



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**BIOPRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E CAROTENÓIDES
POR *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636**

Eunice Valduga

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

ORIENTADOR

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Co- ORIENTADOR

Florianópolis, SC

Dezembro, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC)
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS (EQA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BIOPRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS E CAROTENÓIDES
POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636

Eunice Valduga

Tese apresentada para a
obtenção do Título de Doutor
em Engenharia Química na sub-
área de Biotecnologia.

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

ORIENTADOR

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Co- ORIENTADOR

Florianópolis, SC

Dezembro, 2005

*“ A vida é de fato escuridão,
exceto lá onde houver impulso,
e todo impulso é cego, exceto onde houver sabedoria,
e toda sabedoria é vã, exceto onde há trabalho,
e todo trabalho é vazio, exceto onde há amor,
e quando você trabalha com amor
você se liga com você mesmo
e com o outro, e com Deus”.*

Khalil Gibran

*“Justo quando a lagarta achou que o
mundo tinha acabado,
ela virou uma borboleta”.*

Dedicatória

A minha mãe e meu pai (Altair e Lauri),

Pelo amor e valioso exemplo de vida

Obrigado por me ensinarem a nunca desistir.

Meu irmão Gelson, Cíntia e Luigi,

obrigado por existirem e serem tão especiais.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus passos e me fortalecer espiritualmente nos momentos mais difíceis que enfrentei nesta dura jornada.

Ao professor Agenor Furigo Júnior pela amizade e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor e colega Marco Di Luccio, todo meu carinho por contar não só com um orientador, mas com um verdadeiro amigo e mestre, que deixará ensinamentos de ética, profissionalismo e amizade, a uma vida inteira.

À Alexsandra Valério, o meu especial muito obrigado, pela valiosa colaboração e dedicação, em ajudar a qualquer hora, no desenvolvimento experimental deste trabalho

À professora e colega Helen Treichel que contribuiu com suas idéias e incentivo em algumas etapas do trabalho, pelos ótimos conselhos e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química (UFSC), que contribuíram no meu aprendizado, e em especial ao sempre simpático e prestativo Edivilson.

Ao professor Irajá Nascimento Filho e ao funcionário Rogério Delanora, pelo apoio experimental nas análises cromatográficas.

À professora Elina Bastos Caramão pelo empréstimo do sistema SPME.

Aos amigos Altemir, Jaqueline, Rosângela e Rozane, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos, em especial nos mais difíceis.

À URI - Campus de Erechim, os colegas professores da Engenharia de Alimentos e funcionários do Centro Tecnológico, que de certa forma contribuíram com idéias e incentivo para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi

INTRODUÇÃO.....	1
------------------------	---

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

1. Aromas.....	5
1.1. Considerações gerais sobre a produção de aromas.....	5
1.2. Microrganismos produtores de aromas	11
1.3. Análise e recuperação de compostos voláteis.....	15
2. Carotenóides.....	17
2.1. Estrutura.....	17
2.2. Biossíntese.....	19
2.3. Propriedades e funções dos carotenóides.....	20
2.4. Aspectos industriais da produção de carotenóides.....	21
2.5. Microrganismos produtores de carotenóides.....	22
2.6. Fatores que afetam a produção de carotenóides.....	23
3. Referências Bibliográficas.....	27

CAPÍTULO 2: Microextração em fase sólida (SPME – HS) de compostos voláteis de meios fermentados

Resumo.....	37
1. Introdução.....	38
2. Material e métodos.....	39
2.1. Microextração em fase sólida (SPME - HS).....	39
2.2. Extração com solvente.....	42
2.3. Identificação do composto volátil.....	42
3. Resultados e discussão.....	43

4. Conclusões.....	47
5. Referências Bibliográficas.....	48

CAPÍTULO 3: Bioprodução de compostos voláteis por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636)

Resumo.....	51
1. Introdução.....	52
2. Material e métodos.....	53
2.1. Microrganismo.....	53
2.2. Preparo de meios de cultura.....	53
2.3. Preparo dos substratos.....	54
2.4. Condições de cultivo	55
2.5. Recuperação e concentração dos compostos voláteis.....	56
2.6. Análise dos compostos voláteis.....	57
3. Resultados e discussão.....	58
3.1. Características macroscópicas e de crescimento da linhagem.....	58
3.2. Bioprodução de compostos voláteis.....	59
4. Conclusões.....	67
5. Referências Bibliográficas.....	68

CAPÍTULO 4: Otimização da bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) em meios convencionais

Resumo.....	72
1. Introdução.....	73
2. Material e métodos.....	74
2.1. Condições de cultivo e da bioprodução de carotenóides.....	74
2.2. Recuperação de carotenóides totais.....	75
2.3. Determinação de carotenóides totais.....	77
2.4. Determinações analíticas.....	78
2.4.1. Determinação de biomassa.....	78

2.4.2. Determinação de pH.....	79
2.4.3. Determinação de glicose.....	79
2.4.4. Determinação de nitrogênio total e/ou proteína total.....	79
2.5. Delineamento experimental para estudar a influência da composição do meio e das condições operacionais na bioprodução de carotenóides.....	79
2.6. Análise dos carotenóides.....	81
3. Resultados e discussão.....	82
3.1. Bioprodução e recuperação de carotenóides.....	82
3.1.1. Efeitos da composição do meio e das condições de fermentação.....	84
3.1.2. Otimização da bioprodução de carotenóides.....	91
3.2. Análise dos carotenóides.....	108
4. Conclusões.....	110
5. Referências Bibliográficas.....	110

CAPÍTULO 5: Bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) utilizando substratos agroindustriais

Resumo.....	115
1. Introdução.....	116
2. Material e métodos.....	118
2.1. Condições de cultivo	118
2.2. Substratos industriais testados.....	118
2.2.1. Pré-tratamento com carvão ativo.....	119
2.2.1. Pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico.....	120
2.3. Planejamentos experimentais para otimizar a bioprodução de carotenóides.....	121
2.4. Recuperação de carotenóides totais.....	123
2.5. Metodologia analítica.....	124
2.5.1. Caracterização dos substratos agroindustriais.....	124
2.5.2. Determinação de carotenóides totais.....	125
2.5.3. Determinação de biomassa.....	126
2.5.4. Determinação de pH.....	126

2.5.5. Determinação de glicose.....	126
3. Resultados e discussão.....	127
3.1. Pré-tratamentos de substratos agroindustriais.....	127
3.2. Bioprodução de carotenóides em meios agroindustriais: Efeitos da composição do meio e do pré-tratamento dos substratos.....	133
3.2.1. Substratos agroindustriais sem pré-tratamento.....	133
3.2.2. Substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo.....	135
3.2.3. Substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos.....	146
4. Conclusões.....	160
5. Referências Bibliográficas.....	161
CAPÍTULO 6: Parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de carotenóides por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636)	
Resumo.....	165
1. Introdução.....	166
2. Material e métodos.....	167
2.1. Condições de cultivo	167
2.2. Cinética do processo fermentativo e parâmetros de transformação.....	168
2.2.1. Fatores de conversão.....	168
2.2.2. Produtividade.....	169
2.2.3. Velocidade instantânea e específica.....	169
3. Resultados e discussão.....	171
4. Conclusões.....	178
5. Referências Bibliográficas.....	179
CAPÍTULO 7: Conclusões e sugestões.....	181
ANEXOS.....	186

RESUMO

A crescente demanda de aromas e carotenóides pelas indústrias tem despertado o interesse pela sua bioprodução. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de cultivo e a recuperação de compostos voláteis e carotenóides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor*. A recuperação de compostos voláteis foi realizada por microextração em fase sólida, sendo que as condições que resultaram a máxima adsorção dos analitos na fibra extratora (PDMS 100 μm) foram a temperatura de 60 °C, tempo de extração de 30 min, sem agitação, volume de amostra de 2,5 mL e solução salina saturada de KCl (1:10 v/v). Na bioprodução de compostos voláteis, empregou-se como precursores ricinoleato de sódio, ricinoleato de etila e metila, ácido ricinoléico e óleo de mamona. O ensaio conduzido a 28 °C, 160 rpm, pH 6,0 e com 0,02 % de ácido ricinoléico foi o que proporcionou maior produção de compostos voláteis, sendo identificados o 1,4-butanodiol; 1,2,2-trimetilciclopropilamina; beta-ionona; 2,3-butanodiona; pentanal; tetradecano; 2-isononenal; 4-octen-3-ona; ácido propanóico e octadecano. Na bioprodução de carotenóides, o tratamento empregando N₂ líquido combinado com dimetilsulfóxido, para ruptura celular, e a extração com acetona e metanol (7:3, v/v) permitiu a máxima recuperação de carotenóides totais. Para otimizar a bioprodução de carotenóides, empregou-se técnica de planejamento experimental. Um planejamento do tipo Plackett Burman (*Screening Design*), seguido de um planejamento completo, alcançando-se uma concentração máxima de 1019 $\mu\text{g/L}$ em meio contendo 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte, 14 g/L de peptona, 180 rpm, a 25 °C e um pH inicial de 4,0. Um dos carotenóides majoritários identificado nesta linhagem foi o β -caroteno, correspondendo a aproximadamente 32 % em relação aos carotenóides totais. Na bioprodução de carotenóides com substratos pré-tratados com carvão ativo, o máximo teor de carotenóides totais obtido foi de 208,6 $\mu\text{g/L}$. No entanto, na bioprodução com substratos pré-tratados com ácidos (sulfúrico e fosfórico) foi possível otimizar a concentração de carotenóides totais, obtendo-se teor de 541,51 $\mu\text{g/L}$ com concentração de melão de cana-de-açúcar 10 g/L, água de maceração de milho 5 g/L, Prodex Lac[®] (hidrolisado de levedura) 5 g/L. A partir dos dados levantados na cinética de fermentação verificou-se que a concentração máxima de carotenóides totais em meio convencional e agroindustrial é atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo. A bioprodução de carotenóides apresenta associação com o crescimento celular. O pH final do meio de fermentação agroindustrial apresentou um aumento (pH_{final} ~8,5). A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para a *S. salmonicolor* em meio convencional e agroindustrial foi igual a 0,07 e 0,04 h⁻¹, respectivamente. O fator de conversão $Y_{X/S}$ foi igual a 1,2 g células/g glicose para o meio convencional e a partir de 54 h diminuiu consideravelmente e permanece constante em 0,03 g/g. Essa queda brusca se observa no meio industrial apenas após 78 h, passando de 0,91 para 0,06 g células/g glicose. O mesmo comportamento foi observado para o fator de conversão $Y_{P/S}$, sendo o obtido o máximo de 206,8 μg de carotenóides/g glicose para o meio convencional e 378,6 μg de carotenóides/g glicose para o meio industrial. O meio convencional permitiu a obtenção das maiores produtividades em células (0,08 g.L⁻¹.h⁻¹) e carotenóides (14,2 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Palavras-chave: *Sporidiobolus salmonicolor*; carotenóides; aromas; recuperação.

ABSTRACT

The growing interest for aroma and carotenoids has draw great attention to the production of such compounds by biotechnological processes. This way, the aim of this work was the assessment of volatile compounds and carotenoids production and recovery, using *Sporidiobolus salmonicolor*. The recovery of volatile compounds was carried out by headspace solid-phase microextraction. The experimental conditions that yielded maximum extraction of volatiles by the fiber (polydimethylsiloxane – PDMS 100 μm) were 60°C, 30 min, no stirring, sample volume 2.5 mL and addition of 1:10 of KCl saturated solution. For bioproduction of volatile organic compounds (VOC) some precursors were tested, as sodium ricinoleate, ethyl and methyl ricinoleate, ricinoleic acid and castor oil. The highest yield in VOC's was reached when yeast was cultivated at 28°C, 160 rpm, pH 6.0 using 0.02% of ricinoleic acid. The major compounds found in fermented broth were 1,4-butanediol; 1,2,2-trimethylcyclopropylamine; beta-ionone; 2,3-butanodione; pentanal; tetradecanol; 2-isononenal; 4-octen-3-one; propanoic acid and e octadecane. The best carotenoids production was achieved when fermented cells were treated with liquid N₂ combined to dimethylsulfoxide, for cell lysis, followed by extraction with acetone and methanol (7:3, v/v). For optimization of carotenoid bioproduction experimental design technique was used. A Plackett Burman (*Screening Design*) design was applied, followed by a complete second order design. Maximum concentration of carotenoids reached was 1019 $\mu\text{g/L}$ in a medium composed of 40 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 14 g/L peptone, 180 rpm, 25 °C and initial pH 4.0. One of the major carotenoids produced by this strain that was identified is β -carotene, corresponding to approximately 32 % in relation to total carotenoids. In bioproduction of carotenoids with industrial substrate pretreated with activated carbon, maximum yield in total carotenoids was 208.6 $\mu\text{g/L}$. However, when acid (sulphuric and phosphoric acid) pretreated substrate were used, we could obtain 541.5 $\mu\text{g/L}$ of total carotenoids using 10 g/L molasses, 5 g/L corn steep liquor, 5 g/L yeast hydrolysate (Prodex Lac[®]). Fermentation kinetics showed that maximum total carotenoids in both media is reached after 100 h of fermentation. Carotenoid bioproduction is associated to cell growth. Final pH of agroindustrial medium increased from up to 8.5. Specific growth rate in conventional and agroindustrial media was 0.07 and 0.04 h⁻¹, respectively. Yield factor $Y_{X/S}$ was 1.2 g cell/g glucose for conventional until 54 h. After this time it considerably decreases and remains constant at 0.03 g cell/g glucose. This steep decrease is observed in industrial medium only after 78 h. The same behavior was observed for $Y_{P/S}$. Maximum $Y_{P/S}$ of 206.8 μg carotenoids/g glucose for conventional medium and 378.6 μg carotenoid/g glucose for industrial medium. Conventional medium yielded the highest productivities for cell (0.08 g.L⁻¹.h⁻¹) and was obtained total carotenoids (14.2 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Keywords: *Sporidiobolus salmonicolor*; recovery; aroma; carotenoids.

INTRODUÇÃO

A produção de aromas e corantes têm crescido muito nestes últimos anos, devido aos avanços científicos na área, pela utilização de microrganismos ou enzimas como alternativas à síntese química e à extração vegetal. Os compostos gerados são denominados naturais, sendo portanto, mais valorizados no mercado que aditivos químicos artificiais. Além da conotação “natural”, os produtos obtidos por fermentação microbiana podem ser produzidos em curto prazo, em qualquer época do ano, utilizando substratos de baixo custo, com a vantagem que o Brasil é rico em subprodutos desta natureza.

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de diversos compostos químicos, que incluem ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, álcoois e outras moléculas complexas resultantes de metabolismo secundário de plantas e de microrganismos. Muitos óleos de plantas e aromas naturais estão atualmente disponíveis somente a preços acima de 5.000 US\$/kg. Por exemplo, a 4-decalactona sintética, que compõe o aroma de pêssego, custa cerca de 150 US\$/kg, enquanto a mesma substância obtida de uma fonte natural custa 6.000 US\$/kg (MARQUES, 1998).

Atualmente, os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas ou algas. Porém, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos e, algumas patentes têm sido registradas nos últimos anos. Comercialmente, os carotenóides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões para 2005 (FRASER & BRAMLEY, 2004) e são considerados precursores de fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000), coloração específica e fotoproteção (MARASCO & SCHMIDT-DANNERT, 2003).

A bioprodução de aromas e carotenóides variam em função de fatores químicos, físicos e biológicos. As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de

Introdução

incubação, agitação e aeração, são fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos produzidos, bem como a linhagem do microrganismo.

A produção destes compostos por fermentação resulta em uma baixa concentração dos produtos hidrossolúveis em uma grande quantidade de água. Os compostos produzidos biologicamente, na maioria das vezes, apresentam problemas na extração, na recuperação e na estabilidade, o que acarreta em altos custos nos processos de produção e em muitos casos tornando os mesmos inviáveis.

Face ao exposto, tornam-se necessários o desenvolvimento de estudos de otimização da bioprodução de compostos voláteis e carotenóides, no sentido de aumentar o rendimento e reduzir custos com substratos, bem como técnicas de extração, recuperação e preservação destes compostos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a bioprodução e recuperação de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor*, através do desenvolvimento das seguintes etapas:

- Desenvolvimento de metodologia de extração e recuperação de compostos voláteis;
- Estudo das condições de cultivo tais como composição do meio de cultura, pH do meio, temperatura de incubação e velocidade de agitação, visando a obtenção de condições ideais para a produção de compostos voláteis;
- Identificação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (GC/MS);
- Desenvolvimento de metodologia de extração e recuperação de carotenóides;
- Avaliação das condições de cultivo tais como composição do meio de cultura, pH do meio, temperatura de incubação e velocidade de agitação, visando otimizar a bioprodução de carotenóides em meio convencional e agroindustrial;
- Análise dos carotenóides produzidos, por técnicas de espectrofotometria (espectrofotômetro UV/Visível) e cromatografia líquida (CLAE);
- Obtenção de parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de carotenóides em meio convencional e agroindustrial.

Introdução

Esta tese está dividida em capítulos, conforme descrição resumida apresentada a seguir. No Capítulo 1, serão abordados alguns aspectos teóricos da produção e recuperação de compostos voláteis e carotenóides, bem como propriedades e funções, aspectos industriais da produção, principais microrganismos produtores, fatores que afetam a bioprodução e processos de extração, de recuperação e identificação destes compostos relatados na literatura. O Capítulo 2 apresenta o desenvolvimento de metodologia para a extração de compostos voláteis de meios fermentados, por microextração em fase sólida (SPME – HS). O Capítulo 3 relata o estudo exploratório da bioprodução e identificação de compostos voláteis, em substratos contendo como precursores ricinoleato de sódio, ricinoleato de etila e metila, ácido ricinoléico e óleo de mamona. No Capítulo 4, serão abordados aspectos da bioprodução, recuperação e análise de carotenóides, utilizando meio comercial. O Capítulo 5 aborda aspectos da bioprodução de carotenóides utilizando substratos agroindustriais. No Capítulo 6, serão apresentados os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e bioprodução de carotenóides em meio comercial e industrial. O Capítulo 7 apresenta conclusões finais e sugestões de trabalhos futuros.

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, são apresentados aspectos teóricos da bioprodução e recuperação de aromas e carotenóides. Serão abordados ainda, propriedades e funções, aspectos industriais da produção, principais microrganismos produtores, fatores que afetam a bioprodução e processos de extração e recuperação destes compostos.

1. AROMAS

1.1. Considerações gerais sobre a produção de aromas

A utilização de microrganismos em alimentos, com o propósito de produzir aromas, já existe há centenas de anos. Primeiramente, seu uso objetivava o aumento de vida de prateleira, ocasionado pelos processos fermentativos (a conversão do leite em iogurte, por exemplo). Entretanto, em alimentos e bebidas fermentadas, a ação microbiana não apenas aumenta a vida de prateleira, mas também auxilia a produção de aromas característicos (GATFIELD, 1995).

Os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos (GATFIELD, 1995), e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas (HAMILTON-KEMP et al., 1996) ou que podem ser obtidas de fontes animais. Certos fungos, leveduras e bactérias também possuem potencial para o metabolismo secundário e podem produzir aromas e fragâncias (ARMSTRONG & BROWN, 1994; WELSH, 1995; KOGAN & FREEMAN, 1994; MANLEY, 1995).

As bactérias, fungos e leveduras podem servir como biocatalisadores na produção de produtos naturais. Tais microrganismos, através de seus sistemas enzimáticos, alteram metabolicamente as estruturas de uma ampla faixa de compostos orgânicos. As enzimas

microbianas são capazes de realizar reações de biossíntese ou de degradação; podem também fazer biotransformações, que podem conferir benefícios aos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

A Organização Internacional da Indústria de Aromas separa em quatro classes as substâncias aromatizantes: a primeira classe é a de materiais naturais obtidos de plantas ou de animais; a segunda refere-se aos concentrados de aromas naturais ou de substâncias puras obtidas por métodos físicos; a terceira são substâncias aromatizantes “idênticas às naturais”, porém obtidas por síntese química ou através de reações químicas desde a matéria-prima; e a última são substâncias aromatizantes artificiais que são compostos químicos sintéticos, as quais não foram identificadas como componente natural de um alimento (HERRÁIZ, 1990; HEATH & REINECCIUS, 1986).

Durante muito tempo, as plantas foram a única fonte de compostos de aroma e a maioria destes aromas foram isolados de óleos essenciais (KEMPLER, 1983; JANSSENS et al., 1992). Entretanto, os componentes ativos sensorialmente estão freqüentemente presentes em pequenas quantidades ou então ligados a outras substâncias, o que acarreta uma redução no suprimento de matéria-prima e gastos com isolamento. Outra desvantagem da extração de compostos aromatizantes de plantas é a forte dependência de fatores que dificultam o controle do produto, tais como a influência do tempo, clima, solo e o risco de doenças. Todos estes fatores influem diretamente na variabilidade, na quantidade e na qualidade do produto final (JANSSENS et al. 1992; ABRAHAM & BERGER, 1994; WELSH, 1995; CHRISTEN & LOPEZ-MUNGUÍA, 1994 e KRINGS et al., 1995).

O uso de microrganismos pode oferecer um método alternativo para a produção de aromas e fragrâncias naturais (SCHARPF et al., 1986), pois apresentam possibilidades para produção rápida e controlada dos compostos, além de apresentarem um sistema simples de estudo das vias biossintéticas, que estão envolvidas na formação de compostos voláteis (KEMPLER, 1983). Utilizam matéria-prima de baixo custo e de fácil aquisição para produção de substâncias que podem ser aplicadas em diversas indústrias, principalmente na indústria alimentícia.

Os compostos voláteis podem ser formados a partir de diferentes vias metabólicas de lipídios. Estas vias incluem a β -oxidação, clivagem de hidróxiácidos (lactonas) e

oxidação por enzimas lipoxigenases. Enquanto os produtos primários são aldeídos e cetonas, várias oxidações, reduções e esterificações também fornecem quantidades substanciais de ácidos, álcoois, lactonas e ésteres (HEATH & REINECCIUS, 1986; TRESSL & ALBRECHT, 1986).

Em geral, compostos voláteis são metabólitos secundários, isto é, são substâncias produzidas pelo microrganismo, mas que não são essenciais para o seu metabolismo (ABRAHAM et al., 1993; JIANG, 1995). Os ésteres formados por fungos e leveduras são exemplos de metabólitos secundários. A produção de ésteres seria o mecanismo responsável pela remoção de ácidos e álcoois da célula e do meio, pois, se houvesse um acúmulo destes compostos, poderia ser tóxico para a célula (SCHARPF et al., 1986; LATRASSE & DAMERON, 1988).

Há grupos de compostos de aromas, de importância industrial, tais como: terpenos, lactonas, pirazinas, ésteres, ácidos, álcoois, etc. A Tabela 1 indica exemplos de aromas produzidos por microrganismos e seus constituintes químicos.

Os terpenos são freqüentemente os mais importantes componentes responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais. A grande maioria dos terpenos são produzidos por fungos e pertencem aos Ascomicetos e Basidiomicetos. Estes fungos são adequados aos processos biotecnológicos devido ao fato de crescerem tanto em meios sólidos como em meios líquidos, ambos de composição simples. Assim, representam uma alternativa às tradicionais fontes vegetais, alguns exemplos seriam os gêneros: *Ceratocystis*, *Bjerkandera*, *Ishnoderma* (JANSSENS et al., 1992).

As lactonas estão associadas aos aromas de frutas, manteiga, doce ou nozes (TRESSL & ALBRECHT, 1986). A maioria das lactonas são produzidas quimicamente, mas o uso de microrganismos pode ter grandes vantagens quando comparado à síntese química (GATFIELD, 1995). O *Trichoderma viride* é um fungo de solo que, quando inoculado em um meio simples de crescimento, gera um aroma característico de coco. Isto se deve à presença de 6-pentil-2-pirona, cuja concentração é de 170 mg/L. Já a levedura *Sporobolomyces odoros*, também conhecida por *Sporidiobolus salmonicolor*, produz 1 a 6 mg/L de 4-decalactona, resultando em um aroma intenso de pêssego. O fungo

Tyromyces sambuceus também é capaz de produzir 4-decalactona (TAHARA & MIZUTANI, 1975; JANSSENS et al., 1992).

Tabela 1. Exemplos de aromas produzidos por microrganismos e seus constituintes químicos.

Microrganismos	Descrição sensorial	Voláteis produzidos
Bactérias		
<i>Streptococcus</i> sp.	ácido, manteiga	acetaldeído, diacetil, acetoína
<i>Lactobacillus</i> sp.	ácido, manteiga	acetaldeído, diacetil, ácido láctico
<i>Propionibacterium</i> sp.	azedo, ácido	acetoína, aldeídos
Leveduras		
<i>Saccharomyces</i> sp.	pão, fermentação alcoólica	lactonas, álcoois, tiocompostos
<i>Geotrichum</i> sp.	melão	etil ésteres, álcoois,
<i>Sporobolomyces</i> sp.	pêssego	lactonas
<i>Hansenula</i> sp.	floral, odor de solo	etil ésteres
<i>Kluyveromyces</i> sp.	frutas, rosas	feniletanol, ésteres, terpenos
Fungos		
<i>Aspergillus</i> sp.	cogumelo	álcoois insaturados
<i>Penicillium</i> sp.	cogumelo	2-fenil-etanol, metilcetonas
<i>Ceratocystis</i> sp.	banana, pêsego, ameixa, pêra	álcoois, lactonas, ésteres

Fonte: WELSH (1995).

As pirazinas são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio. Conferem aromas típicos de alimentos aquecidos, tostados, normalmente formados na reação de Maillard (LU et al., 1996). Poucos microrganismos são capazes de sintetizar estes compostos (JANSSENS et al., 1992). Um mutante de *Corynebacterium glutamicum* é capaz de converter certos aminoácidos, incluindo leucina, isoleucina e valina, em quantidades importantes de tetrametilpirazina, produzindo 3 g/L em 5 dias de fermentação (GATFIELD, 1988).

Entre os compostos mais importantes na indústria de aromas de alimentos destacam-se os ésteres, que conferem diversos aromas de flores e frutas e conferem aroma a alimentos fermentados. Várias leveduras do gênero *Saccharomyces* e *Hansenula* produzem acetato de etila a partir de glicose ou de etanol. A *Saccharomyces* sp. produz baixas concentrações de acetato de etila, enquanto *Hansenula* produz quantidades significativas de éster. A *Candida utilis* também produz quantidades consideráveis de acetato de etila a partir de glicose (ARMSTRONG, 1986).

Os ésteres são compostos importantes de aromas de frutas e nelas estão presentes em baixas concentrações, em torno de 1 a 100 ppm. Alguns microrganismos são capazes de converter 3-metilbutil a 3-metilbutirato, que resulta em um aroma de maçã. Já a formação de “off-flavors” em leites pasteurizados e queijos, é devido à produção de butirato de etila e hexanoato de etila por certas bactérias ácido-lácticas e espécies de *Pseudomonas* (JANSSENS et al, 1992). A levedura *Hansenula mrakii* converte álcoois em seus acetatos correspondentes, com um alto rendimento (mais de 90 % para 3-metil-butil-acetato) (GATFIELD, 1988; WELSH, 1995).

A produção de ácidos via microrganismos é importante para o aroma de muitos alimentos fermentados. Um ácido produzido por microrganismos que merece destaque é o ácido láctico. O ácido láctico é opticamente ativo e pode existir na forma L, D ou em uma mistura racêmica (opticamente inativa), dependendo apenas do microrganismo envolvido na sua síntese (HEATH & REINECCIUS, 1986; ALBERTAZZI et al., 1994).

Outros ácidos também podem ser formados durante a fermentação. A maioria dos microrganismos possui lipases que atacam os triglicerídeos, formando glicerol, monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres. Os ácidos podem também ser derivados da desaminação de aminoácidos. Os produtos são ácidos de cadeia alifática e ácidos aromáticos (HEATH & REINECCIUS, 1986).

Os álcoois têm a menor contribuição no aroma, a menos que estejam presentes em concentrações relativamente altas (ppm) ou sejam principalmente os insaturados, como é o caso do 1-octen-3-ol. Os álcoois podem surgir da via metabólica primária de um microrganismo ou pela redução de um composto carbonila em seu álcool correspondente (HEATH & REINECCIUS, 1986).

A produção de álcoois a partir de aminoácidos pode ocorrer pela transaminação, descarboxilação e redução ou pela desaminação oxidativa seguida de descarboxilação e redução. Em qualquer que seja a via metabólica, o produto será sempre o aminoácido com um carbono a menos e sem o grupo amina (HEATH & REINECCIUS, 1986).

As cetonas são compostos importantes no aroma de “blue-cheese”, nos quais as cetonas do tipo 2-alcanonas são responsáveis pelo aroma e sabor típicos do queijo Roquefort. As 2-alcanonas podem ser formadas via bioconversão de gorduras, óleos ou ácidos graxos específicos por *Penicillium roquefortii* e alguns outros microrganismos. As lipases do *Penicillium* liberam primeiramente os ácidos graxos, que sofrem β -oxidação e descarboxilação, chegando a uma 2-alcanona com um átomo de carbono a menos que o ácido graxo original. Os concentrados resultantes podem ser usados, por exemplo, em produtos de queijos, nos quais o aroma foi perdido durante o processamento térmico. Outras aplicações são em biscoitos, sopas e caldos.

