

Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina

Miriam Blümel Chociai*, Iara Maria Pereira Machado, José Domingos Fontana,
Jorge Guido Chociai, Simone Bowles Busato, Tânia Maria Bordin Bonfim

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná

A levedura Phaffia rhodozyma, produtora de astaxantina, pigmento carotenóide largamente empregado na aqüicultura de peixes e crustáceos, pode ser eficientemente cultivada num meio de cultura de baixo custo, à base de caldo de cana diluído 1:10 e uréia a 1 g/L. No entanto, a produção de biomassa e a formação do carotenóide sofrem a inibição pelo substrato (efeito “Crabtree”), limitando desta forma a utilização do caldo de cana com concentrações da fonte de carbono superiores a 20 g/L, importante consideração na produção industrial de astaxantina. No presente trabalho, o cultivo da levedura P. rhodozyma foi realizado em processo descontínuo alimentado, no qual se obteve produtividade volumétrica de 0,024 mg astaxantina/L.h. em relação aos 0,013 mg astaxantina/L.h. obtidos no cultivo controle, que não sofreu alimentação da fonte de carbono.

Unitermos:

- Astaxantina
- *Phaffia rhodozyma*
- Processo de fermentação descontínuo alimentado

*Correspondência:

M. B. Chociai
Departamento de Farmácia
Universidade Federal do Paraná
Rua Prof. Lothário Meissner, 3.400 -
Jd. Botânico
80210-170 - Curitiba - PR
E-mail: miriam@ufpr.br

INTRODUÇÃO

A astaxantina (3,3'-diidroxib- β , β -caroteno-4,4'-diona) é um pigmento oxicarotenóide de cor vermelho-alaranjado presente no meio marinho, provavelmente originário de certas algas verdes e pequenos crustáceos. Estes organismos iniciam uma cadeia alimentar, que leva à pigmentação de outros animais, que, sendo incapazes de sintetizar os carotenóides, são coloridos devido a pigmentos oriundos de sua alimentação (Johnson, An, 1991). A astaxantina é empregada na avicultura (aumento na produção e coloração da carne de galinha e gema de ovos), mas sua principal aplicação é na aqüicultura de peixes (salmão, truta) e crustáceos (lagosta), para os quais a coloração da

carne e/ou carapaça é um fator determinante na aceitação e no preço final do produto (Dike, Lettner, Zollitsch, 1992; Storebaken, No, 1992). Além disso, este carotenóide possui elevada atividade antioxidante, quando comparado com o β -caroteno e o α -tocoferol (Terao, 1989). Por ser a síntese química da astaxantina complexa e de elevado custo, devido à presença dos centros quirais na sua estrutura molecular, existe um grande interesse no uso de fontes biológicas da mesma (Reynders, Rawlings, Harrison, 1996). Entre os organismos produtores de astaxantina, somente a alga verde *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma* são atualmente consideradas de interesse industrial (Goodwin, 1992; Kobayashi, Kakizono, Nagai, 1993). Entre estes, merece atenção especial a leve-

dura em função de sua qualidade nutricional e segurança na utilização como aditivo alimentar para peixes, suprindo além da astaxantina, vários nutrientes como proteínas, carboidratos e lipídios (Martin, Acheampong, Patel, 1993). A levedura *Phaffia rhodozyma*, além da glicose e xilose, fermenta outros açúcares (como a sacarose), que podem ser obtidos a partir do amido, materiais lignocelulósicos, beterraba e cana de açúcar (Vázquez, Santos, Parajó, 1997; Persike *et al.*, 2002). Considerando a produção nacional estimada de 341 milhões de toneladas de cana de açúcar para a safra 2002/2003 e o baixo custo desta matéria prima (US\$ 13/tonelada) (Jornal da Cana, 2002), particularmente no Brasil, a utilização de derivados de cana como meios de cultivo tem sido uma estratégia promissora para o cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*.

