



PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA UTILIZANDO GLICOSE POR DIFERENTES CEPAS DE *Phaffia rhodozyma*

BORBA, Thais de Matos¹; SILVA, Danielle Alves²; KALIL, Susana Juliano³; BURKERT, Janaína F. de Medeiros⁴.

¹Aluna de Engenharia de Alimentos, ²Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, ^{3,4}Professora Dr^a Escola de Química e Alimentos
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Rua Eng. Alfredo Huch, 475 – Centro – 96201-900 – Rio Grande –RS. thatah.borba@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A astaxantina é um pigmento carotenóide, que apresenta forte ação sob os radicais livres, proteção contra peroxidação dos lipídeos e danos da oxidação do colesterol LDL, membranas celulares, células e tecidos. Além disso, tem como funções biológicas, proteção contra oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais, aos efeitos da luz UV, proporcionando uma boa visão e saúde ocular, e aumento da resposta imunológica (Zhong-Ce, *et al.*, 2006; Zheng, *et al.*, 2006).

Este carotenóide pode ser obtido de algumas flores de certas plantas, microrganismos marinhos, animais, algas e líquens, bem como a partir de leveduras como a *Phaffia rhodozyma* (Vustin, *et al.*, 2004). Esta levedura se destaca industrialmente pelo seu metabolismo heterotrófico, padrão de crescimento relativamente rápido, habilidade para alcançar alta densidade celular em fermentadores industriais, qualidade nutricional e segurança como aditivo alimentar por possuir o certificado “Generally Recognized as Safe” (GRAS) (Bonfim, 1999).

A astaxantina pode ser produzida por meios químicos ou biotecnológicos. O produto obtido pela via sintética usado atualmente em alimentação para peixes. Entretanto, os aditivos naturais são preferidos por consumidores do que aqueles produzidos por tecnologias químicas (Zheng, *et al.*, 2006).

As fontes de carbono desempenham um importante papel na produção do carotenóide pela levedura *Phaffia rhodozyma*, sendo assim o presente trabalho teve como objetivo estudar o cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*, utilizando as cepas NRRL-Y 17268, NRRL-Y 10921, NRRL-Y 10922 com glicose no meio de cultura extrato de malte (YM), para produção de astaxantina.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 3 cepas de *Phaffia rhodozyma* para a seleção da melhor produtora de astaxantina: NRRL-Y 17268, NRRL-Y 10921 e NRRL-Y 10922.

A cultura foi acondicionada sob congelamento em glicerol (20%). Para o preparo do inóculo foi adicionado 10mL da cultura em glicerol, previamente descongelada sob refrigeração, em 90mL de meio de cultura YM (Tabela 1),

mantidos a 25°C, por 48h e 150 rpm. O cultivo foi realizado com a adição de 10% de inóculo em erlenmeyers de 500mL contendo 153mL do meio de cultivo, nas condições de 25°C, 150 rpm, por 7 dias.

Tabela 1: Composição do meio de cultura extrato de malte para produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5
KNO ₃	0,2
Glicose	10

Os cultivos e as análises foram feitos em duplicata, sendo acompanhado ao longo do tempo a concentração celular, por espectrofotometria a 620nm (Fonseca, *et al.*, 2006) e o pH. Para a determinação da concentração de astaxantina durante o cultivo, as células foram secas a 40°C por 48 horas e congeladas a -18°C por no mínimo 24 horas e após este período rompidas com dimetilsulfóxido por 30 minutos. Após o rompimento celular, adicionou-se acetona e agitou-se vigorosamente, para extração da astaxantina. As amostras foram centrifugadas e a fase solvente separada. O procedimento foi repetido novamente com o precipitado para completa extração da astaxantina. Nas duas fases solventes, adicionou-se uma solução de NaCl 20% e éter de petróleo. Após agitação e separação das fases por filtração com Na₂SO₄ a absorbância a 474 nm foi determinada e calculada a concentração de astaxantina (Bonfim, 1999; Liu, *et al.*, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o crescimento celular para as três cepas de *P. rhodozyma*, onde a máxima concentração de biomassa atingida foi: NRRL- Y 17268 em 72 horas, 29,2g/L; NRRL- Y 10921 em 72 horas, 18,7g/L; NRRL- Y 10922 em 120 horas, 6,9g/L. A máxima concentração celular de 29,2g/L obtida neste trabalho pela cepa NRRL-Y 17268 foi superior a alcançada por Sun, *et al.* (2004), que estudou o uso da radiação gama como método de mutagenese para isolar a cepa hiper-produtora de carotenóide e assim caracterizar a cepa mutante. Foram utilizadas a cepa 67-385 (como cepa controle) e a cepa mutante 2A2N, e após o processo de radiação gama obtiveram as cepas mutantes 3A e 3A4-8. O pico máximo de crescimento celular foi alcançado pela cepa 67-385 com 5,8g/L, em 15 dias a 20°C e 150rpm.