A produção destes voláteis varia em função de fatores químicos, físicos e biológicos. As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aromas produzidos, além da linhagem do microrganismo (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984; ARMSTRONG & BROWN, 1994; GATFIELD, 1988; SCHARPF et al., 1992; JANSSENS et al., 1992; WELSH, 1995). Estas variáveis podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos que influenciam nos tipos e quantidades dos produtos formados pelos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984). Por exemplo, o *Ceratocystis moniliformis* pode produzir aroma de banana, citros e pêssego. O aroma produzido depende das fontes de carbono e nitrogênio usadas na composição do meio de cultura e é produzido apenas após a depleção da fonte de nitrogênio. Após 5 dias de fermentação obtiveram-se 50 μ g de monoterpenos por miligrama de cultura. O rendimento foi aumentado com a elevação da temperatura e usando altas concentrações de asparagina como fonte de nitrogênio (WELSH, 1995).

1.2. Microrganismos produtores de aromas

Os primeiros relatos de microrganismos produtores de aromas datam de 1970, onde TAHARA et al. (1975) avaliaram a produção de aromas por *Sporobolomyces odorus*. Os compostos identificados foram: metanol, etanol, isobutílico, n-butílico, isoamílico, n-amílico, benzílico, feniletílico, formaldeído, acetaldeído, benzaldeído, fenil-acetaldeído, acetona, metil-etil-cetona, formiato de etila, acetato de etila, di-n-butil ftalato, γ -decalactona, ácido 4-hidroxi-cis-6-dodecanóico e γ -lactona. LANZA et al. (1976) verificaram que o microrganismo *Ceratocystis moniliformis*, produzia compostos de aroma com característica frutal. DRAWERT & BARTON (1978) relataram o processo de biossíntese de monoterpenos (citronelol, linalol e geraniol) a partir de glicose, pela levedura *Kluyveromyces lactis*.

SARRIS & LATRASSE (1985) cultivaram o fungo *Fusarium poae* em caldo de malte e identificaram a presença de um forte odor de frutas. O aroma predominante de pêssego em calda foi identificado como sendo do composto cis-6-dodecen-4-olide, sendo a mais abundante lactona presente no meio, com uma quantidade de 2,0 mg/L.

JANSSENS et al. (1988) estudaram a produção de ésteres por *Geotrichum penicillatum*. Foram identificados os seguintes componentes: acetato de propila, crotoato de etila, propionato de isobutila, valerato de etila, butirato de isobutila, isohexanoato de etila, propionato de isopentila, hexanoato de etila e β -fenil etil acetato. A produção dos diferentes ésteres ocorreu em momentos diferentes do crescimento do microrganismo. Os acetatos foram formados após 57 horas de fermentação, propionato de butirato após 75 horas, isobutirato após 87 horas e posteriormente a síntese de isovalerato. A alta produtividade e especificidade dos ésteres produzidos dependeram do tipo de fonte de nitrogênio e da adição de precursores.

LATRASSE & DAMERON (1988) estudaram a produção de ésteres pelo microrganismo *Geotrichum candidum* mutante (Staron). Quando este microrganismo cresceu em meio de cultura contendo glicerol, uréia, L-asparagina, ácido úrico ou alantoína foi produzido um forte aroma de frutas semelhante ao aroma de marmelo. A análise de voláteis revelou a presença de álcoois e ésteres, sendo que os ésteres responsáveis pelo

aroma de frutas predominante foram derivados de ácidos graxos de cadeia pequena, como propanóico, butanóico e 2-metil butanóico. Através de análise sensorial pelo “sniffing”, no cromatógrafo gasoso, foi verificado que o aroma de marmelo foi sentido durante a eluição de isobutanoato de etila. Além dos ésteres foram identificados os álcoois 2-metil butanol, isobutanol e 2-fenil etanol. As concentrações da maioria dos compostos voláteis foram inferiores a 1 ppm.

YOSHIZAWA et al. (1988) verificaram a produção de aroma agradável de frutas (pêssego, pêra ou maçã) por *Neurospora* sp (ATCC 46892), com predominância do composto hexanoato de etila, e também a presença de 3-metil-1-butanol e acetoína. Na análise quantitativa, foi encontrado mais do que 30 ppm de hexanoato de etila, durante 3 a 4 dias de fermentação, em meio contendo extrato de malte.

YAMAUCHI et al. (1991) estudaram a produção de aroma por várias linhagens de *Neurospora*. Todas as linhagens estudadas tiveram um bom crescimento em caldo de malte. As linhagens de *Neurospora* sp. e *Neurospora sitophila* (IFO 4596) produziram aroma característico de frutas. As linhagens de *Neurospora* (ATCC 46892) produziram cerca de 39 ppm de caproato de etila (responsável pelo aroma de frutas), enquanto que a linhagem de *Neurospora* sp. produziu 15 ppm do referido éster. As linhagens produziram quantidades significativas de álcool isoamílico e acetoína. As linhagens *Neurospora* sp. e *Neurospora sitophila* (IFO 4596) apresentaram 1,65 e 20,1 ppm de 1-octen-3-ol, substância responsável pelo aroma de cogumelo dentre outros compostos.

PASTORE et al. (1994), através de isolamento de linhagens de leveduras obtidas de pólen de flor, frutas maduras e plantas, isolaram uma linhagem de *Geotrichum* sp. de mamão. Após dois dias de incubação, a 30 °C, foi verificada a presença de aroma que se assemelha ao de maçã e morango através de testes sensoriais. O total de compostos encontrados foi de 22, sendo que os de maior concentração foram identificados como: acetato de etila, 2-propanol, propionato de etila, butirato de etila, 2-metil-1-propanol, isovalerato de etila, 3-metil-1-butanol e hexanoato de etila.

FABRE et al. (1995) cultivaram *Kluyveromyces marxianus* em um meio definido e verificaram a formação de um forte aroma de banana, que provavelmente seja devido à produção de acetato de isoamila. Os resultados revelaram que a biossíntese de ésteres

ocorrem após 70 horas de fermentação. Em outras culturas de *K. lactis*, os compostos predominantes foram: álcool isoamílico, álcool 2-fenil etílico e ácido isobutírico, com 180 mg/L, 400 mg/L e 290 mg/L, respectivamente.

JIANG (1995), durante estudos dos voláteis produzidos por *K. lactis* em meio líquido sob agitação, identificou os seguintes compostos predominantes: álcool isoamílico, álcool 2-fenil etílico, 2-3-butanodiol, 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), 2-feniletil acetato, isobutanol e 2-feniletil isobutirato. Verificou também que os voláteis aumentam com o aumento da biomassa, indicando que o metabolismo secundário pode ter começado no estágio inicial do crescimento.

LEE et al. (1995) avaliaram o efeito do pH, aeração e da fermentação em batelada alimentada do hidrolisado do óleo de mamona (0,06 % de ácido ricinoléico) na produção de gama-decalactona por *Sporobolomyces odorus*. O pH (4,0 a 7,0) não apresentou efeito na produção, porém foi observado aumento significativo quando a aeração manteve-se na faixa de 1,0 a 1,5 vvm. A produção máxima de gama-decalactona foi observada quando se efetuou adição do substrato no 3, 4 e 5 dias de cultivo, resultando em 208 mg/L após 168 horas de fermentação. LEE et al. (1999) verificaram a influência de células imobilizadas de *Sporobolomyces odorus*, com alginato de cálcio, na produção de gama-decalactona. As células imobilizadas mostraram maior tolerância a variações de pH do meio de fermentação e a produção foi superior quando comparada às células não imobilizadas, com concentração de 114,7 mg/L e 62,2 mg/L, respectivamente. A produção de gama-decalactona no 13º ciclo de reaproveitamento das células foi cerca de 58,4 % inferior ao primeiro ciclo de fermentação.

LIN et al. (1996) avaliaram o efeito da adição de ácidos graxos (palmítico, esteárico, linoléico e ricinoléico) na produção de gama-decalactona por *Sporobolomyces odorus*. A suplementação com 0,06% de ácido ricinoléico, produziu efeito positivo na produção de gama-decalactona, sendo que após 216 horas de cultivo a concentração foi de 135,4 mg/L.

BRAMORSKI et al. (1997) estudaram a produção de metabólitos voláteis durante o cultivo de *Rhizopus oryzae* em diferentes substratos sólidos agroindustriais com bagaço de mandioca, farinha de soja, bagaço de maçã e amaranto, identificaram os seguintes

compostos: etanol, acetato de etila, acetaldeído, etil propionato e 3-metil butanol, sendo o etanol o composto encontrado em maior concentração no “headspace” de todos os cultivos (80 %). A maior produção de voláteis foi conseguida com o cultivo em amaranto adicionado de solução de sais minerais, obtendo-se 282,8 μmol equivalente de etanol/L.

MEDEIROS (1998) estudou a produção de compostos voláteis aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido, utilizando bagaço de mandioca e farelo de palma forrageira como substrato. Foram identificados nove compostos entre os quais etanol, acetaldeído, acetato de etila e acetato isoamila. A maior concentração foi de 800 $\mu\text{mol/L}$, em experimentos com bagaço de mandioca sem aeração.

MARQUES (1998) realizou estudo da produção e caracterização de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens*. Os principais compostos produzidos foram: acetato de etila, isobutanol, 1-butanol, propanoato de etila, álcool isoamílico, álcool n-amílico, acetato de isoamila, acetato de n-butila, caproato de etila e álcool feniletílico. O maior concentração foi 46,07 g/L de acetato de etila, na temperatura de 30 °C, após 96 horas de fermentação, no meio de cultura composto de glicose e autolisado de levedura.

NETO & PASTORE (2001) selecionaram microrganismos produtores de gama-decalactona, utilizando o óleo de mamona (composto por 80 % de ácido ricinoléico), hidrolisado pela lipase de *Alcaigenes* sp, como precursor na produção de gama-decalactona em meio de cultivo submerso. Duas linhagens identificadas como *Geotrichum* sp e *Geotrichum fragrans* foram selecionadas como produtoras de gama-decalactona, apresentando produção máxima de 370 mg/L e 650 mg/L, respectivamente, em meio de cultura composto de óleo hidrolisado de mamona, na concentração de 5 %, 1 % de glicose e 1 % de autolisado de levedura, em 96 horas de cultivo à 200 rpm e temperatura de 30 °C em pH de 6,0.

WENDHAUSEN et al. (2001) selecionaram microrganismos do gênero *Candida* (*Candida oleophila* e *Candida guilliermondii*) para a produção de gama-decalactona. O meio de biotransformação era composto de ácido ricinoléico (5 g/L) e extrato de carne (20 g/L). Apenas a levedura *Cândida guilliermondii* mostrou consumo de ácido ricinoléico com a formação de um fermentado com aroma de frutas.

1.3. Análise e Recuperação de Compostos Voláteis

Na etapa de preparação de amostras de aromas gerados biotecnologicamente, há a interferência de alguns fatores como o teor de voláteis, complexidade dos aromas, diferença de volatilidade entre os compostos e a instabilidade térmica dos mesmos. Sendo o teor de voláteis freqüentemente baixo, na ordem de partes por milhão (mg/kg), há a necessidade de não somente isolá-lo, mas de concentrá-lo. Outro fator importante é a complexidade dos aromas que incluem compostos de polaridades bastantes distintas e variação de volatilidade, o que exige técnicas diferenciadas para cada faixa de volatilidade (MEDEIROS, 1998).

Para recuperar e concentrar os voláteis produzidos, vários métodos têm sido sugeridos para a remoção seletiva destes compostos do meio de fermentação, como evaporação a vácuo (CYSEWSKI & WILKE, 1977), extração por solvente (MINIER, 1982), processo de separação com membranas (DI LUCCIO, 2001) e adsorção em fibras poliméricas, tais como a técnica de microextração em fase sólida (PAWLISZYN, 1999).

O método de microextração em fase sólida (SPME) consiste de dois processos básicos, a partição dos analitos entre uma fase estacionária e a fase aquosa ou *headspace* da amostra e dessorção dos analitos em um instrumento analítico. O instrumento utilizado para a extração é formado por um "holder" (suporte), um êmbolo e uma agulha de aço. Quando o êmbolo é deslocado para baixo, uma haste metálica que se encontra dentro da agulha é exposta. A extremidade desta haste metálica apresenta um segmento, de aproximadamente um centímetro, de sílica fundida. Este segmento de sílica é recoberto por um filme polimérico que irá fazer a extração dos analitos no *headspace* ou na fase líquida da amostra. A extração também pode ser feita com amostras gasosas (ZELDA, 1996).

As características da fibra extratora (conjunto da fibra e do filme polimérico), tais como espessura e polaridade do filme polimérico devem ser escolhidas de acordo com as características dos analitos a serem extraídos. Após a extração, a fibra extratora é transferida diretamente para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos sofrem dessorção térmica e podem ser subsequenteemente analisados qualitativos e/ou quantitativamente. Neste método, o uso de solventes orgânicos, tão comuns em todos os

outros processos de enriquecimento de amostras, é totalmente dispensável (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994).

As fases estacionárias utilizadas em SPME podem ser adaptadas de acordo com os analitos a serem extraídos. Por exemplo, para compostos orgânicos polares, são utilizadas fases estacionárias polares tais como poliacrilato e carbowax. Por outro lado, a fase estacionária de polidimetilsiloxano (PDMS) é muito eficiente na retenção de compostos apolares ou de baixa polaridade (ZHANG & PAWLISZYN, 1993).

O método de SPME, apesar de ser relativamente novo, vem sendo amplamente utilizado na análise de compostos fenólicos (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994), componentes responsáveis pelo aroma de frutas (IBÁÑEZ et al., 1998), sucos (KATAOKA et al., 2000) e queijo parmesão (2003), voláteis de plantas (CAI et al., 2001; ZINI, 2002) e na análise de pesticidas organofosforados em águas (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

Na literatura, rara são as informações e trabalhos que utilizam essa técnica para identificação de compostos de aromas produzidos por fermentação. GARCIA et al. (1996) empregaram a técnica de SPME, onde avaliaram as condições de adsorção (volume de amostra, tempo, agitação, temperatura, concentração de sal e pH) e de dessorção térmica da fibra poliacrilato (PA – 85 μm), no sentido de maximizar a recuperação dos compostos voláteis (linalol, α -terpeniol, citrionelol, nerol, geraniol) de amostras de vinho. O máximo de extração dos compostos foi obtido com o tempo de extração de 15 min, 1500 rpm, a 60 °C, pH 4,0 e utilizando solução saturada de NaCl. A completa dessorção térmica no injetor do cromatógrafo gasoso ocorreu a 300 °C e por um período de 2,5 min.

GARCIA et al. (1997) realizaram estudo comparativo de diferentes fibras poliméricas (polidimetilsiloxano - PDMS 7, 30 e 100 μm ; poliacrilato – PA, 85 μm e carbowax - CW/DVB, 65 μm) na adsorção de compostos voláteis de amostras de vinho. Com a fibra PA (85 μm) foi possível extrair e identificar por CG/MS 89 compostos, sendo 60 % de álcoois, 22 % de ácidos, 9 % de ésteres, 4 % de terpenos e 5 % de outros compostos. A fibra PDMS (100 μm) foi mais adequada para extração de ésteres e a CW/DVB (65 μm) para ácidos.

MARTINS et al. (2003) avaliaram a bioprodução de 6-pentil- α -pirona por *Thichoderma harzianum* e extraíram a lactona no *headspace* mediante técnica de microextração em fase sólida (PDMS – 100 μ m). Os resultados foram satisfatórios e quando comparado a técnicas de extração com solvente, a quantidade extraída foi duas vezes superior em meio fermentado líquido (submersa) e de 14 vezes superior em amostras de fermentação semi-sólida.

2. CAROTENÓIDES

2.1. Estrutura

Os carotenóides têm a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. Este esqueleto básico pode ser modificado através de várias maneiras, como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação. Os carotenóides hidrocarbonetos são chamados de carotenos e os derivados oxigenados, de xantofilas. O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (PFANDER, 1987; OLIVIER & PALOU, 2000).

A Figura 1 apresenta a estrutura dos principais carotenóides.

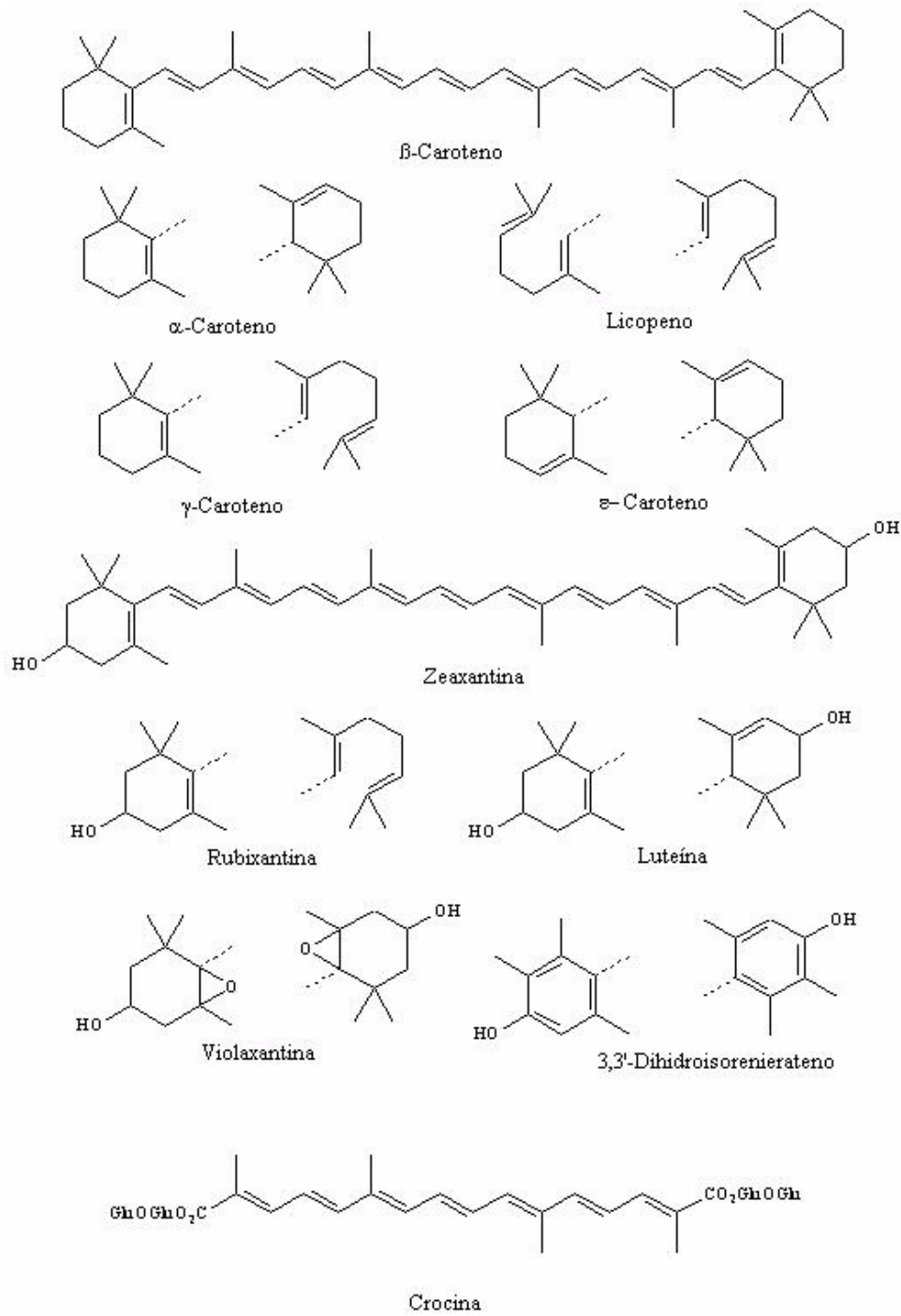


Figura 1. Estrutura dos carotenóides (RATLEDGE & EVANS,1989).

2.2. Biossíntese

A Figura 2 apresenta a biossíntese dos carotenóides (C₄₀) de leveduras.

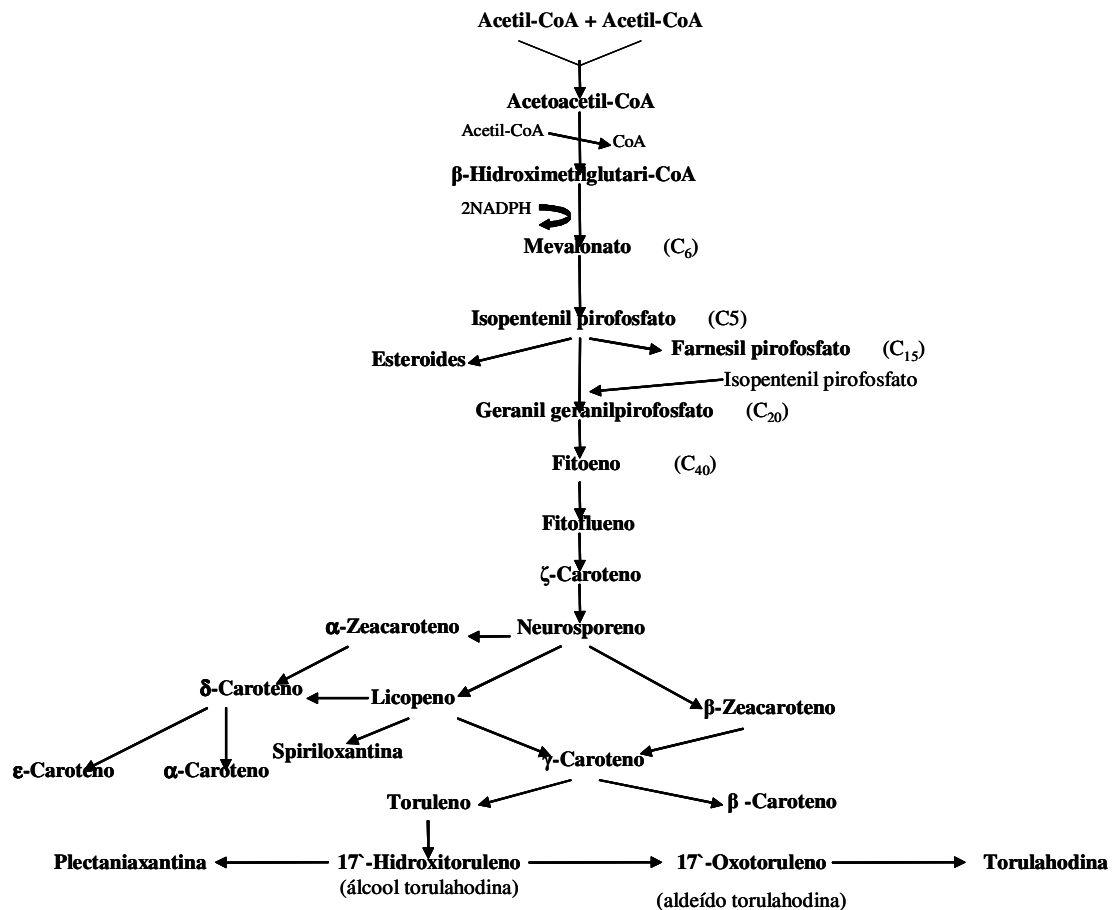


Figura 2. Biossíntese dos carotenóides (C₄₀) de leveduras (RATLEDGE & EVANS, 1989).

Os carotenóides são um grupo de pigmentos contendo unidades repetidas e ramificadas de C₅. A biossíntese encontra-se demonstrada na Figura 2, onde observa-se três estágios distintos: síntese terpenóide básico C₅; síntese de compostos C₄₀, a partir dos intermediários terpenícos; transformação do C₄₀ para formação dos diversos carotenóides. Os estágios iniciais da síntese de carotenóides seguem vias comuns da biossíntese de esteróides. Intermediários como Acetoacetyl-CoA, mevalonato, isopentenil pirofosfato,

geranylgeranylpirofosfato e farnesil pirofosfato, tem sido relacionados com a formação de carotenóides com base em diversos estudos (RATLEDGE & EVANS, 1989).

A primeira etapa da biossíntese dos carotenóides envolve a formação de geranylgeranyl pirofosfato e na sua conversão em fitoeno, através da ação da enzima fitoeno sintetase. Este primeiro caroteno não apresenta coloração. Através de uma série de desidrogenações, outros carotenos são formados, ou seja, com quatro desidrogenações resultam na formação do licopeno e a formação de anéis β nas extremidades da estrutura ocasiona a formação do β -caroteno (JOHNSON et al., 1979).

2.3. Propriedades e funções dos carotenóides

Alguns carotenóides apresentam funções biológicas como a atividade pró-vitamínica A, que é fornecida através da dieta como vitamina A pré-formada, provenientes de alimentos de origem animal (fígado, ovos, peixes, leites e carnes) ou como carotenóides que podem ser biologicamente transformados em vitamina A, geralmente provenientes de alimentos vegetais. Estima-se que 60 % da vitamina A da dieta provenha das pró-vitaminas A (SIMPSON et al., 1971).

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corante, com os objetivos de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Mais recentemente, com o crescente interesse pela saúde, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido a suas atividades biológicas (anticarcinogênico, imunomoduladores, antioxidante, pró-vitamina A), a fim de enriquecer o produto alimentar (SIMPSON et al., 1971). São também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores, coloração específica e fotoproteção (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000).

Nas indústrias de ração, esses pigmentos também são utilizados como corante, destacando-se o uso de astaxantina na criação de salmões e de camarões. A presença de

pequenas quantidades de carotenóides pode ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos, seqüestrando oxigênio singlete (SCHROEDER & JOHNSON, 1995).

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e na atividade pró-vitamínica. São também suscetíveis as oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, reação esta que depende da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, prooxidantes e antioxidantes, alta temperatura, exposição à luz (SCHROEDER & JOHNSON, 1995).

2.4. Aspectos industriais da produção de carotenóides

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com cerca de 600 estruturas caracterizadas, sendo identificados de várias fontes, somente 40 são encontrados em alimentos e alguns destes são utilizados industrialmente como corantes ou substâncias bioativas em rações, cosméticos, alimentos e fármacos (JOHNSON & SCHROEDER, 1995). Estes compostos estão presentes em todos os organismos fotossintetizantes e são responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho de frutas e flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000; MARASCO & SCHMIDT-DANNERT, 2003).

Os carotenóides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas ou algas. Porém, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos e, muitas patentes têm sido registradas nos últimos anos. Comercialmente, os carotenóides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões para 2005 (FRASER & BRAMLEY, 2004) e são considerados precursores de fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000), coloração específica e fotoproteção (MARASCO & SCHMIDT-DANNERT, 2003). A produção de carotenóides por microrganismos também se deve ao crescente mercado da psicultura, sendo que a astaxantina é o pigmento

mais importante para o cultivo de salmão e crustáceo. O mercado mundial de carotenóides para piscicultura apresentou demanda de US\$ 20 bilhões/ano durante a década de 1990 (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

2.5. Microrganismos produtores de carotenóides

Os carotenóides podem ser biossintetizados por microrganismos fotossintetizantes, como por exemplo as algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por microrganismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

A produção de carotenóides pelo processo biotecnológico têm sido investigada, destacando-se a produção comercial de β -caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (FEOFILOVA, 1994) e pelas microalgas marinhas *Dunaliella* (BOROWITZKA et al., 1989), a produção de astaxantina ((3S,3'S)-3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) pela microalga de água doce *Haematococcus* sp e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON & SCHROEDER, 1995). Na Tabela 2 estão apresentados os microrganismos tecnologicamente interessantes com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenóides.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são conhecidas como produtoras de carotenóides, com concentrações variando de 10 a 100 $\mu\text{g/g}$ de biomassa seca (HARI et al., 1992; DE MIGUEL et al., 1997). FRENGOVA et al. (1995), estudaram a co-fermentação por *Rhodotorula glutinis* 22P e *Lactobacillus helveticus* 12A, obtendo rendimento em carotenóides na ordem de 8,4 mg/L. Os carotenóides principais identificados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) foram β -caroteno, toruleno e torulahodina.

Tabela 2. Microrganismos produtores de carotenóides

Espécies	Carotenóides principais
1. Cianobactéria	
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina
2. Algas	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	luteína ((3R,3'R, 6'R)- β , ϵ -caroteno-3,3'-diol)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
3. Fungos e leveduras	
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e licopeno
<i>Rhodotorula</i> sp	toruleno e β -caroteno
<i>Rhodospiridium</i> sp	toruleno e β -caroteno
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína
<i>Rhodotorula glutinis</i>	toruleno e torulahodina (3',4'-dideidro- β , Ψ -caroten-16'-oico)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	astaxantina
<i>Sporobolomyces</i>	β -caroteno e toruleno
<i>Sporidiobolus</i> sp*	Toruleno, torulahodina e β -caroteno

Fonte: MALDONADE (2003); * RATLEDGE & EVANS (1989).

2.6. Fatores que afetam a produção de carotenóides

Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, tais como temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (HAYMAN et al., 1974). FANG & CHIOU (1993) verificaram que os valores máximos de carotenóides totais não estão diretamente correlacionados aos valores máximos de biomassa celular, sendo que a máxima produção de carotenóides observada ocorreu depois de 35 horas de fermentação, enquanto o crescimento celular máximo ocorreu após 25 horas.

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenóides. De acordo com BUZZINI & MARTINI (2000), o uso de glicose levou a maiores rendimentos na produção específica de carotenóides (1.000 µg/g) por *Rhodotorula* sp. SUTHERLAND et al. (1996) verificaram que concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. YAMANE et al. (1997) observaram que houve um aumento de até 12 vezes na produção de β-caroteno quando *P. rhodozyma* cresceu em meio com 5 % (p/v) de açúcar.

HAARD (1988) otimizou a produção de astaxantina utilizando melão (1 % de glicose), sendo que a concentração do carotenóide foi de 552 µg/g de biomassa seca de levedura e de 379 µg/g quando se utilizou L-arabinose. O aumento no teor de glicose para 4 % (p/v), resultou numa diminuição no teor de astaxantina.

