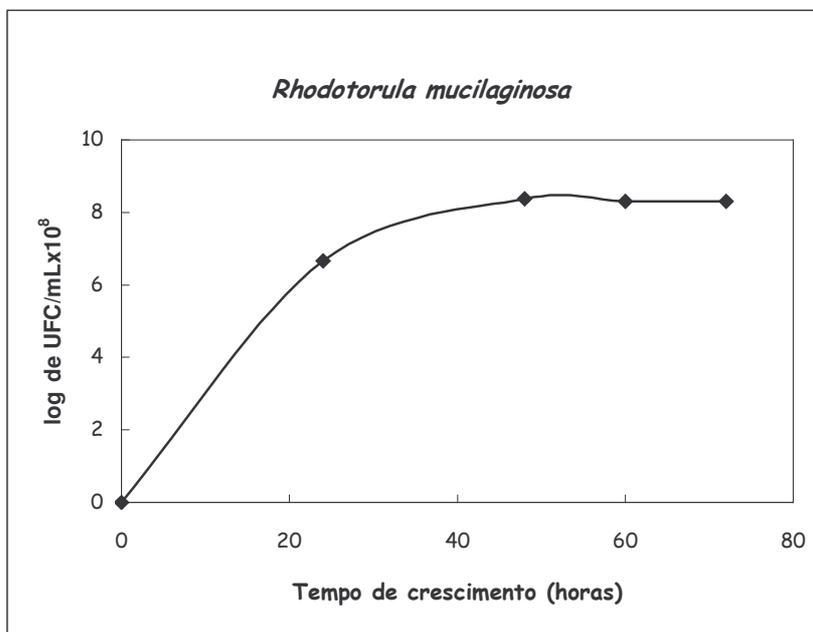


Figura 2: Curva de crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada em placa de Petri com meio YM e incubada a 30°C por 72 horas.

As curvas demonstraram que até 48 horas de cultivo, as leveduras estavam na fase exponencial, sendo o crescimento mais acentuado em *R. glutinis*. Após este período, não houve aumento significativo no número de células viáveis. Isso indicou que a partir deste período, a adição de agentes químicos no meio de cultivo poderia influenciar a produção de carotenóides sem afetar o crescimento das leveduras.

3.2. Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo

As Tabelas 1 e 2 mostram a produção de biomassa e de carotenóides em presença de β -ionona nas leveduras estudadas. A Tabela 3 mostra os dados de glicose residual do meio no final do tempo de cultivo.

Tabela 1: Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tempo de adição de β -ionona ¹	Biomassa (g/100mL)	Produção de carotenóides	
		(μ g/g)	(μ g/L)
Controle ²	0,5661 _a	349,86 _a	1980 _a
0 hora	0,0287 _e	Sem produção _c	Sem produção _a
30 horas	0,4012 _d	269,00 _b	1079 _c
50 horas	0,4550 _c	343,43 _a	1562 _b
70 horas	0,4939 _b	344,59 _a	1701 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

1. Diferentes tempos de cultivo. 2. Sem adição de β -ionona. Cultivo de 84 horas.

Tabela 2: Efeito da adição de β -ionona em diferentes tempos de cultivo na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tempo de adição de β -ionona	Biomassa (g/100mL)	Produção de carotenóides	
		(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,5200 _a	103,54 _a	535 _a
0 hora	0,2925 _d	34,92 _c	102 _e
30 horas	0,4207 _c	52,13 _b	219 _d
50 horas	0,4462 _b	71,28 _b	318 _c
70 horas	0,4723 _b	91,17 _a	430 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 3: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos com β -ionona

Tempo de adição de β -ionona ¹	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula</i> <i>glutinis</i>	<i>Rhodotorula</i> <i>mucilaginosa</i>
Controle ²	0,188 _b	0,205 _b
0 hora	1,000 _a	0,243 _b
30 horas	0,201 _b	0,292 _a
50 horas	0,178 _b	0,269 _b
70 horas	0,189 _b	0,231 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

1. Diferentes tempos de cultivo. 2. Sem adição de β -ionona. Cultivo de 84 horas.

Os dados de biomassa demonstraram que o crescimento de *R. glutinis* e de *R. mucilaginosa* foi inibido quando β -ionona foi acrescida ao meio, especialmente quando adicionada no início do cultivo.

A produção de carotenóides também sofreu inibição em ambas as leveduras. Os resultados demonstraram que quanto mais tardia a adição de β -ionona, menor a diminuição no conteúdo total de carotenóides. A diminuição foi mais acentuada em *R. glutinis*, que teve a produção de carotenóides totalmente inibida com a adição deste agente químico no início do cultivo.

Ainda que β -ionona tenha estimulado a produção de carotenóides em *P. blakesleeanus* [8], Lewis *et al.* [9] observaram que β -ionona não exerceu efeito no crescimento de *P. rhodozyma*, mas inibiu a formação de astaxantina, com acúmulo de β -caroteno.

Os dados de açúcar residual estão em concordância com os dados de crescimento das leveduras. O valor de 1,0g/100mL de glicose para o cultivo de *R. glutinis*, em que β -ionona foi adicionada no início, demonstra a falta de consumo de glicose devido à inibição do crescimento. Em *R. mucilaginosa*, o consumo de glicose foi similar ao controle em todos os tempos de cultivo.

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 3 e 4. A identificação dos carotenóides foi baseada no comportamento cromatográfico e nos espectros de absorção (comprimentos de onda de absorção máxima e estrutura fina). Foram identificados três carotenóides majoritários: β -caroteno, com λ_{max} de 447, 475 e (423) nm, e

valor de III/II igual a 25%; toruleno, com λ_{\max} de 460, 484 e 518nm, valor de III/II igual a 54% e torularrodina, com λ_{\max} de 465, 492 e 523nm, valor III/II igual a 21%, todos em éter de petróleo.

Os cromatogramas de *R. glutinis* demonstram que houve diminuição na proporção de toruleno e especialmente de β -caroteno em relação a torularrodina. Em *R. mucilaginoso*, a adição de β -ionona diminuiu a proporção de β -caroteno e especialmente de toruleno em relação a torularrodina.

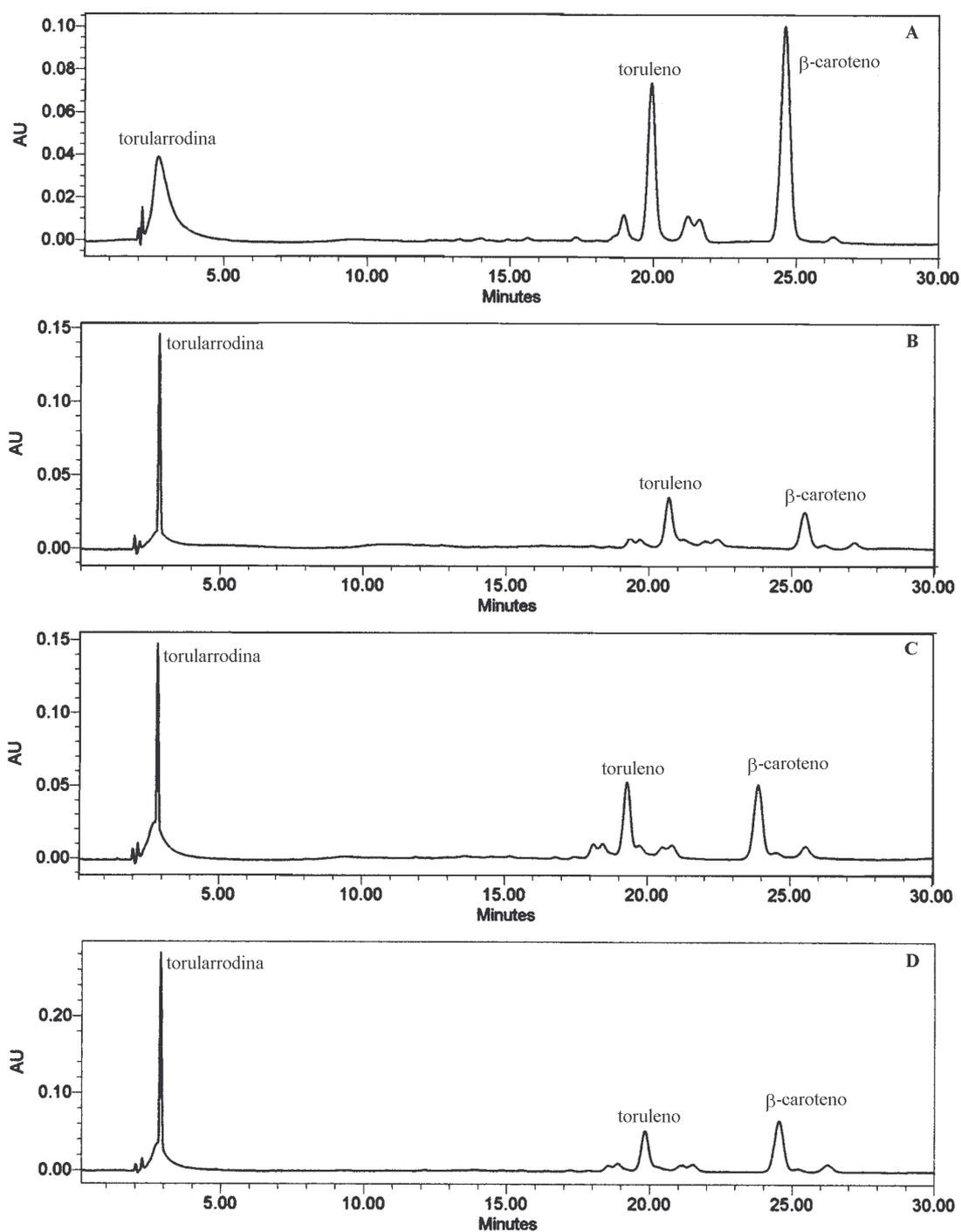


Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual (B) adição de 10⁻³M de β-ionona em 30 horas de cultivo (C) adição de 10⁻³M de β-ionona em 50 horas de cultivo (D) adição de 10⁻³M de β-ionona em 70 horas de cultivo.

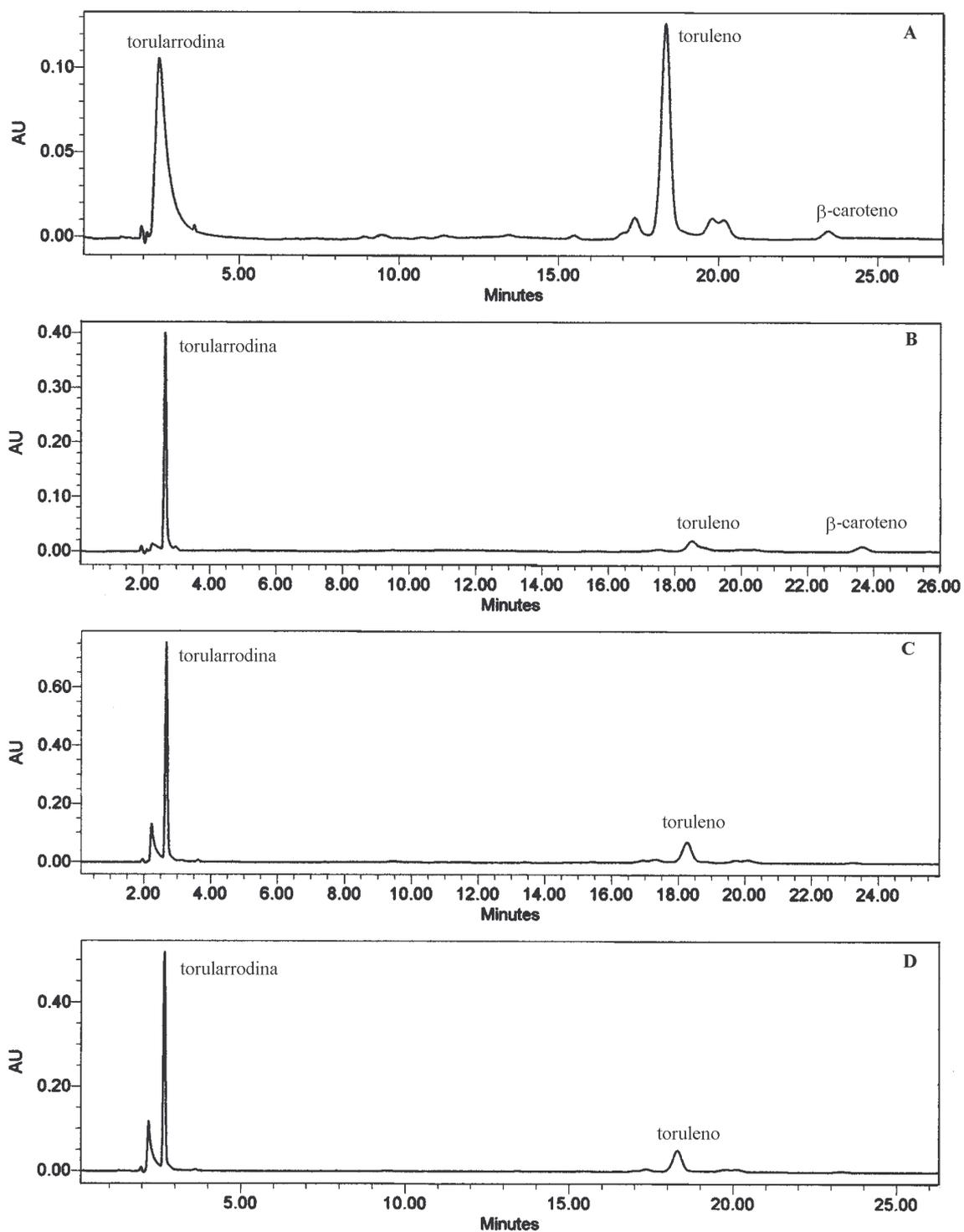


Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual (B) adição de 10⁻³M de β-ionona no início do cultivo (C) adição de 10⁻³M de β-ionona em 50 horas de cultivo (D) adição de 10⁻³M de β-ionona em 70 horas de cultivo.

3.3. Efeito da adição de ácido acético em diferentes concentrações

As Tabelas 4 e 5 mostram a produção de biomassa e de carotenóides na presença de ácido acético, em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, mostrando que não houve nenhum efeito significativo tanto na biomassa como nos carotenóides, contrariando o que foi observado em outros microrganismos.

Tabela 4: Efeito de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Concentração de ácido acético	Biomassa (g/100mL)	Produção de carotenóides (µg/g)	Produção de carotenóides (µg/L)
Controle	0,5594 _a	325,41 _a	1820 _a
0,05%	0,5751 _a	313,61 _a	1803 _a
0,1%	0,5650 _a	338,29 _a	1910 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com as mesmas letras não têm diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$)

Tabela 5: Efeito de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Concentração de ácido acético	Biomassa (g/100mL)	Produção de carotenóides (µg/g)	Produção de carotenóides (µg/L)
Controle	0,5273 _a	105,88 _a	558 _a
0,05%	0,5385 _a	95,10 _a	512 _a
0,1%	0,5257 _a	101,35 _a	532 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com as mesmas letras não têm diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$)

De acordo com Meyer e du Preez [10], em *P. rhodozyma* o aumento na produção de astaxantina, em presença de ácido acético, pode ser uma consequência da diminuição da taxa de crescimento na fase estacionária ou possivelmente devido a um deslocamento no equilíbrio bioquímico no caminho biossintético de carotenóides.

Disch e Rohmer [6] verificaram a participação do acetato no caminho biossintético de carotenóides e observaram que em *R. glutinis*, a acetil-CoA é formada a partir de acetato presente no meio de cultivo e que o acetato atuaria com precursor na biossíntese de

carotenóides, justificando a adição deste composto ao meio de cultivo como uma possível forma de estimular a carotenogênese nesta levedura.

O pH final no meio de cultivo ficou em torno de 6,8 (dados não mostrados), o que demonstrou pequena variação em relação ao valor ajustado inicialmente.

O perfil de carotenóides na presença de 0,1% de ácido acético, em comparação ao controle, em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* são mostrados nas Figuras 5 e 6. Os cromatogramas indicam que o efeito do ácido acético foi diferente nas duas leveduras. Em *R. glutinis* a proporção dos carotenóides foi mantida na presença de ácido acético. Em *R. mucilaginosa* houve um considerável aumento na produção de β -caroteno e uma diminuição na proporção de toruleno, indicando um bloqueio na transformação de γ -caroteno em toruleno, desviando o caminho biossintético.

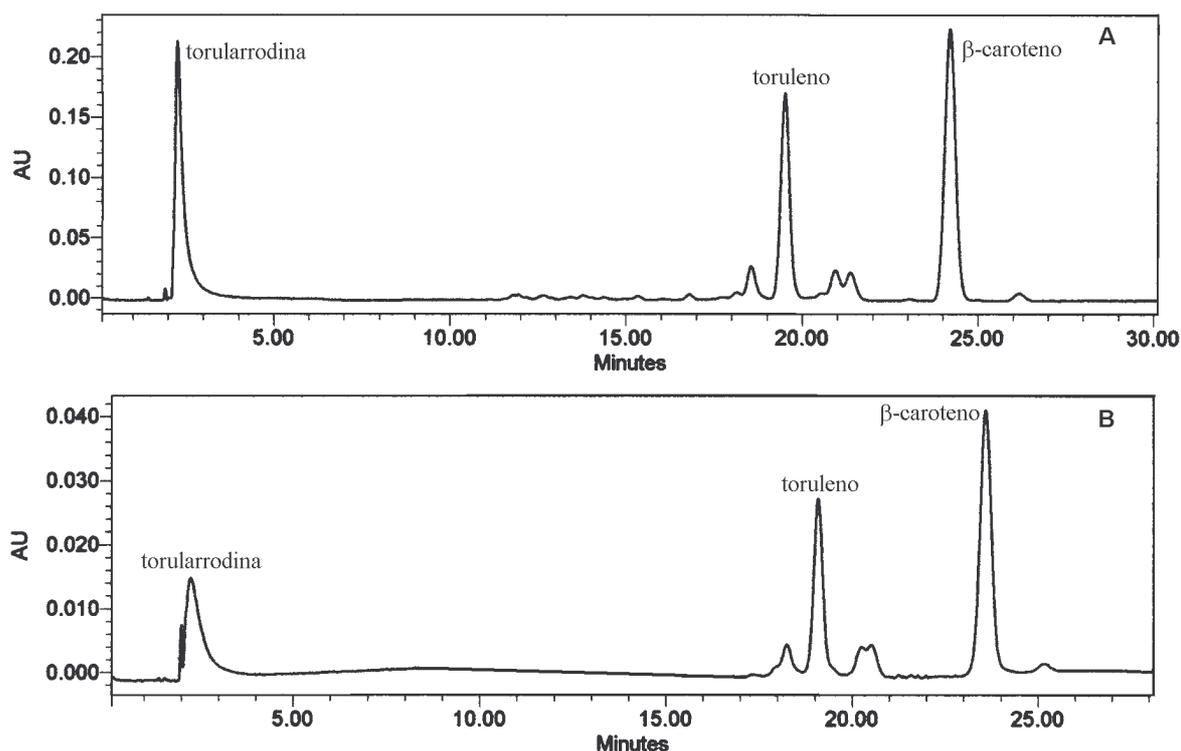


Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético.

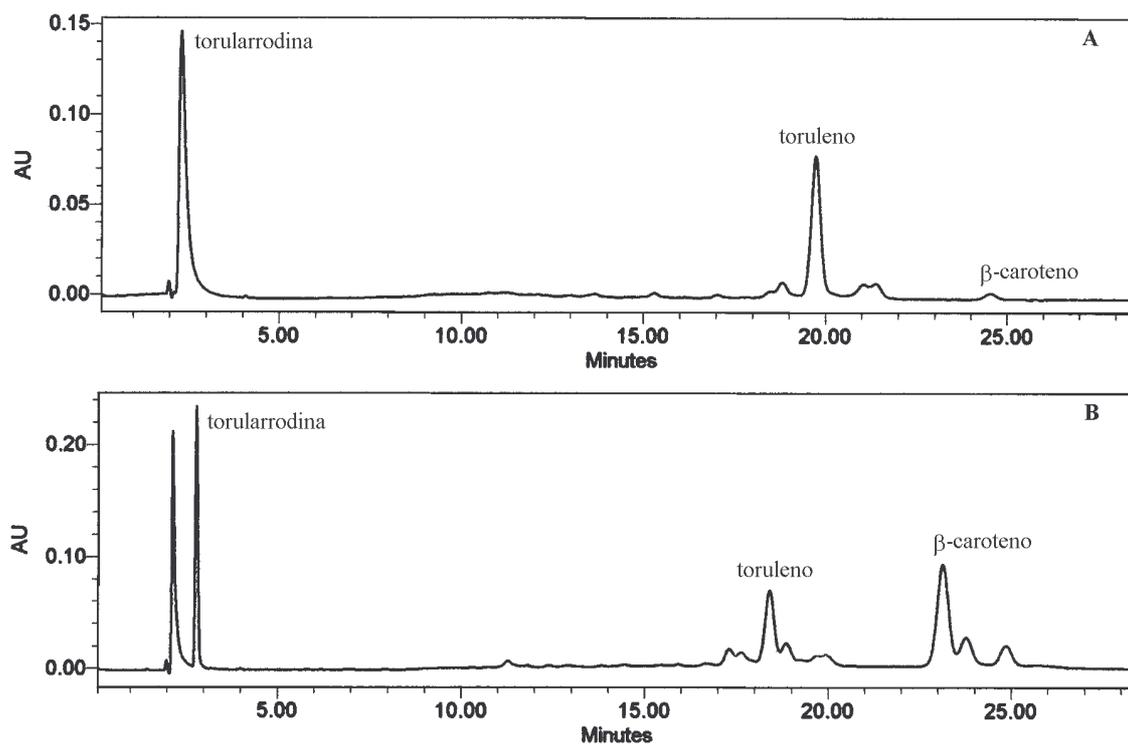


Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético.

