

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS CAROTENOGÊNICAS: UMA BREVE REVISÃO

RODRIGO DE QUEIROZ OLIVEIRA¹, ARISTÓTELES GÓES-NETO², ANA PAULA TROVATTI UETANABARO³, CARLOS AUGUSTO ROSA⁴ & SANDRA APARECIDA DE ASSIS^{5*}

¹Mestre em Biotecnologia (UEFS), Doutorando em Ciências/Biotecnologia (UEFS)

²Prof. Titular do DCBIO/UEFS, Doutor em Botânica (UFRGS)

³Profa. Assistente do DSAU/UEFS, Doutora em Ciência de Alimentos (UNICAMP)

⁴Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia (UFMG), Pós-Doutor (UWO, Canadá)

⁵Profa. Adjunta do DSAU/UEFS, Doutora em Biotecnologia (UNESP)

*Author for correspondence: Universidade Estadual de Feira de Santana, Dep. de Saúde, BR 116, KM 03, Campus, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil (sandraassis@uefs.br)

(Potencial biotecnológico de leveduras carotenogênicas: uma breve revisão) – Os carotenóides são corantes naturais, biossintetizados exclusivamente por vegetais e microrganismos. 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. Os carotenóides em formulações comerciais são de dois tipos: obtidos de extratos vegetais ou sintéticos. Os carotenóides obtidos a partir de microrganismos podem apresentar menores flutuações na composição, em relação aos obtidos a partir de extratos de plantas e podem ser mais baratos que os carotenóides sintéticos. A produção de carotenóides por meio de microrganismos constitui ainda uma alternativa interessante devido à possibilidade da obtenção de pigmentos naturais em escala industrial. As aplicações industriais dos carotenóides envolvem seu uso como suplementação alimentar e como corantes de alimentos e de ração. Assim, esta breve revisão tem por objetivo a divulgação do potencial industrial e biotecnológico de leveduras carotenogênicas.

Palavras-chave: Corantes naturais, carotenóides, leveduras, biotecnologia.

(Yeasts with biotechnological potential to produce carotenoids: A brief review) – Carotenoids are natural colorants produced primarily by plants and microorganisms. Some of them are precursors of vitamin A and, recently, these compounds have been assigned an important role in reducing the risk of various degenerative diseases. Carotenoids in commercial formulations are of two types: vegetable extracts and synthetic. Those carotenoids obtained from microorganisms may make minor fluctuations in the composition, in relation to those obtained from extracts of plants and can be cheaper than the synthetic ones. However, the production of carotenoids by microorganisms is now an interesting alternative because of the possibility of obtaining natural pigments in industrial scale. The industrial applications of carotenoids relate to their use as supplemental food and coloring of food and diet. Thus, this review has the objective to disseminate the industrial production of natural carotenoids through microbial fermentations for biotechnological purposes.

Key words: Natural colorants, carotenoids, yeasts, biotechnology.

INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos lipofílicos de cor amarela, laranja ou vermelha, sendo biossintetizados exclusivamente por vegetais (plantas superiores e algas) e microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras), onde desempenham papel importante na fotossíntese e na foto-proteção, respectivamente (PFANDER, 1992; BHOSALE & BERNSTEIN, 2005). Os animais são incapazes de biossintetizar estes pigmentos, podendo, entretanto obtê-los através da dieta (TEE, 1992).

Comercialmente os carotenóides são utilizados como corantes alimentícios, e em termos de saúde humana como suplementos nutricionais, desempenhando importante papel fisiológico, sendo convertido em vitamina-A (retinol) e ácido retinóico (FRASER & BRAMLEY, 2004).

Nos últimos anos, pesquisas com estes pigmentos evidenciaram efeitos benéficos na diminuição de riscos de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares; estimulando intensa investigação sobre seu papel como

agente antioxidante e como regulador do sistema imunológico (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000; KRINSKY & JOHNSON, 2005).

Os carotenóides usados em formulações comerciais são obtidos por via química ou extração de plantas ou algas (AUSICH, 1997). Entretanto, os extratos vegetais estão sujeitos a flutuações na composição devido à região de cultivo e às condições pós-colheita (SILVA, 2004). Além disso, a tecnologia para produção de carotenóides sintéticos é complexa e cara (AUSICH, 1997; SILVA, 2004).

Alguns microrganismos vêm sendo pesquisados para a produção de carotenóides em escala industrial, tais como bactérias dos gêneros *Flavobacterium* e *Micrococcus* (NELIS & DE ENHEER, 1991), microalgas do gênero *Dunaliella* (PHADWAL & SINGH, 2003), o fungo filamentoso *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU *et al.*, 2002) e leveduras pigmentadas dos gêneros *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (DAVOLI & WEBER, 2002; LIU & WU, 2007; MALDONADE *et al.*, 2007).