Fontana *et al.* (1996a) relataram os primeiros resultados a respeito da produção de astaxantina empregando o caldo de cana como fonte de carbono em concentrações na ordem de 20 g/L. No entanto, quando esta concentração da fonte de carbono é aumentada, diminui-se drasticamente a produção da astaxantina (Bonfim, 1999). Isto é explicado pelo fato de que a levedura *Phaffia rhodozyma* apresenta o efeito “Crabtree”, em que o crescimento celular e a produção de astaxantina ficam comprometidos pelo aumento residual de glicose (Reynders, Rawlings, Harrison, 1997). Neste caso específico, quando mudanças na concentração de nutrientes afetam a produtividade de um determinado metabólito microbiano, a utilização de um processo de fermentação descontínuo alimentado é uma técnica promissora, pois através dela a concentração de nutrientes alimentados à cultura líquida pode ser controlada voluntariamente pela taxa de alimentação (Yamane, Shimizu, 1980).

No presente trabalho, técnicas alternativas de fermentação foram testadas, buscando aumentar o rendimento do processo (biomassa e/ou pigmento carotenóide) pela manutenção de baixa concentração residual de açúcar, através do cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* em processo descontínuo alimentado.

MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Phaffia rhodozyma*, obtida originalmente do ATCC (referência 24202), foi mantida através de transferências periódicas a cada 2 meses, em meio de cultura sólido contendo 1 g/L sacarose; 0,5 g/L extrato de levedura e 0,5 g/L peptona. Como fonte de carbono, foi utilizado o caldo de cana fresco, recentemente extraído, após prévia clarificação através de centrifugação a 6.000 rpm para a remoção de restos celulares e outros materiais

contaminantes provenientes da moagem da cana. O meio de cultura básico foi preparado pela diluição do caldo de cana 1:10 em água destilada, suplementado com uréia na concentração de 1 g/L como fonte de nitrogênio. Em seguida, o pH dos meios foi ajustado para 6,0 com solução de NaOH 2 M e os mesmos foram esterilizados sob vapor fluente durante 30 minutos. Estes meios contém, aproximadamente, 20 g/L de açúcares totais. O meio de cultura concentrado, a ser utilizado na alimentação diferencial dos cultivos, foi preparado de maneira semelhante, ajustando-se a concentração de açúcares totais do caldo de cana para 100 g/L. Cada um dos cultivos foi inoculado com um volume de suspensão de cultura de 48 horas, de modo a obter uma densidade ótica (DO) entre 0,05 e 0,07 de absorbância a 650 nm. Todos os cultivos (triplicata) foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio básico previamente esterilizado (relação de 1:5 entre o volume do meio e o volume do frasco a ser incubado), e incubados em agitador incubador a 24 °C a 125 rpm com pulsos de alimentação variáveis. Em intervalos regulares houve a retirada de amostras (0, 24, 48, 72 e 96 horas) para o acompanhamento do crescimento (através da determinação do peso seco) e do pH. Após centrifugação da amostra coletada foi realizada a dosagem de carboidratos totais no sobrenadante (Dubois *et al.*, 1956). No sedimento (células) obtido após 96 horas de fermentação foi determinado o peso seco e o pigmento carotenóide. A astaxantina foi extraída a partir das células secas como se segue: a um tubo de ensaio contendo as células foram adicionados 2 mL de dimetilsulfóxido. Após 30 minutos foram acrescentados 6 mL de acetona, homogeneizados e centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos. No sedimento foi repetido o processo de extração. Aos sobrenadantes reunidos, foram adicionados 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 200 g/L e 10 mL de éter de petróleo. A fase etérea foi separada, seca por filtração através de sulfato de sódio anidro, transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com éter de petróleo. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro a 474 nm. O cálculo da concentração de astaxantina foi feito a partir de dados da literatura, da absorvidade específica para as xantofilas a 474 nm: $A = 1.600$ (Bonfim, 1999; Goodwin, 1992).

Em todas as coletas realizadas, verificou-se a pureza dos cultivos, utilizando o teste de Gram (coloração de Gram) e pela análise da lâmina contendo material a fresco em microscópio (Bier, 1980). Paralelamente, um cultivo denominado controle (sem alimentação) foi utilizado para comparação dos resultados, principalmente de biomassa e astaxantinogênese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhos de Fontana *et al.* (1996a, 1996b, 1997), demonstraram a eficiente produção da astaxantina em processo de fermentação descontínuo, utilizando o caldo de cana como fonte de carbono em concentrações na ordem de 20 g/L, suplementado com pequenas concentrações de uréia como fonte de nitrogênio (1 g/L).