4. CONCLUSÕES

A β -ionona inibiu o crescimento e a produção de carotenóides em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, sendo o grau de inibição menor quanto mais tardia for a adição deste agente químico ao meio de cultivo. Houve diminuição na proporção de β -caroteno e toruleno em relação a torularrodina em ambas as leveduras, sendo que a diminuição de β -caroteno foi mais marcante em *R. glutinis* e de toruleno em *R. mucilaginosa*.

O ácido acético não provocou mudança no crescimento e no conteúdo total de carotenóides em ambas as leveduras. Entretanto, uma mudança no perfil dos carotenóides foi observada em *R. mucilaginosa*, com aumento na proporção de β -caroteno e diminuição na proporção de toruleno.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, projeto PRONEX (nº 662307/1996-8) pelo suporte financeiro ao trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSICH, R.L. Comercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.** 69: 2169-2173, 1997.
2. BENDICH, A.; OLSON, J.A. Biological action of carotenoids. **FASEB J.** 3: 1927-1932, 1989.
3. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 12-16, 2001.
4. BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 24: 41-45, 2000.
5. DAVIES, B.H. Carotenoid. In: Goodwin, T.W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.
6. DISCH, A.; ROHMER, M. On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/piruvate pathway for biosynthesis in fungi and yeast. **FEMS Microbiol. Lett.** 168: 201-208, 1998.
7. FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.** 1-38, 2004.
8. LEE, T-C; RODRIGUEZ, D.B.; KARASAWA, I.; LEE, T.H.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Chemical alteration of carotene biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus* and mutants. **App. Microbiol.** 30: 988-993, 1975.
9. LEWIS, M.J.; ARGOT, N.; BERLANT, M.C.; MIRANDA, M. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. **Appl. Environ. Microb.** 56: 2944-2945, 1990.
10. MEYER, P.S.; du PREEZ, J.C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Lett.** 15: 919-924, 1993.

11. MILES, A.A; MISRA, J. The estimation of the bactericidal power of blood. **J. Hyg.** 38: 732-749, 1938.
12. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428, 1959.
13. OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Achiv. Latinoamer. Nutr.** 49: 7-11, 1999.
14. PARAJO, J.C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globules* wood. **Biotechnol. Bioeng.** 59: 501-506, 1998
15. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press, Washington, D.C. 1999.

CAPÍTULO 3

Efeito de β -ionona e Ácido Acético e das Condições de Cultivo na Produção de Carotenóides por Leveduras

Artigo a ser enviado para publicação.

Efeito de β -ionona e Ácido Acético e das Condições de Cultivo na Produção de Carotenóides por Leveduras

MAYBI C. DA SILVA⁽¹⁾, JOSÉ R. ERNANDES⁽²⁾, DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA⁽¹⁾

Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.⁽¹⁾

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.⁽²⁾

RESUMO

Mudanças na biossíntese de carotenóides podem ser provocadas por alterações nas condições de cultivo dos microrganismos. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de β -ionona e ácido acético, incidência de luz, ausência ou limitação de glicose e limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, em meio de cultivo “Yeast and Malt”. A fermentação foi realizada em agitador rotatório a 30°C e 140rpm. Os carotenóides produzidos foram quantificados por espectrofotometria de absorção na faixa do visível e o perfil qualitativo obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. A adição de β -ionona ao meio com limitação de glicose inibiu fortemente o crescimento de *R. glutinis*, com ligeira redução sobre a produção de biomassa em *R. mucilaginosa*. Em *R. glutinis*, a produção de carotenóides foi inibida na presença de β -ionona e estimulada na presença de ácido acético. Na presença de ambos prevaleceu a inibição por β -ionona. Em *R. mucilaginosa*, a produção de carotenóides, tanto em $\mu\text{g/g}$ quanto em $\mu\text{g/L}$, foi estimulada por β -ionona e por ácido acético e houve produção proporcionalmente maior de toruleno na presença de ácido acético. Na ausência de glicose, a produção de biomassa e de carotenóides aumentou em ambas as leveduras, tanto na presença de β -ionona quanto de ácido acético. Em *R. glutinis*, houve diminuição de toruleno e de β -caroteno na presença de ácido acético. Em *R. mucilaginosa*, a β -ionona aumentou a proporção de torularrodina e de carotenóides minoritários. A limitação de nitrogênio estimulou a produção de biomassa em ambas as leveduras. A presença de ácido acético em meio com limitação de nitrogênio provocou ligeira diminuição no crescimento de *R. glutinis* e nenhum

efeito na biomassa de *R. mucilaginosa*. Nestas condições, a produção de carotenóides em *R. glutinis*, foi totalmente reprimida na presença de β -ionona e ligeiramente estimulada na presença de ácido acético, sendo que o perfil dos carotenóides foi mantido. Em *R. mucilaginosa*, a presença dos dois agentes químicos não teve efeito na produção de carotenóides. Entretanto, houve um marcante aumento na proporção de toruleno e um ligeiro aumento na proporção de β -caroteno nos meios suplementados com β -ionona e com ácido acético. A incidência de luz não afetou o crescimento e a produção de carotenóides, e nem alterou o perfil dos carotenóides de ambas as leveduras.

Palavras-chave: Carotenóides, *Rhodotorula*, β -ionona, Ácido acético, Fermentação.

ABSTRACT

Changes in carotenoid biosynthesis can be induced by alterations in the culture conditions for the microorganisms. The objective of this work was to investigate the effects of β -ionone and acetic acid, incidence of light, absence or limitation of glucose and limitation of nitrogen on the growth and production of carotenoids in *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa* in yeast malt culture medium. Fermentation was carried out in a shaker at 30°C and 140 rpm. The carotenoids produced were quantified spectrometrically in the visible region and the qualitative pattern obtained by high performance chromatography. The addition of β -ionone to the medium with limited glucose strongly inhibited the growth of *R. glutinis*, but reduced the biomass production in *R. mucilaginosa* only slightly. In *R. glutinis*, the production of carotenoids was inhibited in the presence of β -ionone and stimulated in the presence of acetic acid. In the presence of both, inhibition by β -ionone prevailed. In *R. mucilaginosa*, the production of carotenoids, in $\mu\text{g/g}$ as well as in $\mu\text{g/L}$, was stimulated by β -ionone and by acetic acid, and there was a proportionally higher production of torulene in the presence of acetic acid. In the absence of glucose, there was a greater production of biomass and of carotenoids in both yeasts, in the presence of β -ionone as well as of acetic acid. In *R. glutinis*, there was a decrease in torulene and of β -carotene in the presence of acetic acid. In *R. mucilaginosa*, β -ionone increased the proportion of torularhodin and of the minor carotenoids. Limitation of nitrogen stimulated the production of biomass in both yeasts. The presence of

acetic acid under nitrogen limitation provoked a slight decrease in the growth of *R. glutinis* and no effect in the biomass of *R. mucilaginosa*. Under these conditions, in *R. glutinis*, the production of carotenoids was totally repressed by the presence of β -ionone and slightly stimulated by the presence of acetic acid, the carotenoid pattern being maintained. In *R. mucilaginosa*, the presence of the two chemical agents did not affect the total production of carotenoids. However, there was a marked increase in the proportion of torulene and a slight increase in the proportion of β -carotene in the culture medium supplemented with β -ionone and with acetic acid. The incidence of light did not affect the growth and production of carotenoids, and did not alter the carotenoid pattern in both yeasts.

Key words: Carotenoids, *Rhodotorula*, β -ionone, Acetic acid, fermentation

1. INTRODUÇÃO

Na natureza, mais de 600 carotenóides diferentes foram identificados. Estes pigmentos são encontrados em microrganismos, algas e plantas. Possuem atividade antioxidante com importante papel na prevenção de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e fortalecimento do sistema imunológico. Além disso, carotenóides que contêm anéis cíclicos de β -ionona não substituídos, com cadeia poliênica de pelo menos onze carbonos, são precursores de vitamina A [2, 20, 22].

Por se tratar de corantes naturais, a produção comercial microbiana destes compostos tem sido uma alternativa para a obtenção de carotenóides que não são facilmente sintetizados quimicamente ou que apresentam alto custo de produção [1]. Atualmente pesquisadores vem tentando aumentar a produção de carotenóides em microrganismos através do melhoramento das linhagens e da manipulação das condições de fermentação [4, 6, 13]. Uma tendência importante no aspecto econômico da produção de carotenóides tem sido a otimização do meio de cultivo, com a utilização de fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo [7, 8, 11, 12].

As condições de cultivo exercem influência direta no crescimento e no metabolismo de leveduras. A temperatura de cultivo tem essencial importância na formação de carotenóides em leveduras. De acordo com Simpson *et al.* [25], dependendo da especificidade do microrganismo, haveria variações nas quantidades e nas proporções dos carotenóides

sintetizados. Vários estudos foram conduzidos com *Rhodotorula* em diferentes temperaturas, variando de 4 a 35°C, porém, a temperatura ótima é de 30°C [5, 14, 15, 23].

A adição de certos agentes químicos ao meio de cultivo pode regular ou dirigir a biossíntese para a produção de carotenóides específicos. Um acúmulo de β -caroteno foi observado por Lewis *et al.* [17] em *Phaffia rhodozyma* na presença de β -ionona, resultando na inibição da biossíntese de xantofilas. Lee *et al.* [16] observaram que a presença de β -ionona estimulou a biossíntese de carotenóides em *Phycomyces blakesleeanus*.

Alguns trabalhos [3, 10, 18] demonstram que o acetato é um dos precursores na biossíntese de carotenóides no fungo *P. blakesleeanus* e nas leveduras *Rhodotorula glutinis* e *R. rubra* [3, 10]. Meyer e du Preez [18] observaram que o ácido acético atuava como precursor de acetil Co-A e aumentava a produção de carotenóides em *P. rhodozyma*.

A indução da carotenogênese por luz também tem sido relatada. De acordo com Tada e Shiroishi [27], o efeito da iluminação na síntese de carotenóides em *Rhodotorula* poderia variar com a espécie. Schoefs *et al.* [24] verificaram que *Haematococcus pluvialis* cultivada sob luz produzia mais astaxantina que β -caroteno. Segundo Sakaki *et al.* [26], a produção de torularrodina por *R. glutinis* aumenta quanto maior o tempo de exposição à luz.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de β -ionona e de ácido acético adicionados ao meio “Yeast and Malt” (YM), com limitação de carbono e de nitrogênio, no escuro e sob luz, na tentativa de aumentar a produção de carotenóides.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Leveduras

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em meio YM sólido, descrito no capítulo 2, com repiques mensais. Os inóculos foram preparados como padronizado anteriormente.

2.2. Condições de cultivo

2.2.1. Adição de β -ionona e ácido acético ao meio de cultivo com limitação de glicose

A influência da adição de β -ionona e de ácido acético ao meio de cultivo, com limitação de glicose foi avaliada. O crescimento das leveduras foi feito em duas etapas. Na primeira etapa, após a transferência de 20mL de células viáveis para frascos erlenmeyer

contendo YM puro, estes foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 140rpm, por 60 horas. Após este período, os meios foram centrifugados e o conteúdo celular de cada dois frascos foi transferido para um frasco erlenmeyer com 200mL de YM contendo 0,3% de glicose. Em seguida foi feita adição, em frascos separados, de 0,1% de ácido acético, 10⁻³M de β-ionona e uma mistura dessas duas substâncias. A incubação foi feita sob agitação, nas mesmas condições.

Também foi realizado um ensaio similar em meio sem glicose. Na segunda etapa os frascos erlenmeyer contendo os agentes químicos receberam o conteúdo celular de apenas um frasco da primeira etapa.

Os controles foram preparados com as células sendo transferidas para YM com limitação ou sem glicose. O tempo de incubação foi de 136 horas, para ambos os experimentos e o pH inicial foi ajustado em 6,0.

2.2.2. Adição de β-ionona e de ácido acético ao meio de cultivo com limitação de fonte de nitrogênio

A adição de β-ionona e de ácido acético, ao meio de cultivo com limitação de nitrogênio, sob luz também foi avaliada. Neste estudo, o crescimento das leveduras também foi feito em duas etapas, de forma similar ao estudo com limitação de glicose. A primeira etapa deste experimento foi realizada como descrito anteriormente, no escuro. Após 60 horas, os meios foram centrifugados e o conteúdo celular de cada frasco foi transferido para um frasco erlenmeyer com YM, sem peptona e com 0,1% de extrato de malte e de levedo. A estes frascos foram adicionados, individualmente ou misturados, 10⁻³M de β-ionona e 0,1% de ácido acético. Os frascos foram incubados sob luz, em agitador rotatório por mais 120 horas. Os controles foram preparados com células sendo transferidas para frascos erlenmeyer contendo apenas YM com limitação de nitrogênio e incubados no escuro. O pH inicial foi ajustado em 6,0.

2.2.3. Efeito da luz

O efeito somente da exposição à luz sobre o crescimento e a produção de carotenóides foi avaliado. Alíquotas de 20 mL de células viáveis foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo YM, que foram incubados sob agitação a 30°C, 140rpm, sob luz. A intensidade irradiada pelas lâmpadas presentes no agitador rotatório foi determinada através de uma

análise fotométrica, utilizando um luxímetro Texto 545. O cultivo foi realizado sob intensidade de 3480 lx. Os controles foram incubados no escuro. O tempo de incubação foi de 120 horas. O pH inicial do meio foi ajustado em 6,0.

2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual

Após o período de fermentação, 200mL de meio de cultivo foram divididos em duas alíquotas de 100mL para a quantificação da biomassa e dos carotenóides totais. Estas alíquotas foram centrifugadas a 10.000rpm, por 20 minutos, a 5°C para separação do sobrenadante. A biomassa foi determinada através da secagem das células, em estufa a 100°C, até peso constante. Para a determinação dos carotenóides as células foram armazenadas em frascos plásticos no congelador (-20°C) até a realização das análises (dentro de uma semana).

A concentração de glicose residual foi medida nos sobrenadantes das amostras através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller [19].

2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides

O conteúdo total de carotenóides foi determinado em duplicata de acordo com os procedimentos descritos por Rodriguez-Amaya [21]. As amostras armazenadas em congelador foram descongeladas em temperatura ambiente. Os carotenóides foram extraídos através da trituração em almofariz com hiflosupercel e acetona gelada. A filtração foi realizada em filtro sinterizado (porosidade 3; 20-30µm) e o resíduo sólido foi transferido novamente para o almofariz e re-extraído sucessivas vezes até que o resíduo se tornasse incolor (geralmente três vezes, e cinco vezes no cultivo em meio com limitação de glicose, em duas etapas). Em seguida foi feita uma partição para éter de petróleo. A água residual foi removida com sulfato de sódio anidro e a solução de carotenóides foi concentrada em evaporador rotativo (temperatura inferior a 35°C).

A quantificação do carotenóide total foi feita no espectrofotômetro Beckman DU 640 através da fórmula fornecida por Davies [5], usando o valor de absorvidade igual a 3240, que é o coeficiente de absorção do toruleno em éter de petróleo. A produção de carotenóides foi expressa em µg/L (conteúdo total de carotenóides em µg por litro de meio de cultivo) e a produção específica em µg/g (conteúdo total de carotenóides em µg em relação à massa celular seca em g).

2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato concentrado, obtido como descrito na seção anterior, foi levado à secura sob corrente de nitrogênio. A amostra foi re-dissolvida em 1mL de acetona grau CLAE e injetada imediatamente no cromatógrafo. Um sistema constituído de uma bomba quaternária (Waters modelo 600) com degaseificador na linha, injetor manual e detector com arranjo de diodos (Waters modelo 996) controlado por um software Millennium (versão 3.2), foi utilizado para análise cromatográfica. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo (maxplot).

Para identificação, os espectros de absorção foram analisados em termos de λ_{max} e estrutura espectral fina, expressa pela %III/II, que é a razão entre a altura do pico de absorção de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico do meio (II), o mínimo dos dois picos tomado como linha de base.

Todas as análises foram feitas utilizando uma coluna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS2, 3 μ m, 4,6 x 150mm). A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol e acetato de etila em gradiente linear de 65% de acetonitrila e 35% de metanol a 65% de acetonitrila, 19% de metanol e 16% de acetato de etila, em 4 minutos, e a ultima proporção mantida até o final da corrida (30 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 20°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. O fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20 μ L.

2.4. Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa e de carotenóides, e de açúcar residual foi feito através da ANOVA e da aplicação do teste de Tukey, utilizando pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da adição de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de glicose com crescimento das leveduras em duas etapas

As Tabelas 1 e 2 mostram a produção de biomassa e de carotenóides em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, respectivamente, com crescimento em duas etapas e limitação de glicose na presença de β -ionona e de ácido acético.

Tabela 1: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* cultivada em duas etapas com limitação de glicose

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	1,2395 _a	315,60 _d	3910 _b
β -ionona	0,6933 _b	463,65 _a	3214 _c
Ácido acético	1,2729 _a	349,40 _c	4447 _a
β -ionona + Ácido acético	0,6924 _b	411,22 _b	2847 _d

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Os dados da Tabela 1 são provenientes de cultivos com o dobro de massa celular.

Tabela 2: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada em duas etapas com limitação de glicose

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	1,0747 _a	91,75 _d	986 _c
β -ionona	1,0499 _b	98,88 _c	1038 _c
Ácido acético	1,0551 _b	117,32 _b	1237 _b
β -ionona + Ácido acético	1,1061 _a	124,86 _a	1381 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Os dados da Tabela 2 são provenientes de cultivos com o dobro de massa celular.

A biomassa em torno de 1,0g correspondeu ao crescimento celular proveniente de dois frascos da primeira etapa, o que explica valores diferentes daqueles em torno de 0,5g usualmente observados nos cultivos em meio YM. Na prática, o experimento em duas etapas e com concentração celular dobrada, acarretou uma grande dificuldade nas etapas de centrifugação e transferência de células. Para minimizar estas dificuldades, outros estudos em duas etapas foram realizados com as células de um frasco.

Em *R. glutinis*, foi observada uma forte inibição do crescimento nos meios suplementados com β -ionona; em *R. mucilaginosa*, a inibição por β -ionona foi ligeira.

Em termos de μ g/g parecia ter havido um aumento na produção de carotenóides na presença de β -ionona em *R. glutinis*. Analisando melhor estes dados, o aparente aumento foi devido a menor quantidade de biomassa produzida e não a um aumento real da produção de

carotenóides. Em termos de $\mu\text{g/L}$, a inibição da produção de carotenóides por β -ionona foi mais uma vez demonstrada, enquanto que o ácido acético estimulou a produção. Porém, na presença de ambos, prevaleceu a inibição por β -ionona.

No caso de *R. mucilaginosa*, onde não houve muita diferença na biomassa obtida nos diferentes tratamentos, a produção de carotenóides tanto em termos de $\mu\text{g/g}$ quanto em $\mu\text{g/L}$ foi estimulada tanto na presença de β -ionona quanto de ácido acético.

O pH final do meio de cultivo para este tratamento ficou em torno de 6,8 (dados não apresentados).

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 1 e 2. A diferença mais notável foi o nível proporcionalmente maior de toruleno nos cultivos suplementados com ácido acético em *R. mucilaginosa*. Em *P. rhodozyma*, de acordo com Meyer e du Prezz [18] foi observado um aumento na proporção de astaxantina quando glicose ou ácido acético foram adicionados ao meio de cultivo. Segundo os autores, este aumento pode ser explicado por uma mudança no equilíbrio bioquímico no caminho biossintético dos carotenóides.