Dentre esses microrganismos, as leveduras têm as

seguintes vantagens: (1) natureza unicelular e eucarionte; (2) capacidade de utilizar substratos de baixo custo para o seu crescimento; (3) elevada taxa de crescimento; (4) existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenóide de maior importância (SILVA, 2004; TINOI *et al.*, 2005).

CAROTENÓIDES

Estruturalmente, os carotenóides são em geral, tetraterpenóides de quarenta carbonos, constituído de oito unidades de isoprenóides de cinco carbonos, ligadas de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com ordem invertida no centro (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de uma dupla ligação, diminuição ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes com oxigênio, ou a combinação destes processos resultam na diversidade de estruturas dos carotenóides, como representado na Figura 1 (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999). Eles são classificados como carotenos, se sua estrutura contiver somente átomos de carbono e hidrogênio; ou xantofilas, se apresentar grupos substituintes com oxigênio. Na natureza, mais de 600 carotenóides diferentes já foram identificados (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; PFANDER, 1992).

O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo que absorve luz, sendo responsável pela coloração destes compostos. Além disso, este sistema também confere aos carotenóides alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Rotineiramente, a determinação do conteúdo total dos carotenóides em uma cultura de leveduras é feita em espectrofotômetro e a análise analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (RODRIGUEZ-AMAYA 1999; SU *et al.*, 2002). Por sua vez, os passos para determinação dos carotenóides são: ruptura das células, extração, separação e quantificação (KAISER *et al.*, 2007).

CAROTENÓIDES EM LEVEDURAS

As leveduras são seres eucariontes, formadas por células únicas, de nutrição quimio-heterotrófica absorvitiva,

sendo identificadas através de técnicas convencionais e moleculares como pertencente aos ascomicetos, basidiomicetos ou fungos mitospóricos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Entre as leveduras conhecidas, as basidiomicéticas pertencentes aos gêneros *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, e seus teleomórficos *Rhodospodium* e *Sporidiobolus*, são conhecidas pela produção de carotenóides como o α -caroteno, β -caroteno, toruleno e torularrodina (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

As espécies do gênero *Rhodotorula*, como *R. graminis*, *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, produzem α -caroteno, β -caroteno, toruleno e torularrodina em diferentes proporções (BUZZINI *et al.*, 2005; MALDONADE *et al.*, 2008).

A levedura *Sporobolomyces roseus* é produtora de carotenóides do tipo α -caroteno, toruleno e torularrodina (DAVOLI & WEBER, 2002; MALDONADE *et al.*, 2008).

Entretanto, a levedura basidiomicética *Phaffia rhodozyma* (renomeada como *Xanthophyllomyces dendrorhous*) destaca-se pela síntese do carotenóide astaxantina, o qual varia de 40% a 95% do total de carotenóides acumulado, dependendo da linhagem e das condições do processo fermentativo (JOHNSON & AN, 1991; FANG & WANG, 2002; LIU & WU, 2007).

Em leveduras, os carotenóides têm sido considerados como um metabólito secundário (KAISER *et al.*, 2007), atuando principalmente contra os danos oxidativos causados pela luz (SAKAKI *et al.*, 2001); danos estes que podem afetar o seu crescimento e sobrevivência no ambiente (SAKAKI *et al.*, 2001; KAISER *et al.*, 2007).

Vários pesquisadores vêm tentando minimizar os custos, além de direcionar a biossíntese para a obtenção de carotenóides de maior interesse em leveduras (AN *et al.*, 1996; MISAWA & SHIMADA, 1998; BHOSALE & GADRE, 2002; AKSU & EREN, 2005, 2007; LIU & WU, 2007). Deste modo, a otimização dos processos para a produção está baseada em três aspectos principais: (1) alterações nas condições de cultivo, como temperatura, aeração, pH, iluminação e agitação; (2) otimização da composição de cultivo, com aplicação de fontes de carbono e de nitrogênio de baixo custo, além de agentes químicos e (3) aplicação da engenharia genética, com clonagem de genes carotenogênicos.