Quando a levedura *Phaffia rhodozyma* foi cultivada em processo descontínuo, em caldo de cana diluído 1:10 (20 g/L açúcares totais) suplementado com uréia a 1 g/L obtiveram-se os valores da Figura 1 (cultivo controle). Durante o início da fase de crescimento exponencial (velocidade específica de crescimento = $0,14 \text{ h}^{-1}$) o pH diminuiu, voltando a aumentar já a partir das 24 horas de cultivo, fato anteriormente observado por Johnson e An (1991) segundo os quais a *Phaffia rhodozyma* excreta um intermediário carbônico durante a fase inicial de crescimento, por exemplo um álcool, ácido acético ou um intermediário do ciclo do ácido cítrico, que posteriormente é reassimilado e estimula a carotenogênese. O consumo de açúcares totais é bastante intenso nas primeiras horas, verificando-se que 92% daqueles inicialmente disponíveis foram consumidos nas primeiras 48 horas de cultivo.

Para contornar o efeito “Crabtree”, experimentos foram realizados em processo descontínuo alimentado utilizando-se como meio de alimentação, o caldo de cana concentrado com uma concentração de açúcares totais de 100 g/L. Este meio foi utilizado sem suplementação da

fonte de nitrogênio, uma vez que Acheampong e Martin (1995) verificaram que a carotenogênese é estimulada pela limitação de nitrogênio, quando fungos são cultivados em culturas superficiais, sem a presença da uréia. Reynders, Rawlings e Harrison (1996) empregaram o melaço para o cultivo da *Phaffia rhodozyma*, usando um método de alimentação em série da fonte de carbono.

A Figura 2 mostra o perfil da cultura alimentada com 2 mL de caldo concentrado após 48 e 72 horas de cultivo, considerando o perfil do consumo de açúcares verificado no cultivo controle e a observação de Johnson e Lewis (1979) os quais descreveram que a produção de astaxantina em *Phaffia rhodozyma* ocorre principalmente durante a fase de crescimento exponencial. No acompanhamento do crescimento celular no tempo de 96 horas, obtiveram-se valores de produtividade horária total da biomassa formada (r_{total}) de 0,075 g/L.h, comparativamente aos 0,038 g/L.h observados no cultivo que não sofreu alimentação da fonte de carbono (controle).

Alimentando-se a cultura com o mesmo volume de caldo concentrado após 48, 72 e 96 horas, obtiveram-se as curvas da Figura 3, muito semelhantes àquelas obtidas quando a cultura foi alimentada apenas durante a fase exponencial de crescimento (48 e 72 horas).

A determinação da biomassa microbiana através do peso seco (DCW) e a quantificação da astaxantina foi realizada em todos os cultivos do presente trabalho, ao final de 96 horas de incubação, tempo no qual é máxima a concentração de astaxantina (Bonfim, 1999).

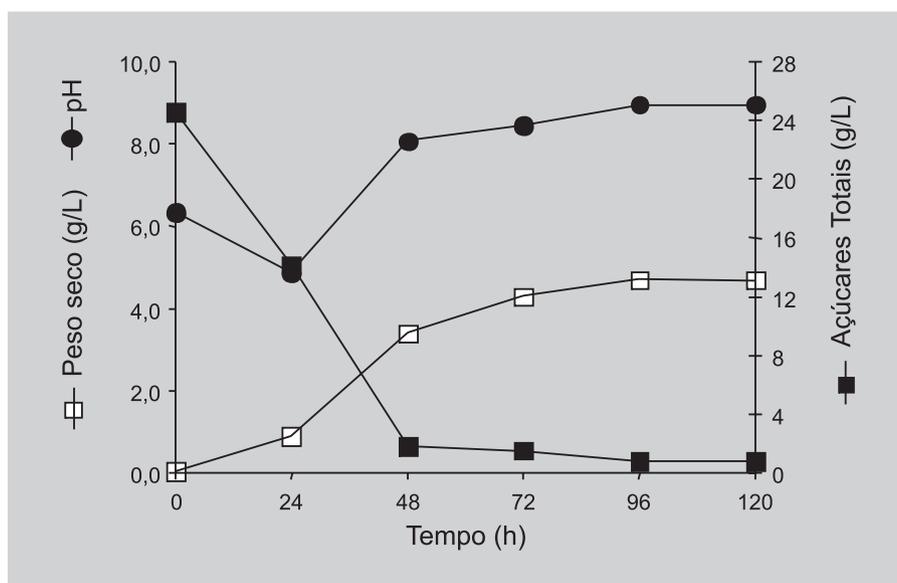


FIGURA 1 - Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* em caldo de cana diluído (concentração de açúcares totais de 20 g/L) e 1 g/L de uréia.