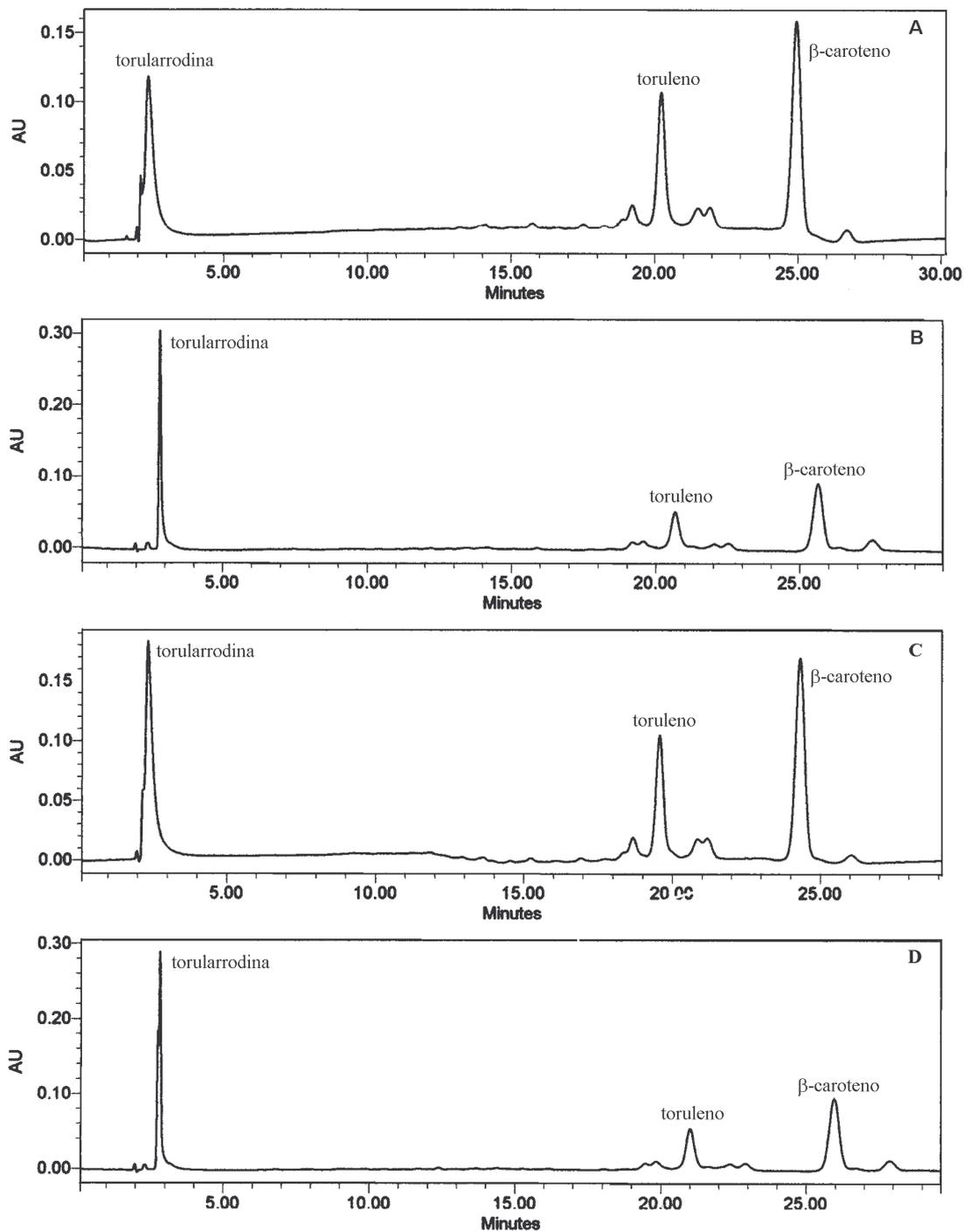


Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻³M de β -ionona, (C) cultivo em em meio suplementado com 0,1% de ácido acético e (D) cultivo em meio suplementado com β -ionona + ácido acético, com limitação de glicose.

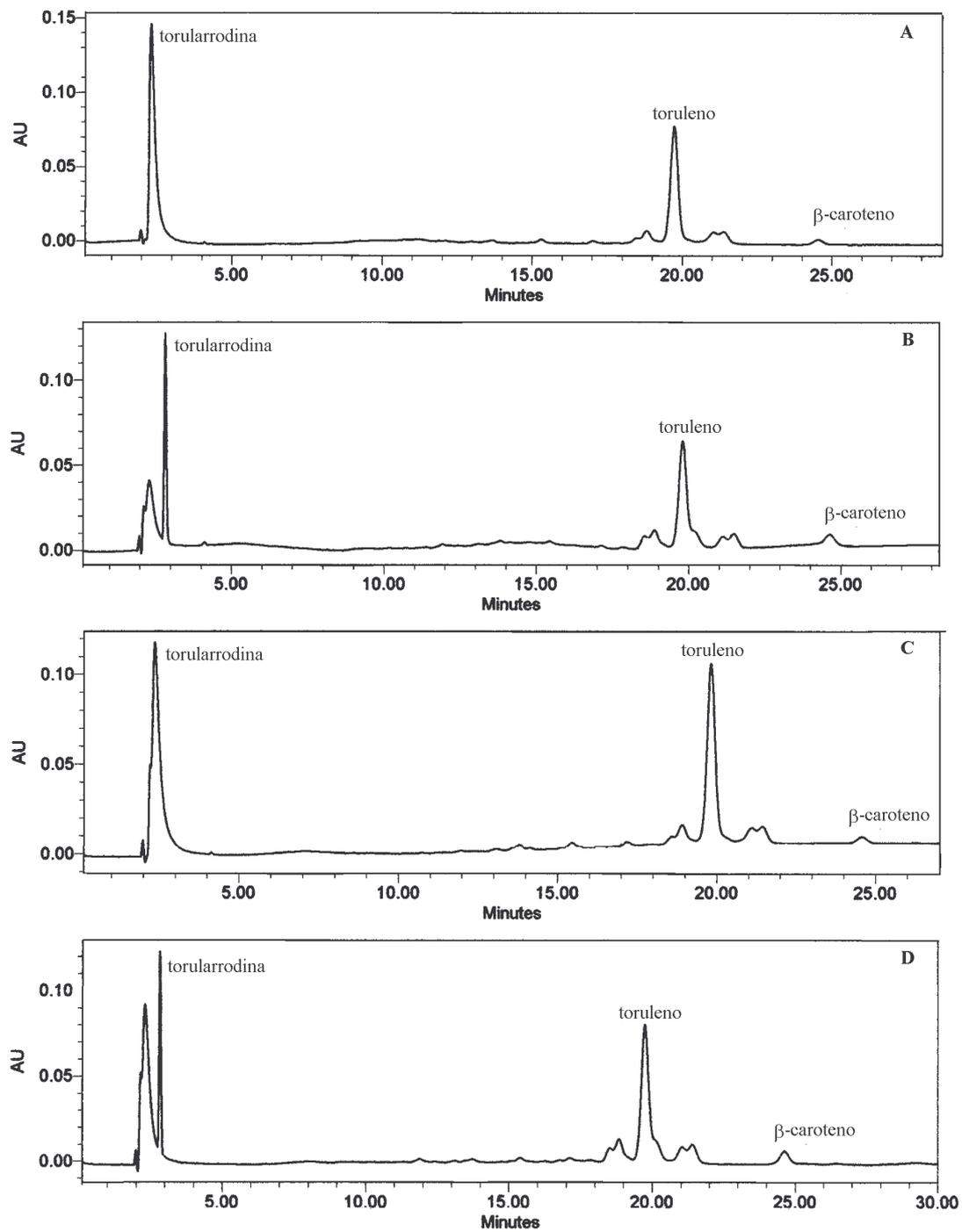


Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻³M de β -ionona, (C) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético e (D) cultivo em meio suplementado com β -ionona + ácido acético; com limitação de glicose.

3.2.Efeito da adição de β -ionona e ácido acético em meio sem glicose com crescimento das leveduras em duas etapas

As Tabelas 3 e 4 mostram a produção de biomassa e de carotenóides com crescimento em duas etapas sem glicose, na presença de β -ionona e de ácido acético.

Tabela 3: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* cultivada em duas etapas sem glicose

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,5475 _b	155,78 _d	852 _d
β -ionona	0,6804 _a	220,12 _c	1497 _c
Ácido acético	0,6334 _a	348,07 _b	2204 _b
β -ionona + Ácido acético	0,6915 _a	383,91 _a	2654 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 4: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada em duas etapas sem glicose

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,5434 _c	77,94 _c	423 _c
β -ionona	0,6805 _a	71,99 _c	489 _b
Ácido acético	0,6053 _b	103,06 _a	623 _a
β -ionona + Ácido acético	0,6927 _a	82,77 _b	537 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Em ambas as leveduras houve maior produção de biomassa tanto na presença de β -ionona quanto de ácido acético. Parece que na ausência de glicose, estes compostos foram utilizados como fonte de carbono, atuando como precursores da via biossintética dos carotenóides e favorecendo a produção de carotenóides na presença de β -ionona e de ácido acético, especialmente na presença deste último.

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 3 e 4. Os cromatogramas indicam que a presença de ácido acético no meio de cultivo sem glicose

diminuiu a proporção de toruleno e de β -caroteno e aumentou a proporção dos carotenóides minoritários em *R. glutinis*. Nossos dados concordam com o que foi observado por Meyer e du Prezz [18], que cultivaram *P. rhodozyma* em meio com ácido acético como única fonte de carbono e verificaram uma diminuição no conteúdo total de carotenóides e na proporção de astaxantina. Em *R. mucilaginoso*, a β -ionona elevou as proporções de torularrodina e dos carotenóides minoritários.

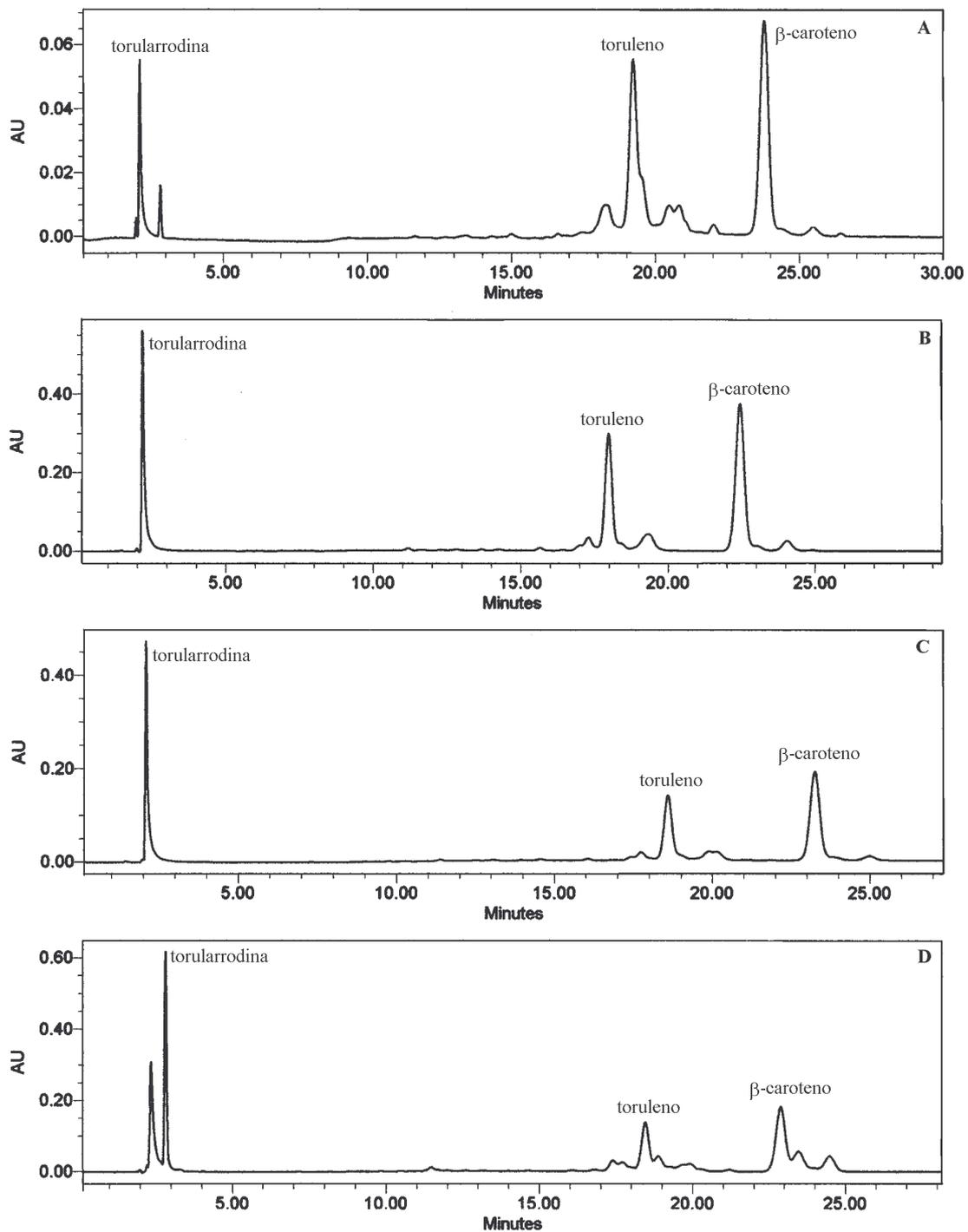


Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻³M de β -ionona sem glicose, (C) cultivo em em meio suplementado com 0,1% de ácido acético sem glicose e (D) cultivo em em meio suplementado com β -ionona + ácido acético sem glicose.

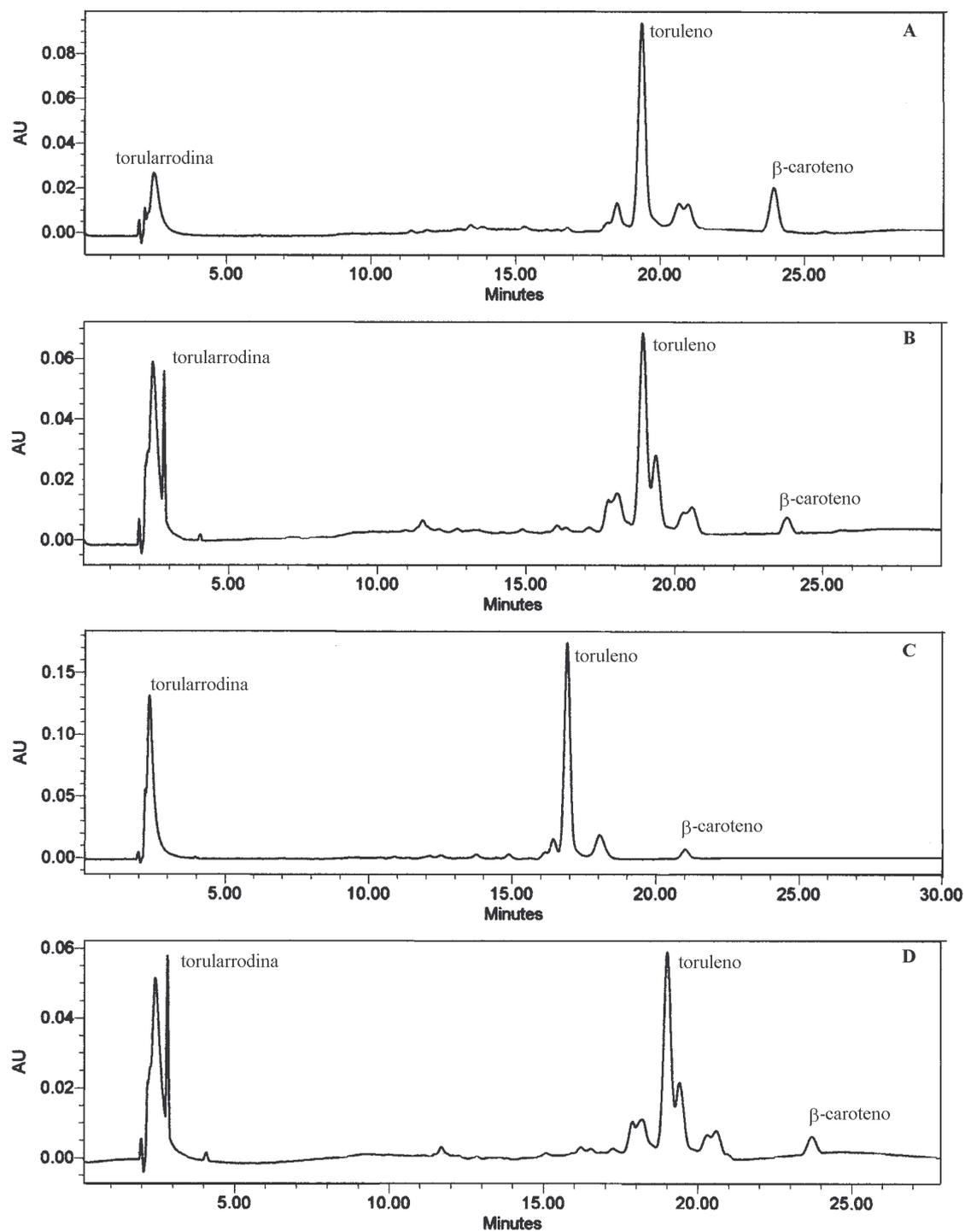


Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻³M de β -ionona sem glicose, (C) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético sem glicose e (D) cultivo em meio suplementado com β -ionona + ácido acético sem glicose.

3.3. Efeito da adição de β -ionona e ácido acético em meio com limitação de nitrogênio sob luz no crescimento das leveduras

As Tabelas 5, 6 e 7 mostram respectivamente, a produção de biomassa e de carotenóides com crescimento em duas etapas, e o açúcar residual em meio de cultivo com limitação de nitrogênio sob exposição à luz.

Tabela 5: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* cultivada em duas etapas com limitação de nitrogênio sob luz

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle (escuro)	0,839 _a	353,02 _a	2266,32 _b
β -ionona	0,345 _d	sem produção _b	sem produção _c
Ácido acético	0,733 _b	374,06 _a	2744,13 _a
β -ionona + Ácido acético	0,540 _c	sem produção _b	sem produção _c

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 6: Efeito de β -ionona e de ácido acético na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotula mucilaginosa* cultivada em duas etapas com limitação de nitrogênio sob luz

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle (escuro)	0,759 _a	124,76 _a	950,13 _a
β -ionona	0,615 _b	148,01 _a	912,72 _a
Ácido acético	0,781 _a	123,99 _a	966,20 _a
β -ionona + Ácido acético	0,764 _a	161,64 _a	1125,38 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 7: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos em duas etapas com limitação de nitrogênio e sob luz, na presença de β -ionona e de ácido acético

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle (escuro)	0,106 _a	0,079 _b
β -ionona	0,126 _a	0,059 _c
Ácido acético	0,069 _b	0,077 _b
β -ionona +Ácido acético	0,044 _b	0,088 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Os dados de crescimento das leveduras em duas etapas revelaram que a limitação de nitrogênio estimulou a produção de biomassa nos controles de ambas leveduras, com valores em torno de 0,8g/100mL comparados a valores em torno de 0,5g/100mL obtidos em cultivo com meio YM normal. A presença de ácido acético em meio com limitação de nitrogênio provocou uma ligeira redução do crescimento de *R. glutinis* e nenhum efeito significativo no crescimento de *R. mucilaginosa*. Por outro lado, a β -ionona reprimiu fortemente a produção de biomassa em *R. glutinis*, com ligeira redução em *R. mucilaginosa*.

A β -ionona na condição deste ensaio inviabilizou a produção de carotenóides em *R. glutinis*. O ácido acético sozinho aumentou ligeiramente a produção de carotenóides. No caso de *R. mucilaginosa*, a produção de carotenóides na presença de β -ionona e ácido acético não diferiu significativamente do controle.

O consumo de glicose foi diferente para as leveduras estudadas. Em *R. glutinis*, o açúcar residual foi menor nos meios contendo ácido acético. Em *R. mucilaginosa*, este teor foi maior no meio com a mistura de β -ionona e ácido acético.

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 5 e 6. Qualitativamente o perfil dos carotenóides majoritários foi mantido no cultivo de *R. glutinis*, cultivada em meio com limitação de nitrogênio, sob luz, na presença de ácido acético em comparação ao controle.

Em *R. mucilaginosa* foi observado um aumento marcante na proporção de toruleno e ligeiro aumento na proporção de β -caroteno nos meios suplementados com β -ionona e com ácido acético.

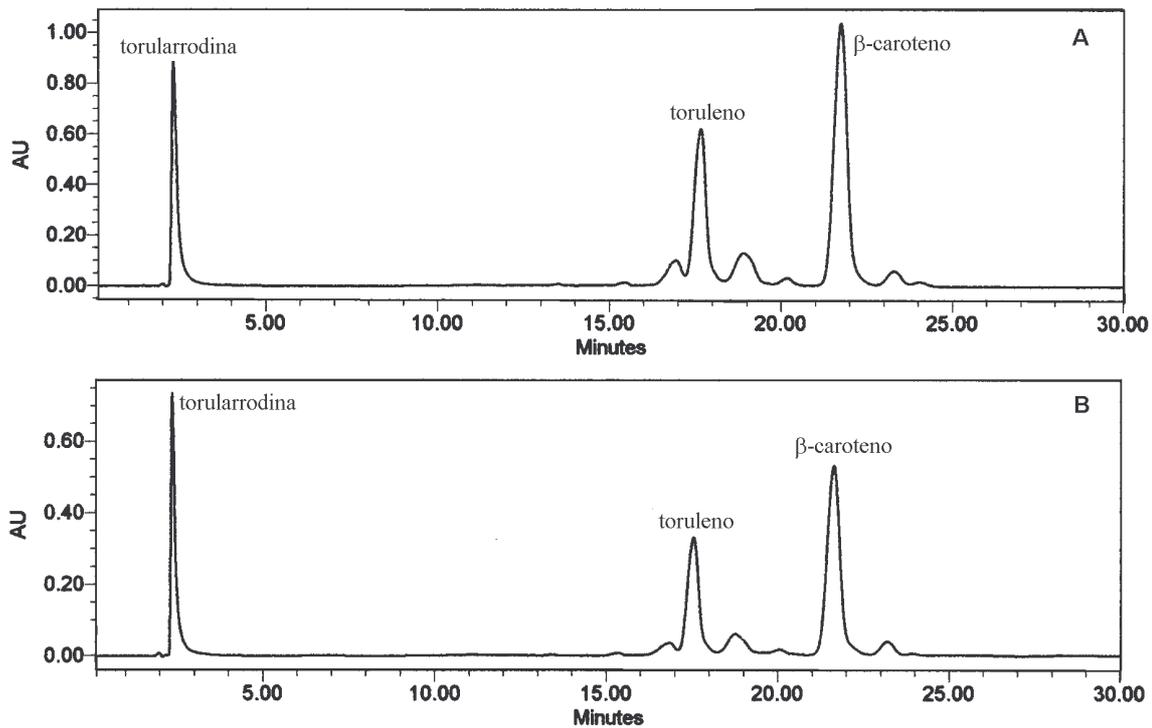


Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio no escuro; (B) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético sob luz.

