



Otimização da produção de pigmentos por *Rhodotorula minuta* URM 5197 e *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 utilizando casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*)

Thaís Santos Moraes Lima¹, Thamilly Moreira Silva ², Abdias Batista da Silva Neto ³, Jabson Meneses Texeira⁴, Thamara Louisy Santos Brito ⁵, Ana Laura Santos Sirino ⁶, Janaína Silva de Freitas ⁷

RESUMO:

Este trabalho teve como objetivo produzir e otimizar a produção de pigmentos por *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* por meio da fermentação submersa, utilizando o resíduo agroindustrial: a casca do maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*), como substrato único. As variáveis avaliadas eram independentes em relação a otimização, foram elas: casca de maracujá-amarelo (CMA), pH, tempo de fermentação, em dias e em gramas (g) como meio de cultivo, este estudo para a da produção do pigmento e sua otimização foi realizado por meio da matriz de Doehlert, com quinze condições experimentais, das quais treze apresentavam diferentes combinações e duas repetiam o ponto central. As variáveis fixas foram 30°C e 150 rpm. Além disso, a análise dos dados foi realizada a partir do Software Statística versão 10.0. Foi visto que a maior quantidade de pigmentos totais e carotenóides totais produzidos pela *Rhodotorula minuta* foi 28±0.01 mg/L e 72.8±0.026 µg/g, respectivamente; enquanto que para a *Rhodotorula mucilaginosa* a produção de pigmentos totais foi 37±0.002 mg/L e de carotenóides totais 236.8±0.013 µg/g. O ponto ótimo de produção de pigmentos totais para *R. minuta* foi 2,3g de CMA, pH 6,5 e 5 dias e para *R. mucilaginosa* 2,5g de CMA, pH 6 e 5 dias. Nas amostras de pigmentos totais foi identificada a presença 0,29mg/L de β-caroteno para *Rhodotorula minuta* e 0,83 mg/L para *Rhodotorula mucilaginosa*. Com isso, foi possível concluir que a casca de maracujá-amarelo pode ser utilizada como fonte de nutriente para crescimento das *Rhodotorula spp*, além da produção de pigmento com carotenóides totais e β-caroteno em sua composição.

PALAVRAS-CHAVE

Bioprocessos; Superfície de resposta; Carotenóides; Casca do maracujá - amarelo

ABSTRACT:

This work aimed to produce and optimize the production of pigments by *Rhodotorula minuta* and *Rhodotorula mucilaginosa* through submerged fermentation, using agroindustrial residue: the bark of passion fruit - yellow (*Passiflora edulis*), as a single substrate. The variables evaluated were independent in relation to optimization, they were: yellow passion fruit bark (CMA), pH, fermentation time, in days and in grams (g) as a culture medium, this study for pigment production and its optimization was performed by means of the Doehlert matrix, with fifteen experimental conditions, of which thirteen presented different combinations and two repeated the central point. The fixed variables were 30°C and 150 rpm. In addition, data analysis was performed from Software Statística version 10.0. It was seen that the highest amount of total pigments

and total carotenoids produced by *Rhodotorula minuta* was 28 ± 0.01 mg/L and 72.8 ± 0.026 $\mu\text{g/g}$, respectively; while for *Rhodotorula mucilaginosa* the production of total pigments was 37 ± 0.002 mg/L and total carotenoids 236.8 ± 0.013 $\mu\text{g/g}$. The optimum point of production of total pigments for *R. minuta* was 2.3g of CMA, pH 6.5 and 5 days and for *R. mucilaginosa* 2.5g of CMA, pH 6 and 5 days. In the total pigment samples, the presence of 0.29mg/L of β -carotene for *Rhodotorula minuta* and 0.83 mg/L for *Rhodotorula mucilaginosa* was identified. With this, it was possible to conclude that the yellow passion fruit bark can be used as a nutrient source for *Rhodotorula* spp growth, in addition to the production of pigment with total carotenoids and β -carotene in its composition.

KEYWORDS Bioprocesses; response surface; Carotenoids; Passion fruit bark – yellow

INTRODUÇÃO:

Sabe-se que os pigmentos naturais podem ser obtidos por meio de animais, plantas e microrganismos (Heer & Sharma, 2017). Nos últimos anos esse último grupo vem despertando interesse industrial, quando comparado com os outros, pois consegue disponibilizar o pigmento de maneira, não depende do espaço geográfico, desse modo, viabiliza a expansão da produção, utiliza pouco espaço, além de poder ser cultivado e metabolizado em substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais (Sen et al., 2019).