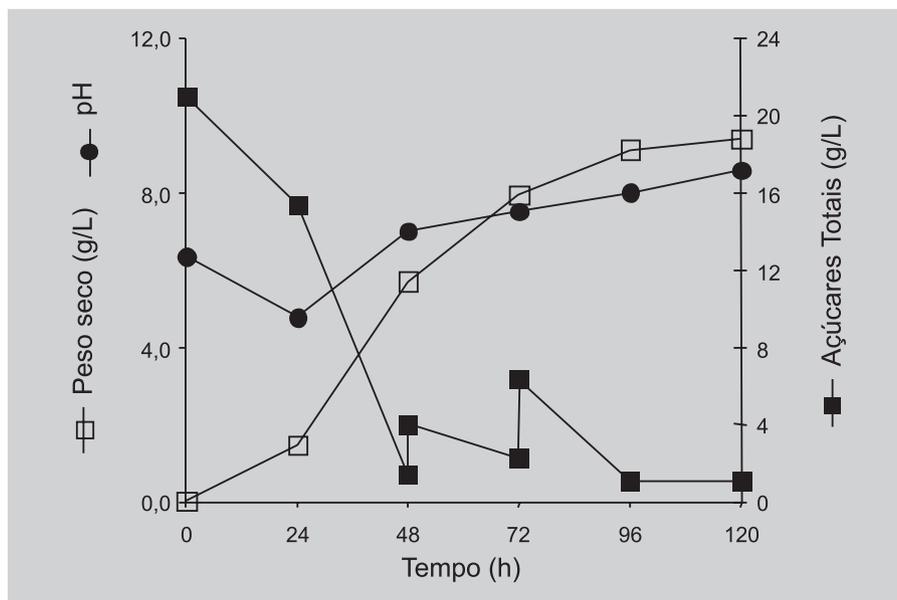


FIGURA 2 - Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* em caldo de cana diluído 1:10 e 1 g/L de uréia, alimentado após 48 e 72 horas com 2 mL de caldo concentrado (concentração de açúcares totais de 100 g/L).

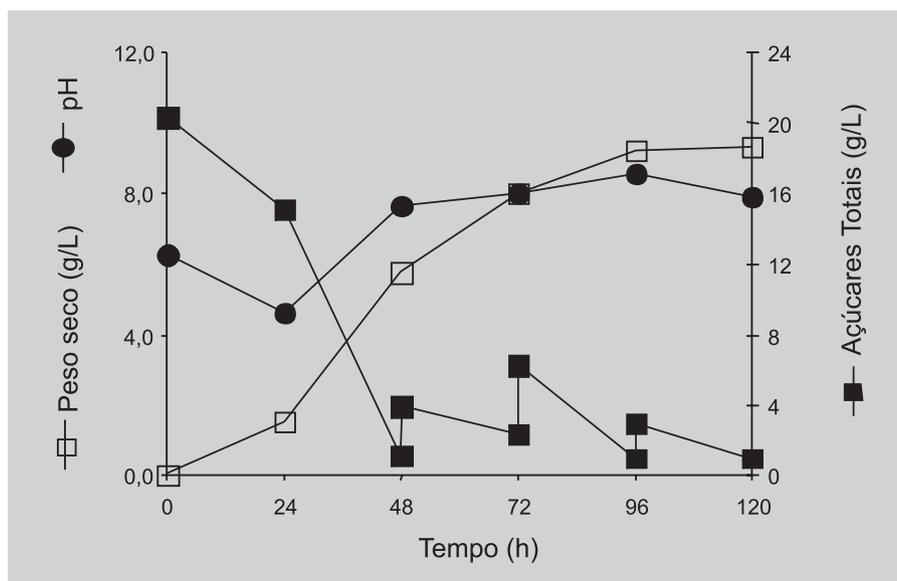


FIGURA 3 - Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* em caldo de cana diluído 1:10 e 1 g/L de uréia, alimentado após 48, 72 e 96 horas e com 2 mL de caldo concentrado (concentração de açúcares totais de 100 g/L).