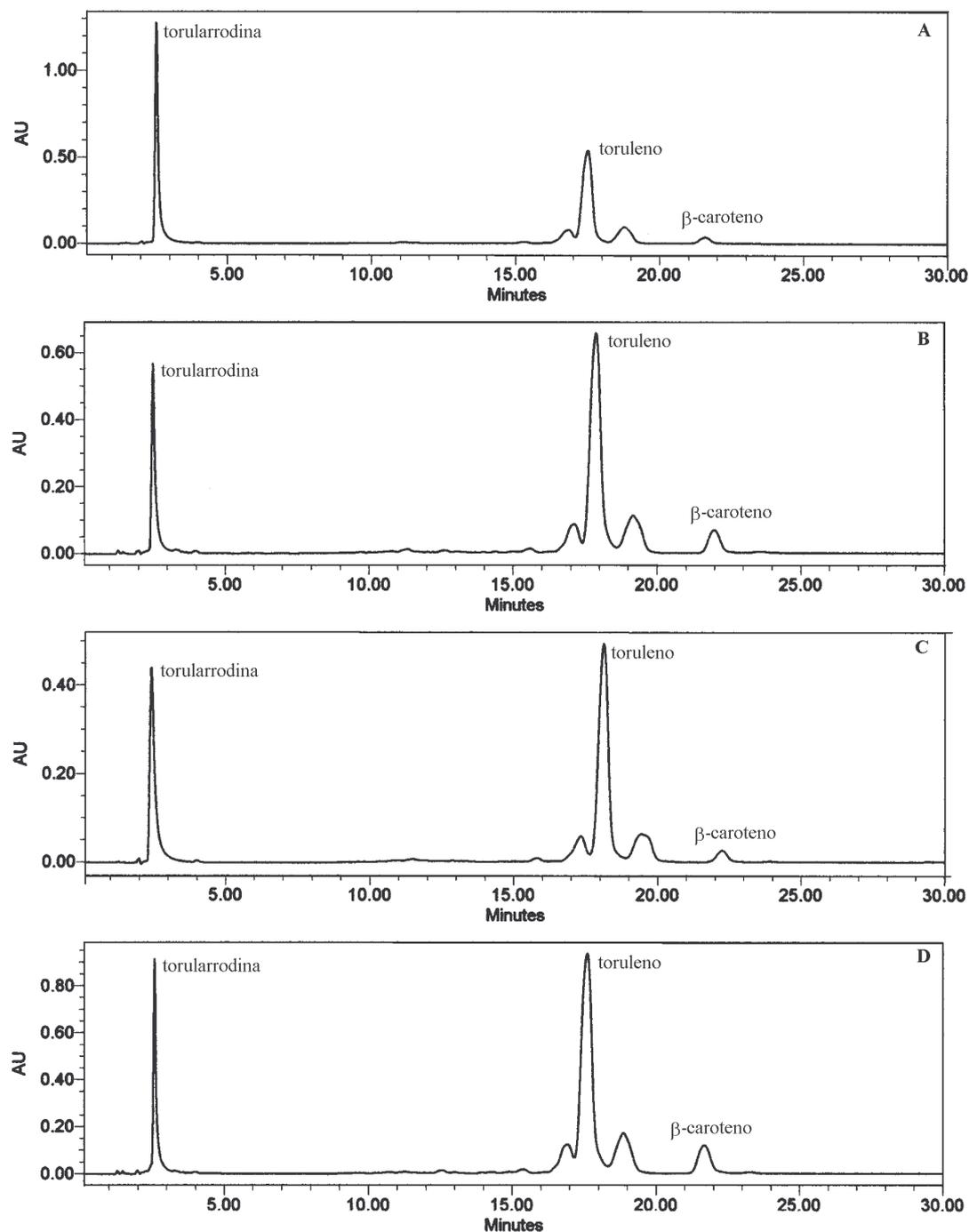


Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio no escuro; (B) cultivo em meio suplementado com 10³M de β-ionona sob intensidade luminosa; (C) cultivo em meio suplementado com 0,1% de ácido acético sob intensidade luminosa e (D) cultivo em meio suplementado com β-ionona + ácido acético sob luz.

3.4. Efeito da exposição à luz no crescimento e na produção de carotenóides em leveduras

As Tabelas 8 e 9 mostram, respectivamente, a produção de biomassa e de carotenóides sob luz. Os dados de açúcar residual são mostrados na Tabela 10.

Tabela 8: Efeito da exposição à luz na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,537 _a	328,35 _a	1696,91 _a
Luz	0,541 _a	293,97 _b	1620,06 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 9: Efeito da exposição à luz na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,505 _a	107,99 _a	544,98 _a
Luz	0,503 _a	89,94 _a	454,95 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com as mesmas letras não têm diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 10: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos sob luz

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle	0,150 _a	0,171 _a
Luz	0,166 _a	0,176 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com as mesmas letras não tem diferença significativa ($p \leq 0,05$)

A exposição de *R. glutinis* à luz levou a uma diminuição significativa na produção de carotenóides em termos de µg/g, efeito não observado em termos de µg/L. A luz não teve efeito significativo na produção de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*. Estes dados se assemelham aos de Bhosale e Gadre [4] que observaram diminuição na proporção de toruleno e aumento na produção de torularrodina.

Os nossos resultados estão de acordo com Sakaki *et al.* [25] em relação ao efeito da luz no crescimento, entretanto, os autores constataram que a luz estimulou a produção de carotenóides em *R. glutinis*, especialmente torularrodina, cuja biossíntese aumentou com maior tempo de exposição da levedura à luz.

Os dados de glicose residual não diferiram dos controles em ambas as leveduras.

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 7 e 8. Os cromatogramas demonstram que a exposição de *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* à luz, nas condições estudadas, não alterou o perfil. Por outro lado, Schoefs *et al.* [23] verificaram que sob exposição à luz, a quantidade de astaxantina produzida foi maior que a quantidade de β -caroteno em *Haematococcus pluvialis*.

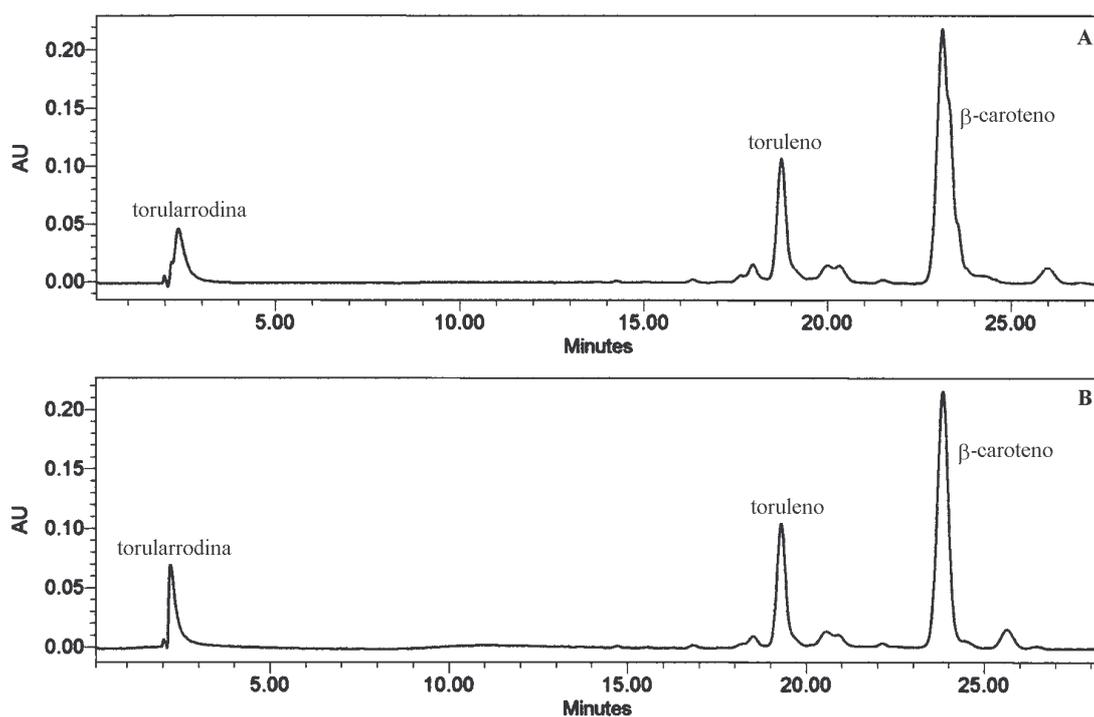


Figura 7: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual no escuro; (B) cultivo em meio usual sob luz.

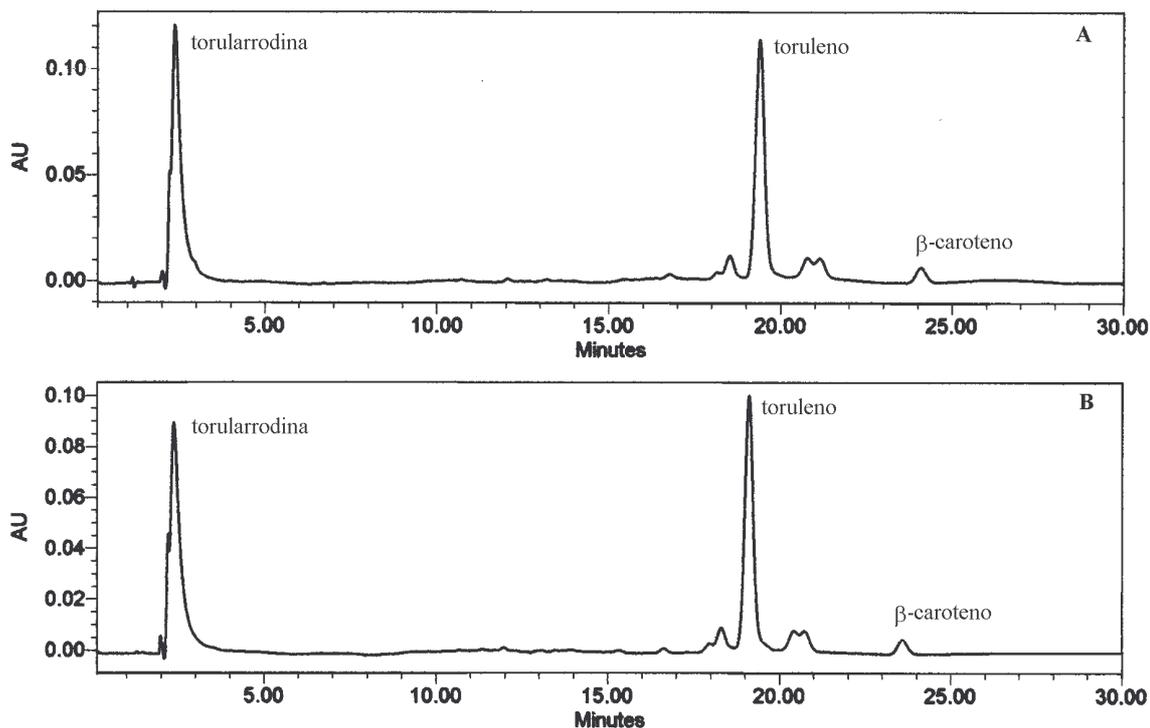


Figura 8: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual no escuro; (B) cultivo em meio usual sob luz.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, projeto PRONEX (nº 662307/1996-8) pelo suporte financeiro ao trabalho.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.** 69: 2169-2173; 1997.
2. BENDICH, A.; OLSON, J.A. Biological action of carotenoids. **FASEB J.** 3: 1927-1932, 1989.

3. BRAITHWAITE, G.D.; GOODWIN, T.W. The incorporation of [¹⁴C] acetate, [¹⁴C] mevalonate and ¹⁴CO₂ into β-carotene by fungus *Phycomyces blakesleeanus*. **Biochem. J.** 76: 5-10, 1960
4. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β-carotene production by *Rhodotorula glutinis*. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 349-353, 2002.
5. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 12-16, 2001.
6. BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 24: 41-45, 2000.
7. BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Biores. Technol.** 71: 41-44, 1999.
8. CHAMOVITZ, D.; MISAWA, N.; SANDMANN, G.; GRANTT, E.; HIRSCHBERG, J. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. **FEBS Lett.** 296: 305-310, 1992
9. DAVIES, B.H. Carotenoid. **In:** Goodwin, T.W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.
10. DISCH, A.; ROHMER, M. On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/piruvate pathway for biosynthesis in fungi and yeast. **FEMS Microbiol. Lett.** 168: 201-208, 1998.
11. ECHAVARRI-ERASUN, C.; JOHNSON, E.A.; Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by fungus *Epicoccum nigrum*. **FEMS Yeast Res.** 4: 511-519, 2004.
12. FONTANA, J.D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T.M.B.; CHOCIAI, B.H.; OLIVEIRA, M.F.; GUIMARÃES, M.F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Biores. Technol.** 58: 121-125, 1996.

13. GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Proc. Biochem.** 33: 385-391, 1998.
14. 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.** 17: 1001-1006, 1995.
15. HAYMAN, E.P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, O.; SIMPSON, K.L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **J. Bacteriol.** 120: 1339-1343, 1974.
16. LEE, T-C; RODRIGUEZ, D.B.; KARASAWA, I.; LEE, T.H.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Chemical alteration of carotene biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus* and mutants. **App. Microbiol.** 30: 988-993, 1975.
17. LEWIS, M.J.; ARGOT, N.; BERLANT, M.C.; MIRANDA, M. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. **Appl. Environ. Microb.** 56: 2944-2945, 1990.
18. MEYER, P.S.; du PREEZ, J.C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Lett.** 15: 919-924, 1993.
19. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428, 1959.
20. OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Achiv. Latinoamer. Nutr.** 49: 7-11, 1999.
21. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press, Washington, D.C. 1999.
22. SANDMANN, G.; ALBRECHT, M.; SCHNURR, G.; KNORZER, O.; BOGER, P. The biotechnological potential and desing of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. **ReviewsTibtech** 17: 233-237, 1999.
23. SANPIETRO, L.M.D.; KULA, M.-R. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. **Yeast** 14: 1007-1016, 1998.
24. SCHOEFS, B.; RMIKI, N.; RACHADI, J.; LEMOINE, Y. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and active synthesis of fatty acids. **FEBS Lett.** 500: 125-128, 2001.
25. SIMPSON, K.L.; NAKAYAMA, T.O.M.; CHICHESTER, C.O. Biosynthesis of Yeast Carotenoids. **J. Bacteriol.** 88: 1688-1694, 1964.

26. SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; TADA, A.; MIKI, W.; KOMEMUSHI, S. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 294-297, 2001.
27. TADA, M.; SHIROISHI, M. Mechanism of Photoregulated carotenogenesis in *Rhodotorula minuta* I. Photocontrol of carotenoid production. **Plant Cell Physiol.** 23: 541-547, 1982.
28. VAZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J.C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 19: 263-268, 1997.

CAPÍTULO 4

Efeito do Ácido Mevalônico na Produção de Carotenóides por Leveduras

Artigo a ser enviado para publicação.

Efeito do Ácido Mevalônico na Produção de Carotenóides por Leveduras

MAYBI C. DA SILVA, DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA

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

RESUMO

Os carotenóides são corantes naturais biossintetizados por plantas, algas e microrganismos. O ácido mevalônico (MVA) atua como precursor-chave no caminho biossintético dos carotenóides. Na tentativa de aumentar a produção de carotenóides nas leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, MVA foi adicionado ao meio de cultivo nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2%. As leveduras foram cultivadas em meio “Yeast Malt” sob agitação de 140rpm a 30°C. Também foi avaliado o efeito da adição de 0,1% de MVA em meio com limitação de nitrogênio e cultivo em duas etapas. Os carotenóides foram quantificados por espectrofotometria de absorção no visível e o perfil qualitativo obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Os dados mostraram que a preseça de MVA no meio de cultivo estimulou a produção de carotenóides nas leveduras com aumento em torno de 120% no conteúdo total de carotenóides em *R. mucilaginosa* e em torno de 35% em *R. glutinis*, sem afetar a produção de biomassa. Houve aumento na produção de toruleno e de β -caroteno em *R. glutinis*. Em *R. mucilaginosa* foi observado expressivo aumento de toruleno. No cultivo das leveduras com 0,1% MVA sob limitação de nitrogênio, uma diminuição na produção de biomassa e um aumento na produção de carotenóides foram observados, tanto na presença quanto na ausência de luz. A limitação de nitrogênio teve o mesmo efeito que a presença de MVA, com aumento de toruleno e β -caroteno em *R. glutinis* e de toruleno em *R. mucilaginosa*.

Palavras-chave: Carotenóides, *Rhodotorula*, Ácido Mevalônico.

ABSTRACT

Carotenoids are natural colorants biosynthesized by plants, algae and microorganisms. Mevalonic acid (MVA) is a key precursor in the biosynthetic pathway of carotenoids. In an attempt to increase the production of carotenoids by the yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*, MVA was added to the culture medium at concentrations of 0.05, 0.1 and 0.2%. The yeasts were cultivated in a yeast malt medium with agitation at 140 rpm at 30°C. Also evaluated was the addition of 0.1% MVA in a medium in which nitrogen was limited and cultivation was done in two steps. The carotenoids were quantified spectrometrically in the visible region and analyzed qualitatively by high performance liquid chromatography. The results showed that the presence of MVA in the medium stimulated the production of carotenoids in the yeasts, increasing the total carotenoid content by about 120% in *R. mucilaginosa* and by about 30% in *R. glutinis*, without affecting the biomass production. There was an increase in the production of torulene and β -carotene in *R. glutinis*. In *R. mucilaginosa*, a marked increase in torulene was observed. In the culture with 0.1% MVA under nitrogen limitation, a reduction of the biomass and an increase in carotenoid production were observed, with or without light exposure. Nitrogen limitation had the same effect as the presence of MVA, with an increase of torulene and β -carotene in *R. glutinis* and of torulene in *R. mucilaginosa*.

Key words: Carotenoids, *Rhodotorula*, Mevalonic acid.

1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelho, exibidas por frutas, flores e raízes. Recentemente os carotenóides tem atraído atenção devido aos efeitos benéficos à saúde humana, principalmente devido à diminuição do risco de doenças degenerativas [2,8,11]. As aplicações industriais dos carotenóides envolvem seu uso como suplementos alimentares e como corantes de alimentos e de ração [13].

A produção anual de carotenóides atualmente está estimada em cerca de 500 milhões de dólares e o mercado está em ascensão, o que tem aumentado o interesse de pesquisadores na produção biotecnológica destes pigmentos [14]. Microrganismos como a microalga

Haematococcus e a levedura *Phaffia rhodozyma* têm sido intensamente estudados para aumentar a produção de astaxantina [1, 4, 6, 7, 9].

Ainda que o caminho biossintético de carotenóides por microrganismos seja conhecido, seu uso industrial é restrito devido a pouca informação disponível sobre os mecanismos de regulação biossintética e à falta de estudos dirigidos tanto para o aumento de biomassa quanto para a produção de carotenóides [3].

Sendo o mevalonato um precursor de carotenóides, a adição de ácido mevalônico ao meio de cultivo pode aumentar a carotenogênese em microrganismos. Calo *et al.* [4], por exemplo, demonstraram que a adição de ácido mevalônico ao meio de cultivo aumentou em quatro vezes a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*.

Entre as leveduras carotenogênicas, duas linhagens do gênero *Rhodotorula*, produtoras de β -caroteno, torularrodina e toruleno, foram escolhidas para este estudo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do ácido mevalônico em meio “Yeast and Malt” (YM), com ou sem limitação de fontes de nitrogênio, no escuro ou sob exposição à luz, na tentativa de aumentar a produção de carotenóides.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Leveduras

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em meio YM sólido, preparado como descrito no capítulo 2, com repiques mensais.

2.2. Condições de cultivo

2.2.1 Adição de ácido mevalônico em diferentes concentrações ao meio de cultivo

O ácido mevalônico foi adicionado diretamente ao meio de cultivo em três diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,2%), de acordo com Calo *et al.* [4].

Os inóculos de *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* foram preparados como padronizado anteriormente. Alíquotas de 20mL contendo as células viáveis foram transferidas para os frascos erlenmeyer contendo o meio YM com ácido mevalônico nas concentrações descritas. Os controles foram preparados com o meio YM, sem o ácido mevalônico. As amostras foram incubadas em agitador rotatório a 30°C e 140rpm por 136 horas.

