

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES A PARTIR
DE FUNGOS FILAMENTOSOS (MUCORALES)**

VÂNIA SOUSA ANDRADE

**Recife
Fevereiro/2003**

VÂNIA SOUSA ANDRADE

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES A PARTIR
DE FUNGOS FILAMENTOSOS (MUCORALES)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área: Microbiologia Aplicada

Orientadores: Profa. Dra. GALBA MARIA DE CAMPOS-TAKAKI
Prof. Dr. BENÍCIO DE BARROS NETO

**Recife
Fevereiro/2003**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. **Galba Maria de Campos-Takaki** (Orientadora)

Departamento de Química (UNICAP), Recife, PE

Prof. Dr. **Benício de Barros Neto**

Departamento de Química Fundamental (UFPE), Recife, PE

Prof. Dr. **José Luiz de Lima Filho**

Departamento de Bioquímica (UFPE), Recife, PE

Profa. Dra. **Maria Aparecida Resende**

Departamento de Microbiologia (UFMG), Belo Horizonte, MG

Profa. Dra. **Maria Fernanda Pimentel**

Departamento de Engenharia Química (UFPE), Recife, PE

"A sabedoria é a meta da alma humana;
mas a pessoa, à medida que em seus conhecimentos avança,
vê o horizonte do desconhecido cada vez mais longe".

(Heráclito)

Para Diógenes
que entendeu o meu compromisso com a Microbiologia,
dispensando-me carinho, apoio e incentivo

Aos meus pais e irmãos,
que por tantas vezes compreenderam a minha ausência,

Agradeço e dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à Universidade Federal de Alagoas, que através da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), proporcionou a oportunidade de seu aperfeiçoamento técnico; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex, CNPq) pelo suporte financeiro. À Universidade Católica de Pernambuco pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB).

Aos orientadores, Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki pelas constantes demonstrações de confiança e ao Prof. Dr. Benício de Barros Neto por transmitir parte da sua experiência no uso da quimiometria através das freqüentes e profícuas informações, que tanto enriqueceram este trabalho.

Ademais, este estudo não teria se concretizado se não houvesse a colaboração de várias pessoas, dentre as quais agradeço a Renato Araújo (Departamento de Física, UFPE) pelos espectros de absorção dos Leds; à Luciana Alves Oliveira (UNICAMP) pelo auxílio nas etapas iniciais e as inúmeras sugestões; à Leonie Asfora Sarubbo (UNICAP) pela grande contribuição, principalmente pelo fornecimento das estruturas químicas; a André Bazante e à Eliete Barros (Central Analítica, Departamento de Química Fundamental, UFPE) pela colaboração durante as análises cromatográficas e espectrofotométricas, respectivamente; à Luciana Franco e à Sandra Teresa Ambrósio pela solicitude; à Sônia Maria de Souza e aos técnicos, Severino Humberto e Salatiel (NPCIAMB/UNICAP), pelo apoio no decorrer das várias etapas experimentais. Os agradecimentos são extensivos a todos aqueles que colaboraram indiretamente com a realização desse estudo e aos componentes da banca examinadora pelas sugestões e correções desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	05
1. CAROTENÓIDES	06
1.1 Estrutura, nomenclatura e classificação	06
1.2 Propriedades e funções biológicas dos carotenóides	13
1.3 Degradação dos carotenóides	23
1.4 Análise físico-química dos carotenóides	25
1.4.1 Isolamento	25
1.4.2 Identificação e quantificação	26
1.4.2.1 Espectrofotometria UV-vísivel	26
1.4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
1.4.2.3 Espectrometria de massas	29
1.4.2.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)	31

2. CAROTENOGÊNESE EM FUNGOS	32
2.1 Ocorrência e distribuição	32
2.2 Biossíntese	34
2.2.1 Formação e insaturação de fitoeno	34
2.2.2 Reações de ciclização	40
2.2.3 Formação de xantofilas	42
2.2.4 Inibidores da biossíntese de carotenóides	44
2.2.5 Regulação da biossíntese	47
2.3 Genes carotenogênicos	53
2.3.1 Genes estruturais	54
2.3.2 Genes reguladores	55
3. CAROTENOGÊNESE: AVANÇOS E PERSPECTIVAS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
CAPÍTULO II - Screening of filamentous mucoralean fungi for production of astaxanthin, β -carotene and lycopene	72
CAPÍTULO III - Seleção de fatores potencialmente importantes para a produção de astaxantina por <i>Mucor javanicus</i> (IFO 4570)	96
CAPÍTULO IV - Otimização sequencial da produção de astaxantina partir de <i>Mucor javanicus</i> (Mucorales)	124
CONCLUSÕES GERAIS	144
ADENDO	145
ANEXOS	146