A comparação da biomassa produzida com a formação do pigmento carotenóide no cultivo controle em relação àquele alimentado, pode ser feita pela análise da Figura 4. No cultivo alimentado após 48 e 72 horas, houve a formação de 9,12 g/L de peso seco, valor significativamente maior que aquele observado no cultivo que não sofreu alimentação da fonte de carbono (4,7 g/L).

Com relação ao pigmento carotenóide, neste mesmo cultivo alimentado (após 48 e 72 horas), obtiveram-se 2,37 mg astaxantina/L contra 1,34 mg/L no cultivo controle. Relacionando-se a produtividade volumétrica do processo, foram obtidos valores de 0,024 mg astaxantina/L.h no cultivo alimentado e apenas de 0,013 mg astaxantina/L.h no cultivo controle, com teores de 0,089 e 0,056 mg de

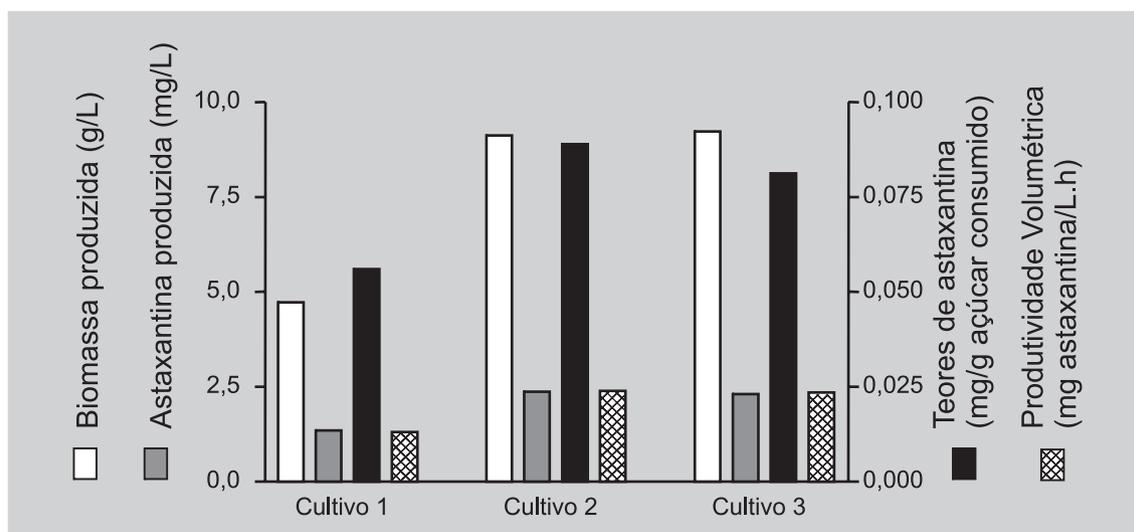


FIGURA 4 - Produção de astaxantina e de biomassa de *Phaffia rhodozyma* em sistema de cultivo descontínuo (cultivo 1), descontínuo alimentado após 48 e 72 horas (cultivo 2) e descontínuo alimentado após 48, 72 e 96 horas (cultivo 3).

astaxantina/g açúcar consumido, respectivamente, comprovando que pela manutenção de baixa concentração residual de açúcar, se consegue suplantar o efeito da inibição pelo substrato sobre o crescimento celular (Yamane *et al.*, 1997) e sobre a astaxantinogênese, já que esta é comprovadamente associada ao crescimento da levedura *Phaffia rhodozyma* (Fontana *et al.*, 1997).

CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que, aliando a utilização do caldo de cana, matéria-prima barata e abundante em nosso país, com a introdução de um processo de fermentação descontínuo alimentado para o cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma*, consegue-se aumentar a produtividade do processo em 84%, comparativamente ao cultivo controle.