2.2.2. Adição de ácido mevalônico no meio com limitação da fonte de nitrogênio exposto à luz

Neste estudo, o meio de cultivo YM com limitação de nitrogênio, foi preparado sem peptona e com 0,1% de extratos de malte e de levedo e 1% de glicose. O cultivo foi realizado em duas etapas com adição de 0,1% de ácido mevalônico.

Na primeira etapa, 20mL de inóculo foram transferidas para os frascos erlenmeyer contendo YM normal, que foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 140rpm por 60 horas até a fase estacionária de crescimento. Após este período os meios foram centrifugados e as células foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo YM com limitação de nitrogênio contendo 0,1% de ácido mevalônico. O pH inicial do meio foi ajustado em 6,0. A incubação em agitador rotatório, sob as mesmas condições, foi feita no escuro ou sob iluminação por mais 96 horas. Foram preparadas duplicatas para cada tratamento.

2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual

Após o período de fermentação, 200mL de meio de cultivo foram divididos em duas alíquotas de 100mL para a quantificação da biomassa e dos carotenóides totais. Estas alíquotas foram centrifugadas a 10.000rpm, por 20 minutos, a 5°C para separação do sobrenadante. A biomassa foi determinada através da secagem das células, em estufa a 100°C, até peso constante. Para a determinação dos carotenóides as células foram armazenadas em frascos plásticos no congelador (-20°C) até a realização das análises (dentro de uma semana).

A concentração de glicose residual foi medida nos sobrenadantes das amostras através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller [10].

2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides

O conteúdo total de carotenóides foi determinado em duplicata de acordo com os procedimentos descritos por Rodriguez-Amaya [12]. As amostras armazenadas em congelador foram descongeladas em temperatura ambiente. Os carotenóides foram extraídos através da trituração em almofariz com hiflosupercel e acetona gelada. A filtração foi realizada em filtro sinterizado (porosidade 3; 20-30µm) e o resíduo sólido foi transferido novamente para o almofariz e re-extraído sucessivas vezes até que o resíduo se tornasse incolor (geralmente três vezes). Em seguida foi feita uma partição para éter de petróleo. A água residual foi removida

com sulfato de sódio anidro e a solução de carotenóides foi concentrada em evaporador rotativo (temperatura inferior a 35°C).

A quantificação do carotenóide total foi feita no espectrofotômetro Beckman DU 640 através da fórmula fornecida por Davies [5], usando o valor de absorvidade igual a 3240, que é o coeficiente de absorção do toruleno em éter de petróleo. A produção de carotenóides foi expressa em µg/L (conteúdo total de carotenóides em µg por litro de meio de cultivo) e a produção específica em µg/g (conteúdo total de carotenóides em µg em relação à massa celular seca em g).

2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato concentrado, obtido como descrito na seção anterior, foi levado à secura sob corrente de nitrogênio. A amostra foi re-dissolvida em 1mL de acetona grau CLAE e injetada imediatamente no cromatógrafo. Um sistema constituído de uma bomba quaternária (Waters modelo 600) com degaseificador na linha, injetor manual e detector com arranjo de diodos (Waters modelo 996) controlado por um software Millennium (versão 3.2), foi utilizado para análise cromatográfica. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo (maxplot).

Para a identificação, os espectros de absorção foram analisados em termos de λ_{max} e estrutura espectral fina, expressa pela %III/II, que é a razão entre a altura do pico de absorção de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico do meio (II), o mínimo dos dois picos tomado como linha de base.

Todas as análises foram feitas utilizando uma coluna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS2, 3µm, 4,6 x 150mm). A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol e acetato de etila, em gradiente linear de 65% de acetonitrila e 35% de metanol a 65% de acetonitrila, 19% de metanol e 16% de acetato de etila, em 4 minutos, a última proporção mantida até o final da corrida (30 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 20°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. O fluxo foi de 0,8 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 20µL.

2.4. Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa, de carotenóides e de açúcar residual foi feito através da ANOVA e da aplicação do teste de Tukey, utilizando pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da adição de ácido mevalônico na produção de carotenóides em leveduras

As Tabelas 1 e 2 mostram a produção de biomassa e de carotenóides; e a Tabela 3, o teor de açúcar residual na presença de ácido mevalônico.

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* no escuro

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,6038 _a	370,58 _c	2237 _b
0,05%	0,6021 _a	452,38 _b	2723 _a
0,1%	0,5955 _a	469,52 _a	2796 _a
0,2%	0,5805 _a	493,69 _a	2865 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de ácido mevalônico na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa* no escuro

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,5704 _a	95,85 _d	546 _d
0,05%	0,5987 _a	149,36 _c	894 _c
0,1%	0,5612 _a	181,40 _b	1039 _b
0,2%	0,5728 _a	210,00 _a	1202 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 3: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos com diferentes concentrações de ácido mevalônico

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle	0,155 _a	0,181 _a
0,05%	0,171 _a	0,219 _a
0,1%	0,199 _a	0,230 _a
0,2%	0,184 _a	0,227 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com as mesmas letras não tem diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$)

A adição de ácido mevalônico no início do cultivo não afetou o crescimento das duas leveduras estudadas. Os valores de biomassa não mostraram uma variação significativa, com média em torno de 0,6 g/100mL.

Houve um aumento na produção de carotenóides de 120% em *R. mucilaginosa* e de pouco mais de 35% em *R. glutinis*. Em *R. glutinis*, com o aumento da concentração de ácido mevalônico de 0,05% para 0,1%, houve um aumento significativo na produção de carotenóides. Quando a concentração foi aumentada de 0,1% para 0,2%, ligeiro aumento foi observado, porém não foi significativo. Em *R. mucilaginosa*, o aumento na carotenogênese foi significativo em cada elevação da concentração de ácido mevalônico.

Os nossos resultados estão de acordo com Calo *et al.* [4] que investigaram o efeito de 0,5 e 0,1% de ácido mevalônico no meio de cultivo de *Phaffia rhodozyma* e observaram um aumento de 300% no nível de carotenóides, principalmente com estímulo na produção de astaxantina.

O teor de açúcar residual não apresentou diferença significativa entre os tratamentos nas duas leveduras estudadas, o que está de acordo com os dados de produção de biomassa, indicando que houve consumo adequado da glicose do meio de cultivo. O pH final do meio de cultivo ficou em torno de 6,8 (dados não mostrados).

Os perfis dos carotenóides são apresentados nas Figuras 1 e 2.

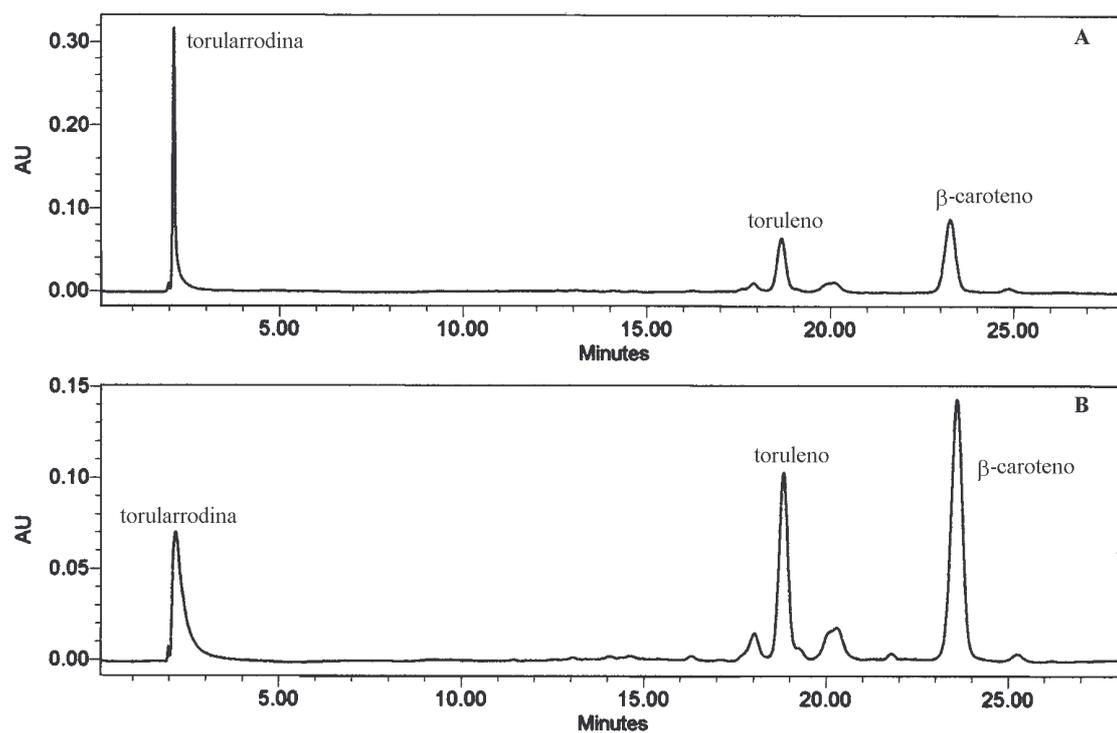


Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 0,2% de ácido mevalônico.

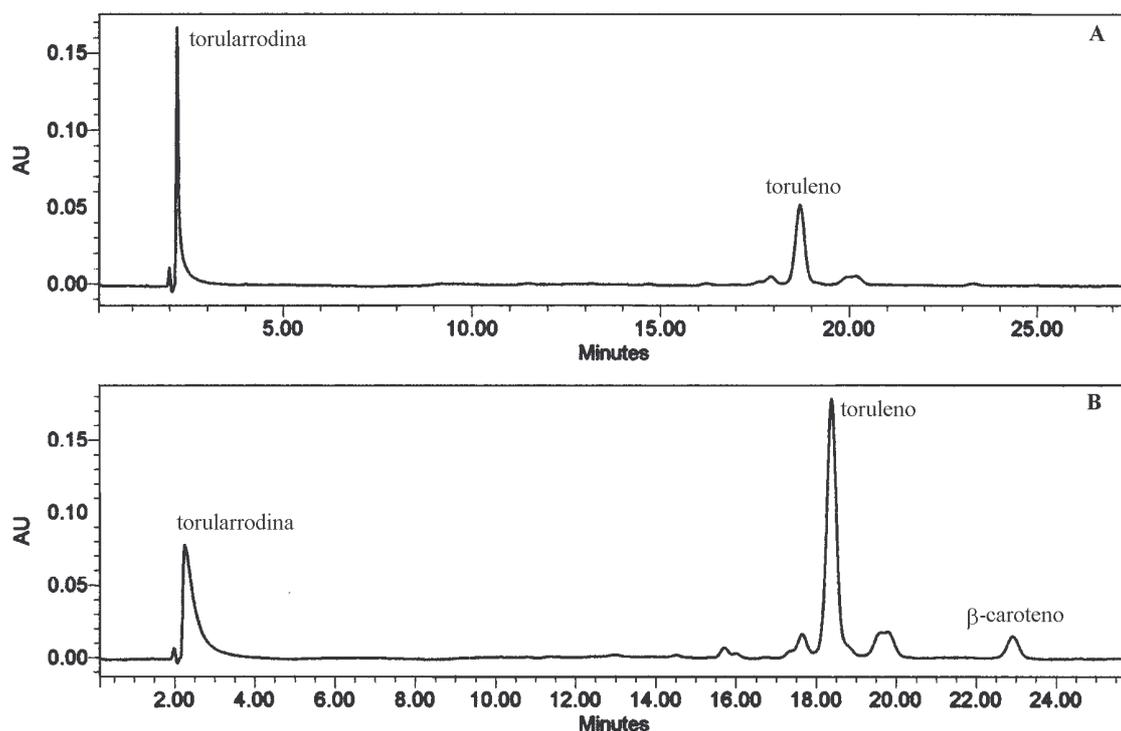


Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 0,2% de ácido mevalônico.

O efeito de ácido mevalônico foi também marcante qualitativamente, com tendências definidas nas duas leveduras. No cultivo de *R. glutinis* em meio contendo 0,2% de ácido mevalônico, houve um aumento na produção de toruleno e de β -caroteno. Em *R. mucilaginosa*, a presença de ácido mevalônico causou aumento expressivo na produção de toruleno e um ligeiro aumento de β -caroteno.

Em ambas as leveduras, a produção de torularrodina foi proporcionalmente menor, o que demonstra que o ácido mevalônico pode ser utilizado na tentativa de desviar a biossíntese para obter o toruleno como carotenóide majoritário, além de aumentar a produção de carotenóides. O toruleno pode se tornar um carotenóide comercial importante devido a sua coloração rósea intensa, conferida pelo sistema de 13 duplas ligações conjugadas, além de ter atividade pró-vitáminica A.

A formação de β -caroteno e toruleno a partir de ácido mevalônico pode ocorrer como representado na figura 3. Em *R. glutinis*, aparentemente houve um bloqueio na transformação

de toruleno a torularrodina, resultando no acúmulo de toruleno e β -caroteno. Em *R. mucilaginosa*, também houve bloqueio na formação de β -caroteno.

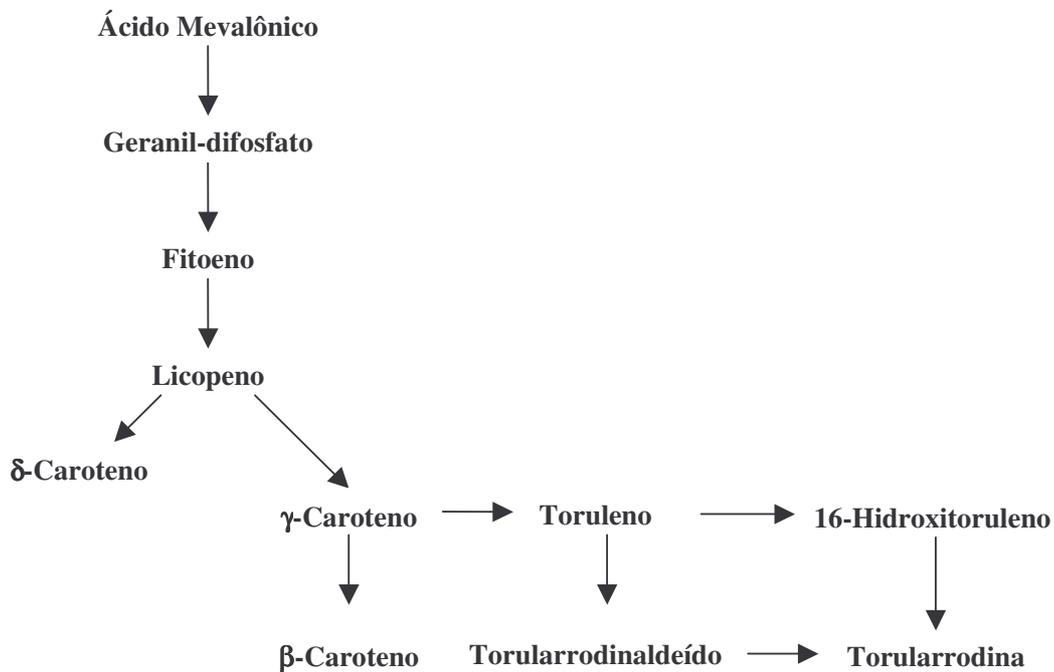


Figura 3: Caminho biossintético de formação de torularrodina a partir de ácido mevalônico.

3.2. Efeito da adição de ácido mevalônico em meio com limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em leveduras sob luz

As Tabelas 4 e 5 mostram a produção de biomassa e de carotenóides nas leveduras cultivadas em duas etapas com deficiência de nitrogênio, sob iluminação.

Tabela 4: Produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* cultivada em duas etapas, com adição de 0,1% de ácido mevalônico e limitação de nitrogênio

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle (escuro)	0,830 _a	387,46 _c	2927,96 _b
Ácido mevalônico (luz)	0,702 _b	460,62 _a	3234,87 _a
Ácido mevalônico (escuro)	0,738 _b	405,86 _b	2995,20 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 5: Produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa* cultivada em duas etapas, com adição de 0,1% de ácido mevalônico e limitação de nitrogênio

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle (escuro)	0,752 _b	109,89 _b	912,65 _b
Ácido mevalônico (luz)	0,790 _a	162,24 _a	1298,74 _a
Ácido mevalônico (escuro)	0,814 _a	155,37 _a	1265,27 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Comparando os dados de biomassa nos controles nas Tabelas 1 e 2 e nas Tabelas 4 e 5, a limitação de nitrogênio aumentou nitidamente o crescimento em ambas leveduras. Entretanto, a adição de ácido mevalônico ao meio sob limitação de nitrogênio exerceu um efeito diferente nas leveduras estudadas. Em *R. glutinis*, a presença de 0,1% de ácido mevalônico diminuiu significativamente a produção de biomassa tanto na presença quanto na ausência de luz. Em *R. mucilaginosa*, houve aumento significativo no crescimento das células cultivadas com e sem luz.

A produção de carotenóides aumentou em *R. glutinis* cultivada com e sem luz, com maior acréscimo sob luz. Em *R. mucilaginosa*, o ácido mevalônico também ocasionou aumento na produção de carotenóides. A quantidade de carotenóides produzida sob iluminação foi maior, porém, não atingiu o nível de significância, comparado ao cultivo no escuro.

De acordo com Tada e Shiroishi [15], um aumento expressivo na produção de carotenóides em cultivos sob luz pode ser explicado pelo fato que a incidência de luz pode

induzir a enzima HMG-CoA redutase em *Rhodotorula* ssp, enzima esta essencial para o acúmulo de mevalonato, o que explica o maior aumento observado sob luz.

Os baixos teores de açúcar residual, mostrados na Tabela 6, indicam que devido à limitação de nitrogênio no meio de cultivo houve um intenso consumo de glicose, em conformidade com o crescimento das leveduras.

Tabela 6: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos em duas etapas em meio com limitação de nitrogênio, na presença de 0,1% de ácido mevalônico, sob exposição à luz

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle (escuro)	0,095 _a	0,104 _a
Ácido mevalônico (luz)	0,033 _c	0,077 _a
Ácido mevalônico (escuro)	0,065 _b	0,085 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Os perfis cromatográficos das amostras cultivadas sob exposição à luz e no escuro, contendo 0,1% de ácido mevalônico são mostrados nas Figuras 4 e 5. Em ambas as leveduras, a limitação de nitrogênio produziu o mesmo efeito que a presença de ácido mevalônico no meio normal: aumento de toruleno e β -caroteno em *R. glutinis* e de toruleno em *R. mucilaginosa*, com diminuição de torularrodina. A adição de ácido mevalônico nestas condições não teve efeito apreciável. Os autores não relataram mudanças nas proporções ou no perfil dos carotenóides.

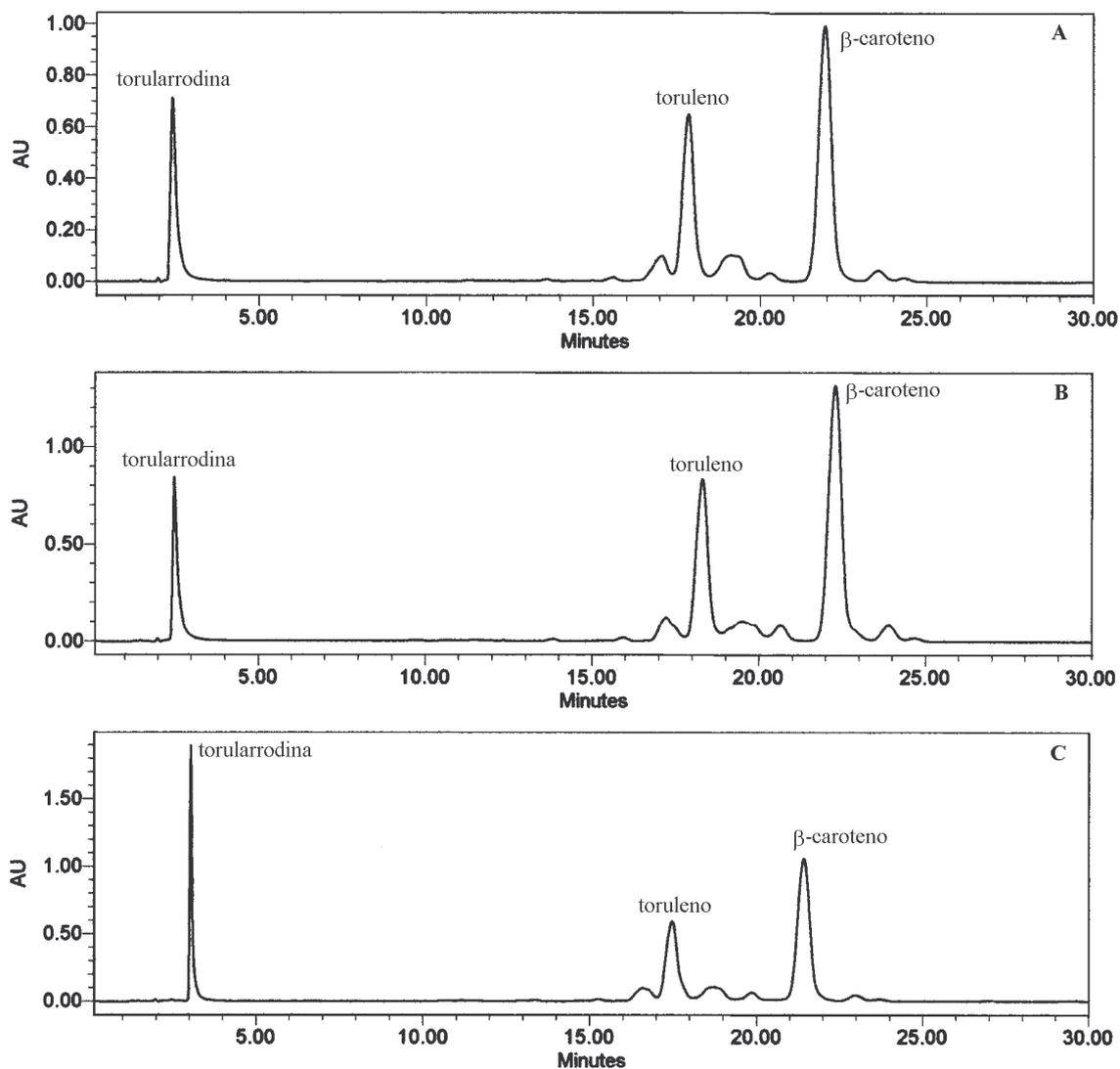


Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio no escuro; (B) cultivo em meio com limitação de nitrogênio e suplementado com 0,1% de ácido mevalônico sob luz; (C) cultivo em meio com limitação de nitrogênio e suplementado com 0,1% de ácido mevalônico no escuro.