Acerca da produção e extração de pigmentos por meio dos microrganismos, o gênero *Rhodotorula* é conhecido por produzir corantes naturais conhecidos como carotenóides que podem ocorrer em nuances que varia entre as cores amarela, laranja e vermelha; outrossim, são utilizados na indústria alimentícia, rações, química e farmacêutica, pois além de colorir, podem apresentar atividades biológicas e atuam como precursores da vitamina A (Guzman et al., 2010; Mata-Gómez et al., 2014; Mussagy et al., 2018; Aruldas et al., 2018; Manimala & Murugesan, 2018; Nabi et al., 2020).

Portanto, este estudo teve como finalidade avaliar a possibilidade de produzir e otimizar a produção de pigmentos totais por *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula mucilaginosa* através da fermentação submersa, utilizando a casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*) sendo ele o único substrato.

MATÉRIAL E MÉTODOS:

COLETA E PREPARO DO RESÍDUO

A matéria-prima utilizada foi a casca de maracujá - amarelo (*Passiflora edulis*), o resíduo foi obtido na cidade de Itapetinga, BA. Após higienização foi reduzido a partes menores e seco (72 horas, 50°C) em estufa (SOLAB – SL 102). Posteriormente foi triturado em moinho de facas Willey (ACB LABOR), com granulometria de 2 mm.

OBRTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS E TÉCNICAS DE MANUETNÇÃO

As leveduras *R. minuta* (isolada da ração da bandeja do recinto de psitacídeos) e *R. mucilaginosa* (isolada do solo) foram adquiridas da Coleção de Cultura de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco - Micoteca URM – UFPE. Para garantir a viabilidade das espécies foram utilizadas quatro técnicas de manutenção: repicagem continua - (método de curto prazo), óleo mineral - (método de médio prazo), água esterilizada - (método de médio prazo) e congelamento comum - (método de médio prazo) (Sola et al., 2012).

Planejamento Experimental: Matriz de Doehlert

No planejamento experimental, os efeitos avaliados em relação a produção de pigmentos pelas leveduras foram: Casca de maracujá-amarelo (g) como meio de cultivo, pH e tempo de fermentação, em dias. O estudo da produção do pigmento e sua otimização foi realizado através da matriz de Doehlert, com quinze condições experimentais, das quais treze apresentaram diferentes combinações e duas repetições no ponto central. As variáveis fixas foram 30°C e 150 rpm. A análise dos dados foi realizada a partir do Software Statistica versão 10.0.

PREPARO DO INÓCULO, MEIO DE CULTURA E PADRONIZAÇÃO DO pH

A obtenção do inóculo ocorreu através do cultivo da *R. minuta* e da *R. mucilaginosa*, em Erlenmeyers (250 mL), com 100 mL do caldo YM; sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas. Os inóculos foram transferidos para o meio de cultura (total 100ml), a uma concentração de 10% (v/v) e uma biomassa inicial estimada de 10⁸ UFC/ml (Silva et al., 2020). O pH do meio de cultivo de todos os ensaios foi padronizado com ácido sulfúrico (2M) ou hidróxido de sódio (2M).

EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS

A extração do pigmento foi realizada a partir de uma adaptação da proposta por Moliné et al. (2012), em quatro etapas. Na primeira etapa ocorre uma centrifugação do fermentado após filtração, a 3000xg, por 5 minutos. O meio de cultivo foi retirado e o “*pellet*” foi separado com água destilada estéril e o sobrenadante descartado. Na segunda etapa foi utilizado 1mL de DMSO (Dimetil sulfóxido), associado ao “*pellet*” e submetidos a agitação em vórtex, por 1 minuto. A mistura foi incubada em banho-maria, por 1 hora, a 55°C. Em seguida centrifugada a 3000xg, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C, em tubos Falcon, com proteção contra a luz. Para terceira etapa foi adicionado 1mL de acetona P.A ao “*pellet*”, seguido de agitação em vórtex, por 1 minuto e posterior centrifugação 3000xg, por 5 minutos. A segunda e terceira etapa foram repetidas até extração exaustiva. A última etapa uniu as frações de acetona e DMSO. Em seguida foi adicionado 2 mL de éter de petróleo (35°C – 65°C) e 0,5mL de solução saturada de NaCl, a 5°C. A mistura foi agitada em vórtex, por 15 segundos e submetida a centrifugação 3000xg, por 10 minutos; a uma temperatura de 5°C. Foi coletada a fase éter de petróleo com os pigmentos e armazenada em tubos Falcon, enrolados em papel alumínio. Os tubos Falcon permaneceram em temperatura ambiente até evaporação total do éter e obtenção do extrato.