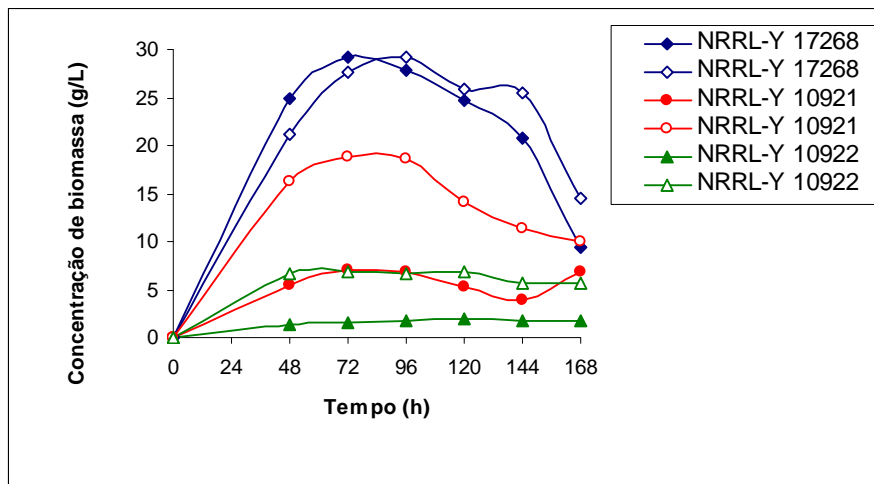


Figura 1: Acompanhamento da concentração de biomassa para produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

A Figura 2 mostra a produção de astaxantina ($\mu\text{g/mL}$), onde observa-se que os picos encontram-se às 144 horas ($11,7\mu\text{g/mL}$) para a cepa NRRL- Y 17268 e às 120 horas ($6,2\mu\text{g/mL}$) para a NRRL- Y 10921. Apesar do crescimento da cepa NRRL-Y 10922 como mostrado na Figura 1, não foi possível detectar nestas condições a concentração de astaxantina. Ni, *et al.* (2007) otimizou as fontes de nitrogênio no meio de cultura para produção de astaxantina, a partir da *Phaffia rhodozyma* 7B12, determinando como condições ótimas $0,28\text{g/L}$ de sulfato de amônio, $0,49\text{g/L}$ nitrato de potássio e $1,19\text{g/L}$ de extrato de carne, nas condições de 22°C , 200 rpm, por 72 horas, obteve como valor máximo de produção de astaxantina $7,71\mu\text{g/mL}$ em 54 horas de cultivo. No nosso estudo observou-se que a cepa NRRL- Y 17268 apresentou uma produção de astaxantina de $11,7\mu\text{g/mL}$ superando assim o valor obtido por esses autores.

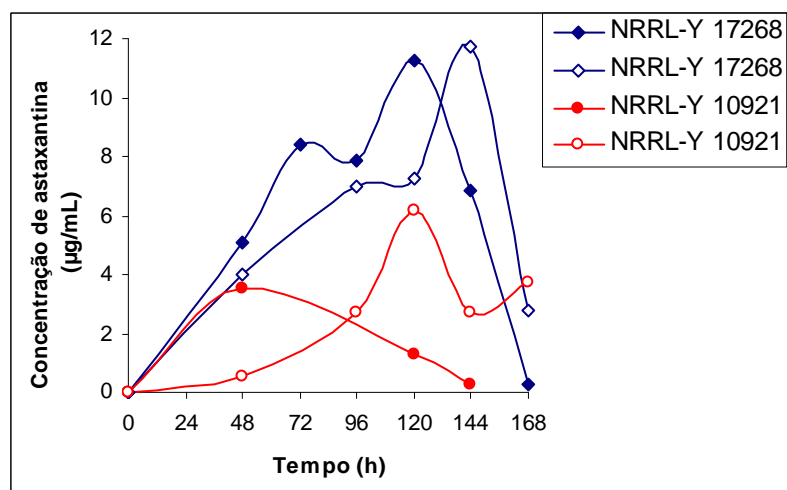


Figura 2: Acompanhamento da concentração de astaxantina durante o cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*.