FRENGOVA et al. (1994) estudaram a produção de carotenóides por *R. glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, em escala piloto. O meio de fermentação foi composto de ultrafiltrado de soro de leite, com concentração de lactose variando de 3,9 a 7,1 % (p/v). A máxima produção de carotenóides obtida foi de 268 µg/g de células secas, no meio contendo 3,9 % (p/v) de fonte de carbono. Os autores observaram que a produção de carotenóides foi paralela ao crescimento celular, porém, a produção máxima de células e a máxima concentração de pigmentos não ocorreram simultaneamente. A máxima concentração de carotenóides ocorreu quando o crescimento celular já havia cessado. Os principais carotenóides identificados foram β-caroteno (43,9 µg/g), toruleno (23,0 µg/g) e torulahodina (182 µg/g)

Fontes de nitrogênio também afetam o crescimento e a pigmentação em *Phaffia rhodozyma*. A peptona foi considerada melhor fonte de nitrogênio para pigmentação, entretanto, estudos relataram que o uso do extrato de leveduras como fonte de nitrogênio aumentou a concentração de carotenóides totais (MEYER & PREEZ, 1994). Resultados similares foram obtidos por CALO et al. (1995), que observaram o aumento de duas vezes na concentração de astaxantina quando foi empregado extrato de levedura.

AN et al. (1991) observaram que a fonte de nitrogênio é lentamente absorvida pelas linhagens mutantes de *P. rhodozyma*, indicando que a biossíntese de astaxantina pode ser

regulada pelo teor de nitrogênio e GIL-HWAN et al. (1996) obtiveram maiores rendimentos na produção de astaxantina quando sais de fosfato foram adicionados ao meio de fermentação de *P. rhodozyma*.

HAYMAN et al. (1995) estudaram o crescimento de *P. rhodozyma*, utilizando farelo de milho como fonte de nitrogênio. Os ensaios foram realizados em meio YM com e sem farelo de milho, 20 °C, 300 rpm por 72 horas. A concentração total de carotenóides foi de 2,4 µg/mL e de 2,1 µg/mL quando se utilizou meio com e sem farelo, respectivamente.

MALDONADE (2003) verificou que, para *Rhodotorula muciliginosa*-137, o extrato de levedura foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, enquanto que os sais de sulfato e fosfato tiveram efeito negativo, sendo que a máxima concentração de carotenóides foi de 745 µg/L, quando utilizou-se 15 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de glicose. Para a linhagem *R. glutinis*, a máxima concentração de carotenóides obtida foi de 1.269 µg/L, com 4 g/L de extrato de levedura, 17 g/L de glicose e pH inicial 4,0.

A temperatura e o pH exercem influência no crescimento microbiano, metabolismo e na viabilidade celular. JOHNSON & GIL-HWAN (1991) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não são as mesmas para o crescimento celular. O pH ótimo de crescimento para *P. rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0.

FANG & CHIOU (1993) verificaram a influência do pH, temperatura e concentração de substrato na fermentação de *P. rhodozyma*. A temperatura ótima de crescimento celular foi de 15 °C em pH inicial de 5,0, obtendo-se 4,9 g/L de massa celular. Também foi neste valor de pH, que obtiveram os maiores valores de rendimento celular ($Y_{x/s}$) e de astaxantina ($Y_{p/s}$), com 1,9 mg/g de células secas e 574,3 µg/g de açúcar consumido. Entretanto, JOHNSON & GIL-HWAN (1991) haviam reportado que a temperatura ótima de crescimento e de produção de astaxantina por *P. rhodozyma* foi de 20 a 22 °C.

SHIH & HANG (1996) observaram que em pH baixos, na faixa de 3,4 a 4,5, houve inibição do crescimento celular e da produção de carotenóides por *R. rubra*, sendo que a máxima concentração celular e produção foram obtidas em pH inicial de 5,0.

FRENGOVA et al. (1995) verificaram que a concentração relativa de cada carotenóide foi alterada pela temperatura de fermentação. Quando *R. glutinis* foi cultivada em 5 °C, ocorreu a produção predominante de β -caroteno, enquanto que o cultivo a 25 °C levou à síntese de toruleno e torulahodina. O crescimento celular ótimo foi obtido a 30 °C. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenóides foi de 8,4 mg/L e de 31,9 g/L de células.

MARTIN et al. (1993) determinaram os parâmetros de crescimento e produção de carotenóides por *R. rubra*, sendo que as condições ótimas de crescimento foram com 15 g/L de glicose, 22 °C e 200 rpm, durante 4 dias de cultivo para obtenção de 4,8 g/L de biomassa seca.

O efeito da iluminação durante o processo de fermentação parece variar de acordo com a espécie de levedura. Embora a síntese de carotenóides seja estimulada pela luz, estudos realizados por JOHNSON et al. (1979) revelaram que a intensidade luminosa não influenciou a pigmentação das células de *P. rhodozyma*. Estudos realizados por AN & JOHNSON et al. (1990), utilizando alta intensidade luminosa, mostraram que a luz inibiu o crescimento celular e a formação de pigmentos, houve aumento da produção de β -zeacaroteno, indicando a presença de estresse celular. VÁSQUES & SANTOS (1998) verificaram que *P. rhodozyma*, quando cultivada sob iluminação, produziu astaxantina como principal carotenóide. Entretanto, quando esta levedura foi cultivada na ausência de luz, o carotenóide principal encontrado foi o HDCO (3-OH-3',4'-dideidro- β - Ψ -caroteno-4-ona), com concentração acima de 0,75 mg/L.

MALDONADE (2003) estudando a composição de carotenóides, das leveduras isoladas no Brasil e cultivadas em meio YM, 200 rpm, 25 °C por 5 dias, sem iluminação, encontrou concentrações de carotenóides totais de 881 μ g/L para *Rhodotorula glutinis*, 594 μ g/L para *R. graminis*-125, 590 μ g/L para *R. mucilaginosa*-137, 545 μ g/L para *R. mucilaginosa*-135, 168 μ g/L para *R. minuta* e 237 μ g/L para *Sporobolomyces* sp. Os principais pigmentos encontrados nestas linhagens foram toruleno e β -caroteno, sendo o β -caroteno predominante em *R. graminis*-125, *R. glutinis* e *Sporobolomyces* sp, enquanto que o toruleno foi o carotenóide principal de *R. mucilaginosa*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B.G.; KRINGS, U.; BERGER, R. G. Dynamic extraction, an efficient screening procedure for aroma producing basidiomycetes. **Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.** v.15, n.5/6, p. 178-181, 1993.

ABRAHAM, B.G.; BERGER, R. G. Higher fungi for generating aroma components through novel Biotechnologies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.42, n.10, p.2344-2348, 1994.

ALBERTAZZI, E.; CARDILLO, R.; SERVI, S.; ZUCCHI, G. Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. **Biotechnology Letters**, v. 16, n.5, p.491-496, 1994.

AN, GIL-HWAN; JOHNSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Microbiology and Serology**, v. 57, p. 191-202, 1990.

AN, GIL-HWAN; BIELICH, J.; AUERBACH, R.; JOHNSON, E. A. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. **Biotechnology**, v. 9, p. 70-73, 1991.

ARMSTRONG, D. W. Selective production of ethyl acetate by *Candida utilis*. **In: Biogenesis of Aromas**. Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p.254-265, 1986.

ARMSTRONG, D. W.; BROWN, L.A. Aliphatic, aromatic, and lactone compounds. **In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients**, edited by Alan Gabelman, 1994.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química nova**, v.24, n. 2, 2001.

BRAHAM, B.G.; BERGER, R. G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.42, n.10, p.2344-2348, 1994.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de compostos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agro-industriais.** Dissertação de Mestrado UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 1997.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β -Carotene production whit algae. **In:** Vandamme, J. E. (ed). *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, Elsevier Applied Science: New York, p. 15-26, 1898.

BUCHHOLZ, K. D.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Anal. Chem.*, v. 66, p. 160-167, 1994.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresearch Technology*, v. 71, p. 41-44, 2000.

CAI, J.; LIU, B.; SU, Q. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *Journal of Chromatography A*, v. 930, p.1-7, 2001.

CALO, P.; VELASQUEZ, J. B.; SIERO, C.; VILLA, T. Análisis of astaxanthin and other carotenoids from serval *Phaffia rhodozyma* mutants. *Journal of Agricultural Chemistry*, v. 43, p.1396-1399, 1995.

CHRISTEN, P.; LOPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymes and Food Flavor. A Review. *Food Biotechnology*, v.8, n.2 e 3, p. 167-190, 1994.

CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, p.1125-1143, 1977.

DE MIGUEL, T. J.; DIAZ, A.; VILLA, T. G. The genus *Rhodospiridium*: a potencial source of β -carotene. *Microbiology*, v. 9, p. 373-375, 1997.

DI LUCCIO, M. **Produção de etanol e frutose em processo fermentativo integrado a processos com membrana.** Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

DRAWERT, F.; BARTON, H. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms: production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 765-766, 1978.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 466-469, 1993.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p.175-181, 1996.

FEOFILOVA, G. I. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. **Applied Biochemical Bioengineering**, v. 30, p.143-153, 1994.

FABRE, C. E.; DUVIAU, V.J.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1207-1212, 1995.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, p.888-894, 1994.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1001-1006, 1995.

GATFIELD, I.L. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. **Food Technology**, p. 110-169, 1988.

GATFIELD, I.L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p. 5-14, 1995.

GARCIA, D.D.;REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 19. n. 4, p. 257-262, 1996.

GARCIA, D.D.;REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers. **Journal High Resol. Chromatogr.**, v. 20, n. 12, p. 665-668, 1997.

GIL-HWAN, AN; CJOI, E.; RHEE, S. Medium optimization for cultivation of carotenoids hyperproducing *Phaffia rhodozyma* mutant HT-5FOIC. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v.5, p.515-518, 1996.

HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeast on molasses. **Biotechnology Letter**, v. 10, p. 609-614, 1988.

HAMILTON-KEMP, T.R.; ARCHBOLD, D.D.; LOUGHRIN, J.H.; COLLINS, R.W.; BYERS, M.E. Metabolism of Natural Volatile Compounds by Strawberry Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.9, p.2802, 1996.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v.120, p. 1339-1343, 1974.

HAYMAN, E. P.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 389-395, 1995.

HARI, R. P. K.; PATEL, T.; MARTIN, A.M. Studies on a new strain of *Rhodotorula rubra* isolated from yogurt. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 43-51, 1992.

HEATH, H.B.; REINECCIUS, G. **Flavor Chemistry and Tecnology. Biogenesis of Flavor in Fruits and Vegetables**, New York, Published by Van Nostrand Reinhold Company, 1986.

HERRÁIZ, T. Produccion biotecnologica de compuestos del aroma de alimentos. Aplicación en la industria alimentaria. **Alimentaria**, p.35-39, 1990.

IBÁÑEZ, E; SEBASTIÁN-LÓPEZ, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 63, n.2, p. 281-286, 1998.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; VANDAMME, E. J.; SCHAMP, N.M. Biosynthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. Bioflavour'87. Analysis – Biochemistry – Biotecnology. Editor Peter Schreier, p. 465-471, 1988.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195-215, 1992.

- JIANG, J. Volatile metabolites produced by *Kluyveromyces lactis* and their changes during fermentation. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 635-640, 1995.
- JONHSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 115, p. 173-183, 1979.
- JONHSON, E. A.; GIL- HWAN AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**, v.11, p.297-326, 1991.
- JONHSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.11, p.297-326, 1995.
- KEMPLER, G. M. Production of Flavor Compounds by Microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v.29, p.29 –51, 1983.
- KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of chromatography A**, v. 880, p.35-62, 2000.
- KOGAN, N.; FREEMAN. A. Development of macrocapsules containing bioflavors generated *in situ* by immobilized cells. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 8, p. 671–677, 1994.
- KRINGS, U.; ABRAHAM, B.G.; BERGER, R.G. Plant impact volatiles from higher fungi: A biotechnological perspective. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p.79–86, 1995.
- LATRASSE, A.; DAMERON, P. Na éster producing microorganism: *Geotrichum candidum* (STARON). Bioflavour'87. **In: Analysis – Biochemistry – Biotechnology**. Editor Peter Schreier, p. 465–471, 1988.
- LEE, S.; LIN, D.; CHOU, C. Growth of and production of gama-decalactone by *Sporobolomyces odoros* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 2, p.195-199, 1995.
- LEE, S.; LIN, D.; CHOU, C. Effect of physical factors on the production of gama-decalactone by immobilized cells of *Sporobolomyces odoros*. **Process Biochemistry**, v. 34, p.845-85, 1999.

LIN, D.; LEE, S.; CHOU, C. Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of gamma-decalactone by *Sporobolomyces odorus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n.1, p.42-45, 1996.

LUGAY, J.C. **Biogeneration of aromas. an industrial perspective. In: Biogeneration of aromas** (T.H. Parliament and Croteau, eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 317, p. 11–17, 1986.

MALDONADE, I. R. **Produção de carotenóides por leveduras**. Campinas. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2003.

MANLEY, C.H. **The development and regulation of flavor, fragrance, and color ingredients produced by biotechnology. Process of production of flavor, fragrance and color Ingredients**, edited by Alan Gabelman, p. 19–39, 1995.

MARASCO, E.; SCHMIDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n.3, p. 145-157, 2003.

MARQUES, D.B. **Produção e caracterização de aroma de frutas por *Pichia membranaefaciens***. Dissertação de Mestrado, FEA/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil,1998.

MARTIN, A M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, p. 321-325, 1993.

MARTINS, P.S.O., LEITE, S.G.F.: SILVA A.J.R. Bio produção de 6-pentil- α -pirona por *Thichoderma harzianum* e sua quantificação após diferentes modos de extração. **In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis, SC, 2003.

MEDEIROS, A. B. P. **Produção de compostos voláteis aromáticos por *Kluyveromyces marxianus* em fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, PR, Brasil,1998.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 779-785, 1994.

MINIER, M.; GOMA, G. Ethanol production by extractive fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p.1565, 1982.

NETO, R.S.; PASTORE, G.M. Seleção de Microrganismos Produtores de Gama-decalactona. **In:** 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, 2001.

OLIVIER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543-555, 2000.

PASTORE, G.M.; SATO, H. H.; YANG, T.S.; PARK, Y.K.; MIN, D. B. Production of fruity aroma by newly isolated yeast. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 389-392, 1994.

PAWLISZYN, J. **Applications of solid phase microextraction**, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, p. 393.

PFANDER, H. **Key to Carotenoids**, 2nd ed. BIRKHAUSER, BASEL, 1987.

RATLEDGE, C.; EVANS, C. T. **Lipids and their metabolism**. In: Rose, A H.; Harrison, J. S. The yeasts: Metabolism and Physiology of yeasts, v.3, 2nd ed., Academic Press, Oxford, UK, 1989.

SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M.; SÁNCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528-534, 2000.

SARIASLANI, F.S.; ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis in Natural Products Chemistry. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.6, p.242–253, 1984.

SARRIS, J.; LATRASSE, A. Production of Odoriferous gama-lactones by *Fusarium poae*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3227-3230, 1985.

SARRIS, J.; ROSAZZA, J.P. N. Production of odoriferous gama-lactones by *Fusarium poae*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3227-3230, 1985.

SCHARPF, L. G.; SEITZ, E. W.; MORRIS, J. A.; FARBOOD, M. I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. **In:** Biogenesis of aromas. Washington, DC, ACS Symposium Series. 317, p. 323-346, 1986.

SCHINDLER, J.; SCHIMID, R. D. Fragrance or aroma chemicals – Microbial synthesis and enzymatic transformation. **Process Biochemistry**, p. 2-8, 1982.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18374-18379, 1995.

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. **Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine.** *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, v. 29, p.570-572, 1996.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O.; PHAFF, H. J. Carotenoid pigments of yeast, p. 493-515. **In** Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Ed). **The Yeasts**, v. 2. Academic Press, New York, 1971.

SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G.; PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 975-980, 1996.

TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Gama-lactones produced by *Sporobolomyces odorus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 281-282, 1975.

TRESSL, R.; ALBRECHT, W. Biogenesis of Aroma Compounds through Acyl Pathways, **In:** Biogenesis of Aroma. ACS Symposium Series 317, p. 114–133, 1986.

VASQUES, M.; SANTOS, V. 3-Hydroxy-3',4'-didehydro- β - Ψ -caroten-one from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnonology Letters**, v. 20, p.181-182, 1998.

WELSH, F. W. Overview of bioprocess flavor and fragrance production. **In:** Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients, edited by Alan Gabelman, 1995.

YAMAUCHI, H., OBATA, T.; AMACHI, T.; HARA, S. Production of characteristic odors by *Neurospora*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 3115-3116, 1991.

YAMANE, YU-ICHI; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and bed-batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4471-4478, 1997.

YOSHIKAWA, K.; YAMAUCHI, H.; HASUO, T.; AKITA, O.; HARA, S. Production of a fruity odor by *Neurospora* sp. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2129-2130, 1988.

WELDHAUSEN, R. JR.; BLOSFELD, M.A.; SILVA, R. A; ROCCO, E. Seleção de microrganismos do gênero *Cândida* produtores de aroma de pêssego por biotransformação do ácido ricinoléico. **In:** 4º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, 2001.

WELSH, F. W. **Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production.** In: Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, 1995.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. **Anal. Chem.**, v. 65, p. 1843-1852, 1993.

ZELDA, P. Varian Chromatography Systems, SPME, Varian Application Note, nº 6, 1996.

ZINI, C. **Estudo de compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através de uso de micro extração em fase sólida.** Tese de Doutorado em Química, UFRGS, 2002.

**CAPÍTULO 2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
(SPME - HS) DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE MEIOS
FERMENTADOS**

MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME - HS) DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE MEIOS FERMENTADOS.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi maximizar as condições de extração de gama-decalactona por microextração em fase sólida (SPME) - método *Headspace* (HS). Utilizou-se uma fibra PDMS 100 μm , frascos de vidro de 10 mL, vedados com lacres de alumínio e septos de borracha faceados com Teflon. Na maximização das condições de extração empregou-se técnica de planejamento experimental, onde variou-se a agitação (0-400 rpm), temperatura (25-60 °C), tempo de extração (10-30 min), volume de amostra (2-3 mL) de uma solução padrão de 50 mg/L de gama-decalactona e solução salina (5 %, 25 % e saturada de KCl, NaCl, Na₂SO₄ e NaH₂PO₄). A identificação da gama-decalactona foi realizada por cromatografia a gás com detecção por Espectrometria de Massas (GC/MSD). As condições que resultaram a máxima adsorção do analito na fibra extratora foram: temperatura de 60 °C, tempo de extração de 30 min, sem agitação, volume de amostra de 2,5 mL e solução salina de KCl saturada (1:10, v/v). A técnica de SPME - HS demonstrou ser eficiente para extração de gama-decalactona de meios líquidos fermentados, pois quando comparada à técnica tradicional de extração com solvente a quantidade extraída foi 1,8 vezes superior.

Palavras-chave: Bioprodução; gama-decalactona; microextração em fase sólida.

1. INTRODUÇÃO

A produção de aromas naturais por fermentação constituem na mistura de compostos químicos, que incluem ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, álcoois e outras moléculas complexas, resultantes do metabolismo secundário dos microrganismos (GATFIELD, 1995). Estes compostos, normalmente, encontram-se em baixa concentração no meio de cultivo, os quais na maioria das vezes apresentam problemas na extração e na recuperação, acarretando em altos custos nos processos de produção e em muitos casos, tornando-se os mesmos inviáveis.

Para recuperar o aroma produzido, o método mais utilizado atualmente continua sendo a extração com solvente orgânico, que pode causar grandes perdas, mascarar os resultados e além de ser trabalhosa. Uma técnica alternativa para realizar essa extração é denominada microextração em fase sólida (SPME). A microextração em fase sólida é baseada no fato de que os analitos presentes na amostra ou no seu “headspace” são absorvidos na fase extratora que consiste em um filme fino polimérico imobilizado sobre uma fibra de sílica fundida. A fase sólida, é na realidade, um sólido disperso em uma matriz polimérica (polidimetilsiloxano – PDMS ou poliacrilato – PA), contudo, a fim de simplificar são denominadas de sólidas, porosas ou mistas (PAWLISZYN, 1999).

Na SPME há três formas básicas de extração: direta, *headspace* e indireta. No modo *headspace* (HS), o filme polimérico é exposto à fase gasosa imediatamente acima da amostra. Este modo de operação é ideal nos casos em que os analitos são suficientemente voláteis na temperatura de extração escolhida, visto que protege a fase extratora de interação com impurezas e permite que a amostra seja modificada (pH, força iônica, etc), sem causar dano ao filme polimérico. Uma das principais vantagens da HS-SPME no que tange à extração de voláteis reside no fato de ser uma técnica não invasiva permitindo a avaliação das amostras em diferentes condições experimentais sem necessidade de danificá-la para a realização da extração (PAWLISZYN, 1999).

O método vem sendo amplamente utilizado na análise de compostos fenólicos (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994), componentes responsáveis pelo aroma de frutas e

suco, e voláteis de folhas e/ou flores de plantas (KATAOKA et al., 2000; ZINI, 2002), na análise de pesticidas organofosforados em águas (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001) e de compostos orgânicos de efluentes (NASCIMENTO FILHO, 2002).

Na literatura raras são as informações e trabalhos que utilizaram essa técnica para extração de compostos de aroma produzidos por fermentação. VERGNAIS et al. (1998) empregaram à técnica de microextração em fase sólida, para identificar os compostos voláteis produzidos por *Staphylococci*. MARTINS et al. (2003) avaliaram a bioprodução de 6-pentil- α -pirona por *Thichoderma harzianum* e quantificaram mediante técnica de microextração em fase sólida (PDMS – 100 μ m) demonstrando que os resultados foram satisfatórios. Quando compararam com técnicas de extração com solvente a quantidade extraída foi duas vezes superior. GARCIA et al. (1996, 1997, 1998) e JELEN et al., citado por KATAOKA et al. (2000) empregaram a técnica de SPME para analisar os compostos voláteis de amostras de vinho e cerveja, respectivamente.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de extração de gama-decalactona de meio de fermentação, por microextração em fase sólida, utilizando o método *headspace* (SPME - HS).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microextração em fase sólida (SPME - HS)

Preliminarmente às extrações, a fibra extratora de polidimetilsiloxano (PDMS 100 μ m, Supelco) foi condicionada no injetor do cromatógrafo à gás (GC/MSD, Shimadzu GC17A, QP5050A) na temperatura de 250 °C por 60 min.

Para ensaios de microextração em fase sólida - método *Headspace*, utilizou-se uma fibra PDMS, frascos de vidro de 10 mL, vedados com lacres de alumínio e septos de borracha faceados com Teflon. O frasco de amostra foi colocado em banho-maria sob temperatura controlada, na superfície de um agitador magnético (Fisaton), conforme

esquema ilustrado nas Figuras 1 e 2. A fibra foi exposta apenas no momento em que a amostra atingiu a temperatura pré-estabelecida (Tabela 1). Neste momento, o aquecimento foi interrompido e a extração do analito ocorreu por um tempo pré-estabelecido.

No estudo das condições de extração, empregou-se técnica de planejamento experimental, onde se variou a agitação, temperatura, tempo de extração e volume de amostra, conforme níveis indicados na Tabela 1. Nas condições de extração utilizou-se uma solução padrão de 50 mg/L de gama-decalactona (Aldrich), dissolvida em meio de fermentação YM: 3 g/L de extrato de levedura (Merck), 3 g/L de extrato de malte (Merck), 5 g/L de peptona (Vetec) e 10 g/L de glicose (Merck). Nas condições de estudo, os experimentos foram realizados em triplicata.

Para verificar a influência de agentes modificadores na adsorção do analito na fibra extratora, adicionou-se solução de sais inorgânicos de KCl (Synth), NaCl (Próton), Na₂SO₄ (Vetec) e NaH₂PO₄ (Quimex) na amostras (1:10, v/v) em concentrações de 5 % (p/v), 25 % (p/v) e saturada, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para avaliar a existência de diferenças significativas. Estas diferenças foram analisadas através do teste de Tukey para comparação de médias com nível de confiança de 95%, utilizando-se *software* STATISTICA versão 5.0.

Tabela 1. Níveis estudados no Planejamento 2^{4-1} , da microextração em fase sólida.

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Volume de amostra (mL)	X ₁	2,0	2,5	3,0
Agitação (rpm)	X ₂	0	200	400
Temperatura (°C)	X ₃	25	42	60
Tempo de extração (min)	X ₄	10	20	30

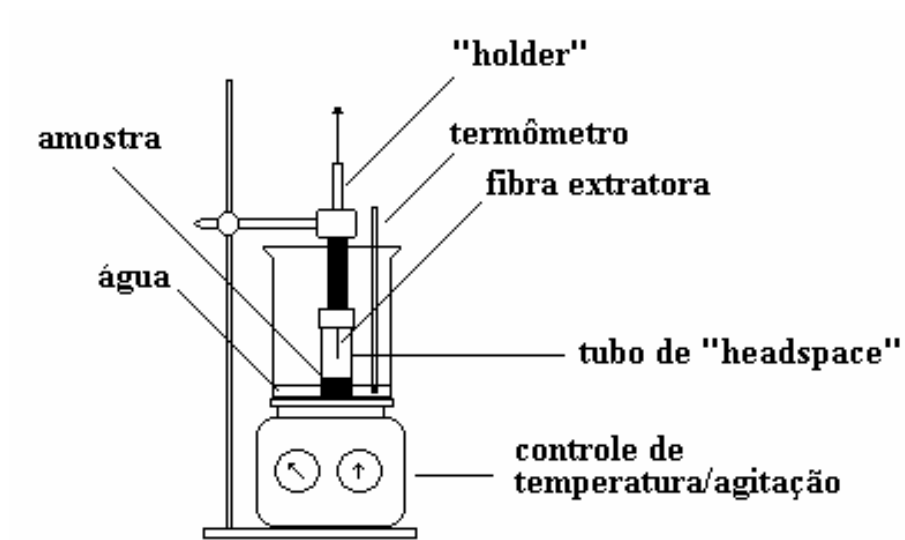


Figura 1. Ilustração do processo de microextração em fase sólida (SPME - HS).

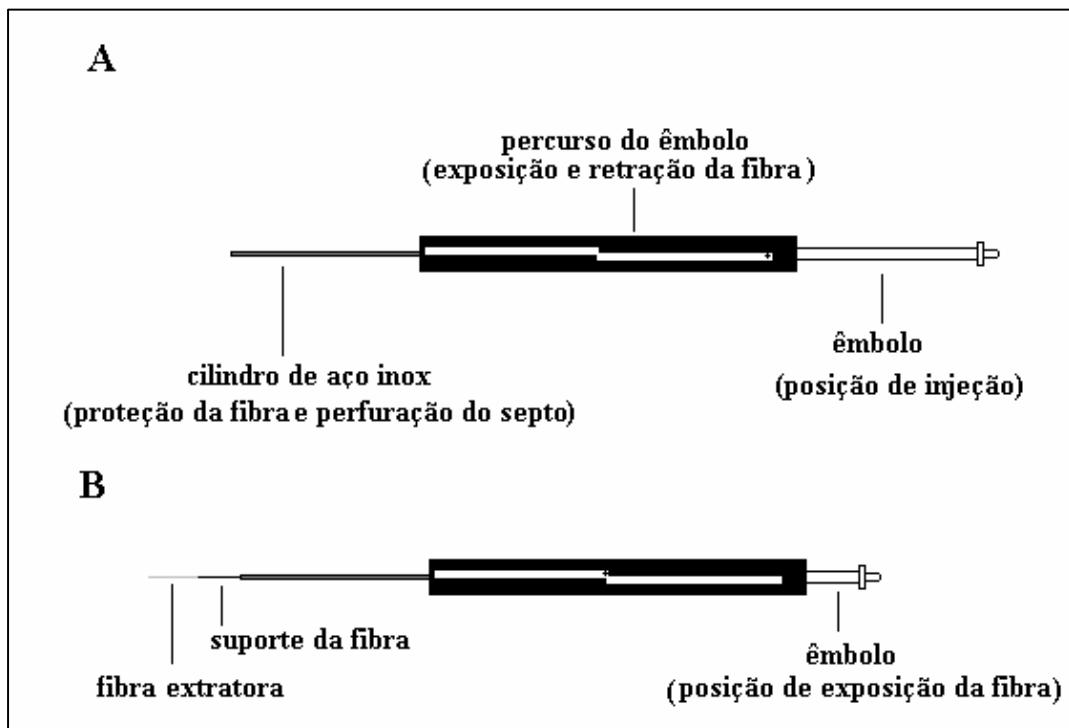


Figura 2. Esquema do *holder* utilizado para SPME nas posições e (A) perfuração do septo e (B) exposição do filme extrator (NASCIMENTO FILHO, 2002).

2.2. Extração com solvente

A extração com solvente foi baseada na metodologia descrita por MARTINS et al. (2003), com modificações. O composto de volátil (gama-decalactona) do meio líquido (10 mL) foi extraído com 10 mL de diclorometano, em frascos de vidro de 40 mL, vedados com lacres de alumínio e septos de borracha faceados com Teflon. A amostra foi agitada a 150 rpm por 2 horas. A fase orgânica foi separada e adicionou-se sulfato de sódio anidro.

2.3. Identificação do composto volátil

Após extração (concentração) do composto volátil do meio de fermentação por técnica SPME - HS, a fibra foi recolhida para dentro da seringa e exposta no interior do injetor de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MSD, Shimadzu GC17A, QP5050A), para que ocorresse a dessorção térmica por um tempo de 10 min.