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Estrutura básica (C ₄₀ H ₅₆) de um caroteno (I) e sua ciclização (II)	06
Figura 2.	Estrutura dos carotenos acíclicos	07
Figura 3.	Estrutura dos carotenos cíclicos	08
Figura 4.	Estruturas de carotenóides típicos de animais	10
Figura 5.	Estruturas de alguns carotenóides que são comuns ou exclusivos de fungos	12
Figura 6.	Propriedades físico-químicas dos carotenóides (Adaptação da Figura editada por Rodriguez-Amaya (1993)	14
Figura 7.	Estruturas dos principais carotenóides de corantes naturais	15
Figura 8.	Bioconversão de β-caroteno à vitamina A	18
Figura 9.	Ações biológicas atribuídas aos carotenóides	19
Figura 10.	Esquema demonstrativo da degradação de carotenóides. Adaptação da Figura editada por Rodriguez-Amaya (1993)	24
Figura 11.	Diagrama geral da via de biossíntese de carotenóides	35
Figura 12.	Via proposta para a biossíntese de GGPP a partir de acetil-CoA, de acordo com Davies (1977)	37
Figura 13.	Formação de licopeno a partir da insaturação do fitoeno	39
Figura 14.	Esquema geral proposto para a biossíntese de carotenos cíclicos, editada por Bramley e Mackenzie (1992)	41
Figura 15.	Via biossintética de astaxantina de acordo com Fraser et al. (1997)	43

CAPÍTULO II

Figure 1. Results of the screening for the presence of pigmentation in mycelia of filamentous fungi: (1) <i>Cunninghamella bertholletiae</i> (IFM 46987), (2) <i>Cunninghamella elegans</i> (IFM 46109), (3) <i>Mucor racemosus</i> (NHL 11569), (4) <i>Mucor circinelloides</i> (IAM 6080) and (5) <i>Mucor javanicus</i> (IFO 4570).	91
Figure 2. Chemical structures of the three carotenoids investigated in the five strains of filamentous fungi	92
Figure 3. Visible absorption spectra of the pigments isolated from the <i>M. circinelloides</i> and <i>M. javanicus</i> strains, and of authentic astaxanthin, β -carotene and lycopene (Sigma Chemical, Co., St. Louis, Mo., USA).....	93
Figure 4. Suggested pathways for astaxanthin biosynthesis in <i>Mucor javanicus</i>	94
Figure 5. Production of astaxanthin by <i>Mucor javanicus</i> (IFO 4570) grown in the synthetic medium of Hesseltine and Anderson (1957) modified by Andrade et al. (2000)	95

CAPÍTULO III

Figura 1. Histograma construído a partir das respostas obtidas na Tabela 2	119
Figura 2. Gráfico normal dos valores dos contrastes calculados a partir dos dados fornecidos na Tabela 3	120
Figura 3. Produtividade em função da cor e da intensidade da luz. Os pontos em vermelho correspondem ao ensaio 16	121
Figura 4. Variação da resposta média com os níveis da cor, da intensidade e do pH	122

Figura 5. Relação entre a biomassa e a produção de astaxantina	123
--	-----

CAPÍTULO IV

Figura 1. Planejamentos seqüenciais em busca da região de máxima produtividade. A escala da astaxantina é logarítmica. As unidades originais para o tempo, a astaxantina e a intensidade luminosa são horas, µg/L e µmol.m ⁻² .s ⁻¹ , respectivamente	142
---	-----

Figura 2. Curvas de nível da Eq. 1 ($y = 1292,7 - 88,5t - 380,2 t^2 - 15,8 I - 61,3 I^2 + 72 It$), ajustada aos resultados do planejamento em estrela da Tabela 2. O tempo e a intensidade estão em unidades codificadas de acordo como as equações da Tabela 2	143
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Nomes triviais e sistemáticos de determinados carotenóides (Bramley e Mackenzie, 1992)	11
Tabela 2. Separação dos carotenóides por CLAE de acordo com Bramley e Mackenzie (1992)	28
Tabela 3. Agentes inibidores da síntese de carotenóides em fungos	46
Tabela 4. Agentes estimuladores da carotenogênese em fungos	47

CAPÍTULO II

Table 1. Kinetic parameters for astaxanthin production by <i>Mucor javanicus</i> . Values shown are averages of two replicate experiments.	90
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} usado para uma triagem de 7 fatores na produção de astaxantina a partir de <i>Mucor javanicus</i>	115
Tabela 2. Respostas obtidas a partir do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} da Tabela 1, cujos ensaios foram realizados em ordem aleatória e em duplicata (x e x')	116
Tabela 3. Efeitos principais e de interação calculados a partir dos rendimentos de astaxantina apresentados na Tabela 2	117

Tabela 4. Confundimento entre os efeitos principais e as interações de dois fatores calculados de acordo com o planejamento fracionário 2^{7-3}	118
---	-----

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Planejamentos fatoriais usados seqüencialmente para o deslocamento até a região de máxima produtividade de astaxantina por <i>Mucor javanicus</i> . Todos os ensaios foram feitos em duplicatas. Os símbolos entre parênteses indicam os níveis inferior (-), superior (+) e central (0)	139
Tabela 2. Planejamento em Estrela para estudo da região em torno do máximo. Os valores dos fatores estão dados em suas unidades originais (tempo em horas e intensidade luminosa em $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e também codificados de acordo com as equações $t = \frac{\text{tempo} - 78}{6}$ e $I = \frac{\text{Intensidade} - 3,5}{0,5}$. Os ensaios 3 e 4 são os mesmos da Etapa III	140
Tabela 3. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático completo dos dados da Tabela 2. As contribuições significativas estão em negrito	141