RESULTADO E DISCUSSÃO:

A composição centesimal do resíduo escolhido indica que a casca de maracujá amarelo pode ser utilizada como fonte de nitrogênio e de carboidrato para o crescimento do microrganismo, pois possui 12,93% de proteína bruta, 1% de extrato etéreo, 7,35% de material mineral, 49,09% de fibra detergente neutro - FDN (8,94% lignina + 29,5% celulose + 10,65% hemicelulose), 38,44% de fibra detergente ácido - FDA (8,94% lignina + 29,50% celulose) e 0,36% cinzas.

Sabe-se que o resíduo com uma maior quantidade de compostos lignocelulósicos, tem um maior potencial para gerar açúcares fermentáveis funcionando como substrato para o crescimento da levedura e produção dos pigmentos (Silva et al., 2020). De acordo, com os resultados apresentados na matriz de Doehlert houve diferença em relação a quantidade de pigmentos e carotenoides totais produzidos entre as diferentes espécies.

A *R. minuta* produziu 28±0.01 mg/L de pigmentos totais utilizando apenas a casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) como substrato, já a *R. mucilaginosa* apresentou

melhor produção de pigmentos. Em ambos os meios a levedura mostrou que consegue metabolizar os nutrientes, seu crescimento e conseqüentemente a sua produção de pigmentos; o que consolida a diminuição o custo de produção e gera aplicação para esse resíduo agroindustrial.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a casca de maracujá-amarelo pode ser utilizada como substrato para crescimento das *Rhodotorula spp* e produção de pigmento com carotenóides totais e β -caroteno, em sua composição. A presença de carotenóides nesses pigmentos fomenta e direciona estudos posteriores para purificação e verificação das possíveis atividades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, toxicidade, antifúngica), com o intuito do uso do pigmento não apenas com a finalidade de colorir alguma substância, mas para utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética.

AGRADECIMENTOS:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB, Brasil) pelo apoio financeiro concedido e à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pela assessoria financeira, técnica e administrativa.

¹Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

² Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, BR 415, Km 3 Itapetinga - Bahia, Brasil. tmoraes2559@gmail.com.

³ Doutora em Bioquímica Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Estrada do Bem Querer, Km 04 Vitória da Conquista – Bahia, Brasil. Thamillynutri@yahoo.com.br

⁴ Mestrando em Biologia e Biotecnologia dos Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus - Bahia, Brasil. abdiasbatista41@gmail.com

⁵ Mestrando em Biologia e Biotecnologia dos Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus - Bahia, Brasil. Jabsonmeneses@gmail.com

⁶ Doutoranda em Biologia e Biotecnologia dos Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro Salobrinho, Ilhéus - Bahia, Brasil. thaamaralouisy@hotmail.com

⁷ Graduanda em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, BR 415, Km 3 Itapetinga - Bahia, Brasil. analaurasantos2011@hotmail.com

⁸ Docente Orientadora, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, BR 415, Km 3 Itapetinga - Bahia, Brasil. janainafreitas@uesb.edu.br

Referências:

Heer, K. & Sharma, S. (2017). Microbial pigments as a natural color: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8 (5), 1913-1922.

Sen, T., Barrow, C.J. & Deshmukh, S.K. (2019). Microbial Pigments in the Food Industry - Challenges and the Way Forward. *Frontiers in Nutrition*, 6 (7), 1-14. doi: [10.3389/fnut.2019.00007](https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007).

Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P.W., O'Connell, M. (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in Orange colored *Capsicum spp*. *Plant Science*. [179 \(1-2\), 49 - 59](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.014). doi:[10.1016/j.plantsci.2010.04.014](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.014).

Mata-Gómez, L.C., Montañez, J.C., Méndez-Zavala, A., Aguilar, C.N. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 13 (12), 2-11

- Mussagy, C.U., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, V.C., Pereira, J.F.B. (2018). Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1095-1114. doi: 10.1007/s00253-018-9557-5.
- Aruldas, C.A., Dufossé, L., Ahmad, W.A. (2018). Current perspective of yellowish – Orange pigments from microorganisms – a review. *Journal of Cleaner Production*. 180, 168-182. doi: [10.1016/j.jclepro.2018.01.093](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093).
- Manimala, M.R.A. & Murugusan, R. (2018). Characterization of carotenoid pigment production from yeast *Sporobolomyces* sp. and their application in food products. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7 (1), 2818-2821.
- Nabi, F., Arain, M.A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., Soomro, F., Wang, Z., Ye, R. & Liu, J. (2020). Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 1809-1818. doi:[10.1111/jpn.13375](https://doi.org/10.1111/jpn.13375).