As condições cromatográficas foram inicialmente ajustadas, em função da melhor separação do composto em estudo, tais como: coluna DB-5 (30m×0,25mm×0,25µm); temperatura do forno: 150 °C; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura da interface: 300 °C; fluxo do gás de arraste (hélio): 0,6 mL/min; programação da coluna: 150 °C por 3 min passando a 220 °C (gradiente de 3 °C/ min), de 220 °C a 250 °C (gradiente de 10°C/ min) e permanecendo 5 min nesta temperatura para a purga da coluna.

O espectro de massa do constituinte da amostra foi comparado com dados da biblioteca compatível com as classes químicas do composto em estudo e pelo tempo de retenção relativo ao do padrão externo autêntico da gama-decalactona (Aldrich, 98% de pureza).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 e Figura 3 encontram-se a matriz do planejamento experimental 2^{4-1} e a estimativa dos efeitos (valor absoluto) pelo gráfico de Pareto, respectivamente.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental 2^{4-1} (valores reais e codificados) com a resposta em área média (UA) do pico cromatográfico da gama-decalactona.

Ensaio	Variáveis Independentes*				Resposta
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Área Média (10 ⁶ U.A)
1	2 (-1)	10 (-1)	25 (-1)	0 (-1)	9,8 ± 0,17
2	2 (-1)	10 (-1)	60 (1)	400 (1)	23,1 ± 0,23
3	2 (-1)	30 (1)	25 (-1)	400 (1)	21,7 ± 2,0
4	2 (-1)	30 (1)	60 (1)	0 (-1)	46,5 ± 0,84
5	3 (1)	10 (-1)	25 (-1)	400 (1)	7,1 ± 2,8
6	3 (1)	10 (-1)	60 (1)	0 (-1)	21,1 ± 1,4
7	3 (1)	30 (1)	25 (-1)	0 (-1)	1,8 ± 0,13
8	3 (1)	30 (1)	60 (1)	400 (1)	44,3 ± 2,6
9	2,5 (0)	20 (0)	42 (0)	200 (0)	17,7 ± 0,54
10	2,5 (0)	20 (0)	42 (0)	200 (0)	17,0 ± 0,40
11	2,5 (0)	20 (0)	42 (0)	200 (0)	17,5 ± 0,64

*X₁ = volume (mL); X₂ = tempo (min); X₃ = temperatura (°C); X₄ = agitação (rpm).

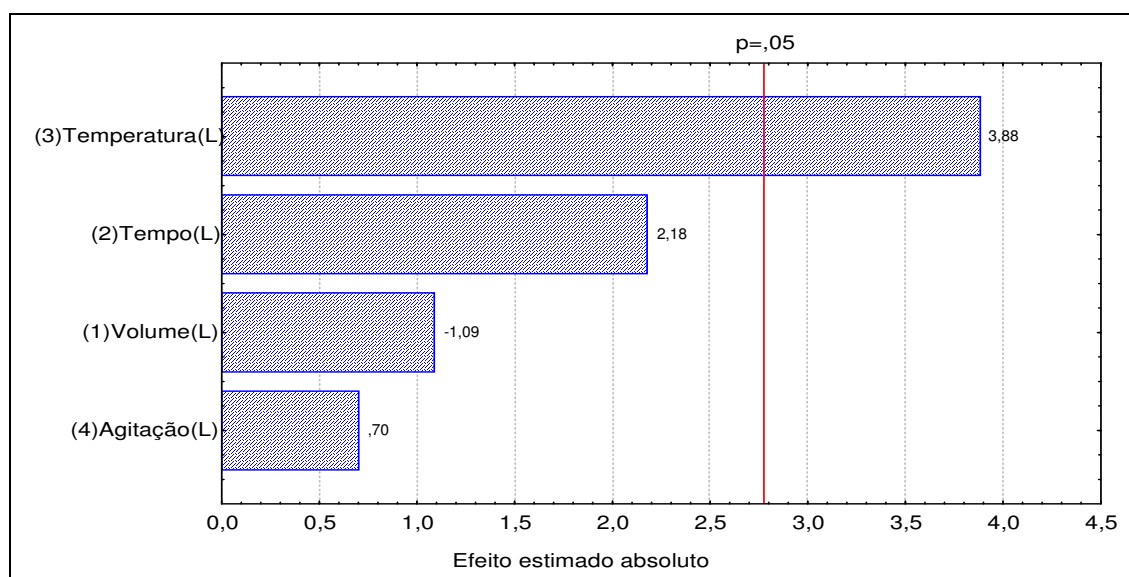


Figura 3. Estimativa dos efeitos (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental 1, para a área média (U.A) do analito (gama-decalactona).

Pelo gráfico de Pareto (Figura 3) verificou-se que apenas a temperatura apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$), o que indica uma tendência de enriquecimento do analito adsorvido pela fibra extratora quando a temperatura de extração tiver seus valores de estudo aumentados. Neste contexto realizaram-se experimentos em triplicata nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C, fixando-se o tempo de extração (30 min), agitação (0 rpm) e volume de amostra (2,5 mL), conforme dados indicados na Tabela 3.

Tabela 3. Variação de área (U.A) para o pico do analito em relação a temperatura de extração.

Ensaio	Temperatura (°C)	Área Média ($\times 10^6$ U.A) [*]
1	50	$25,9 \pm 7,7^c$
2	60	$47,1 \pm 3,4^a$
3	70	$32,5 \pm 8,6^b$
4	80	$3,0 \pm 1,7^d$

* médias \pm desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa em nível de 5% (Teste Tukey).

A Tabela 3 mostra que a temperatura que possibilitou a maior adsorção do analito (gama-decalactona) pela fibra extratora, ou seja, maior área média do pico cromatográfico, foi a 60 °C, indicando que valores superiores e/ou inferiores a este, acarretam uma diminuição da adsorção do analito pela fibra extratora, a 5 % de significância. Segundo PAWLISZYN (1999) o rendimento da extração depende do equilíbrio dinâmico dos analitos entre as três fases envolvidas no sistema SPME -HS: a amostra, a fase *headspace* e o filme polimérico da fibra que são mantidos em um sistema fechado a uma dada temperatura. Neste caso, quanto maior a temperatura mais os analitos são transferidos da amostra se concentrando no *headspace* o que favorece a extração, ou seja, enquanto o equilíbrio for favorável à adsorção dos analitos, a fibra será enriquecida e, conseqüentemente, as áreas médias serão crescentes. Por outro lado o aumento da temperatura reduz os coeficientes de partição dos analitos entre o filme polimérico e a fase *headspace*, já que o processo de adsorção dos analitos no filme da fibra é exotérmico, ou seja, atinge-se o ponto de saturação da fibra; neste caso, o equilíbrio é deslocado na direção do *headspace*, com a conseqüente redução da área média dos analitos.

Resultados semelhantes foram obtidos por IBÁÑEZ et al. (1998) ao otimizar as condições de microextração em fase sólida (SPME – *headspace*) para identificar compostos voláteis de frutas (framboesa, morango, manga e banana). As faixas estudadas de temperatura foram entre 30 e 60 °C e tempo de extração entre 15 e 30 min, sendo que a condição de 60 °C e 30 min de extração proporcionou melhor extração dos analitos na fase *headspace* e adsorção pela fibra polimérica (PDMS 100 µm).

A Tabela 4 mostra a influência da adição de sais inorgânicos sobre a extração do analito (gama-decalactona). A adição de solução salina melhorou a adsorção do analito pela fibra extratora, proporcionando um aumento na área média do pico cromatográfico, sendo que os melhores resultados foram obtidos com KCl saturado, seguidos de 5 % Na₂SO₄, NaCl saturada e 25 % Na₂SO₄, respectivamente. Alguns autores afirmam que dependendo do analito, a sensibilidade do método pode ser melhorada pela redução do pH, que mantém os analitos na forma neutra e pela adição de um sal, que irá concorrer com os íons orgânicos pela solvatação das moléculas de água. Desta forma os analitos, livres de solvatação, podem ser adsorvidos mais facilmente (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994; LIU & YANG, 2002).

Tabela 4. Influência da adição de sais inorgânicos sobre a área média do analito.

Ensaio	Solução Salina	Área Média (x 10 ⁶ U. A) [*]
1	5 % KCl	48,2 ± 3,5 ^d
2	25 % KCl	56,5 ± 1,3 ^{cb}
3	KCl saturada	66,3 ± 4,0 ^a
4	5 % NaCl	55,2 ± 0,88 ^{cb}
5	NaCl saturada	59,8 ± 2,2 ^{ac}
6	5 % Na ₂ SO ₄	61,5 ± 3,8 ^{ab}
7	25 % Na ₂ SO ₄	59,3 ± 0,69 ^{abc}
8	Na ₂ SO ₄ saturada	52,1 ± 2,0 ^d
9	25 % NaH ₂ PO ₄	54,1 ± 1,5 ^c
10	Sem sal	47,1 ± 1,5 ^d

* médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa em nível de 5% (Teste Tukey).

GARCIA et al. (1998), ao avaliarem a influência da adição dos sais inorgânicos de NaCl, KCl, KBr e NH₄Cl na adsorção de compostos voláteis de amostras de vinho *Riesling*, verificaram que a solução salina de NaCl saturada possibilitou maior extração no *headspace* da amostra do α -terpineol, linalol, hotrienol e trans-linalol. Os resultados também foram satisfatórios quando se adicionou 300 mg de NaCl/mL de amostra de vinho. Em relação à extração do α -terpineol, resultados semelhantes foram obtidos com a solução salina de KCl saturada.

A Tabela 5 apresenta comparação da extração com solvente (ES) e SPME - HS sem e com a adição de solução salina de KCl saturada, respectivamente. Pode-se verificar que SPME com adição de KCl saturado apresenta maior sensibilidade em relação à extração com solvente, sendo 1,8 vezes superior. Este resultado é coerente com o que foi afirmado por MARTINS et al. (2003), que compararam SPME e extração com solvente de 6-penti- α -pirona produzido por *Thichoderma harzianum*, e concluíram que o aumento da sensibilidade da SPME, em relação à extração com solvente, é de duas vezes para a fermentação líquida.

Tabela 5. Comparação da área média (UA) do pico cromatográfico da gama-decalactona, método SPME –HS e extração com solvente (ES).

Ensaio	Área Média (x10 ⁶ U.A) [*]
ES	36,8±4,5 ^c
SPME sem adição sal	47,1±1,5 ^b
SPME com adição sal	66,3±4,0 ^a

* médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa em nível de 5% (Teste Tukey).

4. CONCLUSÕES

A técnica de SPME - HS demonstrou ser eficiente para extração de gama-decalactona de meios líquidos, pois quando comparada à técnica tradicional de extração com solvente, a quantidade extraída foi 1,8 vezes superior.

As condições que resultaram na máxima adsorção do analito na fibra extratora (PDMS 100 µm) foram a temperatura de 60 °C, tempo de extração de 30 min, sem agitação, volume de amostra de 2,5 mL e solução salina de KCl saturada (1:10, v/v).

A microextração em fase sólida possui vantagens de ser prática e rápida, necessitando de volume pequeno de amostra e, portanto, mais adequada para análise de compostos voláteis de meios fermentados e/ou sintéticos, principalmente em amostras com baixas concentrações dos analitos e, por não empregar solventes, concentrando a amostra ao invés de diluí-la, como acontece na extração com solventes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química nova**, v.24, n. 2, 2001.

BUCHHOLZ, K. D.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 160-167, 1994.

GARCIA, D.D.;REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 19, n. may, p. 257-262, 1996.

GARCIA, D.D.;REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 20, n. December, p. 665-668, 1997.

GARCIA, D.D.;REICHENBÄCHER, M.; DANZER, K. Analysis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. **J. High Resol. Chromatogr.**, v. 21, n. 7, p. 373-377, 1998.

GATFIELD, I.L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p. 5-14, 1995.

IBÁÑEZ, E; SEBASTIÁN-LÓPEZ, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 281-286, 1998.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of chromatography A**, v, 880, p. 35-62, 2000.

LIU, T.-T.; YANG, T-S. Optimization of solid-phase microextraction analysis for studying change of headspace flavor compounds of banana during ripening. **J. Agric. Food Chem.**, v..50, p. 653-657, 2002.

MARTINS, P.S.O., LEITE, S.G.F.: SILVA A.J.R. Bio produção de 6-pentil- α -pirona por *Thichoderma harzianum* e sua quantificação após diferentes modos de extração. **In:** XIV simpósio nacional de fermentações, Florianópolis, SC, 2003.

NASCIMENTO FILHO, I. **Estudo de compostos orgânicos em lixiviado de aterro sanitário.** Tese de Doutorado em Química, UFRGS, 2002.

PAWLISZYN, J. **Applications of Solid phase microextraction,** Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999, p. 393.

VERGNAIS, L, MASSON, F., MONTEL M.C., BERDAGUÉ, TALÓN, J.L. Revaluation of Solid-Phase Microextraction for Analysis of Volatile Metabolites Produced by *Staphylococci*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46,p. 228-234, 1998.

ZINI, C. **Estudo de compostos voláteis de algumas espécies de eucalipto através de uso de micro extração em fase sólida.** Tese de Doutorado em Química, UFRGS, 2002.

**CAPÍTULO 3. BIOPRODUÇÃO DE COMPOSTOS
VOLÁTEIS POR *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636)**

BIOPRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS POR *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636).

RESUMO

Este estudo explorou a versatilidade da linhagem *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), de crescer e produzir compostos voláteis em substratos contendo como precursores ricinoleato de sódio, ricinoleato de etila e metila, ácido ricinoléico e óleo de mamona. Na bioprodução, empregou-se técnica de planejamento experimental, onde variou-se a agitação (120-200 rpm), temperatura (23-33 °C), pH (4,0-8,0), concentração do precursor (0,02-0,1 %) e manitol (0-6 %) e asparagina (0-0,2 %) em meios de fermentação YMM e YNB. Os compostos voláteis produzidos foram extraídos dos meios fermentados pela técnica de microextração em fase sólida (SPME – método *headspace*) e identificados por cromatografia gasosa (CG/MS). O ensaio a 28 °C, 160 rpm, pH 6,0 e com 0,02 % de ácido ricinoléico foi o que proporcionou maior produção de compostos voláteis, sendo identificados o 1,4-butanodiol; 1,2,2-trimetilciclopropilamina; beta-ionona; 2,3-butanodiona; pentanal; tetradecano; 2-isononenal; 4-octen-3-ona; ac. propanóico e octadecano. Nos ensaios onde houve formação de beta-ionona, constatou-se também o aparecimento de compostos pigmentados, semelhantes a carotenóides.

Palavras-chave: Bioprodução; Aromas; *Sporidiobolus salmonicolor*.

1. INTRODUÇÃO

O aroma é um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas. Atualmente, os consumidores estão dando preferência aos alimentos que apresentem ingredientes naturais. Para atender a esta crescente demanda do mercado consumidor, o processo biotecnológico é de grande interesse para a indústria de aromas, pois pode permitir a produção, em grande escala, de importantes insumos aromatizantes a custo relativamente baixo. Além disso, os compostos gerados são denominados naturais, sendo, portanto, mais valorizados no mercado que aditivos químicos artificiais e utiliza microrganismos ou enzimas como alternativas à síntese química e à extração vegetal.

A maioria dos aromas naturais é o resultado de misturas de compostos químicos que incluem ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, álcoois e outras moléculas complexas resultantes de metabolismo secundário de plantas ou de microrganismos. A produção destes voláteis varia em função de fatores químicos, físicos e biológicos. As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e quantidade dos compostos de aromas produzidos, além da linhagem do microrganismo (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984; ARMSTRONG & BROWN, 1994; GATFIELD, 1988 e 1995; SCHARPF et al., 1986; JANSSENS et al., 1992; WELSH, 1995). Estas variáveis podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos que influenciam nos tipos e quantidades dos produtos formados pelos microrganismos (SARIASLANI & ROSAZZA, 1984).

Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos de produção de compostos voláteis e aromas por *Sporidiobolus salmonicolor*, como alternativa de processo biotecnológico de produção de flavorizantes de interesse industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Uma linhagem de levedura, identificada como sendo *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636, foi utilizada em ensaios de crescimento e de bioprodução de compostos voláteis. A fim de verificar as características macroscópicas das colônias, foi realizado plaqueamento da cultura em ágar YM (*Yeast Malt Extract Agar*), com 48 horas de crescimento.

2.2. Preparo de meios de cultura

A seguir encontram-se descritos os procedimentos de preparo dos meios de cultura:

- **Meio de manutenção:** Meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*), com a seguinte composição: 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L de bacto peptona (Vetec), 10 g/L de glicose (Nuclear) e 20 g/L de ágar (Vetec). O meio foi introduzido em tubos de ensaio com rosca e esterilizado a 121 °C por 15 min em autoclave (Phoenix, modelo AV75). Após a esterilização, o meio ainda quente foi inclinado sob a bancada em um ângulo de aproximadamente 30° até o completo resfriamento.
- **Meio de inóculo:** Meio YM (*Yeast Malt Extract*), com a seguinte composição: extrato de levedura (3 g/L), extrato de malte (3 g/L), bacto peptona (5 g/L) e glicose (10 g/L). A esterilização do meio foi realizada através de autoclavagem a 121 °C por 15 min.
- **Meios de fermentação:** Para ensaios de fermentação utilizaram-se YMM (*Yeast Malt Extract*) modificado, composto por 1 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de extrato de malte, 0,5 g/L de bacto triptona (Difco), 15 g/L de glicose, 2 g/L de ácido cassamínico (Merck), 2 g/L de KH_2PO_4 (Synth), 0,13 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear),

0,01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear) e 3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Synth), e YNB (*Yeast Nitrogen Base*- Difco), composto por extrato de levedura (67 g/L), dextrose (50 g/L), sem aminoácidos e sulfato de amônia. A esterilização dos meios foi realizada através de autoclavagem a 121 °C por 15 min.

2.3. Preparo dos substratos

A seguir encontram-se descritos os procedimentos de preparo dos precursores:

- **Ricinoleato de etila:**

a) Método 1: reação de esterificação foi realizada a partir de 32 g de ricinoleato de sódio (Brazmo), 17 mL de ácido clorídrico (Merck) e 50 mL de álcool etílico (Nuclear), sob refluxo por 4 horas. Em seguida, o volume total foi transferido para um funil de separação, onde foram adicionados 100 mL de água quente (80 °C), para melhor separação das fases. Posteriormente, efetuou-se a destilação do solvente;

b) Método 2: reação de esterificação foi realizada com 25 g de óleo de mamona (Delaware), 225 mL de etanol e 0,5 % de NaOH (Vetec) por um período de 3 horas. Depois de decorrido o tempo de reação, foi neutralizado com 10 mL de solução de ácido sulfúrico 10 % (Quimex). Em seguida, o volume total foi transferido para um funil de separação, onde foram adicionados primeiramente 200 mL de água quente (80 °C) e 50 mL de n-heptano (Merck) para separação dos ésteres, e posteriormente 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio (Proton) para melhor visualização da separação das fases. A fase superior foi concentrada em ésteres por evaporação do n-heptano, conservados a 4 °C e posteriormente utilizada como precursor.

- **Ricinoleato de metila:** A reação de esterificação foi realizada a partir de 100 mL de óleo de mamona, 1500 mL de hexano (Merck) e 100 mL de potássia metílica 2 M, sob refluxo por 3 horas. Em seguida, adicionaram-se 2 L de solução saturada de KCl (Synth) para melhor visualização da separação das fases e fracionamento da

fase orgânica e aquosa. Posteriormente, destilou-se a fase orgânica, conservou-se a 4 °C e posteriormente utilizou-se como precursor.

- **Ácido ricinoléico:** A reação foi realizada com 10 g de ricinoleato de sódio, acidificação com ácido clorídrico concentrado (pH = 2) e solubilização com 20 mL de éter etílico (Quimex). Em seguida, fracionou-se a fase orgânica e aquosa. Posteriormente, destilou-se a fase orgânica, conservou-se a 4 °C e posteriormente utilizou-se como precursor.

2.4. Condições de cultivo

Inicialmente, a cultura de *Sporidiobolus salmonicolor* liofilizada foi hidratada em meio YM, em estufa (Fanem, modelo 002CB) a 25 °C por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, a cultura foi inoculada e incubada por 48 horas a 25 °C. Após este tempo de crescimento, os tubos contendo os microrganismos foram conservados a 4 °C. A repicagem foi realizada a cada 2 meses.

Para o preparo do inóculo, transferiu-se uma alçada de células da cultura estoque para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do caldo de cultivo. O frasco foi tampado com algodão para permitir a aeração adequada e incubado a 28 °C, 160 rpm por aproximadamente 12 horas em um agitador orbital (shaker - Nova Ética, modelo 430 RDB), sendo que a concentração celular foi acompanhada e padronizada através de medida de densidade ótica (D.O) em espectrofotômetro (Agilent, modelo 8553) a 650 nm. A suspensão foi usada como inóculo em uma fração de 2 % em frascos agitados.

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições de fermentação, foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (Screening Design) de 12 ensaios com 3 pontos centrais. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 1.

Os ensaios de bioprodução de compostos voláteis foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo YMM e/ou YNB, suplementados ou não com manitol (Sigma) e asparagina (Vetec), por um período de 7 dias. Os erlenmeyers

foram tampados com rolhas de borracha, apresentando na parte central um pequeno orifício no qual foi conectada a uma mangueira plástica com septo de vedação na extremidade, para auxiliar na coleta de amostra. Nos experimentos com ricinoleato de metila, ricinoleato de etila (método 2), óleo de mamona e ácido ricinoléico, como precursores, foram realizados apenas nos ensaios correspondendo ao ponto central do planejamento experimental. Os precursores foram adicionados no final da fase exponencial de crescimento, sendo que a concentração celular foi acompanhada através de medida de densidade ótica (D.O) em espectrofotômetro (Agilent, modelo 8553) a 650 nm.

Tabela 1. Valores utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman (12 ensaios com 3 replicatas no ponto central).

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X ₁	23	28	33
Agitação (rpm)	X ₂	120	160	200
pH	X ₃	4,0	6,0	8,0
Conc. Precursor (%)*	X ₄	0,02	0,06	0,1
Manitol (%)	X ₅	0	3,0	6,0
Asparagina (%)	X ₆	0	0,1	0,2

* precursor: ricinoleato de sódio; ricinoleato de etila (método 1 e 2); ricinoleato de metila; ácido ricinoléico e óleo de mamona

2.5. Recuperação e concentração dos compostos voláteis

Na recuperação e concentração dos compostos voláteis dos meios fermentados, empregou-se a técnica de microextração em fase sólida (SPME - HS) - método *Headspace*, conforme descrito no Capítulo 2, onde se utilizou uma fibra PDMS (100 µm, Supelco), frascos de vidro de 10 mL vedados com lacres de alumínio e septos de borracha faceados com Teflon. Utilizou-se um volume de amostra de 2,5 mL com solução salina de KCl

saturada (1:10, v/v). O frasco de amostra foi colocado em banho-maria (Fisaton), sob temperatura controlada. A fibra foi exposta apenas no momento em que a amostra atingiu a temperatura de 60 °C. Neste momento, o aquecimento foi interrompido e a extração dos analitos ocorreu por um tempo de 30 min.

2.6. Análise dos compostos voláteis

Após extração (concentração) dos analitos das amostras do meio de fermentação, a fibra foi recolhida para dentro da seringa e exposta no interior do injetor de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MSD, Shimadzu GC17A, QP5050A), para que ocorresse a dessorção térmica, por um tempo de 10 min.

A condições cromatográficas foram: coluna DB-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm); temperatura do forno: 150 °C; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura da interface: 300 °C; fluxo do gás de arraste (hélio): 0,6 mL/min; programação da coluna: 150 °C por 3 min passando a 220 °C (gradiente de 3 °C/min), de 220 °C a 250 °C (gradiente de 10 °C/min) e permanecendo 5 min nesta temperatura para a purga da coluna.

Os espectros de massas dos constituintes das amostras foram comparados com dados da biblioteca compatível com as classes químicas do composto em estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características macroscópicas e de crescimento da linhagem

A Figura 1 apresenta as características macroscópicas das colônias da linhagem de levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). A coloração das colônias em meio YM ágar foi salmão. As colônias da levedura apresentaram característica arredondada, possuindo superfície lisa e brilhante. A textura das colônias era gomosa, não apresentando dificuldade na remoção do meio sólido. A elevação das colônias foi do tipo "drop-like".

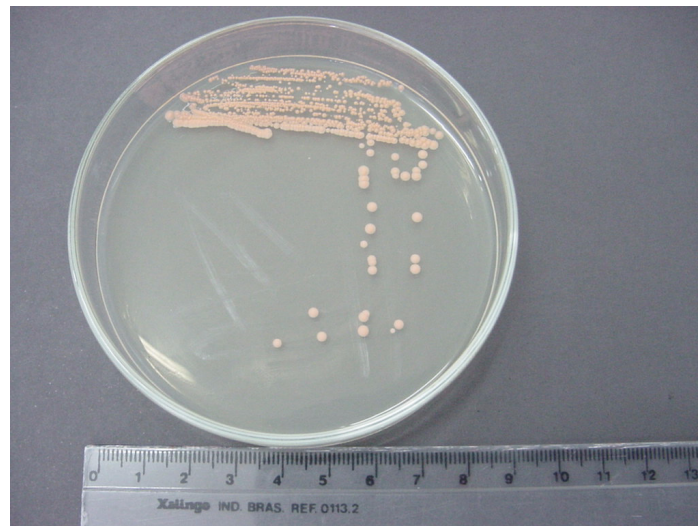


Figura 1. Características macroscópicas da linhagem de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) cultivadas em meio de cultura YM ágar, com 48 horas de crescimento.

A Figura 2 mostra o crescimento celular (D.O) em função do tempo (horas) da cultura, incubada a 28 °C a 160 rpm em um agitador recíprocante (shaker). A levedura apresentou uma fase de adaptação (lag) nas primeiras 12 horas de crescimento, nas 30 horas seguintes uma fase exponencial de crescimento. O crescimento celular apresentou seu ponto máximo em 48 horas (0,725 UA) e posteriormente observou-se uma fase de declínio de crescimento celular.

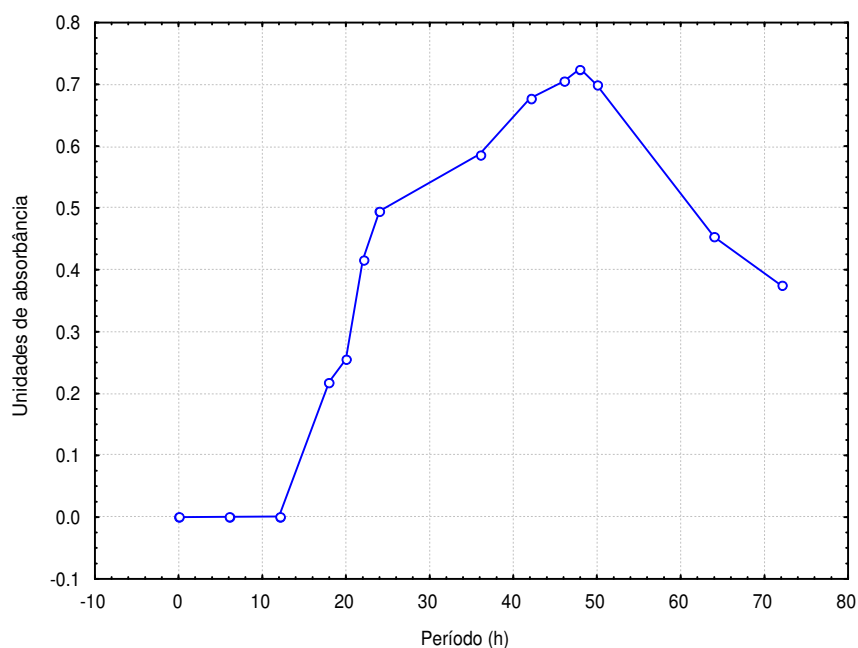


Figura 2. Curva de crescimento celular (UA) da linhagem de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), durante 72 horas de crescimento.

3.2. Bioprodução de compostos voláteis

Nas Tabelas 2 e 3, encontram-se as matrizes do planejamento experimental Plackett-Burman de 12 ensaios com 3 pontos centrais (valores reais e codificados) para os ensaios empregando ricinoleato de sódio e ricinoleato de etila (método 1) como precursores em meio de fermentação YMM e a suas respectivas respostas (compostos voláteis e/ou formação de compostos pigmentados).

Nos experimentos utilizando ricinoleato de sódio como substrato não foi detectada a formação de compostos voláteis. Nos ensaios 3, 7 e 11, observou-se a formação de compostos pigmentados, semelhantes a carotenóides (Figura 3). Porém, ensaios complementares de identificação e quantificação de tais compostos tornam-se necessários. Nos experimentos utilizando ricinoleato de etila com precursor, não foi detectada formação de compostos voláteis e de pigmentação.