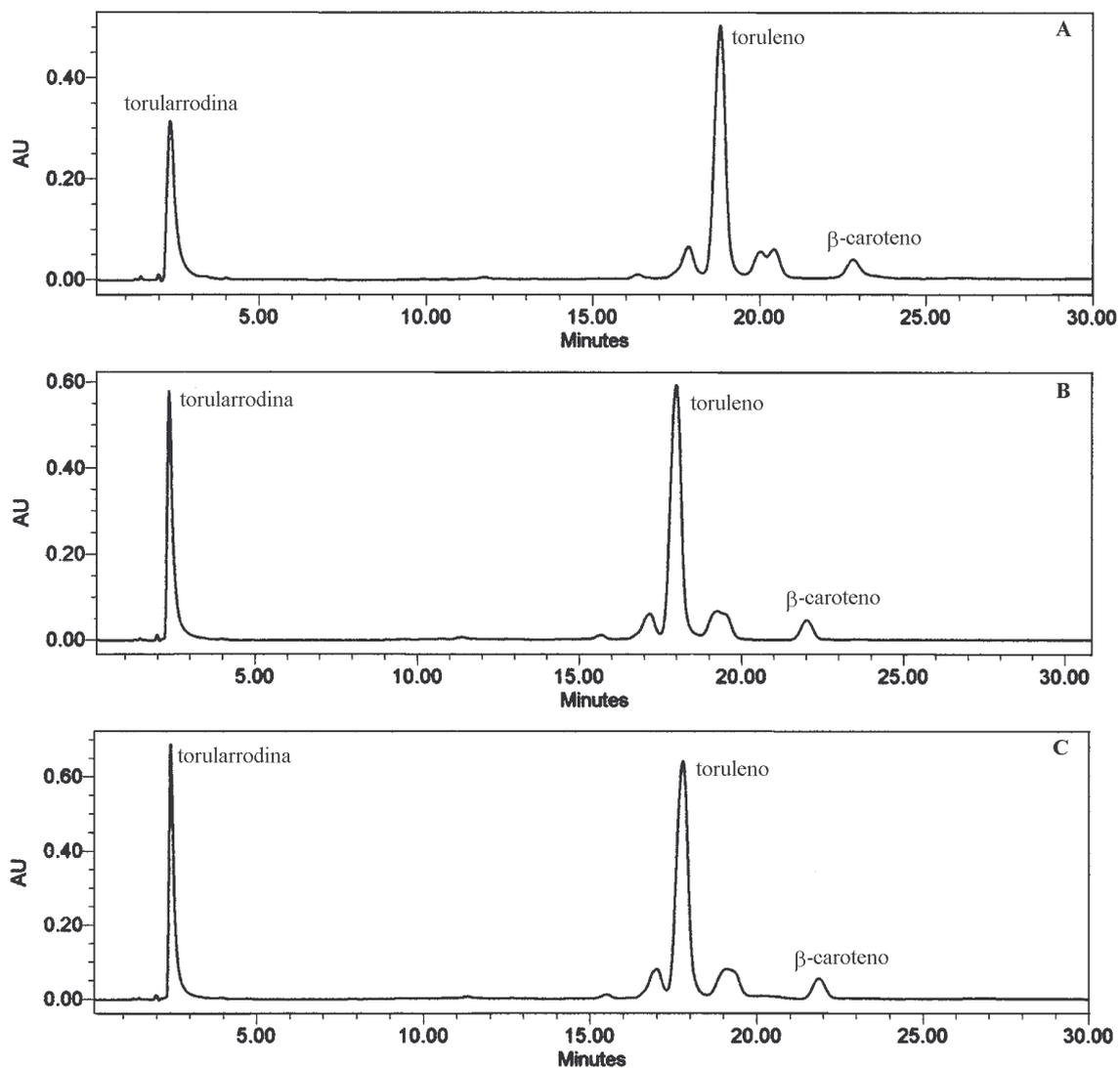


Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio no escuro; (B) cultivo em meio com limitação de nitrogênio e suplementado com 0,1% de ácido mevalônico sob luz; (C) cultivo em meio com limitação de nitrogênio e suplementado com 0,1% de ácido mevalônico no escuro.

4. CONCLUSÕES

Os estudos demonstraram que a adição de ácido mevalônico ao meio de cultivo normal estimulou a produção de carotenóides em 35% em *Rhodotorula glutinis* e em 120% em

Rhodotorula mucilaginosa, com maior produção de toruleno em ambas leveduras e β -caroteno em *R. glutinis*.

Nos cultivos em duas etapas, a limitação de nitrogênio aumentou significativamente o crescimento das leveduras, entretanto esta limitação associada à presença de 0,1% de ácido mevalônico ocasionou uma diminuição na produção de biomassa em *R. glutinis* e um aumento em *R. mucilaginosa*, tanto no claro quanto no escuro.

A produção de carotenóides sob limitação de nitrogênio e na presença de ácido mevalônico aumentou nas duas leveduras tanto no claro quanto no escuro.

Os dados indicam que, apesar do alto custo do ácido mevalônico este agente químico pode ser utilizado para aumentar a produção de carotenóides em leveduras do gênero *Rhodotorula*, especialmente de toruleno, embora sejam necessários mais estudos para avaliar a melhor condição de cultivo para este fim.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, projeto PRONEX (nº 662307/1996-8) pelo suporte financeiro ao trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSICH, R.L. Comercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.** 69: 2169-2173; 1997.
2. BENDICH, A.; OLSON, J.A. Biological action of carotenoids. **FASEB J.** 3: 1927-1932, 1989.
3. BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 24: 41-45, 2000.

4. CALO, P.; MIGUEL, T. VELÁSQUEZ, J.B.; VILLA, T.G. Mevalonic acid increases *trans*-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol. Lett.** 17: 575-578, 1995.
5. DAVIES, B.H. Carotenoid. **In:** Goodwin, T.W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.** s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.
6. FANG, T.J.; CHENG, Y.S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **J. Ferm. Bioeng.** 75: 466-469, 1993.
7. FANG, T.J.; WANG, J-M. Extractability of astaxanthin in mixed culture of carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage fermentation. **Proc. Biochem.** 37: 1235-1245, 2002.
8. FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.** 43: 1-38, 2004.
9. GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Proc. Biochem.** 33: 385-391, 1998.
10. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428, 1959.
11. OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Achiv. Latinoamer. Nutr.** 49: 7-11, 1999.
12. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press, Washington, D.C. 1999.
13. SANDMANN, G. Genetic manipulation of carotenoids biosynthesis: strategies, problems and achievements. **Trends Plant Sci.** 6: 14-17, 2001.
14. SANDMANN, G.; ALBRECHT, M.; SCHNURR, G.; KNORZER, O.; BOGER, P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. **Tibtech** 17: 233-237, 1999.
15. TADA, M.; SHIROISHI, M. The influence of light illumination on the growth and carotenoid formation of *Rhodotorula minuta*. **Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ.** 50: 63-68, 1978.

CAPÍTULO 5

EFEITO DE AMINOÁCIDOS E DIFENILAMINA NA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR LEVEDURAS

Artigo a ser enviado para publicação.

RESUMO

As leveduras do gênero *Rhodotorula* estão entre as principais leveduras carotenogênicas, sendo que o seu crescimento e a produção de carotenóides dependem das condições de cultivo. A produção de carotenóides específicos pode ser conseguida pela adição ao meio de cultivo de certos agentes químicos que influenciam a biossíntese. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos seguintes compostos na produção de carotenóides em *Rhodotorula glutinis* e *R. mucilaginosa*: (a) difenilamina, (b) asparagina e glutamina, (c) treonina e prolina, (d) asparagina, (e) fenilalanina. Também foi verificado o efeito da limitação de nitrogênio. O meio utilizado foi o “Yeast and Malt” e os cultivos foram realizados em agitador rotatório a 140rpm e 30°C. A produção de biomassa foi determinada por peso seco. Os carotenóides totais foram determinados por espectrofotometria de absorção no visível e o perfil qualitativo obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Difenilamina não afetou o crescimento, mas inibiu a produção de carotenóides em ambas as leveduras. Em *R. mucilaginosa* houve aumento na proporção de β -caroteno na presença de difenilamina. A limitação de nitrogênio diminuiu o crescimento, mas aumentou em 100% a produção de carotenóides em ambas as leveduras, sem alteração no perfil dos carotenóides. Misturas de asparagina e glutamina, e de treonina e prolina diminuíram o crescimento e a carotenogênese, mas aumentaram a proporção de torularrodina em ambas as leveduras. A adição individual de asparagina e de fenilalanina, em meio com limitação de nitrogênio, não teve efeito significativo no crescimento das leveduras. A asparagina estimulou a produção de carotenóides em *R. glutinis*, sem mudança no perfil dos carotenóides. Em *R. mucilaginosa*, ambos os aminoácidos diminuíram a proporção de toruleno.

Palavras-chave: Carotenóides, *Rhodotorula*, Aminoácidos, Difenilamina.

ABSTRACT

The yeasts of the genus *Rhodotorula* are among the principal carotenogenic yeasts, the growth of which and the production of carotenoids depending on the culture conditions. The production of specific carotenoids can be achieved by the addition to the culture medium of specific chemical agents that influence the biosynthesis. The objective of the present study

was to evaluate the effect of the following compounds on the production of carotenoids in *Rhodotorula glutinis* and *R. mucilaginosa*: (a) diphenylamine, (b) asparagine and glutamine, (c) threonine and proline, (d) asparagine, (e) phenylalanine. The effect of nitrogen limitation was also verified. The medium utilized was yeast and malt and cultures were carried out in a shaker at 140 rpm at 30°C. The production of biomass was determined by the dry weight. The total carotenoid contents were determined by absorption spectrometry in the visible region and the qualitative profile was obtained by high performance liquid chromatography. Diphenylamine did not affect the growth but inhibited the production of carotenoids in both yeasts. In *R. mucilaginosa*, there was an increase in the proportion of β -carotene in the presence of diphenylamine. Limitation of nitrogen reduced the growth but increased the production of carotenoids by 100% in both yeasts, without altering the carotenoid pattern. Mixtures of asparagine and glutamine decreased the growth and carotenogenesis, but increased the proportion of torularhodin in both yeasts. The individual addition of asparagine and phenylalanine, in a medium with limited nitrogen, did not have significant effect on the growth of the yeasts. Asparagine stimulated the production of carotenoids in *R. glutinis*, without changing the carotenoid pattern. In *R. mucilaginosa*, both amino acids decreased the proportion of torulene.

Key words: Carotenoids, *Rhodotorula*, Amino acids, Diphenylamine

1. INTRODUÇÃO

A produção de carotenóides a partir de fontes biológicas é atualmente uma área de intensa investigação. Industrialmente, β -caroteno, precursor de vitamina A, é utilizado como suplemento em ração e em alimentos, enquanto que a astaxantina tem sido empregada principalmente para pigmentação de peixes, como truta e salmão. Licopeno e astaxantina também têm despertado interesse dos pesquisadores pelos efeitos benéficos à saúde devido as suas propriedades antioxidantes [3, 7, 8, 14].

A produção microbiana de carotenóides e os efeitos da composição do meio e das condições de cultivo no crescimento e na produção de carotenóides têm sido estudados por vários pesquisadores [2, 4, 8, 11]. Entre os aspectos estudados para regulação da biossíntese de

carotenóides está a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo. Garbayo *et al.* [10] observaram que a limitação de nitrogênio induziu a um aumento significativo na produção de carotenóides em *Gibberella fujikuroi*. Por outro lado, Fang e Cheng [7] demonstraram que a presença de peptona e de misturas de diferentes fontes de nitrogênio aumentou consideravelmente a produção de astaxantina em *Phaffia rhodozyma*.

Alcântara e Sanchez [1], observaram em *Flavobacterium sp* um aumento na produção de carotenóides com elevação da concentração de asparagina. A mistura de asparagina e glutamina, entre as diferentes combinações testadas em meio contendo somente glicose, promoveu o melhor crescimento e a maior produção de carotenóides. Os resultados sugeriram que asparagina foi utilizada primeiramente como fonte de nitrogênio e que, provavelmente, ocorreu a formação de catabólitos que atuaram como promotores do crescimento e da carotenogênese em *Flavobacterium sp*.

An *et al.* [2] verificaram o efeito da adição de glutamina, aspartato, asparagina e prolina ao meio de cultivo na carotenogênese em *P. rhodozyma*. A adição de aminoácidos aumentou o crescimento, mas diminuiu a produção de carotenóides, o que poderia ser explicado pela baixa atividade do ciclo do ácido cítrico, levando a uma diminuição da carotenogênese.

Bhosale e Gadre [4] observaram que a produção de carotenóides por *R. glutinis* aumentou significativamente no meio contendo extrato de levedura, glicose e treonina.

Alguns estudos sobre a regulação da biossíntese de carotenóides utilizaram inibidores como difenilamina para esclarecer a seqüência da biossíntese e para o isolamento de linhagens superprodutoras. Fan *et al.* [6] estudaram o efeito de difenilamina na produção de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* e demonstraram que a inibição da síntese deste pigmento levou ao acúmulo de β -caroteno como produto final. Fraser *et al.* [9] verificaram que difenilamina previne a desaturação em *Muccor circinelloides*, com acúmulo de fitoeno e fitoflueno, um efeito similar ao observado em *Phycomyces blakesleanus*.

No presente trabalho foram investigados os efeitos da limitação de nitrogênio no meio de cultivo, e da adição de difenilamina e de alguns aminoácidos no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras do gênero *Rhodotorula*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Leveduras

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. As leveduras foram mantidas sob refrigeração, em meio YM sólido, preparado como descrito anteriormente (capítulo 2), com repiques mensais.

A preparação do inóculo e a introdução no meio de cultivo foram realizadas de acordo com o Capítulo 2.

2.2. Condições de cultivo

2.2.1. Adição de difenilamina ao meio de cultivo

Foram utilizadas baixas concentrações de difenilamina para evitar um efeito inibitório do crescimento. De acordo com Fan *et al.* [6], a difenilamina foi solubilizada em uma solução de etanol 70% em pH 9,0. Após a transferência de 20mL do inóculo para frascos erlenmeyer contendo 200mL de YM, a difenilamina foi adicionada, assepticamente, nas concentrações de 30 e 60 μ M. A incubação foi feita em agitador rotatório a 30°C e 140rpm por 136 horas. Os frascos controles foram preparados com a adição do mesmo volume de etanol 70% puro.

2.2.2. Limitação de fonte de nitrogênio

Um estudo foi feito para avaliar o efeito da deficiência de fonte de nitrogênio no meio de cultivo. O crescimento das leveduras foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, o inóculo (20mL de células viáveis) foi transferido para frascos contendo YM, que foram incubados por 60 horas em agitador rotatório a 30°C, 140rpm. Na segunda etapa, o conteúdo celular foi transferido para frascos com YM, preparado sem peptona e com 0,1% de extratos de malte e de levedo e 1% de glicose. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, sob as mesmas condições, por 96 horas. Os controles foram preparados com a transferência de células para frascos erlenmeyer contendo YM com composição usual. O pH foi ajustado inicialmente em 6,0.

2.2.3. Adição de aminoácidos com e sem limitação de nitrogênio

Foram transferidos 20 mL de células viáveis para frascos contendo 10g/L de glicose e uma concentração individual de 10^{-2} M dos aminoácidos combinados: asparagina e glutamina, treonina e prolina. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 140rpm por 120

horas. Os controles foram preparados com o inóculo sendo transferido para frascos erlenmeyer contendo YM.

Um outro estudo foi realizado para verificar o efeito da adição de aminoácidos individuais ao meio de cultivo com limitação de nitrogênio, em duas etapas, como descrito na seção anterior. A estes frascos foram adicionados 10^{-2} M de asparagina e de fenilalanina, em cultivos separados. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, sob as mesmas condições por 96 horas. Os controles foram preparados com células sendo transferidas para frascos erlenmeyer contendo YM, com limitação de fonte de nitrogênio.

2.3. Determinação de biomassa, carotenóides e de açúcar residual

Após o período de fermentação, os 200mL de meio foram divididos em duas alíquotas de 100mL: uma para a quantificação da biomassa e outra para a quantificação dos carotenóides produzidos. Estas foram centrifugadas a 10.000rpm, por 20 minutos, a 5°C para separação do sobrenadante. Foram feitas medidas do pH final do meio de cultivo e a biomassa foi determinada através da secagem das células, em estufa a 100°C, até peso constante. Para a determinação dos carotenóides as células foram armazenadas em frascos plásticos no congelador (-20°C) até que as análises pudessem ser realizadas (dentro de uma semana).

A concentração de glicose residual foi medida nos sobrenadantes das amostras através do método do ácido dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller [13].

2.3.1. Determinação do conteúdo total de carotenóides

O conteúdo total de carotenóides foi feito em duplicata de acordo com os procedimentos descritos por Rodriguez-Amaya [15]. As amostras armazenadas em congelador foram descongeladas em temperatura ambiente. Os carotenóides foram extraídos através da trituração em almofariz com hiflosupercel e acetona gelada. A filtração foi realizada em filtro sinterizado (porosidade 3; 20-30µm) e o resíduo sólido foi transferido novamente para o almofariz e re-extraído sucessivas vezes até que o resíduo se tornasse incolor (geralmente três vezes). Em seguida foi feita uma partição para éter de petróleo. A água residual foi removida com sulfato de sódio anidro e a solução de carotenóides foi concentrada em evaporador rotativo (temperatura inferior a 35°C).

A quantificação do carotenóide total foi feita no espectrofotômetro Beckman DU 640 através da fórmula fornecida por Davies [5], usando o valor de absorvidade igual a 3240, que

é o coeficiente de absorção do toruleno em éter de petróleo. A produção de carotenóides foi expressa em $\mu\text{g/L}$ (conteúdo total de carotenóides em μg por litro de meio de cultivo) e a produção específica em $\mu\text{g/g}$ (conteúdo total de carotenóides em μg em relação à massa celular seca em g).

2.3.2. Análise qualitativa dos carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato concentrado, obtido como descrito na seção anterior, foi levado à secura sob corrente de nitrogênio. A amostra foi re-dissolvida em 1mL de acetona grau CLAE e injetada imediatamente no cromatógrafo. Um sistema constituído de uma bomba quaternária (Waters modelo 600) com degaseificador na linha, injetor manual e detector com arranjo de diodos (Waters modelo 996) controlado por um software Millennium (versão 3.2), foi utilizado para análise cromatográfica. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo (maxplot).

Para a identificação, os espectros de absorção foram analisados em termos de λ_{max} e estrutura espectral fina, expressa pela $\%III/II$, que é a razão entre a altura do pico de absorção de maior comprimento de onda (III) e a altura do pico do meio (II), o mínimo dos dois picos tomado como linha de base.

Todas as análises foram feitas utilizando uma coluna de fase reversa (Spherisorb S3 ODS2, $3\mu\text{m}$, $4,6 \times 150\text{mm}$). A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol e acetato de etila, em gradiente linear de 65% de acetonitrila e 35% de metanol, a 65% de acetonitrila, 19% de metanol e 16% de acetato de etila, em 4 minutos, a última proporção mantida até o final da corrida (30 minutos). A temperatura foi de aproximadamente 20°C e o tempo de re-equilíbrio da coluna foi de 15 minutos. O fluxo foi de $0,8 \text{ mL/min}$ e o volume de amostra injetado foi de $20\mu\text{L}$.

2.4. Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos dados de produção de biomassa e de carotenóides, e de açúcar residual foi feito através da ANOVA e da aplicação do teste de Tukey, utilizando pacote estatístico SAS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da adição de difenilamina na produção de carotenóides em leveduras

As Tabelas 1 e 2 mostram a produção de biomassa e de carotenóides na presença de difenilamina em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, respectivamente.