LISTA DE ABREVIATURAS

ACETIL-COA	- acetil coenzima A
AMO-1618	- 2-isopropil-5-metil-4-trimetilamônio
AMPc	- Adenilato cíclico
ATP	- Adenosina trifosfato (Ribonucleosídeo 5'-trifosfato)
BHT	- Butylated Hydroxy Toluene
CHAPS	- 3-(3-cloramidopropil) - dimetilamônio -1- propanosulfonato
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CPTA	- 2-(4-clorofenil) trietilamina
DMAPP	- dimetilalil pirofosfato
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DTT	- Dithiothreitol
ED₅₀	- Dose média efetiva
EM	- Espectrometria de massas
ER	- retículo endoplasmático
ERO (S)	- Espécies reativas do oxigênio
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
FPP	- farnesil pirofosfato
GGPP	- geranylgeranyl pirofosfato
GPP	- geranyl pirofosfato
HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IPP	- isopentenil pirofosfato
MVA	- Ácido mevalônico
MVAP	- Ácido mevalônico 5-fosfato
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMR	- Ressonância nuclear magnética
PCMB	- p-cloromercuribenzoato
pH	- potencial hidrogeniônico
PPPP	- prefitoeno pirofosfato
PSPP	- presqualeno pirofosfato
RNAm	- Ácido ribonucléico mensageiro

RESUMO

A via microbiológica de produção de carotenóides de interesse comercial, quando comparada à contrapartida oriunda de síntese química, vem alcançando progressiva aceitação, expressa por uma duplicação do porte de mercado a cada quinquênio. De um modo geral, observa-se que os fungos apresentam um relevante potencial biotecnológico para a produção de carotenóides, uma vez que acumulam pigmentos durante o crescimento micelial. Neste trabalho a presença de astaxantina, β -caroteno e licopeno foi investigada em três espécies do Gênero *Mucor* (*M. circinelloides*, *M. javanicus* e *M. racemosus*) e duas espécies do Gênero *Cunninghamella* (*C. bertholletiae* e *C. elegans*). Através da análise espectrofotométrica (UV-visível) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constatou-se que dentre as cinco amostras investigadas as concentrações tanto de astaxantina (19,8 $\mu\text{g/g}$) como de β -caroteno (13,5 $\mu\text{g/g}$) foram mais altas no micélio de *M. javanicus*. O licopeno não foi detectado em nenhuma amostra. Surpreendentemente, a presença de astaxantina foi pela primeira vez observada em uma espécie de *Mucor*. O teor de astaxantina encontrado a partir de *M. javanicus* abriu perspectivas para a maximização dos rendimentos. Neste sentido, fatores, nutricionais e físicos, implicados no crescimento dos microrganismos e na produção de carotenóides, foram alterados e combinados através de planejamentos fatoriais completos e fracionários, buscando a localização da região de máxima produção. A otimização seqüencial do processo permitiu o aumento dos rendimentos de 145,9 para 1297,0 $\mu\text{g/L}$, confirmando o potencial de *M. javanicus* como fonte de astaxantina.

Palavras chave: carotenóides, astaxantina, β -caroteno, licopeno, *Mucor*, Mucorales.

E. mail: vaniasa@uol.com.br

ABSTRACT

Microbiological production, as opposed to chemical synthesis, of carotenoids for commercial purposes has become more and more widely accepted, having doubled its share of the market every five years. Generally speaking, it has been observed that fungi show significant biological potential for producing carotenoids, once pigments have accumulated during mycelial growth. In this paper the presence of astaxanthin, β -carotene and lycopene was investigated in three strains of the *Mucor* genus (*M. circinelloides*, *M. javanicus* and *M. racemosus*) and two strains of *Cunninghamella* (*C. bertholletiae* and *C. elegans*). Using spectrophotometric (visible-UV) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis, it was ascertained that, of the five strains investigated, concentrations of both astaxanthin (19.8 $\mu\text{g/g}$) and β -carotene (13.5 $\mu\text{g/g}$) were higher in the *M. javanicus* mycelium. Lycopene was not detected in any of the samples. Surprisingly, this was the first time astaxanthin had been observed in a *Mucor* species. The level of astaxanthin concentration obtained from *M. javanicus* suggested that it might be possible to maximize its yield. To this end, nutritional and physical factors involved in the growth of microorganisms and carotenoid production were changed and combined using of factorial designs, aiming to locate the region where maximum production occurs. Sequential optimization of the process generated an increase in yield from 145.9 $\mu\text{g/L}$ to 1297.0 $\mu\text{g/L}$, thereby confirming the potential of *M. javanicus* as a source of astaxanthin.

Keywords: carotenoids, astaxanthin, β -carotene, lycopene, *Mucor*, Mucorales.

E. mail: vaniasa@uol.com.br