Tabela 2. Matriz do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (valores reais e codificados) com precursor ricinoleato de sódio e suas respectivas respostas (Compostos voláteis e/ou Pigmentados).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Comp. volátil	comp. pigment
1	33 (1)	120 (-1)	8 (1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
2	33 (1)	200 (1)	4 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
3	23 (-1)	200 (1)	8 (1)	0,02 (-1)	6 (1)	0 (-1)	ND	+++++
4	33 (1)	120 (-1)	8 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	ND
5	33 (1)	200 (1)	4 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	ND	ND
6	33 (1)	200 (1)	8 (1)	0,02 (-1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
7	23 (-1)	200 (1)	8 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	+++
8	23 (-1)	120 (-1)	8 (1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	ND	ND
9	23 (-1)	120 (-1)	4 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
10	33 (1)	120 (-1)	4 (-1)	0,02 (-1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
11	23 (-1)	200 (1)	4 (-1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	++
12	23 (-1)	120 (-1)	4 (-1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
13	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND
14	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND
15	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND

*X₁ – temperatura (°C); X₂ – agitação (rpm); X₃ – pH; X₄ – precursor (%; ricinoleato de sódio); X₅ - Manitol (%); X₆ – asparagina (%); ND – não detectado; + - nível de intensidade dos pigmentos formados

Tabela 3. Matriz do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (valores reais e codificados) com precursor ricinoleato de etila (método 1) e suas respectivas respostas (Compostos voláteis e/ou pigmentados).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Comp. volátil	comp. pigment
16	33 (1)	120 (-1)	8 (1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
17	33 (1)	200 (1)	4 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
18	23 (-1)	200 (1)	8 (1)	0,02 (-1)	6 (1)	0 (-1)	ND	ND
19	33 (1)	120 (-1)	8 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	ND
20	33 (1)	200 (1)	4 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	ND	ND
21	33 (1)	200 (1)	8 (1)	0,02 (-1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
22	23 (-1)	200 (1)	8 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	ND
23	23 (-1)	120 (-1)	8 (1)	0,1 (1)	6 (1)	0 (-1)	ND	ND
24	23 (-1)	120 (-1)	4 (-1)	0,1 (1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
25	33 (1)	120 (-1)	4 (-1)	0,02 (-1)	6 (1)	0,2 (1)	ND	ND
26	23 (-1)	200 (1)	4 (-1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	ND	ND
27	23 (-1)	120 (-1)	4 (-1)	0,02 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	ND	ND
28	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND
29	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND
30	28 (0)	160 (0)	6 (0)	0,06 (0)	3 (0)	0,1 (0)	ND	ND

* X₁ – temperatura (°C); X₂ – agitação (rpm); X₃ – pH; X₄ – precursor (%; ricinoleato de etila – método 1); X₅ - Manitol (%); X₆ – asparagina (%); ND – não detectado; + - nível de intensidade dos pigmentos formados.

Nas Tabelas 4, 5 e 6, encontram-se os experimentos realizados no ponto central da matriz do planejamento experimental, para os ensaios empregando ácido ricinoléico, ricinoleato de metila e etila (método 2), óleos de mamona como precursores em meio de fermentação YMM e YNB e a suas respostas (compostos de voláteis e/ou pigmentados), respectivamente.

Nos ensaios com ácido ricinoléico, ricinoleato de metila e etila (metodo 2) e óleo de mamona como precursores, obteve-se traços de compostos voláteis (Tabelas 4, 5 e 6), porém não foi detectada a formação de gama-decalactona, conforme foi descrito por WANG et al. (2000), LIN et al. (1996), DUFOSSÉ et al. (1998), nas mesmas condições do estudo.

Tabela 4. Ensaios realizados no ponto central com meio YMM e YNB com diferentes concentrações de ácido ricinoléico e suas respectivas respostas (Compostos de aroma/ Pigmentos).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Composto volátil	Composto pigmentado
31	28	160	6	0,02	0	0	TR	+
32	28	160	6	0,06	0	0	TR	++++
33	28	160	6	0,1	0	0	TR	++++
34**	28	160	6	0,06	3	0,1	TR	+

* X₁ – temperatura (°C); X₂ – agitação (rpm); X₃ – pH; X₄ – precursor (%; ácido ricinoléico); X₅ - Manitol (%); X₆ – asparagina (%); ND – não detectado; + - nível de intensidade dos pigmentos formados; TR – traços de compostos voláteis, **Meio de fermentação YNB

Tabela 5. Ensaios realizados no ponto central com meio YMM e YNB com diferentes concentrações de ricinoleato de metila e etila (método 2) e suas respectivas respostas (Compostos voláteis e/ou Pigmentados).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Composto volátil	Composto pigmentado
35	28	160	6	2	0	0	TR	++
36	28	160	6	8	0	0	TR	+++++
37	28	160	6	16	0	0	TR	ND
38^a	28	160	6	5	0	0	TR	+
39**	28	160	6	8	3	0,1	ND	+

* X₁ – temperatura (°C); X₂ – agitação (rpm); X₃ – pH; X₄ –precursor (%; ricinoleato de metila e etila - a); X₅ - Manitol (%); X₆ – asparagina (%); ND – não detectado; + - nível de intensidade dos pigmentos formados; TR – traços de compostos voláteis; **Meio de fermentação YNB

Tabela 6. Ensaios realizados no ponto central com meio YMM e YNB com diferentes concentrações de Óleo de mamona e suas respectivas respostas (Compostos voláteis e/ou pigmentados).

Ensaio	Variáveis Independentes*						Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Composto volátil	Composto Pigmentado
40	28	160	6	0,08	0	0	TR	++++
41	28	160	6	0,16	0	0	TR	++

* X₁ – temperatura (°C); X₂ – agitação (rpm); X₃ – pH; X₄ –precursor (%; ricinoleato de metila e etila - a); X₅ - Manitol (%); X₆ – asparagina (%); ND – não detectado; + - nível de intensidade dos pigmentos formados; TR – traços de compostos voláteis.

As Tabelas 7, 8 e 9, apresentam os compostos identificados (análise qualitativa: biblioteca do sistema GC/MS) dos respectivos ensaios.

Tabela 7. Perfil cromatográfico dos compostos (biblioteca do sistema GC/MS), utilizando ácido ricinoléico como precursor.

Ensaio	Composto volátil	Probabilidade (%)	Tempo retenção (min)
31	1,4 butanodiol	81	2,5
	1,2,2 trimetilciclopropilamina	83	3,0
	Beta-ionona	76	3,5
	2,3 butanodiona	79	6,7
	Pentanal	76	9,6
	Tetradecano	78	12,1
	2 isononenal	76	14,9
	4 octen-3-ona	76	27,0
	Àcido propanóico	71	28,6
	Octadecano	77	29,2
32	Beta-ionona	87	3,5
	Ac. 1,2- bezenodicarboxilico	92	29,2
33	Beta –ionona	88	3,2
34	Beta –ionona	91	3,5

Tabela 8. Perfil cromatográfico dos compostos (biblioteca do sistema GC/MS), utilizando ricinoleato de metila e etila como precursores.

Ensaio	Composto volátil	Probabilidade (%)	Tempo retenção (min)
35	Beta-ionona	79	3,5
36	Beta-ionona	85	3,5
37	2 etil-1-hexanol	94	4,0
	Undecano	93	5,0
38	2 etil-1-hexanol	94	6,5
39	Beta-ionona	80	3,5

Tabela 9. Perfil cromatográfico dos compostos (biblioteca do sistema GC/MS), utilizando Óleo de mamona como precursor.

Ensaio	Composto volátil	Probabilidade (%)	Tempo retenção (min)
40	Heptanal	75	3,0
41	Beta-ionona	86	3,5



Figura 3. Aspecto geral da bioprodução de pigmentos por *Sporidiobolus salmonicolor* (A – Ensaio 3; B – Ensaio 36; C – Ensaio 40; D – Ensaio 32; E – Ensaio 33; F – Ensaio 7; G – Ensaio 11; H – Ensaio 38; I – Ensaio 35; J – Ensaio 39).

O perfil cromatográfico dos compostos voláteis diferenciados nos ensaios está relacionado com a composição do meio de fermentação, principalmente a fonte de carbono. O mesmo foi verificado por WELSH (1995) o *Ceratocystis moniliformis* produz aroma de banana, citros e pêssego, dependendo das fontes de carbono e nitrogênio usadas na composição do meio de cultura. Após 5 dias de fermentação, obtiveram-se 50 µg de monoterpenos por miligrama de cultura. O rendimento foi aumentado com a elevação da temperatura e usando altas concentrações de asparagina como fonte de nitrogênio.

Observou-se que o ensaio 31 (Tabela 4) com a concentração de 0,02 % de ácido ricinoléico foi a condição que proporcionou maior quantidade de compostos voláteis (Tabela 7) de interesse, com formação predominante de cetonas e aldeídos. O composto aromático 2-3 butanodiona, biossintetizado é uma das mais importantes dicetonas e de grande interesse comercial por seu odor característico à manteiga (WELSH et al., 1989). O composto undecano que foi identificado no ensaio 37 (Tabela 8), segundo LEE et al. (2003) é um dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma do queijo parmesão. Os compostos 2,3-butanodiona e 2-isononenal foram encontrados no aroma do suco de pêssego (DERAIL et al., 1999).

Os ensaios com óleo de mamona (Tabela 9) não aumentaram a produção de compostos voláteis; somente foi observada a formação de heptanal e beta-ionona, apesar da reconhecida capacidade dos óleos na produção de esterases, reconhecidamente precursores de aromas (BRAMORSKI, 1997).

Nos experimentos 32 a 36 e 38 a 41 houve formação de compostos pigmentados (Tabelas 4, 6 e 7, e Figura 3). É interessante observar que nos ensaios onde houve formação de compostos pigmentados, constatou-se também o aparecimento do composto volátil beta-ionona (Tabelas 7, 8 e 9), que é reconhecidamente um dos produtos resultantes da degradação oxidativa do alfa e beta-caroteno (WACHÉ et al., 2003). A beta-ionona tem sido relatada como constituinte de aromas, com característica frutal e/ou floral (COOPER et al., 2003; BOVOLENTA, et al., 2004), podendo ser encontrado no aroma de frutas como framboesa (IBÁÑEZ et al., 1998; KATOAKA et al., 2000), manga (KATOAKA, et al., 2000), laranja tipo valência (MAHATTANATAWEE et al., 2005), melão (LAMIKANRA & RICHARD, 2002), tomate (BEZMAN et al., 2003) e vinhos (SABON et al., 2002).

Porém, a presença de beta-ionona em plantas é mínima, e por esta razão as indústrias de aromas usam beta-ionona sintética devido aos custos altos de extração (BOSSER & BERLIN, 1994).

4. CONCLUSÕES

O perfil cromatográfico dos compostos voláteis está diretamente relacionado com a composição do meio de fermentação, principalmente a fonte de carbono. No experimento empregando-se concentração de 0,02 % de ácido ricinoléico, a 28°C, 160 rpm e pH inicial 6,0, foram identificados 10 compostos voláteis: 1,2,2-trimetilciclopropilamina; beta-ionona; 1,4-butanodiol; 2,3-butanodiona; pentanal; tetradecano; 2-isononenal; 4-octen-3-ona; ácido propanóico e octadecano.

Quando se utilizaram ricinoleato de sódio e de etila como substratos não foi detectada a formação de compostos voláteis

Nos ensaios com ácido ricinoléico, ricinoleato de metila e etila (método 2) e óleo de mamona como precursores, também houve o aparecimento de compostos pigmentados (laranja e/ou amarelo), semelhantes a carotenóides. A formação de beta-ionona verificada nestes ensaios, possivelmente esteja relacionada à oxidação dos carotenóides. A síntese da beta-ionona por biotransformação é interessante devido ao seu valor de mercado, sua classificação como “natural” e o baixo custo de seu precursor, óleo de mamona e/ou seus derivados, tornando-se desta forma uma alternativa à síntese química e à extração vegetal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, D. W.; BROWN, L.A. Aliphatic, Aromatic, and Lactone Compounds. **In:** Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients, edited by Alan Gabelman, 1994.

BEZMAN, Y.; MAYER, F.; TAKEOKA, G.; BUTTERY, G. B.; RABINOWITCH, H.; NAIM, M. Differential effects of tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 722-726, 2003.

BOSSER, A.; BERLIN, J. M. Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthine/ β -carotene system involving free radical formation. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 129-133, 1994.

BOVOLENTA, M.; CASTRONOVO, A V.; ZANONI, G.; VIDARI, G. A simple and efficient highly enantioselective synthesis of α -ionone and α -damascone. **J. Org. Chem.**, v. 69, p. 8959-8962, 2004.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de compostos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agro-industriais.** Dissertação de Mestrado UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 1997.

COOPER, C.M.; DAVIES, N.W.; MENARY, R. C-27 apocarotenoids in the flowers of *Boronia megastigma* (Nees). **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 2384-2389, 2003.

DERAIL, C.; HOFMANN, T.; SCHIEBERLE, P. Differences in ley odorants of Handmade juice of Yellow-flesh Peaches (*Prunus persica* L.) induced by the workup procedure. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4742-4745, 1999.

DUFOSSÉ, L.; FERON, G.; MAUVAIS, G.; BONNARME, P.; DURAND, A.; SPINNLER, H. Production of γ -decalactone and 4-Hydroxy-Decanoic acid in the genus *Sporidiobolus*. **J. of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.2, p.169-173, 1998.

GATFIELD, I.L. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. **Food Technology**, p. 110-169, 1988.

GATFIELD, I.L. Enzymatic and Microbial Generation of Flavor. **Perfumer & Flavorist**, v.20, p. 5 –14, 1995.

IBÁÑEZ, E.; SEBASTIÁN-LÓPEZ, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 281-286, 1998.

JANSSENS, L.; DE POOTER, H.L.; SCHAMP, N.M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v.27, p.195–215, 1992.

KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **J. of chromatography A**, v. 880, p.35-62, 2000.

LAMIKANRA, O.; RICHARD, O. Effect of storage on some volatile aroma compounds in Fresh-cut Cantaloupe Melon. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p. 4043-4047, 2002.

LEE, J.; DIONO, R.; KIM, G.; MIN, D. Optimization of solid phase microextraction análisis for the headspace volatile compounds of Parmesan Cheese. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 5, p.1136-1140, 2003.

LIN, S.; LEE, S.; CHOU, C. Effects of various fatty acid components of castor oil on the growth and production of gama-decalactone by *Sporobolomyces odorus*. **J. of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 1, p.42-45, 1996.

MAHATTANATAWEE, K.; ROUSEFE, R.; VALIM, M.F.; NAIM, M. Identification and aroma impact of Norisoprenoids in Orange Juice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 393-397, 2005.

SABON, I.; REVEL, G.; KOTSERIDIS, Y.; BERTRAND, A. Determination of volatile compounds in grenache wines in relation with different terroirs in the rhone valley. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p.6341-6345, 2002.

SARIASLANI, F.S.; ROSAZZA, J.P.N. Biocatalysis in natural products chemistry. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.6, p.242–253, 1984.

SCARPF, L. G.; SEITZ, E.W.; MORRIS, J.A.; FARBOOD, M.I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes. **In: Biogenesis of aromas**. Washington, DC, ACS Symposium Series. 317, p. 323-346, 1986.

WACHÉ, Y.; BOSSER-DERRATULD, A.; LHUCUENOT, J.; BELIN, J. Effect of cis/trans isomerism of β -carotene on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 1984-1987, 2003.

WANG, X.; MAUVAIS, G.; CACHON, R.; DIVIÉS, C.; FERON, G. Addition of reducing agent dithiothreitol improves 4-decanolide synthesis by the genus *Sporidiobolus*. **J. of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 3, p. 338-340, 2000.

WELSH, F. W.; MURRAY, W. D.; WILLIAMS, R. E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 105-169, 1989.

WELSH, F. W. **Overview of Bioprocess Flavor and Fragrance Production**. In: *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients*, edited by Alan Gabelman, 1995.

**CAPÍTULO 4. OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE
CAROTENÓIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636)
EM MEIO CONVENCIONAL**

OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) EM MEIO CONVENCIONAL

RESUMO

A crescente demanda de carotenóides pelas indústrias tem despertado o interesse pela sua bioprodução. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar condições de cultivo e a recuperação de carotenóides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). A bioprodução foi realizada em agitador orbital (shaker), onde se utilizou 10 % (v/v) do inóculo (25 °C, 180 rpm por 48 horas), incubado por 120 horas e em ambiente sem iluminação. No tratamento empregando N₂ líquido/DMSO para ruptura celular e extração com acetona/metanol (7:3, v/v), obteve-se o máximo de recuperação de carotenóides totais. Para otimizar a bioprodução de carotenóides empregou-se técnica de planejamento experimental. Primeiramente um planejamento do tipo Plackett Burman (*Screening Design*), seguido de um planejamento completo de segunda ordem, foi utilizado para otimizar a concentração de carotenóides em meio convencional, obtendo-se uma concentração máxima de 1019 µg/L em meio contendo 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte, 14 g/L de peptona, 180 rpm, temperatura de 25 °C e um pH inicial de 4,0. Um dos carotenóides majoritários identificado nesta linhagem foi o β-caroteno, correspondendo a aproximadamente 32 % em relação aos carotenóides totais.

Palavras-chave: *Sporidiobolus salmonicolor*; carotenóides; recuperação.

1. INTRODUÇÃO

O interesse por carotenóides tem aumentado nos últimos anos, devido à crescente demanda destes compostos nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de ração. Também a procura por compostos com conotação natural tem resultado em um aumento de pesquisas referentes à produção de carotenóides por via fermentativa. Além dos benefícios causados à saúde, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido às suas ações biológicas, com atividade anticarcinogênica, imunomoduladora e antioxidante (SIMPSON et al., 1971).

As leveduras do gênero *Sporobolomyces* sp têm sido reportadas como produtoras de carotenóides. MALDONADE (2003) obteve uma concentração de carotenóides de 237 µg/L e uma produção específica de 72 µg/g de massa seca. Os principais pigmentos encontrados nesta linhagem foram o β-caroteno (36 µg/g) e toruleno (22 µg/g).

Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (HAYMAN et al., 1974). Em geral, os valores máximos de carotenóides totais não estão diretamente correlacionados aos valores máximos de biomassa celular, sendo que a máxima produção de carotenóides observada por FANG & CHIOU (1993) ocorreu depois de 35 horas de fermentação, enquanto o crescimento celular máximo ocorreu após 25 horas. JOHNSON et al. (1991) verificaram que o pH ótimo de crescimento para *Phaffia rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0.

A sacarose e a glicose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenóides. O uso de glicose pode levar a maiores rendimentos na produção específica de carotenóides (1.000 µg/g) por *Rhodotorula* sp. (BUZZINI & MARTINI, 2000). No entanto, concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, sendo que a sacarose, maltose e celobiose produziram melhores resultados na produção de astaxantina por *P. rhodozyma* (SUTHERLAND et al., 1996).

Face ao exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos de otimização da composição do meio de produção de carotenóides, a fim de aproveitar melhor os componentes do meio de fermentação, no sentido de aumentar o rendimento e reduzir

custos de substratos, bem como de técnicas de recuperação (extração) e preservação destes compostos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar condições de cultivo e de recuperação de carotenóides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* utilizando a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e da bioprodução de carotenóides

Uma linhagem da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) foi utilizada nos ensaios para produção de carotenóides.

Inicialmente, a cultura liofilizada foi hidratada em meio YM (*Yeast Malt Extract*): 3 g/L de extrato de levedura (Merck), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L de bacto peptona (Merck) e 10 g/L de glicose (Nuclear), a 25 °C por 72 horas. Posteriormente, a cultura foi transferida para tubos inclinados, contendo o meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) com a seguinte composição: 3 g/L de extrato de levedura (Merck), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L de bacto peptona (Merck), 10 g/L de glicose (Nuclear) e 20 g/L de ágar (Difco) e incubados por 48 horas a 25 °C. Após este tempo de crescimento, os tubos contendo os microrganismos foram conservados a 4 °C em refrigerador (Brastemp). A repicagem foi realizada a cada 2 meses. A cultura estoque (suspensão de células) também foi preservada a -80 °C (CFC *Free*) após congelamento com N₂ líquido.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM. Após esterilização, estes frascos foram inoculados com suspensão de células com alça de níquel-cromo da cultura dos tubos de ensaio, e incubados a 25 °C e 180 rpm (MALDONADE, 2003).

Os ensaios de bioprodução de carotenóides foram realizados em agitador orbital (Nova Ética RDB-430) com controle de temperatura e agitação, no qual foram colocados Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de fermentação e incubados a 27 °C,

200 rpm, por 120 horas e sem iluminação. A composição do meio variou de acordo com os planejamentos experimentais, descritos no item 2.5.

Para definir as condições de cultivo, vários ensaios preliminares foram realizados: a) adição de suspensão de células com alça de níquel-cromo diretamente no meio de fermentação YM suplementado ou não com fonte adicional de carbono (0,08 % óleo de mamona) com e sem restrição de glicose; b) adição de 10 % (v/v) do inóculo, incubado por 24, 48 e 72 horas, no meio de fermentação (com e sem suplementação e/ou restrição de glicose); c) adição de suspensão de células com alça de níquel-cromo diretamente no meio de fermentação, incubado por 24 horas e com posterior adição de óleo de mamona.

2.2. Recuperação de Carotenóides totais

Em função da forte associação dos carotenóides com as células (carotenogênese intracelular) e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, testaram-se diferentes tratamentos de rompimento celular e de extração com solventes (Figura 1):

Método 1 - As células, após centrifugação (Eppendorf 5403) a 3.000×g, 5 °C por 10 min foram trituradas em almofariz juntamente com solvente acetona (Quimex) e celite (Nuclear). Em seguida, o extrato foi filtrado a vácuo (Tecnal TE-058) até que o solvente permanecesse incolor e o resíduo sem coloração. Os pigmentos foram transferidos da acetona para éter de petróleo (Quimex), em funil de separação. Após três ou quatro lavagens com água destilada, a solução de carotenóides em éter de petróleo foi transferida para um Erlenmeyer contendo sulfato de sódio anidro (Vetec). Posteriormente, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 35 °C e o volume foi ajustado em balão volumétrico com éter de petróleo (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; MALDONADE, 2003).

Método 2 - As células (2 g), após centrifugação (3.000×g, 5 °C, 10 min), foram submetidas a sucessivas macerações em almofariz juntamente com N₂ líquido. Em seguida, adicionou-se acetona (4 mL), submeteu-se a homogeneização em vortex (Phoenix AP-56) e

centrifugação (3.000×g, 5 °C, 20 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em éter de petróleo.

Método 3 – O rompimento celular foi realizado da mesma maneira que no método 2. Às células foram adicionados 4 mL de solução tampão Tris-HCl (Merck) 20 mM (pH = 8,0), agitando-se em vortex.. Em seguida, o tampão foi eliminado por centrifugação. Posteriormente, os carotenóides das células hidratadas foram extraídos com 2 mL de uma mistura acetona: metanol (7:3, v/v) e centrifugados a 3.000×g a 5 °C por 20 min, conforme descrito por QIAN et al. (2002). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. A mistura foi concentrada em evaporador rotativo a 35 °C e solubilizada em metanol (Merck).

Método 4 – Nas células (2 g) adicionaram-se 2 mL de dimetilsufóxido - DMSO (Nuclear), homogeneizou-se em vortex e a suspensão foi pré-aquecida a 55 °C/10 min (Fanem 102). Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato de sódio (Merck) 1 M (pH = 7,0), agitou-se em vortex, centrifugou-se (3.000×g, 5 °C, 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, adicionou-se 2 mL da mistura hexano (Quimex): acetato de etila (Nuclear) (1:1, v/v), seguida de centrifugação, conforme descrito por SUN et al. (2004). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em metanol.

Método 5 - As células (2 g), após centrifugação (3.000×g, 5 °C, 10 min), foram submetidas a rompimento celular com a adição de 4 mL de dimetilsufóxido (DMSO), pré-aquecidas a 55° C/30 min e homogeneizou-se periodicamente com vortex. Em seguida, adicionou-se 2 mL da mistura acetona: metanol (7:3, v/v) e centrifugou-se (3.000×g, 5 °C, 10 min), seguindo metodologia descrita por SEDMAK et al. (1990). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em metanol

Método 6 - As células (2 g), após centrifugação (3.000×g, 5 °C, 10 min), foram submetidas a sucessivas macerações em almofariz juntamente com N₂ líquido. No pellet macerado foram adicionados 4 mL de dimetilsufóxido (DMSO), pré-aqueceu-se a 55 °C/30 min e homogeneizou-se periodicamente com vortex. Em seguida, adicionou-se 2 mL da mistura acetona:metanol (7:3,v/v) e centrifugação (3.000×g, 5 °C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células permanecessem sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em metanol.

Métodos 7, 8, 9, 10 e 11 – A etapa de rompimento celular foi realizada da mesma forma que no tratamento 6. As extrações foram realizadas, seguindo recomendações de DAVIES (1976), com 2 mL da mistura metanol:acetona (1:1, v/v), clorofórmio (Nuclear):metanol (2:1), metanol:éter de petróleo (9:1, v/v), hexano:acetato de etila (1:1, v/v) e metanol:éter de petróleo (7:3, v/v), respectivamente.

2.3. Determinação de carotenóides totais

A absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro (Agilent UV-8553). A concentração total de carotenóides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 448 nm, utilizando a equação descrita por DAVIES (1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi o referente a β-caroteno: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$, para o éter de petróleo (DAVIES, 1976) e $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$, para o metanol (SILVA et al., 2004).

Os resultados da concentração de carotenóides foram expressos em termos de carotenóides totais (µg/L) e em produção específica de carotenóides (µg/g). A produção específica de carotenóides representa a concentração total de carotenóides (µg) em relação à biomassa de levedura seca obtida em 1 litro de meio fermentado (DAVIES, 1976).

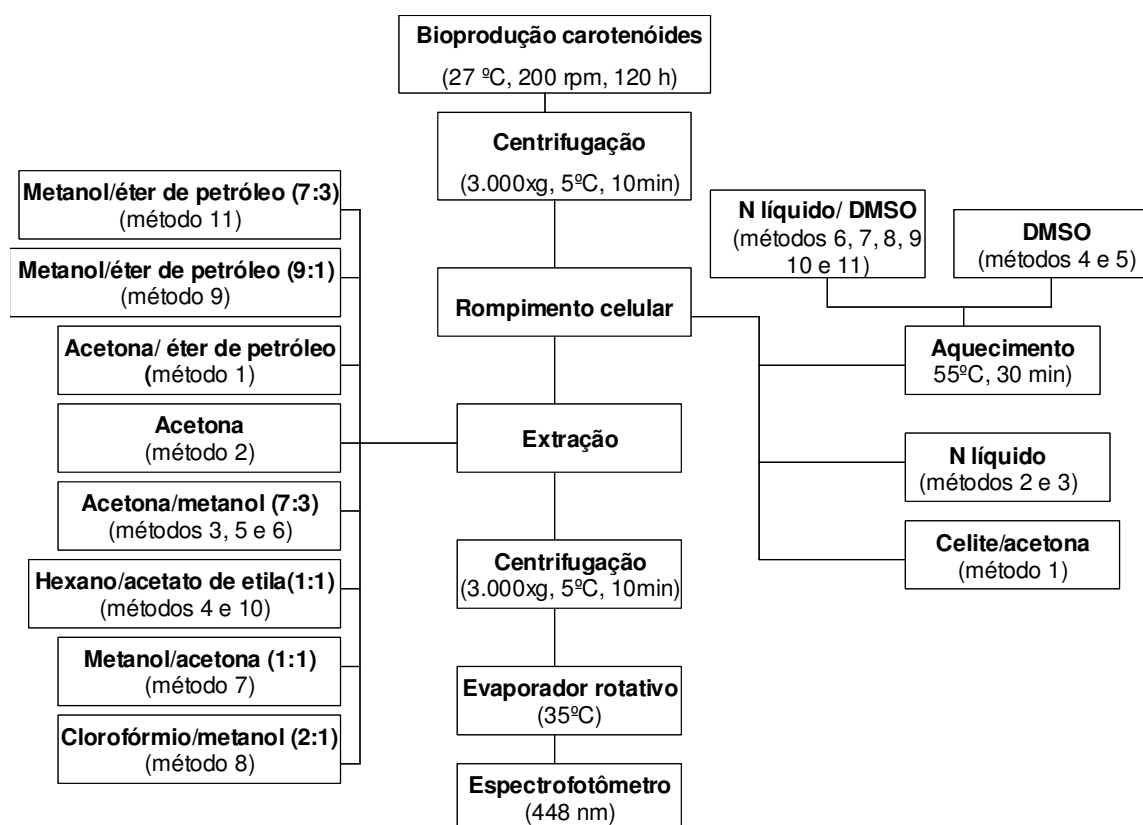


Figura 1. Esquema da extração e recuperação de carotenóides totais.

2.4. Determinações analíticas

2.4.1. Determinação da Biomassa

As células foram centrifugadas a 3.000xg e 5 °C por 10 min. Após extração dos carotenóides (descritas no item 2.2), as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas e a massa celular foi quantificada através de secagem em estufa a 105 °C (Fanem SE-320) até massa constante.

2.4.2. Determinação do pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado utilizando potenciômetro digital (Digimed DMPH-2).

2.4.3. Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático – Glicose PAP, liquiform (LABTEST Diagnóstica). A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose, formando ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. A intensidade da cor é medida em espectrofotômetro ($\lambda = 505 \text{ nm}$).

2.4.4. Determinação de nitrogênio total e/ou proteína total

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Velp DK-20 e UDK-126D) segundo metodologia da AOAC (1995).

2.5. Delineamento experimental para estudar a influência da composição do meio e das condições operacionais na bioprodução de carotenóides

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições de fermentação, foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais (HAALAND, 1989). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 1. A matriz do planejamento experimental Plackett-Burman encontra-se descrita na Tabela 6.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X ₁	20	28	35
Agitação (rpm)	X ₂	150	180	200
pH	X ₃	4,0	6,0	8,0
Extrato de levedura (g/L)	X ₄	0	5,0	10,0
Extrato de malte (g/L)	X ₅	0	5,0	10,0
Peptona (g/L)	X ₆	0	5,0	10,0
Glicose (g/L)	X ₇	2,0	21,0	40,0
Óleo de mamona (g/L)	X ₈	0	7,5	15,0

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman realizou-se um planejamento fatorial completo (2^3 com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes).