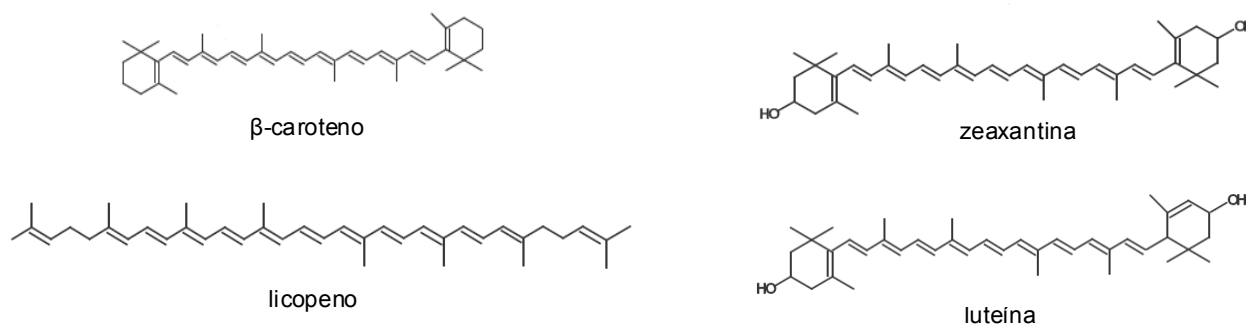


Fig. 1. Estrutura química dos carotenóides mais comumente encontrados nos alimentos vegetais. Fonte: RODRIGUEZ-AMAYA (1999).

APLICAÇÃO INDUSTRIAL E BIOTECNOLÓGICA DE CAROTENÓIDES

O mercado de carotenóides encontra-se em ascensão, e há previsão de ultrapassar a barreira de um bilhão de dólares em 2009, o que tem aumentado o interesse de pesquisadores na produção biotecnológica destes pigmentos (OLIVEIRA & JUNQUEIRA, 2006).

A via microbiológica de produção de carotenóides de interesse comercial, quando comparada à de síntese química, vem alcançando progressiva aceitação expressa por uma duplicação do porte de mercado a cada quinquênio (FONTANA *et al.*, 2000).

As aplicações industriais dos carotenóides envolvem seu uso como suplementos alimentares (atividade pró-vitáminica) e como corantes de alimentos e de ração (SILVA, 2004).

Em se tratando de nutrição humana, β -caroteno é utilizado como precursor de vitamina A, sendo que essa conversão ocorre naturalmente no fígado. Esse precursor tem a vantagem adicional de não ser convertido em vitamina A quando o corpo humano não necessita, evitando assim, potencial toxicidade causada por vitamina A em excesso (SILVA, 2004).

A utilização de carotenóides como corante natural para alimentos preencherá um quesito de valor na motivação do consumidor que é a sensação de cor dos alimentos (OLIVEIRA & JUNQUEIRA, 2006). Deste modo, a aplicação mais comum da astaxantina é na piscicultura, para pigmentação de crustáceos e peixes, como o salmão (JOHNSON & SCHROEDER, 1995). Na avicultura, alimentos ricos em β -caroteno, têm sido empregados na dieta de galinhas

poedeiras para melhorar a intensidade da pigmentação da gema do ovo (CARVALHO *et al.*, 2006).

De acordo com revisão feita por RAO & RAO (2007), também são atribuídas aos carotenóides, ações que promovem à saúde como diminuição do risco ao câncer e à formação de catarata, eficiência do sistema imunológico, bloqueio da degeneração macular e prevenção de doença cardiovascular.

O SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO COMO LOCAL POTENCIAL NA OBTENÇÃO DE CAROTENÓIDES

As atividades de pesquisas em diversidade microbiana e, conseqüentemente, a exploração tecnológica dos recursos microbianos, são ainda bastante limitadas no Brasil e inexpressíveis na região Semi-Árida (OLIVEIRA, 2007). Esta região ocupa uma área de aproximadamente 8% do território nacional, onde predomina o Bioma Caatinga (PPBio, 2007).

FELL *et al.* (2000), estimaram que somente 1% de todas as leveduras basidiomicéticas (compreendendo as pigmentadas e não-pigmentadas) já foram descobertas e descritas, indicando uma vasta biodiversidade a ser explorada, como fonte natural de novos carotenóides.

Para OLIVEIRA (2007), a região Semi-Árida brasileira consiste em um local potencial na obtenção de leveduras carotenogênicas, com possíveis microrganismos endêmicos devido às características desta região geográfica. No entanto, a exploração microbiana será melhor desenvolvida e aproveitada dentro de um programa de desenvolvimento científico, tecnológico, econômico e ambiental para esta região.