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de difenilamina na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,5594 _a	325,41 _a	1820 _a
Difenilamina 30µM	0,5382 _a	211,92 _b	1140 _b
Difenilamina 60µM	0,5241 _a	50,26 _c	262 _c

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de difenilamina na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,5273 _a	105,88 _a	558 _a
Difenilamina 30µM	0,5271 _a	72,01 _b	379 _b
Difenilamina 60µM	0,4864 _a	27,15 _c	132 _c

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

A adição de difenilamina no meio do cultivo não produziu diferença significativa no crescimento das duas leveduras estudadas, embora os valores de biomassa obtidos tenderam a ser um pouco menores que aqueles dos controles.

Quanto à produção de carotenóides, a presença de difenilamina provocou um forte efeito inibitório. Em *R. glutinis*, a presença de 30µM de difenilamina provocou uma inibição na produção de carotenóides menos acentuada que aquela observada na presença de 60µM, em que a produção foi seis vezes menor. Em *R. mucilaginosa* a produção foi três vezes menor nesta concentração de difenilamina. Este efeito inibidor está de acordo com a literatura. Por exemplo, a adição de difenilamina no meio de cultivo, segundo Fan *et al.* [6], provocou uma forte diminuição na produção de carotenóides em *Haematococcus pluvialis*.

Os perfis dos carotenóides são mostrados nas Figuras 1 e 2. O efeito de difenilamina foi também qualitativamente marcante. A produção de toruleno e de torularrodina foi fortemente reprimida nas duas leveduras, enquanto que surgiram carotenóides não identificados, possivelmente intermediários biossintéticos. Por outro lado, houve um considerável aumento de β -caroteno em *R. mucilaginosa*.

Segundo Lee *et al.* [12], em *Phycomyces blakesleeanus* a difenilamina atuou nas etapas de desidrogenação, estimulando a formação de fitoeno. De acordo com Fan *et al.* [7], a presença de difenilamina no meio de cultivo leva a um acúmulo de β -caroteno com inibição da biossíntese de carotenóides como astaxantina e cantaxantina em *Phaffia rhodozyma* e em *Haematococcus pluvialis*. Entretanto nossos dados sugerem que poderia ter havido um bloqueio na transformação de γ -caroteno para toruleno e torularrodina, desviando o caminho biossintético para a formação de β -caroteno em *R. mucilaginosa*.

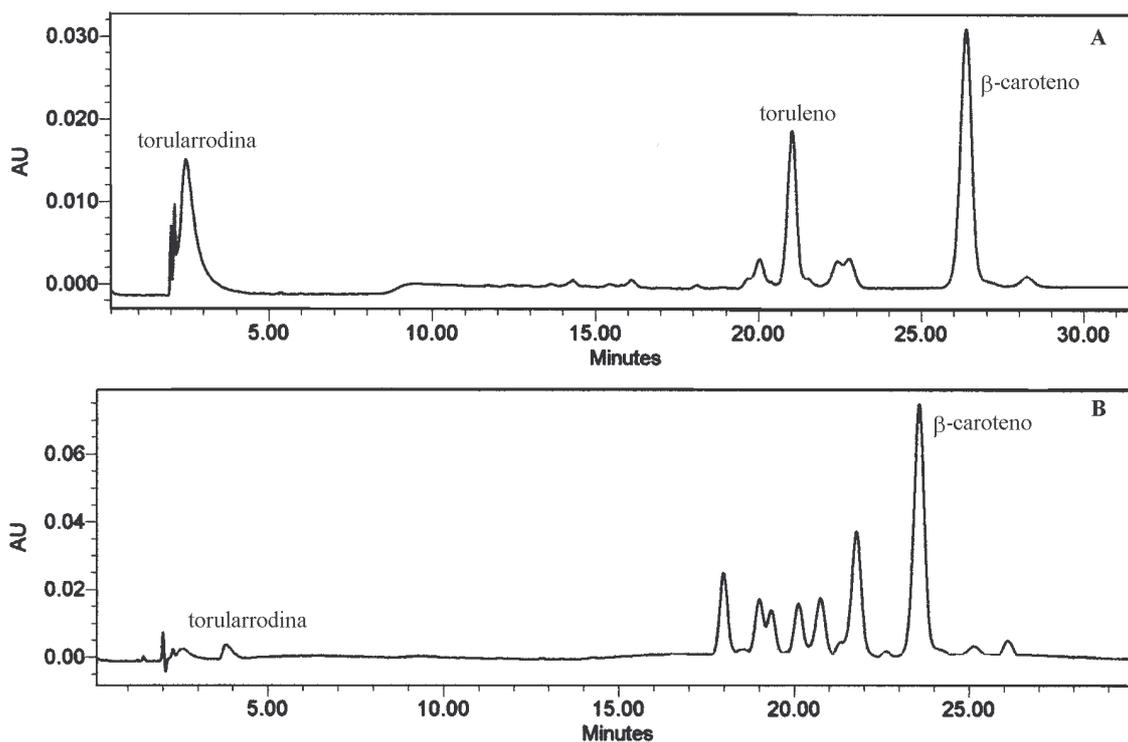


Figura 1: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com 60 μ M de difenilamina.

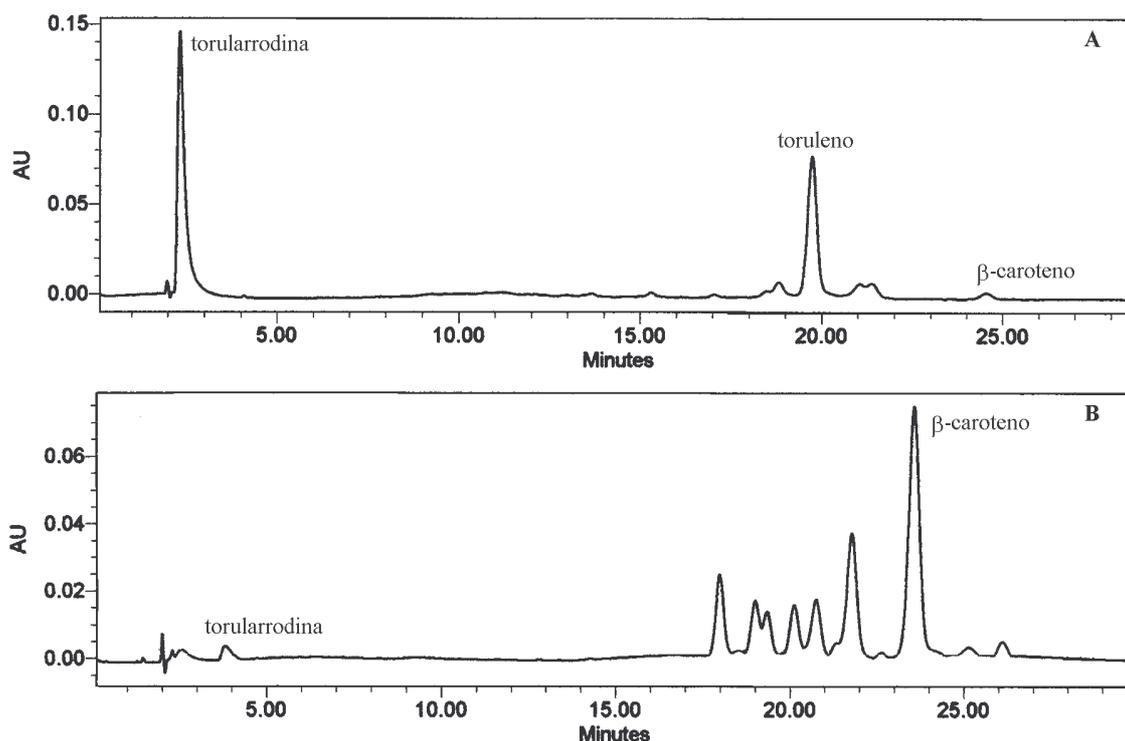


Figura 2: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em presença de 60 μ M de difenilamina.

3.2. Efeito da limitação de nitrogênio no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras

As Tabelas 3 e 4 mostram a produção de biomassa e de carotenóides em meio de cultivo com limitação de nitrogênio e os dados de açúcar residual são mostrados na Tabela 5.

Tabela 3: Efeito da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,5332 _a	333,66 _b	1762,03 _b
Meio deficiente em N	0,4220 _b	699,04 _a	2946,60 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 4: Efeito da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,5004 _a	120,35 _b	1101,51 _a
Meio deficiente em N	0,3838 _b	249,04 _a	956,01 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 5: Açúcar residual determinado nos sobrenadantes dos cultivos em meio com limitação de nitrogênio

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle	0,161 _a	0,174 _a
Meio deficiente em N	0,068 _b	0,072 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma linha com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

A limitação de nitrogênio diminuiu significativamente a produção de biomassa em ambas as leveduras. Entretanto, esta condição de estresse ocasionou um aumento de 100% na produção de carotenóides em *R. glutinis*. Em *R. mucilaginosa*, também houve um aumento significativo no conteúdo total de carotenóides em µg/g mas não em µg/L devido a menor quantidade de biomassa produzida.

Embora a produção de biomassa tenha sido menor, houve acentuada utilização de glicose, aparentemente devido a limitação de nitrogênio e/ou a produção maior de carotenóides.

Os perfis qualitativos dos carotenóides são mostrados nas Figuras 3 e 4. Qualitativamente, a limitação de nitrogênio no meio de cultivo não afetou o perfil cromatográfico dos carotenóides produzidos por ambas leveduras.

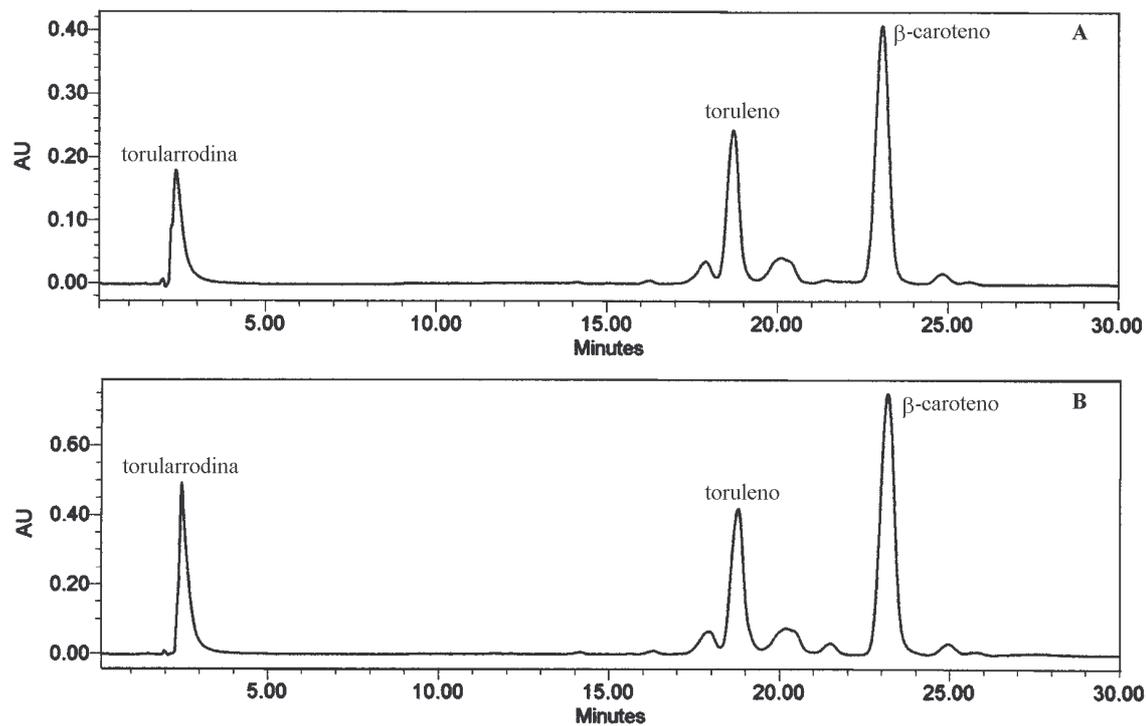


Figura 3: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio com limitação de nitrogênio.

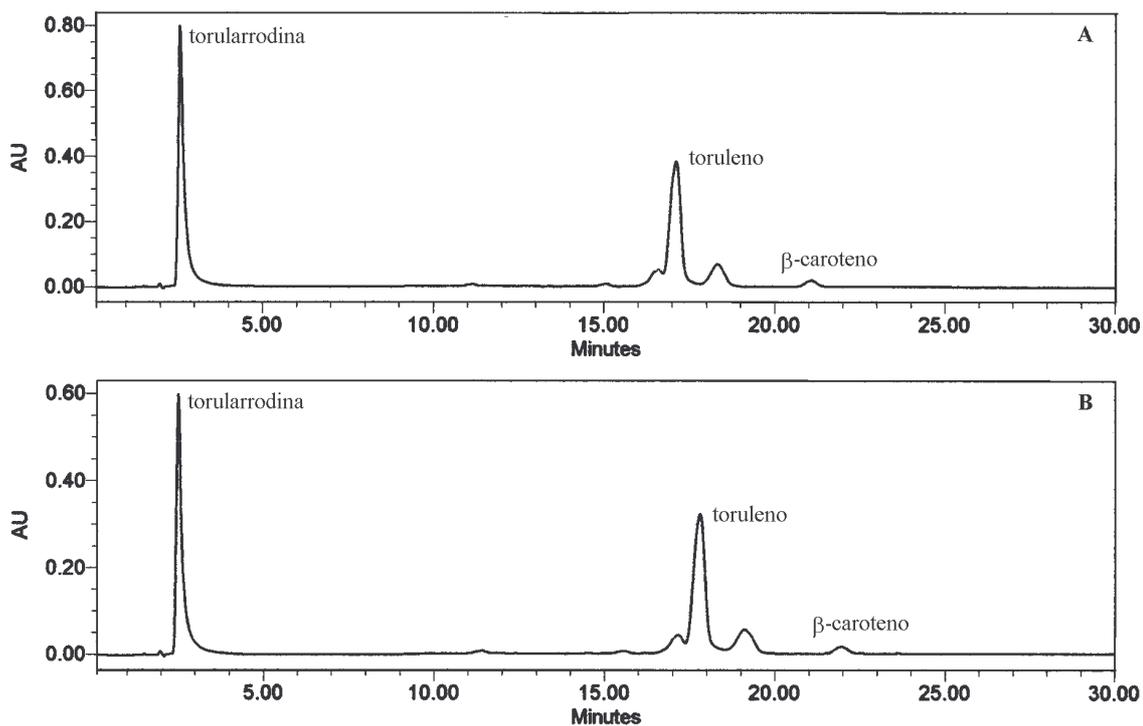


Figura 4: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos, fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio com limitação de nitrogênio.

3.3. Efeito da adição de mistura de aminoácidos no crescimento e na produção de carotenóides em leveduras

As Tabelas 6, 7 e 8 mostram a produção de biomassa e de carotenóides em meio de cultivo com mistura de aminoácidos e a glicose residual para as leveduras estudadas.

Tabela 6: Efeito da mistura de aminoácidos e glicose na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,5454 _a	367,24 _a	1920,94 _a
Asparagina + Glutamina	0,1644 _b	144,02 _b	236,57 _b
Treonina + Prolina	0,1565 _b	184,98 _b	253,19 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤0,05)

Tabela 7: Efeito da mistura de aminoácidos e glicose na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(µg/g)	(µg/L)
Controle	0,4744 _a	100,22 _a	524,60 _a
Asparagina + Glutamina	0,1075 _b	39,52 _c	42,47 _b
Treonina + Prolina	0,0935 _b	75,82 _b	78,85 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤0,05)

Tabela 8: Açúcar residual no sobrenadante do meio com mistura de aminoácidos e glicose

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle	0,151 _b	0,167 _b
Asparagina + Glutamina	0,624 _a	0,908 _a
Treonina + Prolina	0,612 _a	0,925 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p≤0,05)

A adição das misturas de aminoácidos diminuiu significativamente a produção de biomassa e de carotenóides nas duas leveduras estudadas. Em *R. glutinis* não houve diferença significativa entre o efeito das misturas de asparagina e glutamina e de treonina e prolina na produção de biomassa e de carotenóides. Em *R. mucilaginosa*, a diminuição de carotenóides em µg/g foi maior com asparagina e glutamina, efeito não observado nos valores expressos em

$\mu\text{g/L}$. Os valores de pH final do meio de cultivo ficaram em torno de 6,5 (dados não mostrados).

Bhosale e Gadre [4] observaram um aumento na carotenogênese em *R. glutinis* na presença de glicose e treonina. An *et al.* [2] observaram que misturas de aminoácidos contendo aspartato, aspargina, glutamato, glutamina e prolina aumentaram a produção de biomassa, mas diminuíram a produção de carotenóides em *P. rhodozyma*.

As misturas de aminoácidos levaram a uma menor produção de biomassa, o que justifica o aumento no teor de açúcar residual, observado em ambas as leveduras.

Os perfis dos carotenóides referentes às amostras contendo mistura de 10^{-2}M de aminoácidos são mostrados nas Figuras 5 e 6. A adição das misturas de aminoácidos ocasionou mudança no perfil dos carotenóides majoritários produzidos pelas leveduras. Em *R. glutinis*, a presença de ambas misturas de aminoácidos provocou diminuição na produção de β -caroteno. Entretanto, Bhosale e Gadre [4] observaram um aumento na proporção de β -caroteno, com diminuição de toruleno e torularrodina em *R. glutinis* cultivada em meio com glicose e treonina. Em *R. mucilaginosa* um aumento de toruleno foi observado na presença de asparagina e glutamina.

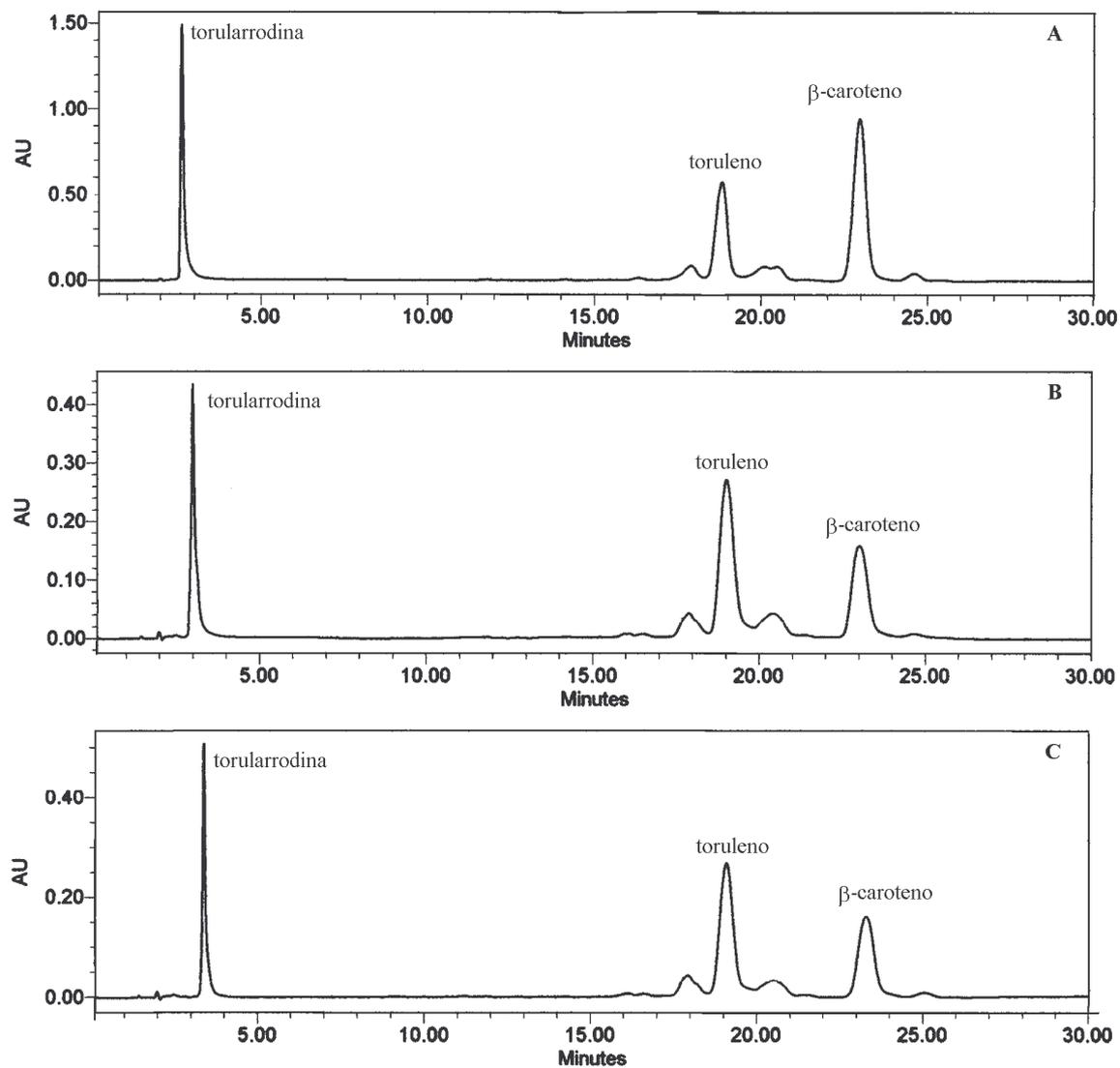


Figura 5: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com mistura de 10⁻²M de asparagina + glutamina, (C) cultivo em meio suplementado com mistura de 10⁻²M de treonina + prolina.