A Tabela 2 apresenta os valores codificados e reais do planejamento experimental completo, para três variáveis independentes e cinco níveis de variação, respectivamente. Esse delineamento apresenta ainda dois níveis de variáveis axiais codificadas com $-\alpha$ e $+\alpha$. O valor de α é função do número de variáveis independentes, sendo definido pela seguinte equação (HAALAND, 1989): $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$.

A faixa de estudo de cada variável foi estabelecida a partir dos resultados obtidos no delineamento anterior (Plackett-Burman). As variáveis independentes estudadas foram extrato de malte, peptona e glicose, e as variáveis fixadas foram temperatura (25 °C), agitação (180 rpm) e pH (4,0). As respostas ou variáveis dependentes estudadas foram: carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), produção de específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$), biomassa (g/L), proteína (%), glicose residual (g/L) e pH final.

Tabela 2. Valores utilizados no planejamento completo 2^3 , com 3 replicatas no ponto central.

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extrato de malte (g/L)	X ₅	1,6	5,0	10,0	15,0	18,4
Peptona (g/L)	X ₆	2,24	7,0	14,0	21,0	25,8
Glicose (g/L)	X ₇	6,4	20,0	40,0	60,0	73,6

2.6. Análise dos carotenóides

O extrato de carotenóides totais da condição otimizada foi seco em liofilizador (Edwards), redissolvido em 3 mL de acetona (Merck). Para separar os carotenóides foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Agilent 1100), constituído de conjunto de bombeamento quaternário de solvente, detector de arranjo de diodos, injetor (“loop” de 20 µL), degaseificador “on-line” e sistema de aquisição e processamento de dados.

Os carotenóides foram separados em coluna C₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) e os cromatogramas foram lidos a 470 nm. A fase móvel era composta de THF (tetrahidrofurano, Merck)/água/metanol (Merck) em gradiente ternário, mantendo-se na proporção de 15:4:81 por 40 min e na proporção de 35:0:65 até o final da corrida (70 min), na vazão de 0,5 mL/min e volume de injeção de 20 µL (MALDONADE , 2003). Os solventes grau cromatográficos e o extrato de carotenóides, foram previamente filtrados em membrana (Millipore) de 0,45 µm antes da injeção,

A identificação do β-caroteno foi realizada através da comparação (co-cromatografia) com o padrão (100 µg/L.de β-caroteno - >95 %, Sigma C-4582) e ordem de eluição na coluna.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Bioprodução e recuperação de carotenóides

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos após 120 horas de fermentação em diferentes condições de cultivo e de recuperação dos carotenóides, respectivamente.

Tabela 3. Influência das condições de cultivo na produção de carotenóides e biomassa.

Ensaio*	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	534,9 ± 41,9 ^a	178,4 ± 8,6 ^a	3,0 ± 0,2 ^d
2	27,0 ± 5,0 ^e	12,1 ± 2,1 ^e	2,2 ± 0,1 ^{de}
3	168,0 ± 22,8 ^d	77,4 ± 10,5 ^d	3,4 ± 0,4 ^{cd}
4	300,1 ± 2,3 ^c	85,0 ± 0,7 ^{cd}	4,1 ± 0,6 ^b
5	306,4 ± 2,7 ^c	162,7 ± 5,3 ^b	1,9 ± 0,1 ^e
6	440,1 ± 6,9 ^b	101,9 ± 7,3 ^c	4,3 ± 0,4 ^{ab}
7	438,0 ± 20,4 ^b	95,4 ± 4,6 ^c	4,6 ± 0,1 ^a
8	530,3 ± 7,4 ^a	124,2 ± 4,7 ^b	4,3 ± 0,2 ^{ab}

Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 5 % (Teste Tukey); * 1- 10 % de inóculo por 72 horas e suplementado 0,08 % óleo de mamona; 2 – Inóculo idem 1 e fermentação sem glicose; 3 – suspensão de cultura, incubados por 24 horas e adição óleo de mamona; 4 – suspensão de cultura e suplementado com óleo de mamona; 5 – idem 1, sem suplementação; 6 – idem 1, inóculo por 12 horas; 7 – idem 1, inóculo por 24 horas; 8 - idem 1, inóculo por 48 horas.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3, nas condições de cultivo investigadas, verifica-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de carotenóides quando se adicionou 10 % de inóculo, crescido por 48 horas e 72 horas, no meio YM suplementado com fonte adicional de carbono (0,08 % de óleo de mamona). A remoção de glicose no meio de fermentação ocasionou uma diminuição de aproximadamente 20 vezes na produção de carotenóides.

Tabela 4. Influência das condições de extração e recuperação dos carotenóides.

Métodos*	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	282,6 ± 5,6 ^c	51,0 ± 3,0 ^c	5,5 ± 0,4 ^{ab}
2	117,5 ± 2,2 ^e	23,6 ± 1,1 ^d	4,9 ± 0,1 ^{ab}
3	256,0 ± 43,7 ^{cd}	42,7 ± 8,4 ^c	6,0 ± 0,2 ^a
4	130,6 ± 4,4 ^e	21,8 ± 0,1 ^d	6,0 ± 0,2 ^a
5	192,6 ± 2,1 ^{de}	40,3 ± 0,9 ^c	4,8 ± 0,2 ^b
6	537,8 ± 51,8 ^a	150,1 ± 30,3 ^a	3,6 ± 0,4 ^c
7	456,8 ± 12,2 ^b	96,4 ± 1,4 ^b	4,7 ± 0,1 ^b
8	295,2 ± 10,9 ^c	53,8 ± 4,0 ^c	5,5 ± 0,3 ^a
9	296,8 ± 9,7 ^c	50,2 ± 1,1 ^c	5,9 ± 0,2 ^a
10	146,3 ± 6,9 ^e	28,5 ± 1,2 ^d	5,1 ± 0,3 ^{ab}
11	280,1 ± 8,9 ^c	50,5 ± 4,3 ^c	5,6 ± 0,3 ^{ab}

Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa á nível de 5% (Teste Tukey)

***1** – celite e acetona/éter de petróleo; **2** – N₂ líquido e acetona/éter de petróleo; **3** - N₂ líquido/Tris-HCl e acetona:metanol (7:3); **4** – DMSO/tampão fosfato e hexano:acetato de etila; **5** – DMSO e acetona:metanol (7:3); **6** - N₂ líquido/DMSO e acetona:metanol (7:3); **7** - N₂ líquido/DMSO e metanol:acetona(1:1); **8** - N₂ líquido/DMSO e clorofórmio:metanol (2:1); **9** - N₂ líquido/DMSO e metanol:éter (9:1); **10** - N₂ líquido/DMSO e hexano:acetato de etila (1:1); **11** - N₂ líquido/DMSO e metanol:éter (7:3).

O método 6 (Tabela 4), com ruptura celular combinando N₂ líquido e DMSO, e seguido de extração com acetona:metanol (7:3, v/v), foi o tratamento que possibilitou maior recuperação dos carotenóides.

MALDONADE (2003) obteve uma concentração de carotenóides de 237 µg/L para a levedura do gênero *Sporobolomyces* sp e uma biomassa celular de 3,3 g/L, nas mesmas condições de cultivo do ensaio 1 (Tabela 3), porém sem a adição de óleo de mamona no meio de fermentação e ruptura celular com celite, seguida da extração com acetona e fracionamento com éter de petróleo.

3.1.1. Efeitos da composição do meio e das condições de fermentação

Os resultados obtidos pelo planejamento experimental do tipo Plackett-Burman estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Através dos resultados apresentados na Tabela 5, na faixa de concentração investigada, verifica-se que o teor de carotenóides aumenta com o aumento das concentrações de glicose, extrato de malte e peptona. Este fato pode ser melhor observado na Figura 2 (Gráfico de Pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados.

Observa-se que a glicose foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, seguida da concentração de peptona, agitação e concentração de extrato de malte. Estas três variáveis tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95 %, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentaram do nível -1 para o +1, houve aumento na concentração de carotenóides totais. Portanto, para otimizar a bioprodução de carotenóides totais deve-se deslocar os níveis de estudo para valores superiores para a concentração de glicose, peptona e extrato de malte, assim como a faixa de agitação. Entretanto, o extrato de levedura, o pH, o óleo de mamona e a temperatura apresentaram efeitos negativos significativos. Assim, os níveis de estudo para o extrato de levedura e óleo de mamona, bem como o pH e a temperatura devem ser deslocados para valores inferiores, a fim de melhorar a produção de carotenóides. Como as duas primeiras variáveis no nível -1, a concentração foi nula, estas variáveis podem ser excluídas do processo fermentativo.

Tabela 5. Matriz do planejamento e respostas das variáveis da composição do meio e das condições de fermentação na concentração dos carotenóides e biomassa.

Ensaio	Variáveis Independentes*								Respostas		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	31,52	212,97	0,15
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	231,81	89,68	2,58
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	953,92	1543,56	0,62
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	97,60	167,69	0,58
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	393,04	79,87	4,92
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	351,32	100,09	3,51
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	531,78	365,23	1,46
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	315,83	89,78	3,52
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	232,11	105,99	2,19
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1340,15	2314,59	0,58
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1236,91	2004,72	0,62
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	57,40	103,61	0,55
13	0	0	0	0	0	0	0	0	371,52	94,78	3,92
14	0	0	0	0	0	0	0	0	389,41	89,71	4,34
15	0	0	0	0	0	0	0	0	335,83	71,12	4,72
Controle				YM					307,88	93,29	3,30

* X₁ = temperatura; X₂ = agitação; X₃ = pH; X₄ = extrato de levedura; X₅ = extrato de malte; X₆ = peptona; X₇ = glicose; X₈ = óleo de mamona

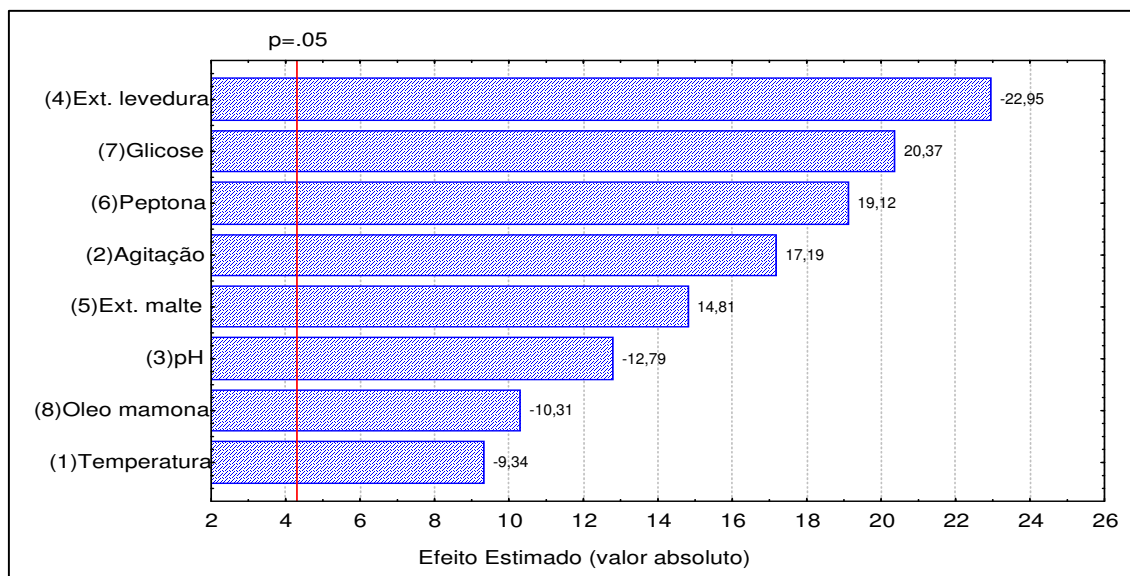


Figura 2. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a concentração de carotenóides totais.

Em relação à produção específica de carotenóides (Figura 3) observa-se que todas as variáveis também apresentaram influência significativa nos níveis estudados. A concentração de glicose, peptona, extrato de malte e agitação tiveram efeito positivo, enquanto que extrato de levedura, pH, óleo de mamona e temperatura tiveram efeito negativo, como no caso da produção de carotenóides totais. Através da análise dos resultados obtidos nota-se que as faixas de concentração de glicose, peptona e extrato de malte devem ser aumentadas, e do pH e temperatura diminuídas.

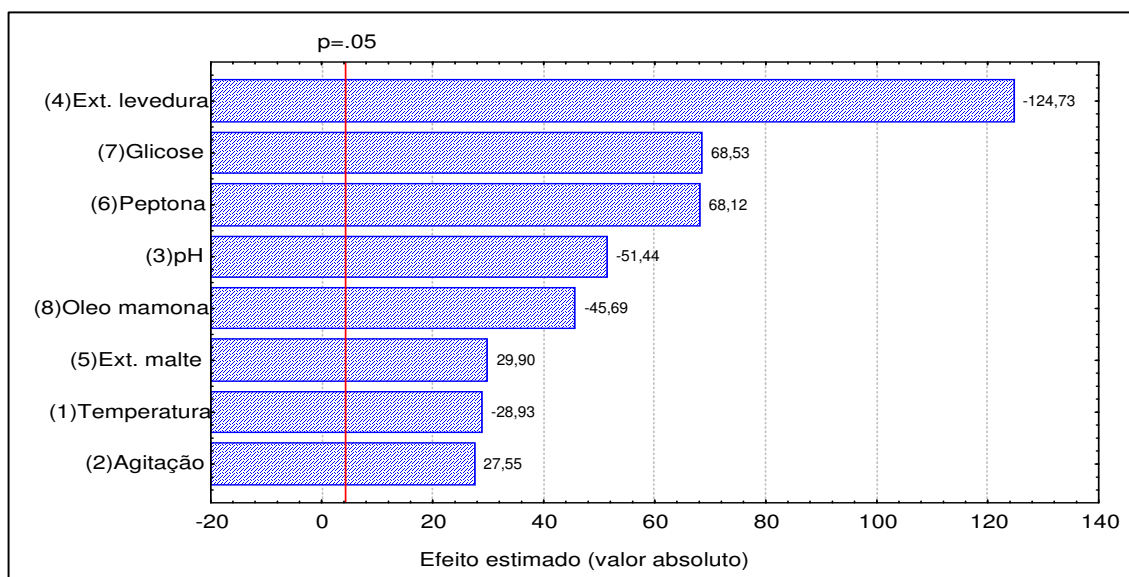


Figura 3. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a produção específica de carotenóides.

Na biomassa (Figura 4), verifica-se que o extrato de malte e de levedura, bem como a agitação apresentaram efeitos positivos significativos no intervalo de confiança de 95 %, sendo que o efeito das demais variáveis não foi significativo no intervalo de confiança estudado.

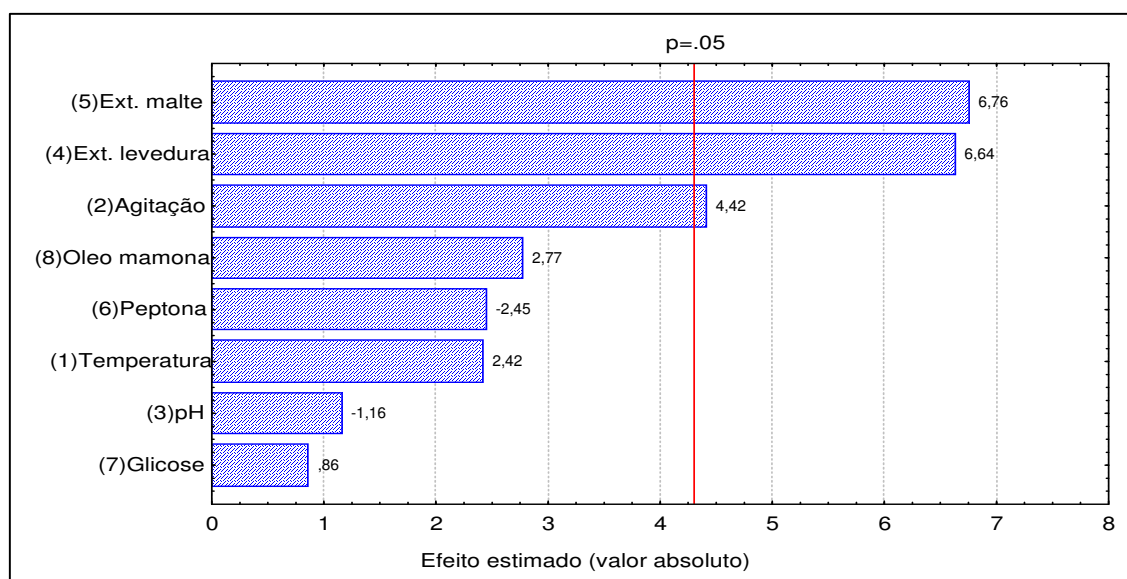


Figura 4. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental do tipo Plackett-Burman, para a biomassa.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 6 e a análise dos efeitos das variáveis testadas, verifica-se que para o teor de proteína da biomassa celular, o extrato de malte e a glicose tiveram efeito positivo significativo no intervalo de confiança de 95 % e a agitação efeito negativo, sendo que as demais variáveis não influenciaram significativamente no nível de confiança estudado. No pH final, observou-se que todas as variáveis tiveram influência significativa no intervalo de confiança estudado. A temperatura, extrato de levedura, óleo de mamona e extrato de malte apresentaram efeito positivo, enquanto que glicose, peptona e agitação tiveram efeito negativo. Em relação à glicose residual, observou-se que o extrato de levedura, o pH, o óleo de mamona e a temperatura apresentam efeito negativo significativo ($p < 0,05$).

Tabela 6. Matriz do planejamento e respostas das variáveis da composição do meio e das condições de fermentação no teor de proteína, pH_{final} e glicose residual.

Ensaio	Variáveis Independentes*								Respostas		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Proteína (b.s,%)	pH final	Glicose residual (g/L)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	6,30	5,50	11,24
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	2,02	8,73	2,30
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,39	6,15	0,65
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	3,33	9,00	1,00
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3,57	6,92	16,86
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	2,98	7,28	11,84
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	3,73	3,75	14,88
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	4,19	6,70	17,19
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	6,92	7,36	0,27
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	6,31	5,06	20,53
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	3,07	4,17	20,15
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,38	4,18	15,29
13	0	0	0	0	0	0	0	0	3,03	5,42	15,26
14	0	0	0	0	0	0	0	0	3,58	5,37	15,71
15	0	0	0	0	0	0	0	0	3,54	5,35	15,37

* X₁ = temperatura; X₂ = agitação; X₃ = pH; X₄ = extrato de levedura; X₅ = extrato de malte; X₆ = peptona; X₇ = glicose; X₈ = óleo de mamona; b.s = base seca.

Como o objetivo principal deste trabalho foi de incrementar a concentração de carotenóides, o planejamento fatorial completo para otimização da produção de carotenóides foi baseado nos resultados apresentados da resposta de carotenóides totais (µg/L). Portanto, as variáveis utilizadas para a otimização da bioprodução de carotenóides foram: glicose, extrato de malte, peptona, pH inicial, temperatura e agitação. As faixas de concentrações de glicose, extrato de malte e peptona foram ligeiramente aumentadas, sendo que a temperatura e a agitação foram fixadas nos valores de 25 °C e 180 rpm,

respectivamente. O efeito do pH inicial na concentração de carotenóides e biomassa foi avaliado e verificou-se que o melhor pH de crescimento para *Sporidiobolus salmonicolor* encontra-se entre 4,0 e 5,0, enquanto que a máxima produção de carotenóides foi a pH 4,0, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Efeito do pH_{inicial} na concentração de carotenóides totais, produção específica de carotenóides e biomassa.

Ensaio* (pH _{inicial})	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)
3,0	407,45 ± 3,88 ^b	163,47 ± 25,47 ^a	2,52 ± 0,42 ^c
4,0	455,42 ± 6,25 ^a	111,85 ± 3,74 ^b	4,07 ± 0,08 ^{ab}
5,0	204,90 ± 13,17 ^c	53,74 ± 6,32 ^c	3,82 ± 0,20 ^b

* Meio de fermentação YM; Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais indicam não haver diferença significativa à nível de 5 % (Teste Tukey).

O efeito do pH inicial do meio de fermentação, na produção de carotenóides e biomassa foi avaliado por outros autores. MALDONADE (2003) observou que a máxima concentração de carotenóides totais por *Rhodotorula glutis* foi de 1269 µg/L, com pH inicial de 4,0; 4,0 g/L de extrato de levedura e 17,0 g/L de glicose, sendo que a variação do pH inicial (3,0 a 4,5) exerceu pequena influência na produção de carotenóides. Entretanto, SHIH & HANG (1996) observaram que o pH inicial do meio de fermentação afetou significativamente (p<0,05) a produção de carotenóides totais por *Rhodotorula rubra*, onde na faixa de pH de 3,4 a 4,3, houve inibição do crescimento celular assim como da produção de carotenóides. A máxima produção celular e de pigmentos ocorreu a pH inicial de 5,0. O mesmo foi verificado por JOHNSON et al. (1991) onde o pH ótimo de crescimento para *Phaffia rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina ocorreu a pH 5,0.

3.1.2. Otimização da bioprodução de carotenóides

A Tabela 8 apresenta os valores reais e codificados do planejamento fatorial completo 2^3 e as respostas para a concentração de carotenóides totais, produção específica de carotenóides e biomassa. Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que os ensaios que apresentaram uma maior concentração de carotenóides totais foram os correspondentes aos pontos centrais do meio de cultura.

Tabela 8. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de carotenóides totais, produção específica de carotenóides e biomassa.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas		
	X ₅	X ₆	X ₇	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóide (µg/g)	Biomassa (g/L)
1	5(-1)	7(-1)	20(-1)	579,22	270,66	2,14
2	15(1)	7(-1)	20(-1)	490,78	108,10	4,54
3	5(-1)	21(1)	20(-1)	494,31	123,27	4,01
4	15(1)	21(1)	20(-1)	590,69	109,18	5,41
5	5(-1)	7(-1)	60(1)	137,79	109,36	1,26
6	15(1)	7(-1)	60(1)	168,38	65,26	2,58
7	5(-1)	21(1)	60(1)	940,88	256,37	3,67
8	15(1)	21(1)	60(1)	281,96	80,10	3,52
9	10(0)	14(0)	40(0)	1064,40	338,98	3,14
10	10(0)	14(0)	40(0)	1037,55	297,29	3,49
11	10(0)	14(0)	40(0)	971,66	230,25	4,22
12	10(0)	14(0)	6,4(-1,68)	642,84	260,26	2,47
13	10(0)	14(0)	73,6(1,68)	561,27	152,94	3,67
14	10(0)	2,24(-1,68)	40(0)	174,51	147,89	1,18
15	10(0)	25,8(1,68)	40(0)	524,75	88,19	5,95
16	1,6(-1,68)	14(0)	40(0)	158,33	67,09	2,36
17	18,4(1,68)	14(0)	40(0)	443,23	82,54	5,37

*X₅ = extrato de malte (g/L); X₆ = peptona (g/L); X₇ = glicose (g/L).

A Tabela 9 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de p e t, para o teor de carotenóides totais. Observa-se que todas as variáveis independentes estudadas exercem influência sobre a produção de carotenóides. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 9. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para os carotenóides totais.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*	1019,13	27,49	37,07	0,0007
(1)Ext.malte (L)	-10,39	12,92	-0,804	0,5057
Ext. malte (Q)*	-238,31	14,23	-16,74	0,0035
(2)Peptona (L)*	111,40	12,92	8,62	0,0132
Peptona (Q)*	-221,01	14,23	-15,53	0,0041
(3)Glicose (L)*	-55,92	12,92	-4,33	0,0495
Glicose (Q)*	-131,57	14,23	-9,24	0,0115
1L. 2L	-63,09	16,87	-3,74	0,0647
1L. 3L*	-79,53	16,87	-4,71	0,0422
2L. 3L*	112,71	16,87	6,68	0,0217

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas (extrato de malte, glicose e peptona), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 10. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,91) e o F calculado (2,01 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 5.

Tabela 10. Análise de variância para os carotenóides totais.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	1292412	7	184630,20	6,60
Resíduos	251740,10	9	27971,12	
Falta de ajuste	247185,50	7		
Erro puro	4554,58	2		
Total	1544152	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}, 95\%}=3,29$; Coeficiente de correlação: $R=0,91$

Equação 1:

$$C_{\text{totais}} = 1019,12 - 238,31.(X_5)^2 + 111,40.X_6 - 221,01.(X_6)^2 - 55,92.X_7 - 131,57.(X_7)^2 - 79,53.X_5.X_7 + 112,71.X_6.X_7 \quad (1)$$

Onde: C_{totais} = Carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$); X_5 = extrato de malte; X_6 = peptona ; X_7 = glicose

O máximo teor de carotenóides totais ($1019 \mu\text{g/L}$) foi obtido nos ensaios correspondendo ao ponto central de concentração dos três substratos (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L peptona) que compõem o meio de fermentação, caracterizando a otimização da produção de carotenóides totais. Comparando os resultados obtidos com o meio de controle - YM ($307,88 \mu\text{g/L}$), observa-se que a concentração de carotenóides totais otimizada é 3,3 vezes superior ao controle.

Na literatura raros são os trabalhos que relatam os efeitos das condições de cultivo na otimização da produção de carotenóides. Recentemente, MALDONADE (2003) avaliou o efeito da composição do meio (glicose, extrato de levedura, MgSO_4 , KH_2PO_4) na produção de carotenóides por *Rhodotorula mucilaginosa*-137. O extrato de levedura foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, enquanto que os sais de sulfato tiveram efeito negativo. A máxima concentração de carotenóides totais foi de $745 \mu\text{g/L}$ com 15 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de glicose. FANG & CHIOU (1993) aumentaram a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, otimizando as condições de

cultivo, sendo que o extrato de levedura e a glicose foram as melhores fontes de nitrogênio e carbono, resultando numa concentração de 7809 µg/L. Resultados similares foram obtidos por YAMANE et al. (1997) observaram que houve aumento de até 12 vezes na produção de β-caroteno quando *Phaffia rhodozyma* foi crescida num meio com concentração de glicose de 5 % (p/v). Em outro estudo HAARD (1988), isolou β-caroteno e β-zeacaroteno como principais pigmentos de *Phaffia rhodozyma*, em meio de fermentação constituído por 100 g/L de glicose. SUTHERLAND et al. (1996) verificaram que as fontes de carbono, que favoreceram melhores crescimentos celulares de *Phaffia rhodozyma*, foram a sacarose e glicose, porém concentrações altas de glicose inibiram a produção de astaxantina.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de p e t, para a produção específica de carotenóides. Observa-se que o extrato de malte foi a variável independente que exerceu influência significativa (p<0,05), sobre a produção específica de carotenóides (µg/g). Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste na análise de variância.

Tabela 11. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a produção específica de carotenóides.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	287,71	31,60	9,10	0,0118
(1)Ext.malte (L)	-27,19	14,85	-1,83	0,2085
Ext. malte (Q)*	-72,05	16,36	-4,40	0,0479
(2)Peptona (L)	-6,21	14,85	-0,424	0,7164
Peptona (Q)	-56,74	16,36	-3,47	0,0740
(3)Glicose (L)	-20,55	14,85	-1,38	0,3006
Glicose (Q)	-25,36	16,36	-1,55	0,2612
1L. 2L	2,04	19,39	0,105	0,9259
1L. 3L	-5,46	19,39	-0,282	0,8046
2L. 3L	38,52	19,39	1,99	0,1854

*fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

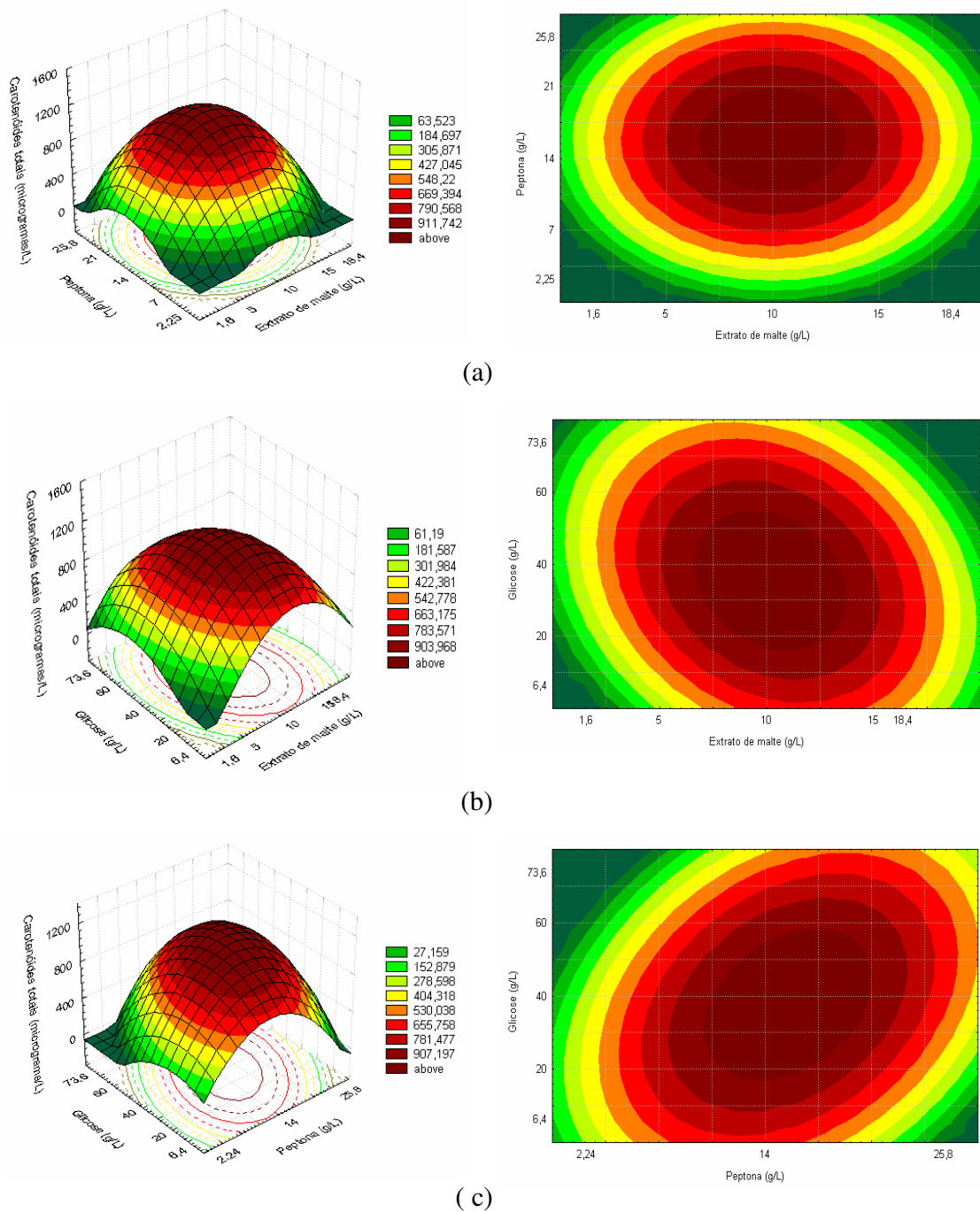


Figura 5. Superfícies de resposta e curvas de contorno para os carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), glicose e peptona (c).