REFERÊNCIAS

- AKSU Z & AT EREN. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry** 40: 2985-2991.
- AKSU Z & AT EREN. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal** 35: 107-113.
- ALEXOPOULOS CJ, C MIMS & M BLACKWELL. 1996. **Introductory mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons.
- AN G-H, C-H KIM, E-S CHOI, RHEE. 1996. Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* Mutant HT-5FO1C. **Journal Fermentation Bioengineering** 82(5): 515-518.
- AUSICH RL. 1997. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Applied Chemistry** 69: 2169-2173.
- BHOSALE P & PS BERNSTEIN. 2005. Microbial xanthophylls. **Applied Microbiology Biotechnology** 68(4): 445-455.
- BHOSALE P & RV GADRE. 2002. Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced β -carotene production by *Rhodotorula glutinis*. **Letters Applied Microbiology** 34: 349-353.
- BUZZINI P, A MARTINI, MGB TURCHETTI, UM PAGNONI, P DAVOLI. 2005. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. **Enzyme and Microbial Technology** 36: 687-692.
- CARVALHO PR, MCG PITA, E PIBER-NETO, RMS MIRANDOLA & CX MENDONÇA-JÚNIOR. 2006. Influência da adição de fontes marinhas de carotenóides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Brazilian Journal Veterinary Research animal Science** 43(5): 654-663.
- DAVOLI P & RWS WEBER. 2002. Carotenoid pigments from the red mirror yeast, *Sporobolomyces roseus*. **Mycologist** 16: 102-108.
- DELGADO-VARGAS F, AR JIMÉNEZ & O PAREDES-LÓPEZ. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Review Food Science Nutrition** 40(3): 173-289.
- FANG TJ & J-M WANG. 2002. Extractability of astaxanthin in mixed culture of carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage fermentation. **Process Biochemistry** 37: 1235-1245.
- FELL JW, T BOEKHOUT, A FONSECA, G SCORZETTI & A STATZELL-TALLMAN. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rD1/D2 domain sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1351-

- 1371.
- FONTANA JD, SV MENDES, DS PERSIKE, LF PERACETTA & M PASSOS. 2000. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 3: 40-45.
- FRASER PD & PM BRAMLEY. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Prog. Lipid Res.** 43: 228-265.
- JOHNSON EA & G-H AN. 1991. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology** 11(4): 297-326.
- JOHNSON EA & WA SCHROEDER. 1995. Microbial carotenoids production. **Advances Biochemistry Engineering** 53: 119-178.
- KAISER P, P SURMANN, G VALLENTIN & H FUHRMANN. 2007. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal Microbiol. Methods** 70: 142-149.
- KRINSKY NI & EJ JOHNSON. 2005. Carotenoid action and their relation to health and disease. **Molecular Aspects Med.**, 26(6): 459-516.
- LIU YS & JY WU. 2007. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal** 36: 182-189.
- MALDONADE IR, DB RODRÍGUEZ-AMAYA & ARP SCAMPARINI. 2008. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry** 107: 145-150.
- MALDONADE IR, ARP SCAMPARINI & DB RODRÍGUEZ-AMAYA. 2007. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology** 38: 65-70.
- MANTZOURIDOU F, T ROUKAS & P KOTZEKIDOU. 2002. Effect of the aeration rate and agitation speed on b-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemistry Engineering Journal** 10: 123-135.
- MISAWA N & H SHIMADA. 1998. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts – Minireview. **Journal Biotechnology** 59: 169-181.
- NELIS H & AP DE ENHEER. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. **Journal of Applied Bacteriology** 70: 181-191.
- OLIVEIRA RQ. 2007. **Bioprospecção de microrganismos leveduriformes produtores de pectinases extracelulares isolados do Semi-árido baiano**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- OLIVEIRA RQ & VC JUNQUEIRA. 2006. **Plano de negócios: Microteno**. Feira de Santana.
- PFANDER H. 1992. Carotenoids: an overview. **Methods Enzymology** 213: 3-13.
- PHADWAL K & PK SINGH. 2003. Effect of nutrient depletion on β -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. **Bioresourch Technology** 90: 55-58.
- PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE DO SEMI-ÁRIDO. 2007. Disponível em: <<http://www.uefs.br/ppbio/home.htm>>. Acesso em: 22 dez. 2007.
- RAO AV & LG RAO. 2007. Carotenoids and human health - Invited review. **Pharmacology Research** 55:207-216.
- RODRÍGUEZ-AMAYA DB. 1999. **A guide to carotenoids analysis in foods**. Washington, D.C.: International Life Science Institute.
- SAKAKI H, T NAKANISHI, A TADA, W MIKI & S KOMEMUSHI. 2001. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. **Journal Bioscience Bioengineering** 92: 294-297.
- SILVA MC. 2004. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimento), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SU O, KG ROWLEY & NDH BALAZS. 2002. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. Review. **Journal of Chromatography B**, 781: 393-418.
- TEE ES. 1992. Carotenoids and retinoids in human nutrition. **Critical Review Food Science and Nutrition** 31(1/2): 103-163.
- TINOI J, N RAKARIYATHAM & RL DEMING. 2005. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry** 40: 2551-2557.