ABSTRACT

Cultivation of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) yeast in discontinuous system to obtain astaxanthin

The yeast *Phaffia rhodozyma* produces astaxanthin, a carotenoid pigment widely applied in fish and crustacean cultivation. This yeast can be efficiently cultured in a low cost medium, sugar cane broth diluted 1:10 and supplemented with 1 g/L urea. However, the biomass and astaxanthin production undergo inhibition by the substrate (Crabtree effect), limiting the utilization of su-

gar cane broth up to 20 g/L total sugar concentration. Therefore, this effect must be considered during the industrial production of astaxanthin. In the present work, using fed batch system to cultivate *P. rhodozyma* we were able to obtain 0.024 mg astaxanthin/l.h compared to 0.013 mg astaxanthin/l.h obtained by the discontinuous cultivation system.

UNITERMS: Astaxanthin. *Phaffia rhodozyma*. Fed batch cultivation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHEAMPONG, E. A., MARTIN, A. M. Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Basic Microbiol.*, Berlin, v. 35, n. 3, p. 147-155, 1995.
- BIER, O. *Bacteriologia e imunologia*. São Paulo: Melhoramentos, 1980. 838 p.
- BONFIM, T. M. B. *Produção de astaxantina pela levedura Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous) a partir de meios de cultura de baixo custo*. Curitiba, 1999. 158 p. [Tese de Doutorado em Ciências, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].
- DIKE, A. O., LETTNER, F., ZOLLITSCH, W. The supplementation of layers feed with the yeast – *Phaffia rhodozyma* – as pigment carrier. *Archiv für geflügelkunde*, Kingston, v. 5, p. 205-209, 1992.

- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMITON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- 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.*, Totowa, v. 57/58, p. 413-422, 1996a.
- FONTANA, J. D., CZEZUGA, B., BONFIM, T. M. B., CHOCIAI, M. B., OLIVEIRA, B. H., GUIMARÃES, M. F., BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. *Biores. Technol.*, v. 58, p. 121-125, 1996b.
- FONTANA, J. D., CHOCIAI, M. B., BARON, M., GUIMARÃES, M. F., MARASCHIN, M., ULHOA, C., FLORÊNCIO, J. A., BONFIM, T. M. B. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma*: optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Washington, v. 63-65, p. 305-314, 1997.
- GOODWIN, T. W. Distribution of carotenoids. *Methods in enzymology*, New York, v. 213, p. 167-172, 1992.
- JOHNSON, E. A., AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. *Crit. Rev. in Biotechnol.*, Boca Raton, v. 11, n. 4, p. 297-326, 1991.
- JOHNSON, E. A., LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 115, p. 173-183, 1979.
- JORNAL DA CANA. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/>> Acesso em: 27 maio. 2002.
- KOBAYASHI, M., KAKIZONO, T., NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 59, p. 867-873, 1993.
- MARTIN, A. M.; ACHEAMPONG, E.; PATEL, T. R. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 58, p. 223-230, 1993.
- PERSIKE, D. S., BONFIM, T. M. B., SANTOS, M. H. R., LYNG, S. M. O., CHIARELLO, M. D., FONTANA, J. D. Invertase and urease activities in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly *Phaffia rhodozyma*). *Biores. Technol.*, v. 82, p. 79-85, 2002.
- REYNDERS, M. B., RAWLINGS, D. E., HARRISON, S. T. L. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.*, Middlesex, v. 19, n. 6, p. 549-552, 1997.
- REYNDERS, M. B., RAWLINGS, D. E., HARRISON, S. T. L. Demonstration of the crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.*, Middlesex, v. 19, n. 6, p. 549-552, 1997.
- REYNDERS, M. B., RAWLINGS, D. E., HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. *Biotechnol. Lett.*, Middlesex, v. 18, n. 6, p. 649-654, 1996.
- STOREBAKKEN, T., NO, H. K. Pigmentation of rainbow trout. *Aquaculture*, Amsterdam, v.100, p. 209-229, 1992.
- TERAO, J. Antioxidant activity of b-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, v. 24, p. 659-661, 1989.
- VÁZQUEZ, M., SANTOS, V., PARAJÓ, J. C. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, p. 263-268, 1997.
- YAMANE, T., SHIMIZU, S. Fed batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 30, p. 147-194, 1980.
- YAMANE, Y. I., HIGASHIDA, K., NAKASHIMADA, Y., KARIZONO, T., NISHIO, N. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. *Biotechnol. Lett.*, Middlesex, v. 19, n. 11, p. 1109-1111, 1997.

Recebido para publicação em 01 de julho de 2002.