A Equação 2 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta produção específica de carotenóides em função das variáveis independentes analisadas (extrato de malte, glicose e peptona), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 12. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,88) e o F calculado (18,09 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 6. A máxima produção específica de carotenóides (287,71 µg/g) encontra-se nos ensaios correspondendo ao ponto central de concentração dos três substratos (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L peptona) que compõe o meio de fermentação, caracterizando a otimização da produção de carotenóides específicos.

Tabela 12. Análise de variância para a produção específica de carotenóides.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	25,03	1	25,03	67,65
Resíduos	5,60	15	0,37	
Falta de ajuste	4,99	13		
Erro puro	0,61	2		
Total	30,64	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab } 95\%}=3,74$; Coeficiente de correlação: $R=0,88$

Equação 2:

$$C_{\text{especifica}} = 287,71 - 72,05 \cdot (X_5)^2 \quad (2)$$

Onde: $C_{\text{especifica}}$ = produção específica de carotenóides (µg/g); X_5 = extrato de malte

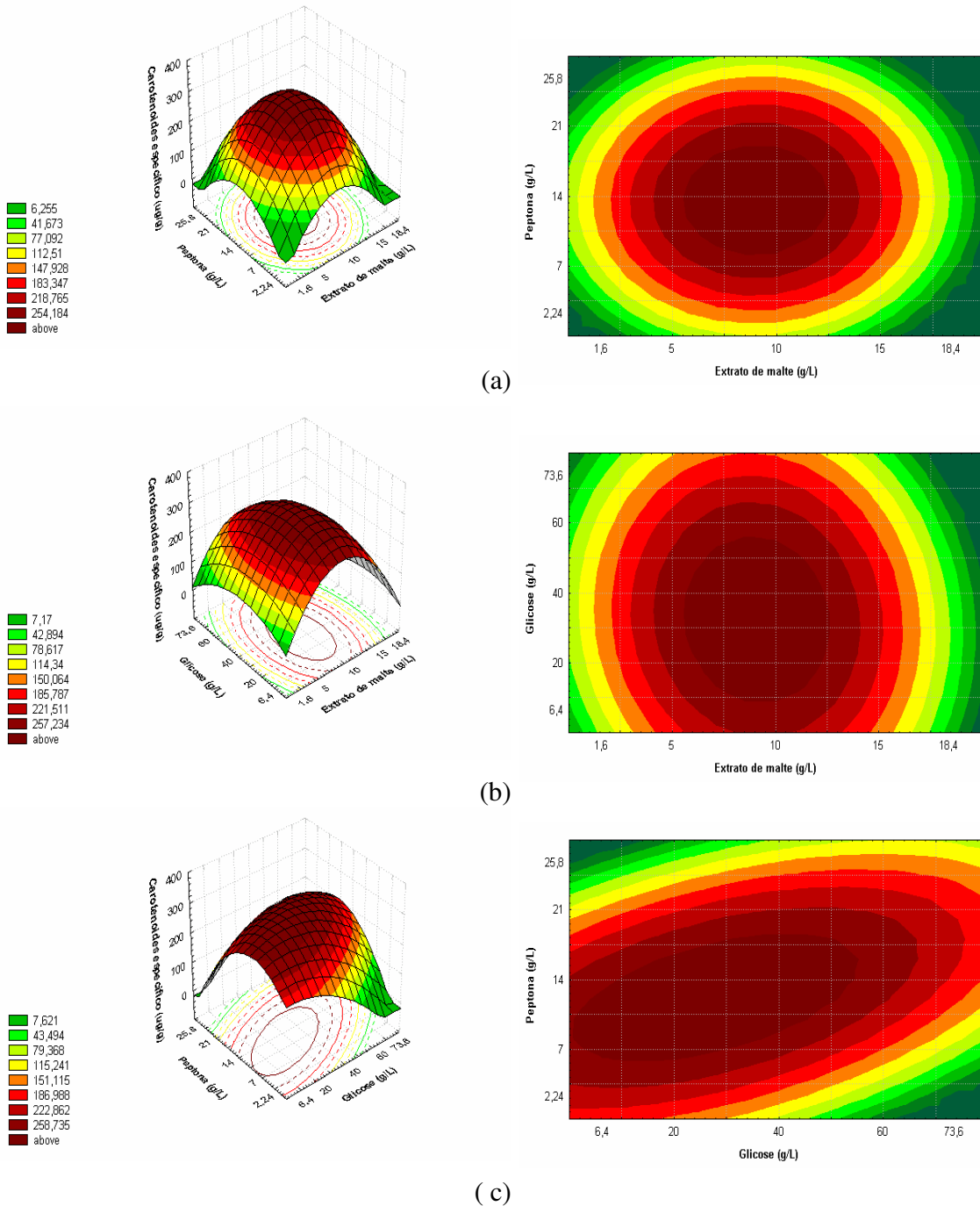


Figura 6. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), peptona e glicose (c).

A Tabela 13 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de p e t, para a biomassa (g/L). Observa-se que o extrato de malte e a peptona foram as variáveis independentes que exerceram influência significativa ($p < 0,05$) positiva, sobre a produção de biomassa. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 13. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a biomassa.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	3,62	0,317	11,42	0,0076
(1)Ext.malte (L)*	0,735	0,149	4,93	0,0388
Ext. malte (Q)	0,065	0,164	0,398	0,7293
(2)Peptona (L)*	1,034	0,149	6,93	0,0202
Peptona (Q)	-0,041	0,164	-0,249	0,8265
(3)Glicose (L)	-0,224	0,149	-1,50	0,2723
Glicose (Q)	-0,216	0,164	-1,32	0,3187
1L. 2L	-0,309	0,194	-1,58	0,2539
1L. 3L	-0,329	0,194	-1,69	0,2336
2L. 3L	0,076	0,194	0,391	0,7333

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A equação 3 apresenta o modelo codificado não linear de primeira ordem, que descreve a resposta produção de biomassa em função das variáveis independentes analisadas (extrato de malte, glicose e peptona), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 14. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o F calculado (8,16 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 7.

Tabela 14. Análise de variância para a biomassa.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	25,03	2	12,52	30,54
Resíduos	5,60	14	0,41	
Falta de ajuste	4,99	12		
Erro puro	0,61	2		
Total	30,64	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}, 95\%}=3,74$; Coeficiente de correlação: $R=0,90$

Equação 3:

$\text{Biomassa} = 3,62 + 0,735.X_5 + 1,034.X_6 \quad (3)$
--

Onde: Biomassa = Biomassa (g/L); X_5 = extrato de malte; X_6 = peptona.

Na Figura 7 observa-se que a tendência da máxima produção de biomassa situa-se na faixa de concentrações de extrato de malte e peptona maiores que 18,4 g/L e 25,8 g/L, respectivamente. O aumento da concentração de glicose resultou numa diminuição não significativa ($p<0,05$), no crescimento celular. De acordo com a Tabela 8, a produção de biomassa de *Sporidiobolus salmonicolor* variou de 1,18 a 5,95 g/L, dependendo das condições de cultivo.

Recentemente, MALDONADE (2003) avaliou o crescimento celular por *Sporobolomyces* em meio YM, obtendo 3,3 g/L após 5 dias de fermentação. Em trabalho semelhante, o autor indicou que o crescimento celular de *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*-137, é afetado pela concentração de glicose e extrato de levedura. A produção de biomassa por *R. mucilaginosa*-137 atingiu o valor máximo de 8 g/L, na faixa de concentração de 15 a 17,1 g/L de extrato de levedura e de 15 a 20 g/L de glicose. Em relação à *R. glutinis* há uma tendência de aumento (16 g/L) quando a faixa de concentração situa-se entre 8 a 12 g/l de extrato de levedura e glicose acima de 16 g/L. FREGOVA et al. (1994) observaram que o aumento da concentração da fonte de carbono (lactose) de 3,9 para 7,1 % (p/v), resultou num incremento não significativo de 27 g/L para 30 g/L de biomassa de *R. glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*.

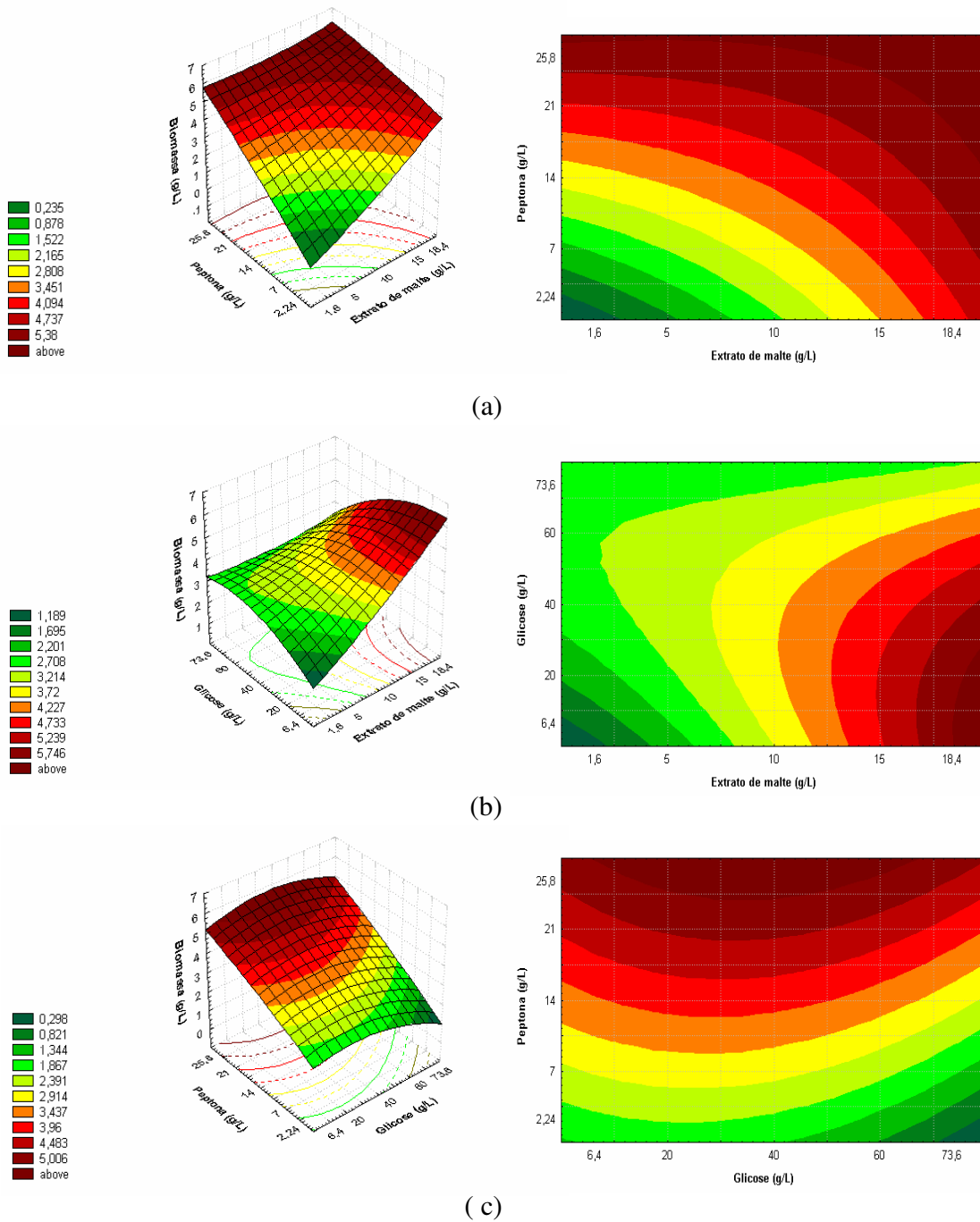


Figura 7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a biomassa (g/L) em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), peptona e glicose (c).

A Tabela 15 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com as respostas de proteína, pH final e glicose residual ($Gli_{residual}$).

Tabela 15. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de proteína, pH_{final} e $Gli_{residual}$.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas		
	X_5	X_6	X_7	pH_{final}	$Gli_{residual}$ (g/L)	Proteína (b.s,%)
1	5(-1)	7(-1)	20(-1)	2,96	17,22	4,61
2	15(1)	7(-1)	20(-1)	2,92	16,99	2,75
3	5(-1)	21(1)	20(-1)	4,30	1,08	2,92
4	15(1)	21(1)	20(-1)	4,30	2,86	3,34
5	5(-1)	7(-1)	60(1)	2,77	17,82	4,38
6	15(1)	7(-1)	60(1)	2,99	18,09	3,84
7	5(-1)	21(1)	60(1)	3,51	17,75	1,8
8	15(1)	21(1)	60(1)	3,74	18,48	4,29
9	10(0)	14(0)	40(0)	3,58	17,12	3,23
10	10(0)	14(0)	40(0)	3,75	16,71	4,28
11	10(0)	14(0)	40(0)	4,02	16,26	2,76
12	10(0)	14(0)	6,4(-1,68)	6,56	5,42	3,92
13	10(0)	14(0)	73,6(1,68)	3,71	18,20	2,81
14	10(0)	2,24(-1,68)	40(0)	2,32	14,48	5,98
15	10(0)	25,8(1,68)	40(0)	3,8	13,37	2,79
16	1,6(-1,68)	14(0)	40(0)	3,52	17,38	2,69
17	18,4(1,68)	14(0)	40(0)	3,63	13,47	3,04

* X_5 = extrato de malte (g/L); X_6 = peptona (g/L); X_7 = glicose (g/L); b.s = base seca.

A Tabela 16 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de p e t, para o pH final. Observa-se que os efeitos lineares e quadráticos da concentração de peptona e glicose sobre o pH final são estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 16. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para o pH final.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	3,82	0,128	29,85	0,0011
(1)Ext.malte (L)	0,046	0,060	0,726	0,5434
Ext. malte (Q)	-0,184	0,066	-2,79	0,1082
(2)Peptona (L)*	0,491	0,060	8,17	0,0146
Peptona (Q)*	-0,367	0,066	-5,54	0,0310
(3)Glicose (L)*	-0,459	0,060	-7,63	0,0167
Glicose (Q)*	0,368	0,066	5,56	0,0308
1L. 2L	0,006	0,079	0,079	0,9437
1L. 3L	0,061	0,079	0,781	0,5167
2L. 3L	-0,154	0,079	-1,96	0,1891

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 4 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta pH_{final} em função das variáveis independentes analisadas (extrato de malte, glicose e peptona), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 17. O coeficiente de correlação obtido (0,91) e o F calculado (4,34 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 8.

Tabela 17. Análise de variância para o pH_{final} .

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	11,15	4	2,79	14,15
Resíduos	2,37	12	0,197	
Falta de ajuste	2,27	10		
Erro puro	0,098	2		
Total	13,52	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%}=3,26$; Coeficiente de correlação: $R=0,91$

Equação 4:

$$pH_{\text{final}} = 3,82 + 0,491.X_6 - 0,367.(X_6)^2 - 0,459.X_7 + 0,368.(X_7)^2 \quad (4)$$

Onde: X_6 = peptona; X_7 = glicose.

A Tabela 18 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a glicose residual. Observa-se que esta variável foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelos efeitos lineares e quadráticos da peptona e glicose, e interação entre peptona e glicose. O aumento da concentração de peptona ocasionou uma diminuição da glicose residual no meio de fermentação, porém o contrário foi verificado na interação da glicose e peptona. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 18. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a glicose residual.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*	16,67	0,248	67,30	0,0002
(1)Ext.malte (L)	-0,294	0,116	-2,53	0,1272
Ext. malte (Q)	-0,394	0,128	-3,07	0,0917
(2)Peptona (L)*	-2,33	0,116	-20,02	0,0025
Peptona (Q)*	-0,925	0,128	-7,21	0,0187
(3)Glicose (L)*	4,06	0,116	34,90	0,0008
Glicose (Q)*	-1,67	0,128	-13,05	0,0058
1L. 2L	0,309	0,152	2,03	0,1795
1L. 3L	-0,069	0,152	-0,45	0,6955
2L. 3L*	3,82	0,152	25,14	0,0016

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

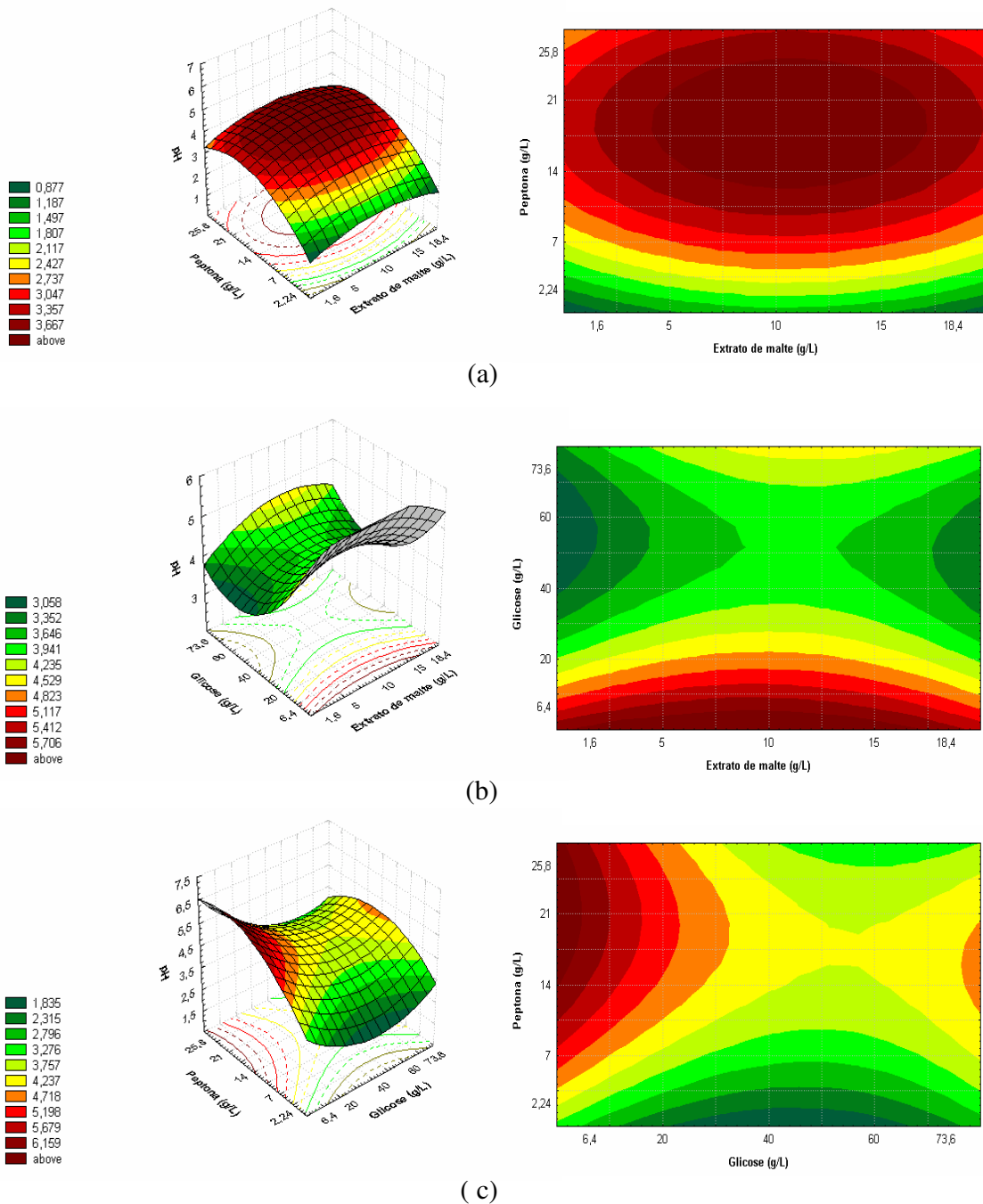


Figura 8. Superfícies de respostas e curvas de contorno para o pH_{final} em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), peptona e glicose (c).

A Equação 5 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta glicose residual em função das variáveis independentes analisadas (extrato de malte, glicose e peptona), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 19. O coeficiente de correlação obtido (0,95) e o F calculado (6,58 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 9.

Tabela 19. Análise de variância para a glicose residual.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	452,89	5	90,58	21,06
Resíduos	47,36	11	4,30	
Falta de ajuste	46,99	9		
Erro puro	0,370	2		
Total	500,26	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab } 95\%}=3,20$; Coeficiente de correlação: $R=0,95$

Equação 5:

$$\text{Gli}_{\text{residual}} = 16,67 - 2,33.X_6 - 0,925.(X_6)^2 + 4,06.X_7 - 1,67.(X_7)^2 + 3,82.X_6.X_7 \quad (5)$$

Onde: $\text{Gli}_{\text{residual}}$ = Glicose residual (g/L); X_6 = peptona; X_7 = glicose.

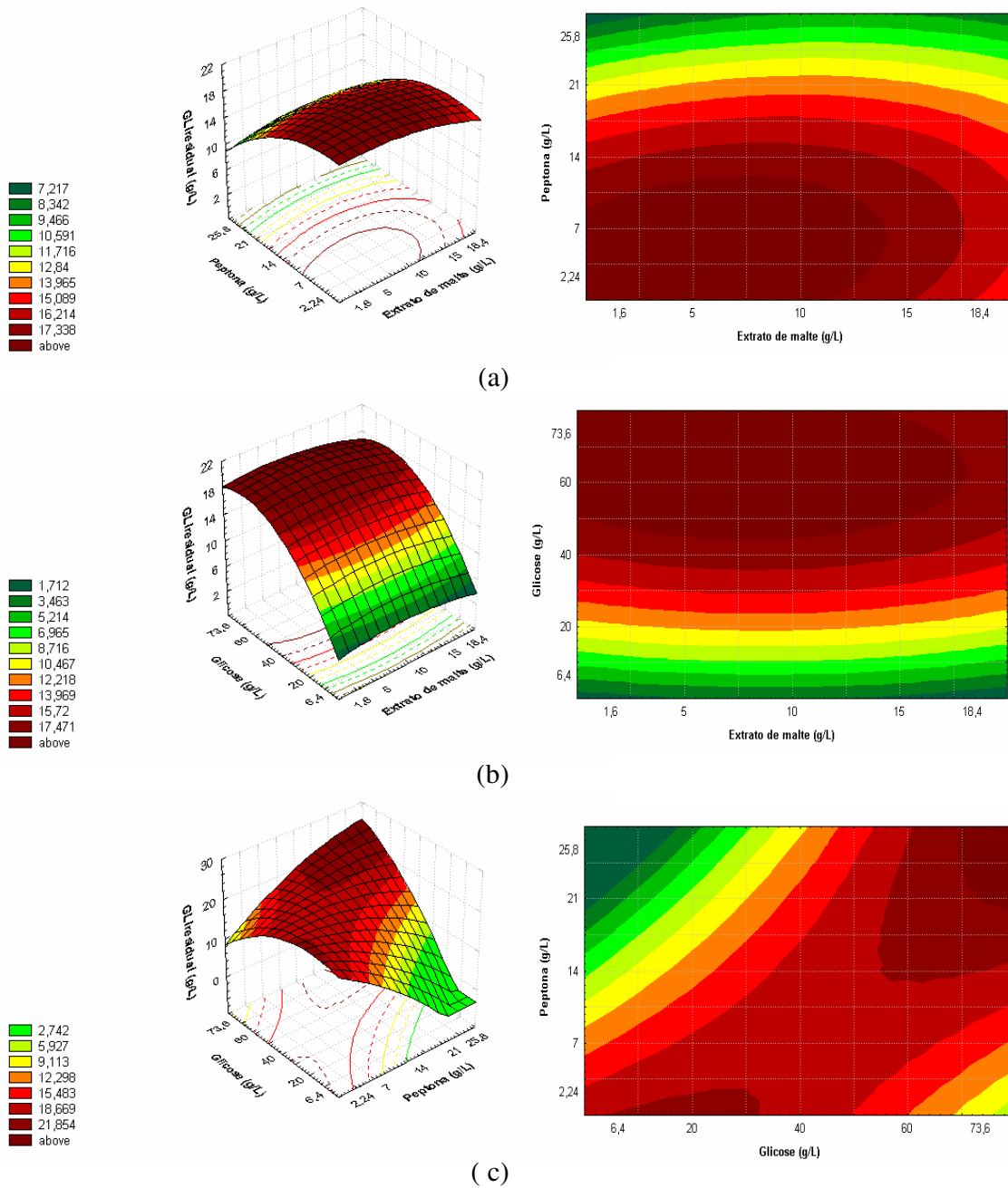


Figura 9. Superfícies de respostas e curvas de contorno para $Gli_{residual}$ em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), peptona e glicose (c).

Em relação à proteína celular (Figura 10) observa-se que as variáveis independentes não influenciaram significativamente ($p < 0,05$) esta resposta, no intervalo de confiança estudado. Entretanto, nenhum dos artigos consultados sobre a determinação de teores de proteínas em células de leveduras pigmentadas apresentou relação entre a composição do meio de cultivo com os teores de proteínas (MALDONADE, 2003; MARTIN et al., 1993; MATELLI et al., 1990; JOHNSON et al., 1980).

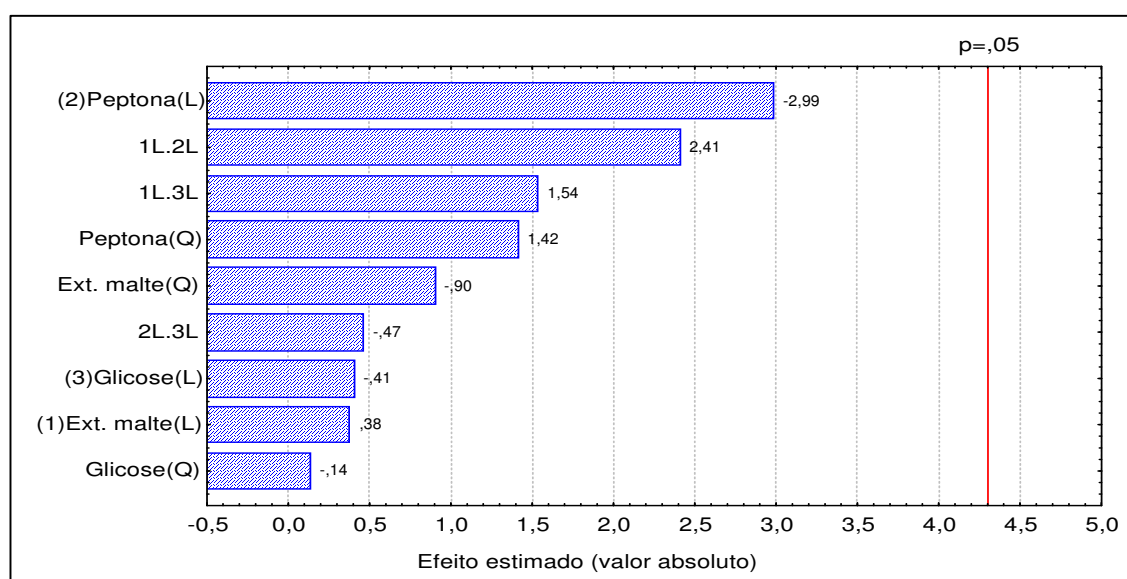


Figura 10. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental completo 2^3 para a proteína celular.

O teor de proteína celular obtido neste trabalho variou de 1,80 a 5,98 %, sendo estes inferiores aos encontrados na literatura para leveduras pigmentadas. De acordo com JOHNSON et al. (1980) o teor de proteína na biomassa celular de *P. rhodozyma* foi de 30 %, enquanto que MARTIN et al. (1993) relataram 47 %. Em *R. rubra*, os teores de proteínas foram de 48 % (MARTIN et al., 1993) e 38,2 % (MATELLI et al., 1990). Em outro estudo, MALDONADE (2003) encontrou para a *R. mucilaginosa-13* e *R. glutinis*, teores que variaram de 47 a 68 % e de 21 a 51 % (dependendo das condições de cultivo), respectivamente.