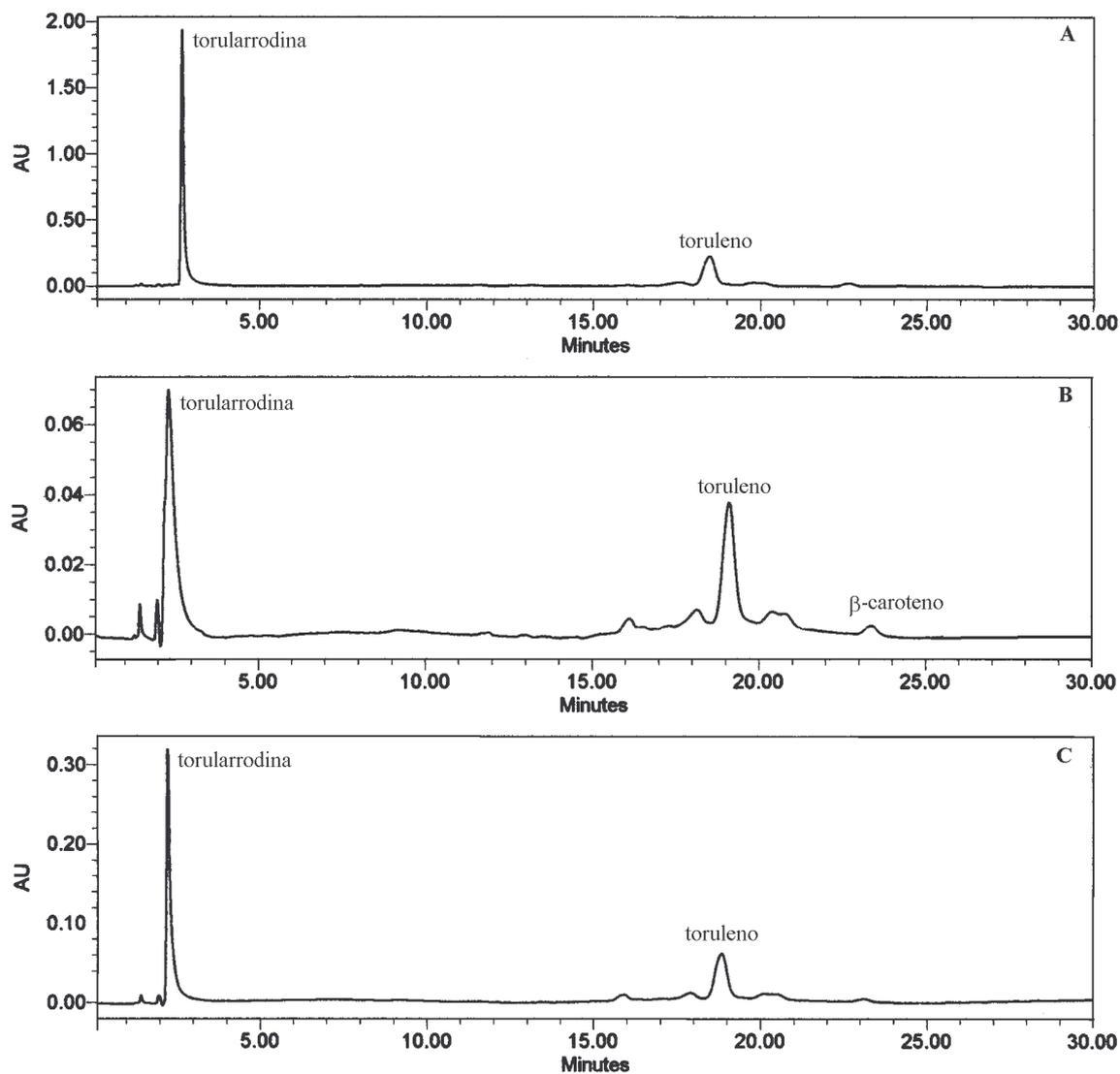


Figura 6: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio usual; (B) cultivo em meio suplementado com mistura de 10⁻²M de asparagina+glutamina, (C) cultivo em meio suplementado com mistura de 10⁻²M de treonina+prolina.

3.4. Efeito da adição individual de aminoácidos no crescimento e na produção de carotenóides por leveduras cultivadas sob limitação de nitrogênio

As Tabelas 9 e 10 mostram, respectivamente, a produção de biomassa e de carotenóides com limitação de nitrogênio no meio de cultivo e com adição individual de 10^{-2} M de asparagina e fenilalanina. A Tabela 11 mostra os dados de açúcar residual.

Tabela 9: Efeito da adição de aminoácidos e da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,8436 _a	280,94 _b	2375,15 _c
Asparagina	0,6746 _a	456,39 _a	3078,70 _a
Fenilalanina	0,8388 _a	329,65 _b	2751,54 _b

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 10: Efeito da adição de aminoácidos e da limitação de nitrogênio na produção de biomassa e de carotenóides em *Rhodotorula mucilaginosa*

Tratamento	Biomassa	Produção de carotenóides	
	(g/100mL)	(μ g/g)	(μ g/L)
Controle	0,7060 _a	131,97 _a	930,47 _a
Asparagina	0,7620 _a	132,85 _a	1012,57 _a
Fenilalanina	0,6091 _a	131,86 _a	799,53 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 11: Açúcar residual nos sobrenadantes dos cultivos com aminoácidos e com limitação de nitrogênio

Tratamento	Glicose (g/100mL)	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Controle	0,090 _a	0,067 _a
Asparagina	0,060 _b	0,065 _a
Fenilalanina	0,063 _b	0,073 _a

Média de análises em duplicata.

Valores na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

A adição individual de asparagina e de fenilalanina não teve efeito significativo no crescimento das leveduras estudadas. A produção de carotenóides em *R. glutinis* aumentou significativamente na presença de asparagina, efeito não observado na presença de fenilalanina. Em *R. mucilaginosa*, ambos aminoácidos não tiveram influência na carotenogênese.

Alcântara e Sanchez [1] observaram um efeito estimulatório na produção de zeaxantina em *Flavobacterium sp.* De acordo com estes autores, a asparagina estimulou o crescimento e a produção de carotenóides através da formação de oxalacetato, o qual é fonte de acetil co-A, que atua como precursor de isopentil pirofosfato e alimenta o caminho biossintético de carotenóides.

Os dados de açúcar residual demonstram que a limitação de nitrogênio favoreceu o consumo de glicose por ambas as leveduras, uma vez que na falta de maior disponibilidade de fonte de nitrogênio, a levedura aumentaria a utilização da fonte de carbono presente no meio de cultivo.

Os perfis dos carotenóides produzidos são mostrados nas Figuras 7 e 8. Na presença de asparagina e de fenilalanina, tanto em *R. glutinis* quanto em *R. mucilaginosa*, a produção de torularrodina foi estimulada. Em *R. mucilaginosa* houve diminuição de toruleno na presença de ambos aminoácidos.

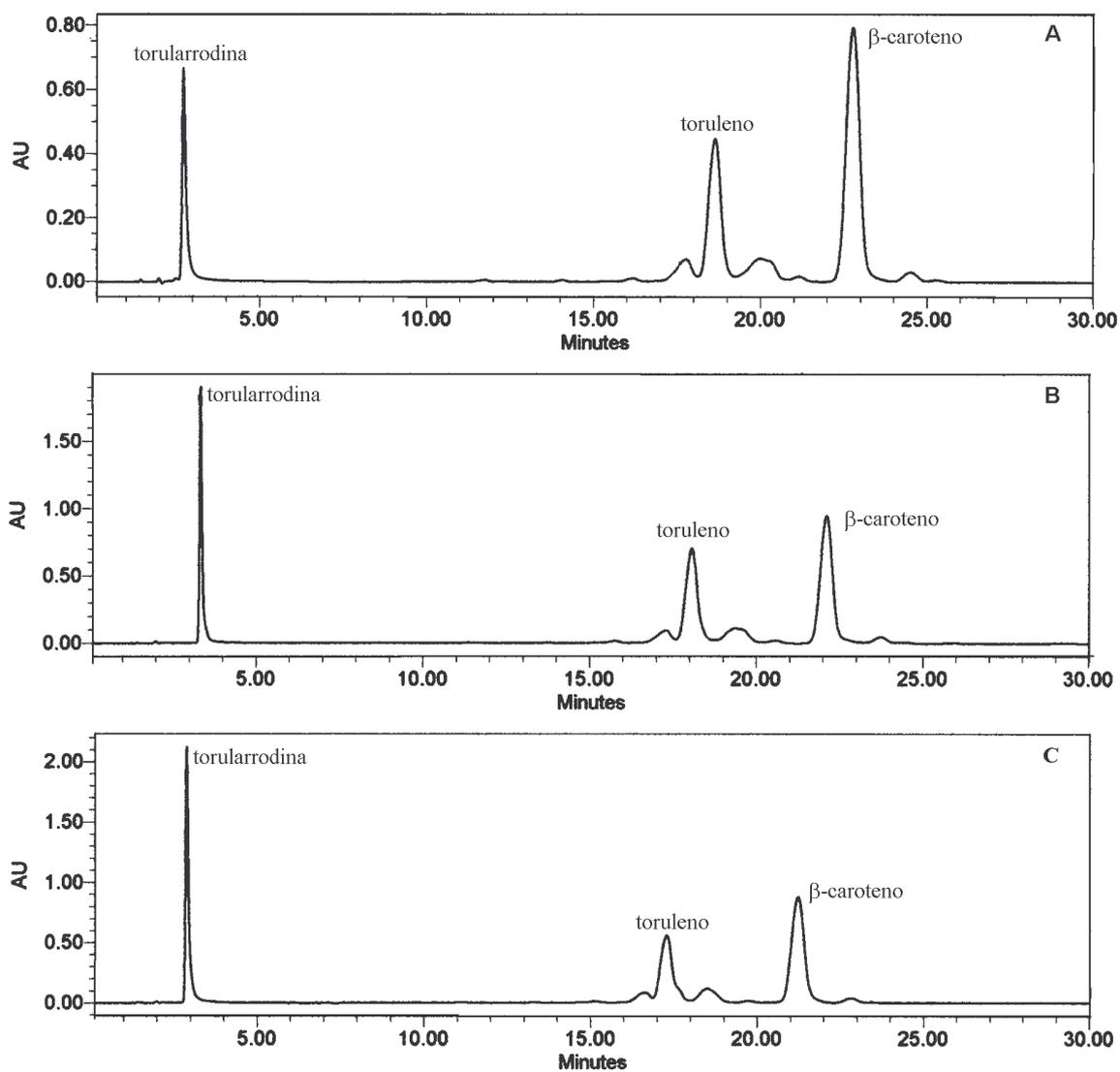


Figura 7: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula glutinis* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻²M de asparagina, (C) cultivo em meio suplementado com 10⁻²M de fenilalanina.

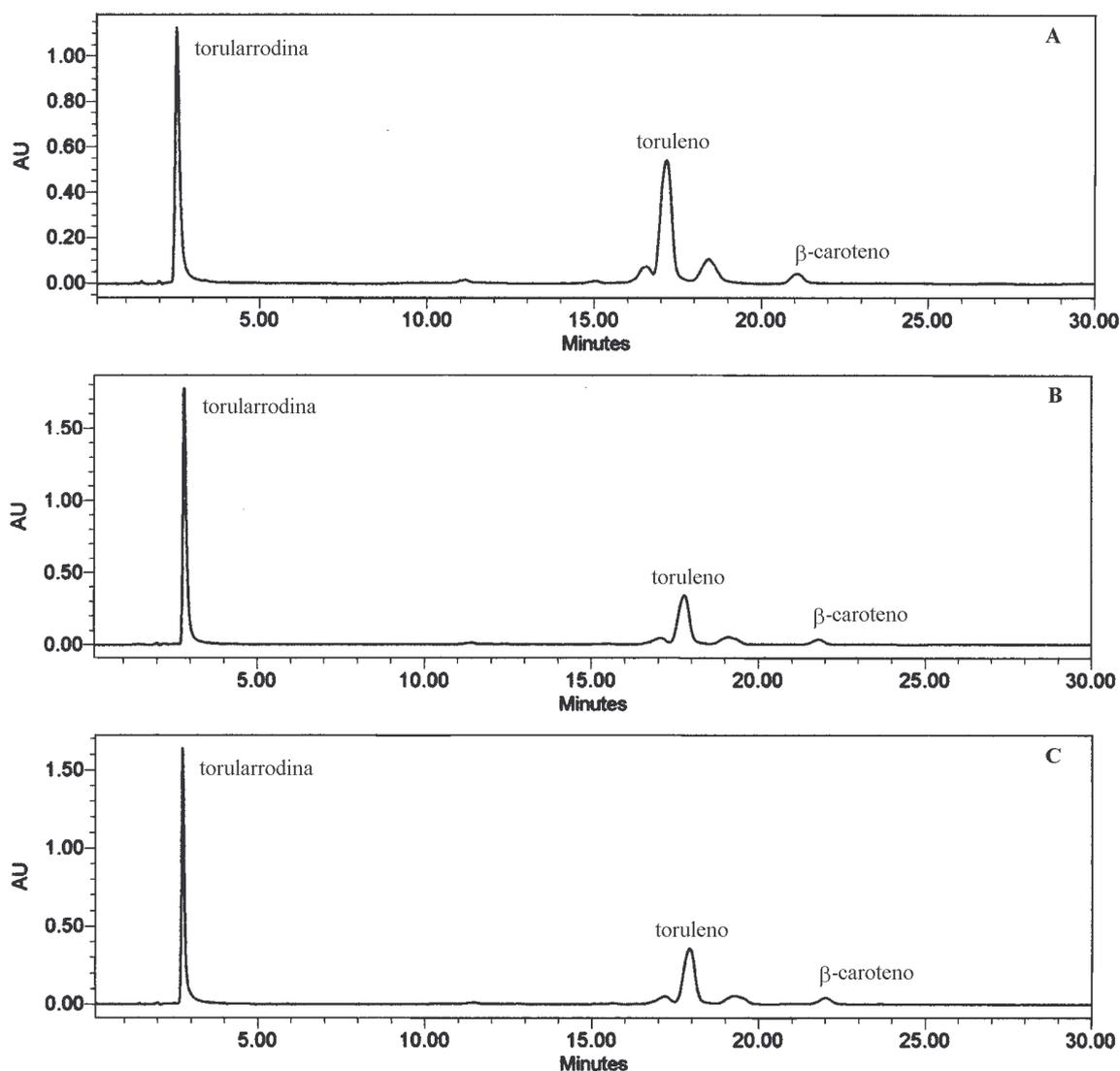


Figura 8: Cromatogramas dos carotenóides de *Rhodotorula mucilaginosa* obtidos por CLAE em coluna Spherisorb S3 ODS2 3 μ (4,6x150mm); fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila em gradiente linear de 65:35:0 a 65:19:16 em 4 minutos; fluxo de 0,8mL/min; temperatura da coluna 20°C. (A) cultivo em meio com limitação de nitrogênio; (B) cultivo em meio suplementado com 10⁻²M de asparagina, (C) cultivo em meio suplementado com 10⁻²M de fenilalanina.

4. CONCLUSÕES

A difenilamina não teve efeito no crescimento, mas inibiu a produção de carotenóides em *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, em grau proporcional a sua concentração. Por outro lado, houve aumento na proporção de β -caroteno em *R. mucilaginosa*.

A limitação de nitrogênio no meio de cultivo diminuiu a produção de biomassa mas levou a um considerável aumento na produção de carotenóides em ambas as leveduras, sem modificar o perfil qualitativo dos carotenóides.

Misturas de asparagina e glutamina e de treonina e prolina provocaram diminuição do crescimento e da carotenogênese, mas aumentaram o nível de torularrodina em ambas as leveduras. Houve diminuição na proporção de toruleno em *R. mucilaginosa*.

A adição de aminoácidos individuais em meio com limitação de nitrogênio não afetou o crescimento de ambas leveduras. A asparagina estimulou a produção de carotenóides em *R. glutinis*. Em *R. mucilaginosa*, houve diminuição na proporção de toruleno na presença de ambos os aminoácidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida a primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, projeto PRONEX (nº 662307/1996-8) pelo suporte financeiro ao trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCANTARA, S.; SANCHEZ, S. Influence of carbon and nitrogen on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. **J. Ind. Microbiol.** 23: 697-700, 1999.
2. AN, G.H.; SCHUMAN, D.B.; JOHNSON, E. A. Isolation of *Phaffia rhodozyma* with increased astaxanthin content. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 116-124, 1989.
3. AUSICH, R.L. Comercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.** 69: 2169-2173; 1997.
4. BHOSALE, P.; GADRE, R.V. Optimization of carotenoid production from hyper-producing *Rhodotorula glutinis* mutant 32 by a factorial approach. **Lett. Appl. Microbiol.** 33: 12-16, 2001.

5. DAVIES, B.H. Carotenoid. **In:** Goodwin, T.W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.
6. FAN, L. VONSHAK, A.; GABBAY, R.; HIRSHBERG, J.; COHEN, Z.; BOUSSIBA, S. The biosynthetic pathway of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* as indicated by inhibition with diphenylamine. **Plant Cell Physiol.** 36: 1519-1524, 1995.
7. FANG, T.J.; CHENG, Y.S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **J. Ferm. Bioeng.** 75: 466-469, 1993.
8. FANG, T.J.; CHIOU, T-Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of the red yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501. **J. Ind. Microbiol.** 16: 175-181, 1996.
9. FRASER, P.D.; RUIZ-HIDALGO, M.J.; LOPEZ-MATAS, M.A.; ALVAREZ, M.I.; ESLAVA, A.P.; BRAMLEY, P.M. Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Muccor circinelloides*. **Bioch. Bioph. Acta.** 1289: 203-208, 1996.
10. GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J.E.; BARBOTIN, J.N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enz. Microbiol. Technol.** 33: 629-634, 2003.
11. GONG, X.; CHEN, F. Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. **Proc. Biochem.** 33: 385-391, 1998.
12. LEE, T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KARASAWA, I.; SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Chemical alteration of carotenoid biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus* and mutants. **Appl. Microbiol.** 30: 988-993, 1975.
13. MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428, 1959.
14. MIURA, Y.; KONDO, K.; SAITO, T.; SHIMADA, H.; FRASER, P.D.; MISAWA, N. Production of carotenoids lycopene, β -carotene, and astaxanthin in food yeast *Candida utilis*. **Appl. Env. Microbiol.** 64: 1226-1229, 1998.
15. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A guide to carotenoid analysis in food. **ILSI Press**, Washington, D.C. 1999.

CONCLUSÕES GERAIS

1. A β -ionona, em meio de cultura YM, inibiu o crescimento e a produção de carotenóides em ambas as leveduras, com diminuição de toruleno e de β -caroteno em relação à torularrodina. Em meio com limitação de glicose, a β -ionona inibiu o crescimento e a produção de carotenóides em *Rhodotorula glutinis*, com diminuição na produção de biomassa e estímulo na carotenogênese em *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo mantido o perfil qualitativo dos carotenóides. Em meio sem glicose, a β -ionona aumentou a biomassa e a produção de carotenóides em ambas as leveduras, mantendo o perfil qualitativo dos carotenóides em *R. glutinis* e aumentando a proporção de torularrodina em *R. mucilaginosa*. Em meio com limitação de nitrogênio, a β -ionona reprimiu a carotenogênese em *R. glutinis*, mas aumentou ligeiramente o β -caroteno e mais acentuadamente o toruleno em *R. mucilaginosa*.

2. O ácido acético, em meio YM, não teve efeito no crescimento e na carotenogênese em ambas as leveduras, mas estimulou a produção de β -caroteno. Em meio com limitação de glicose, o ácido acético não influenciou o crescimento mas estimulou a produção de carotenóides nas duas leveduras, com expressivo aumento de toruleno em *R. mucilaginosa*. Em meio sem glicose, o ácido acético estimulou a produção de biomassa e de carotenóides de ambas as leveduras, com diminuição de toruleno e de β -caroteno em *R. glutinis*. Em meio com limitação de nitrogênio, o ácido acético diminuiu a biomassa e estimulou a produção de carotenóides em *R. glutinis*, sem efeito em *R. mucilaginosa*.

3. O ácido mevalônico estimulou a produção de carotenóides em ambas as leveduras, com aumento de toruleno e de β -caroteno. Em meio com limitação de nitrogênio, tanto no escuro como sob luz, o ácido mevalônico diminuiu a biomassa e aumentou a carotenogênese em ambas as leveduras.

4. A asparagina e a fenilalanina, individualmente, não tiveram efeito na produção de biomassa de ambas as leveduras, mas diminuíram a proporção de toruleno em *R. mucilaginosa*. A asparagina estimulou a produção de carotenóides em *R. glutinis*.

5. As misturas de asparagina e glutamina e de treonina e prolina diminuíram o crescimento e a carotenogênese em ambas as leveduras, com aumento de torularrodina.

6. A limitação de nitrogênio por si só diminuiu o crescimento e duplicou a produção de carotenóides em ambas as leveduras, sem alteração no perfil qualitativo dos carotenóides.

7. A incidência de luz não afetou o crescimento e a produção de carotenóides em ambas as leveduras, mas aumentou significativamente a produção de carotenóides em *R. glutinis*.