A Figura 3 apresenta o acompanhamento do pH durante os 7 dias de cultivo. Segundo Zhong, *et al.* (2006), o valor de pH favorável ao crescimento de *Phaffia rhodozyma* é próximo de 6,0 e para a produção de astaxantina próximo de 4,0.

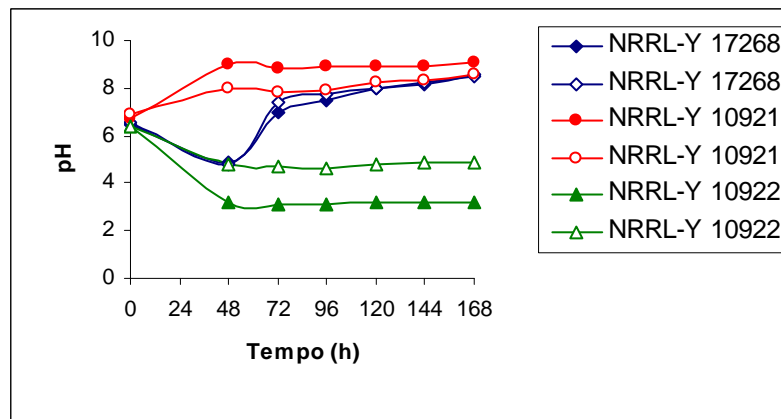


Figura 3: Acompanhamento do pH durante a produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*.

Observando a influência do pH na produção de biomassa para a cepa NRRL-Y 10922, nota-se que a mesma não atingiu valor superior a 5,0, mantendo-se nesta faixa ou abaixo da mesma durante todos os dias de cultivo, não sendo favorável ao crescimento celular, e provavelmente pela baixa concentração celular alcançada (Figura 1) não houve a detecção do carotenóide. Enquanto a cepa NRRL-Y 10921 manteve o pH acima de 7 durante as 168 horas permitindo a obtenção de biomassa possibilitando a quantificação da astaxantina, embora em baixas concentrações.

4. CONCLUSÕES

A *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268 foi selecionada como a melhor produtora do carotenóide astaxantina utilizando o meio de cultura contendo extrato de levedura 3g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L, KNO₃ 0,2 g/L, glicose 10 g/L a 25°C, 150 rpm, alcançando 29,2 g/L de concentração celular em 72 horas e 11,7µg/mL de concentração volumétrica de astaxantina em 144 horas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONFIM, T.M.B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo.** PhD. Thesis, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1999.

FONSECA, R. A. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. **Determinação do crescimento de biomassa de três cepas de *Phaffia rhodozyma*.** XVIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIU, Y.S.; WU, J.Y.; HO, K.P. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. In: **Biochemical Engineering Journal**, 27, p. 331-335, 2006.

NI, Hui; CHEN, Qi-he; RUAN H.; YANG, Y.; LI L.; WU, G.; HU Y.; HE, G. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science**, 2007.

SUN, N.; LEE, S.; SONG, K. B. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. **International Journal of Food Microbiology**, 2004, 94, p. 263-267.

VUSTIN, M. M.; BELYKN, E. N.; KISHILOVA, S. A. Relationship between Astaxanthin Production and the Intensity of Anabolic Processes in the Yeast *Phaffia rhodozyma*. **Microbiology**, 2003, 73, p. 643-649.

ZHENG, Y. G.; HU, Z. C.; WANG and SHEN Y. C. Large- Scale Production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Food and Bioprocess Processing**, 2006, 84, p. 164-166.

ZHONG, C. Hu; ZHENG, Y. G.; SHEN Y. C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39, p. 586-590.

AGRADECIMENTOS: CNPq, Capes e FAPERGS