3.2. Análise dos carotenóides

A Tabela 20 e a Figura 11 mostram os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a separação cromatográfica dos carotenóides produzidos por *Sporiodiobolus salmonicolor* (CBS 2636). Observa-se a separação de cinco picos cromatográficos, nas condições investigadas. Um dos carotenóides majoritários identificado nesta linhagem foi o β -caroteno (pico 5), correspondendo a aproximadamente 32 % em relação aos carotenóides totais. Os demais carotenóides não foram identificados, pois não estão disponíveis no mercado padrões cromatográficos. Estes padrões de carotenóides são normalmente sintetizados ou isolados a partir de uma fonte natural, purificados e confirmados a identidade da estrutura do composto por técnica de ressonância magnética nuclear (RMN).

Segundo KIMURA (2000) o comportamento cromatográfico e o espectro de absorção UV-visível são as primeiras ferramentas utilizadas para a identificação de carotenóides. O tempo de retenção reflete a polaridade e os comprimentos de onda de máxima absorção e a estrutura fina (forma) do espectro reflete o cromóforo. No entanto, o uso destes dois parâmetros como critério único para identificação embora prática comum pode não ser conclusivo e pode levar a erros de identificação. Tempos de retenção são difíceis de se reproduzir e mesmo quando padrões autênticos são disponíveis para co-cromatografia, a identificação será inconclusiva uma vez que diferentes carotenóides podem ter o mesmo tempo de retenção. Da mesma forma, diferentes carotenóides podem ter os mesmo cromóforos e então apresentar o mesmo espectro.

MALDONADE (2003) avaliou a composição de carotenóides de leveduras isoladas no Brasil, sendo que a linhagem do gênero *Sporobolomyces* a concentração de carotenóides totais foi de 237 $\mu\text{g/L}$. Os principais pigmentos encontrados nesta linhagem foram o β -caroteno (118 $\mu\text{g/L}$), toruleno (71 $\mu\text{g/L}$), γ -caroteno (20 $\mu\text{g/L}$), β -zeacaroteno (18 $\mu\text{g/L}$) e torulahodina (10 $\mu\text{g/L}$)

Tabela 20. Propriedades, obtidas por CLAE, dos carotenóides de *Sporidiobolus salmonicolor*.

Pico	Carotenóide	t _R (min)	Área (%)
1*	β-caroteno	38,23	100,00
2	NI	17,28	2,54
3	NI	34,13	41,8
4	NI	35,82	22,71
5	β-caroteno	38,09	32,31
6	NI	45,55	0,64

* Padrão β-caroteno; NI – não identificado.

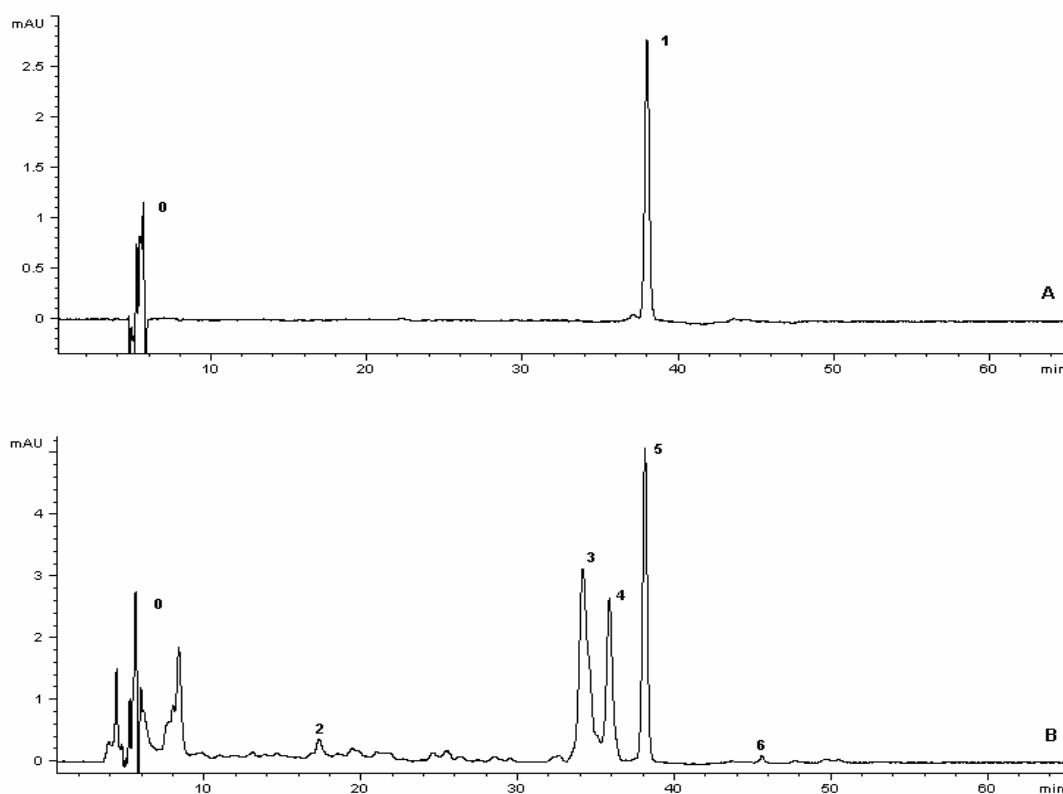


Figura 11. Cromatograma, obtido por CLAE dos carotenóides, do padrão β-caroteno (A) e da amostra (B). Pico identificação: 0 – mistura de solventes; 1 e 5 - β-caroteno; 2,3,4 e 6 – não identificados. Condições cromatográficas: coluna C₁₈ (5 μm, 4,6 mm x 250 mm), fase móvel: THF/água/metanol (15:4:81/40 min e 35:0:65/30 min), fluxo de 0,5 mL/min e detecção a 470 nm.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a linhagem *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) produz carotenóides intracelulares com forte associação destes com as células, sendo que o tratamento empregando N₂ líquido combinado a dimetilsulfóxido (DMSO) possibilitou a ruptura celular e a extração com acetona/metanol (7:3, v/v), permitiu obter o máximo de recuperação de carotenóides totais.

O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da bioprodução de carotenóides obtendo-se um teor de carotenóides de 1019 µg/L (287,71 µg/g) com concentração de glicose 40 g/L, extrato de malte 10 g/L, peptona 14 g/L, agitação 180 rpm, temperatura 25 °C e pH inicial 4,0.

A máxima produção de biomassa situa-se na faixa de concentrações de extrato de malte e peptona maiores que 18,4 g/L e 25,8 g/L, respectivamente. A biomassa de *Sporidiobolus salmonicolor* variou de 1,18 a 5,95 g/L, dependendo das condições de cultivo.

Um dos carotenóides majoritários identificado nesta linhagem foi o β-caroteno, correspondendo a aproximadamente 32 % em relação aos carotenóides totais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16. Ed. Washington, 1995.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresearch Technology**, v.71, p. 41-44, 2000.

CALO, P.; VELASQUEZ, J. B.; SIERO, C.; VILLA, T. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. **Journal of Agricultural Chemistry**, v. 43, p.1396-1399, 1995.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**, s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, p. 466-469, 1993.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p. 175-181, 1996.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, p.888-894, 1994.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker. V. 105, 1989, 259p.

HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeast on molasses. **Biotechnology Letter**, v. 10, p. 609-614, 1988.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v.120, p. 1339-1343, 1974.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Science**, v. 59, p. 1777-1782, 1980.

JOHNSON, E. A.; GIL- HWAN AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1991.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1995.

KIMURA, M. **Aprimoramento da metodologia para determinação de carotenóides em alimentos**. Campinas. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000.

MALDONADE, I. R. **Produção de Carotenóides por Leveduras**. Campinas. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2003.

MARTIN, A. M.; LU, C.; PATEL, T. Growth parameters for the yeast *Rhodotorula rubra* grown in peat extracts. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, p. 321-325, 1993.

MATELLI, H. L.; DE SILVA, I. M.; SOUZA, N.O; POMEROY, D. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain grown on sugar cane juice. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 207-208, 1990.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 789-785, 1994.

QIAN, P.; MIZOGUCHI, T.; FUJII, R.; HARA, K. Conformation analysis of carotenoids in the purple bacterium *Rhodobium marinum* based on NMR spectroscopy and AM1 calculation. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 42, p. 1311–1319, 2002.

RODRIGUEZ –AMAYA, B. D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Food**. Washington, D. C.: International Life Science Institute Prece, p.64, 1999.

SEDMAK, J.J.; WEERASINGHE, D. K.; JOLLY, S.O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology. Techn.**, v. 4, p. 107–112, 1990.

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. **Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine**. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, v. 29, p. 570-572, 1996.

SILVA, C.; CABRAL, J.M.S.; KEULEN, F.V. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 257–262, 2004.

SIMPSON, K. L.; CHICHESTER, C. O.; PHAFF, H. J. Carotenoid pigments of yeast, p. 493-515. In Rose, A. H.; Harrison, J. S. (Ed). **The Yeasts**, v. 2. Academic Press, New York, 1971.

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**, v. 94, p. 263–267, 2004.

SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G.; PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 975-980, 1996.

YAMANE, YU-ICHI; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence os oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4471-4478, 1997.

**CAPÍTULO 5. BIOPRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR
Sporidiobolus salmonicolor (CBS 2636) UTILIZANDO
SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS**

BIOPRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) UTILIZANDO SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

RESUMO

A crescente demanda de carotenóides pelas indústrias tem despertado o interesse pela sua bioprodução. A redução de custos de processo incentiva a utilização de substratos industriais de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho refere-se à bioprodução de carotenóides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* utilizando substratos agroindustriais. A bioprodução foi realizada em agitador orbital (shaker), utilizando 10 % (v/v) de inóculo, com incubação a 25 °C, 180 rpm, por 120 horas e em ambiente sem iluminação. A recuperação dos carotenóides foi realizada empregando N₂ líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). Para otimização da produção de carotenóides totais utilizando substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo (4 %/90 °C/150 rpm/1 h) e com ácidos (sulfúrico e fosfórico), empregou-se técnica de planejamento experimental (planejamento completo de segunda ordem). Na bioprodução de carotenóides com substratos pré-tratados com carvão ativo, o máximo teor de carotenóides totais obtido foi de 208,63 µg/L, com concentração de água de maceração de milho 10 g/L, melaço de cana-de-açúcar 10 g/L, Prodex Lac® (hidrolisado de levedura) 10 g/L, agitação 180 rpm, temperatura 25 °C e pH inicial 4,0. No entanto, na bioprodução de carotenóides com substratos pré-tratados com ácidos foi possível otimizar a concentração de carotenóides totais, obtendo-se teor de 541,51 µg/L com concentração de melaço de cana-de-açúcar 10 g/L, água de maceração de milho 5 g/L, Prodex Lac® 5 g/L, agitação 180 rpm, temperatura 25 °C e pH inicial 4,0.

Palavras-chave: *Sporidiobolus salmonicolor*; substratos agroindustriais; carotenóides.

1. INTRODUÇÃO

O interesse por carotenóides tem aumentado nos últimos anos, devido à crescente demanda destes compostos nas indústrias de alimentos (corantes e em suplementos nutricionais), farmacêutica, cosmética e de ração, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões para 2005 (FRASER & BRAMLEY, 2004). Também a procura por compostos com conotação natural tem resultado num aumento de pesquisas referentes à produção de carotenóides por via fermentativa. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de carotenóides visa um aumento do rendimento da concentração de carotenóide assim como a redução de custos relativos ao processo, através da utilização de substratos de baixo custo, como os subprodutos agroindustriais, e ricos em açúcares e matéria orgânica, sendo que no contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza.

A literatura cita o uso de glicose e sacarose como fontes de carbono preferenciais para a bioprodução de carotenóides (BUZZINI & MARTINI, 2000), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melaço, soro de leite, farelo de milho, água de maceração de milho, entre outros. HAARD (1988) otimizou a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, utilizando melaço (1 % de glicose), sendo que a concentração do carotenóide foi de 552 µg/g de biomassa seca. FREGOVA et al. (1994) estudaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, em meio composto de ultrafiltrado de soro de leite, com concentração de lactose variando de 3,9 a 7,1 %. A máxima produção de carotenóides obtida foi de 268 µg/g de células secas, no meio contendo 3,9 % de fonte de carbono e os principais carotenóides identificados foram β-caroteno (43,9 µg/g), toruleno (23,0 µg/g) e torulahodina (182 µg/g). HAYMAN et al. (1995) estudaram o crescimento de *P. rhodozyma*, utilizando farelo de milho como fonte de nitrogênio. A concentração total de carotenóides foi de 2,4 µg/mL e de 2,1 µg/mL quando se utilizou meio com e sem farelo, respectivamente.

Porém, sabe-se que os meios industriais utilizados para a bioprodução são bastante complexos e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação (TREICHEL, 2004).

Por exemplo, o melaço é um subproduto da indústria de açúcar que é utilizado com grande frequência como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e matéria-prima para a indústria de fermentações (SIRIANUNTAPIBOON et al., 2004). Porém, altas concentrações de metais pesados no meio causam problemas críticos durante a fermentação, tais como inibição do crescimento microbiano, influenciam o pH do substrato e estão envolvidos na inativação das enzimas associadas com a biossíntese do produto (ROUKAS, 1998).

A literatura relata alguns trabalhos que utilizaram diferentes técnicas de clarificação e remoção de metais pesados. ROUKAS (1998) empregaram resinas catiônicas, tratamento com ácido sulfúrico, tratamento com tricálcio fosfato, ferrocianeto de potássio e EDTA no pré-tratamento de melaço de beterraba e os resultados mostraram que o tratamento com ácido sulfúrico foi o que gerou as máximas concentrações do produto estudado. KASSEN & KOKUGAN (1997) testaram os efeitos do pré-tratamento do melaço através da microfiltração com uma membrana de cerâmica (0,05 μm) na fermentação de etanol. Os resultados mostraram que cerca de 99,5 % de glicose poderiam ser metabolizados pelas células no melaço pré-tratado, enquanto apenas 83,1 % de glicose são metabolizados pelas células no melaço não tratado. RYAN & JOHNSON (2001) estudaram os efeitos da modificação de uma membrana padrão de diálise, comercialmente disponível, através da redução de seus poros com a deposição de cristais de octanato de cálcio na membrana. A membrana modificada foi capaz de reduzir a concentração de potássio no melaço, aumentando o rendimento da fermentação, com perdas de açúcares bem menores durante a difusão. TREICHEL (2004) testou os efeitos dos pré-tratamentos do melaço e água de maceração de milho, com carvão ativo, terra diatomácea, ácido sulfúrico e ácido fosfórico, na produção da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. O pré-tratamento mais adequado para os meios industriais foi com 8 % (p/v) de carvão ativo (ANF – Carvorite), 1 hora de agitação em frascos agitados a 70 °C e 150 rpm.

Assim, verifica-se pela literatura que a utilização de resíduos industriais tem tido grande interesse de estudo devido ao apelo ecológico e econômico, além de uma ampla aplicação, portanto requerendo em alguns casos, estudos de clarificação que viabilizem não só a obtenção dos produtos, mas também as etapas de recuperação e purificação dos mesmos sem aumento excessivo no custo do processo. Neste contexto, o objetivo deste

trabalho foi estudar a bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) em meio industrial bruto e pré-tratado através do desenvolvimento das seguintes etapas: Estudo de diferentes pré-tratamentos para os substratos industriais; Caracterização dos substratos industriais pré-tratados e otimização da bioprodução de carotenóides em meio industrial pré-tratado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo

A linhagem da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 foi utilizada nos ensaios para produção de carotenóides utilizando meios agroindustriais.

O inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM. Após esterilização, estes frascos foram inoculados com suspensão de células, incubados a 25 °C, 180 rpm por 48 horas.

Os ensaios de bioprodução de carotenóides foram realizados em agitador orbital (Nova Ética RDB-430) com controle de temperatura e agitação, no qual foram colocados Erlenmeyeres de 250 mL, contendo 100 mL de meio e incubados a 25 °C, 180 rpm, pH inicial de 4,0, por 120 horas e sem iluminação, conforme condições definidas para o meio convencional (Capítulo 4).

2.2. Substratos industriais testados

Os substratos industriais utilizados foram melaço de cana-de-açúcar, adquirido na Usina Ester na região da Grande Campinas/SP, água de maceração de milho (AMM) cedida

pela Corn Products – Mogi Guaçu/SP e Prodex Lac® (hidrolisado de levedura) adquirido da Indústria Prodesa - Mogi Mirim/SP.

Os meios industriais (melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho) utilizados para produção de carotenóides são bastante complexos, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação devido à formação de precipitados no meio de fermentação e/ou pela presença de pigmentos que poderão ser extraídos com os carotenóides. Como o meio de cultivo consiste em resíduos industriais como fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, a utilização do meio pré-clarificado é indispensável para não comprometer a recuperação e extração dos carotenóides.

Nos estudos de pré-tratamento realizados no melaço e na água de maceração de milho, empregaram-se tratamentos com carvão ativo e com ácido sulfúrico e fosfórico, conforme descrito a seguir.

2.2.1 Pré-tratamento com carvão ativo

Em ensaios de pré-tratamento com carvão ativo Carvorite-ANF (Tabela 1) foram utilizadas concentrações de 4 e 8 % (p/v). A água de maceração de milho e o melaço de cana-de-açúcar foram utilizados na concentração de 100 g/L. Os experimentos foram realizados em frascos agitados, com agitação de 150 rpm por 1 hora, a 70 e 90 °C. Posteriormente, realizou-se centrifugações (10.000 ×g, 5°C, 15 min) e filtração em papel (Whatman nº1). A água de maceração de milho foi filtrada por duas vezes e então centrifugada, e o melaço foi filtrado por três vezes após uma centrifugação inicial. Como a centrifugação não foi capaz de remover todo o carvão do meio, foi necessária uma operação final de polimento, realizada com filtração em membranas de acetato de celulose (Sartorius) de 0,8 e 0,2 µm, buscando separar o máximo de carvão possível do meio.

Tabela 1. Características do carvão ativo Carvorite-ANF.

Aspecto	Pulverizado
Granulometria	38 % a 45 % retido pela malha de mesh 325
pH	5,0 a 6,5
Eficiência relativa	75 %
Cinzas	5 % a 7 %
Densidade aparente	0,450 g/cm ³
Umidade ao embalar	<4 %
Filtrabilidade	Ótima

Fonte: Carvorite Ltda – Irati/PR.

2.2.2 Pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico

Os ensaios com o tratamento ácido foram realizados conforme metodologia descrita por TREICHEL (2004), esquematizada na Figura 1. A água de maceração de milho e o melaço de cana-de-açúcar foram utilizados na concentração de 100 g/L. Inicialmente, ajustou-se o pH do melaço e da água de maceração de milho para 3,0 utilizando ácido sulfúrico (Quimex) 1 N e ácido fosfórico (Nuclear) 1 N, respectivamente.

Os substratos permaneceram em repouso por 24 horas a 24 °C; então os mesmos foram centrifugados (Eppendorf 5403) a 5000 rpm por 15 minutos e ajustou-se o pH para 4,0 no melaço e 5,5 para a água de maceração de milho, com solução de NaOH (Vetec) 2 N.

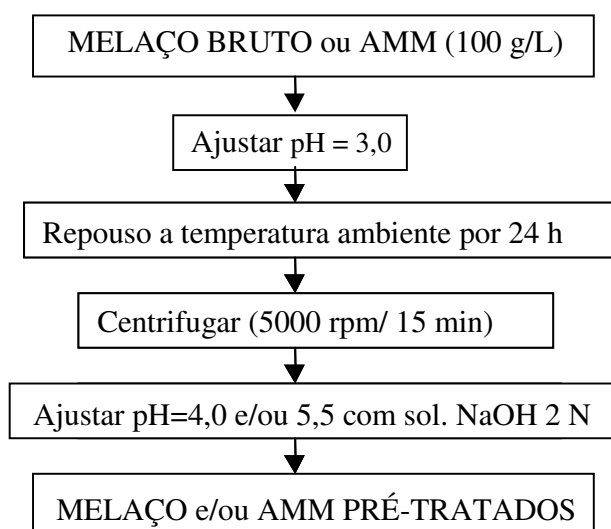


Figura 1. Fluxograma do pré-tratamento do melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho (AMM) com ácido sulfúrico e ácido fosfórico.

2.3 Planejamentos experimentais para otimizar a bioprodução de carotenóides

Para estudar os efeitos da composição dos substratos industriais e do pré-tratamento na produção de carotenóides, foi utilizado quatro planejamentos fatoriais completos 2^3 ensaios com 3 pontos centrais (Planejamento 1 - sem pré-tratamento; Planejamento 2 – pré-tratamento com carvão ativo (4 %, 70 °C, 1 h e 150 rpm); Planejamento 3 – pré-tratamento com carvão ativo (8 %, 90 °C, 1 h e 150 rpm) e Planejamento 4 - pré-tratamento ácido). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 2.

A partir dos resultados obtidos nos planejamentos fatoriais anteriores, as faixas de variações entre o limite inferior e superior de cada variável foram ajustadas e planejamentos fatoriais completos 2^2 ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes foram realizados para os pré-tratamentos com carvão ativo e ácidos (sulfúrico ou fosfórico). As variáveis independentes estudadas para o pré-tratamento com carvão ativo foram à água de maceração de milho (AMM) e Prodex Lac®, e a variável fixada foi o melão de cana-de-

açúcar, sendo que os níveis das variáveis independentes encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 2. Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento completo 2³.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Melaço de cana-de-açúcar (g/L)*	X ₁	10	25	40
Água de maceração de milho (g/L)*	X ₂	0	5	10
Prodex Lac® (g/L)	X ₃	0	5	10

* sem pré-tratamento; pré-tratamento com carvão ativo; pré-tratamento com ácido sulfúrico e/ou ácido fosfórico.

Tabela 3. Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2² para o pré-tratamento com carvão ativo.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	1	1,41
AMM (g/L)	X ₂	3	5	10	15	17
Prodex Lac® (g/L)	X ₃	1	5	15	25	29

* Ponto Central, X₁ - Melaço de cana-de-açúcar (40 g/L)

No pré-tratamento com ácidos as variáveis independentes estudadas foram o melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®, e a variável fixada foi a água de maceração de milho, sendo que os níveis das variáveis independentes encontram-se descritos na Tabela 4. Os ensaios de fermentação dos planejamentos fatoriais completos foram realizados conforme descrito no item 2.1.

Tabela 4. Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para o pré-tratamento com ácidos.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0*	1	1,41
Melaço de cana-de-açúcar (g/L)	X ₁	0	2,9	10	17,1	20
Prodex Lac® (g/L)	X ₃	0	1,4	5	8,5	10

* Ponto Central, X₂ - AMM (5 g/L)

As respostas ou variáveis dependentes estudadas foram: concentração de carotenóides (µg/L), produção de específica de carotenóides (µg/g), biomassa (g/L), glicose residual (g/L) e pH final.

2.4. Recuperação de Carotenóides totais

As células foram centrifugadas a 3.000 ×g, 5 °C por 10 min (Eppendorf 5403) e submetidas a sucessivas macerações em almofariz, após congelamento com N₂ líquido. Posteriormente, adicionou-se dimetilsufóxido - DMSO (Nuclear) na relação 2:1, seguindo de aquecimento a 55 °C/30 min (Fanem 102) e homogeneizações periódicas em vortex (Phoenix AP-56). Em seguida, adicionou-se mistura de acetona (Quimex):metanol (7:3, v/v), seguindo de centrifugações (3.000 ×g, 5 °C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células apresentem-se sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em metanol (Merck).

A Figura 2 mostra o esquema do processo de recuperação e extração dos carotenóides totais.

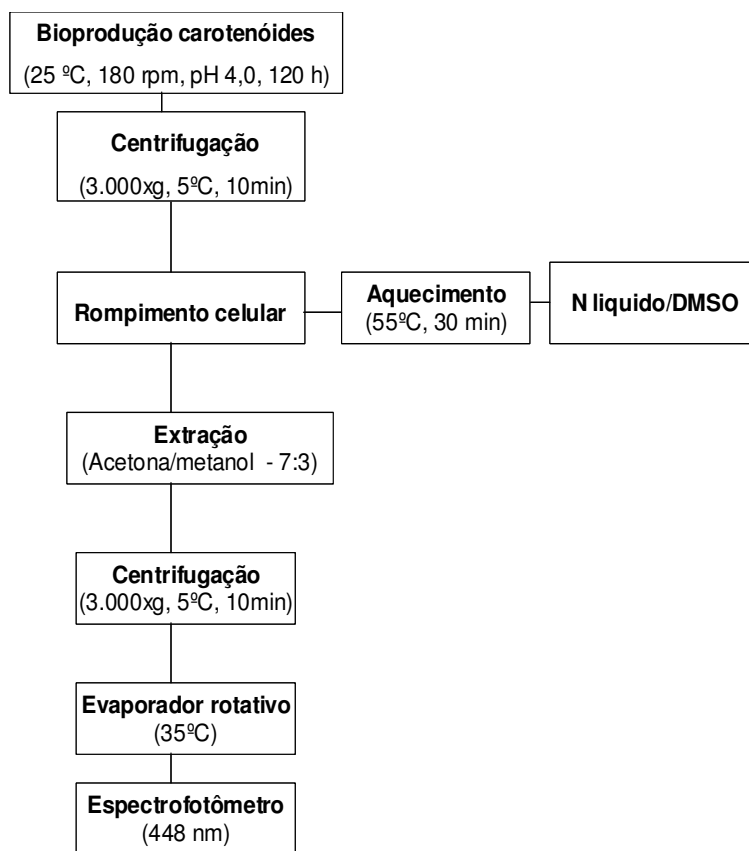


Figura 2. Fluxograma da recuperação e extração dos carotenóides totais.

2.5. Metodologia analítica

2.5.1 Caracterização dos substratos industriais

Para caracterizar os substratos agroindustriais brutos e após os pré-tratamentos com carvão ativo e ácido (sulfúrico e/ou fosfórico) efetuaram-se as seguintes análises físico-químicas:

a) Minerais totais (cinzas) determinados por incineração em mufla (Novus) a 550 °C de acordo com procedimentos descritos por IAL (1985);

b) Macronutrientes (Mg, Ca, Na, K, P) e micronutrientes (Mn, Fe, Zn, Cu.) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama - FAAS (Varian Spectra AA-55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Mg, K, P, Na, Mn, Zn, Fe, e Cu, como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/ acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, K, Na, Cu, Mn, Zn e Fe foram realizados no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrões na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrões. Os parâmetros instrumentais são apresentados na Tabela I (Anexo I);

c) Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995);

d) Glicose (Gli) foi determinada pelo método enzimático: Glicose PAP, liquiform (LABTEST Diagnóstica, 2005);

e) Densidade ótica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 600 nm.

Os efeitos das variáveis investigadas foram estatisticamente avaliados pela análise de variância (Teste de Tukey), com nível de confiança de 95 %, utilizando *software* STATISTICA versão 5.0.

2.5.2 Determinação de carotenóides totais

A absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553). A concentração total de carotenóides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 448 nm, utilizando a equação descrita por DAVIES (1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi o referente ao β -caroteno: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$, para o solvente metanol (SILVA et al., 2004).

Os resultados da concentração de carotenóides foram expressos em termos de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$) e em produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$). A produção

específica de carotenóides representa a concentração total de carotenóides (μg) em relação à biomassa seca de levedura obtida em 1 litro de meio fermentado (DAVIES, 1976).

2.5.3 Determinação da Biomassa

As células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ e 5°C por 10 minutos. Após extração dos carotenóides (descritas no item 2.4), as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas e a massa celular foi quantificada através de secagem em estufa (Fanem SE-320) a 105°C até peso constante.

2.5.4 Determinação do pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

2.5.5 Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático: Glicose PAP, liquiform (LABTEST Diagnóstica, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Pré-tratamentos de substratos agroindustriais

Os resultados de densidade ótica (D.O) e glicose (GLI) no melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho antes e após os pré-tratamentos com carvão ativo e com ácidos (sulfúrico/fosfórico) encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados de densidade ótica (D.O) e de glicose (GLI) antes e após os pré-tratamentos.

Pré-tratamentos	Amostras*			
	Melaço de cana-de-açúcar		AMM	
	DO (600 nm)	GLI(g/L)	DO (600 nm)	GLI(g/L)
Sem pré-tratamento	1,729 ^a	60,10 ^a	3,52 ^a	2,88 ^a
Carvão ativo				
4% (m/m)/70°C/60min	0,485 ^d	51,80 ^c	0,210 ^b	2,72 ^a
4% (m/m)/90°C/60min	1,396 ^b	39,48 ^d	0,145 ^e	1,47 ^d
8% (m/m)/70°C/60min	1,082 ^c	52,74 ^{bc}	0,162 ^d	2,40 ^b
8% (m/m)/90°C/60min	0,195 ^e	36,39 ^d	0,126 ^f	1,36 ^d
Ac. (sulfúrico/fosfórico)	1,347 ^b	55,79 ^b	0,177 ^c	1,78 ^c

* Médias seguidas de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa a 5 % (Teste Tukey); concentração de 100 g/L de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho (AMM).

Na análise estatística para a densidade ótica (D.O) verificou-se que, para a faixa estudada, o aumento na concentração de carvão ativo e na temperatura de pré-tratamento apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos substratos agroindustriais. Analisando estes resultados, nota-se que o pré-tratamento 8 % (m/m) / 90°C por um período de 60 min acarretou perdas de 39,45 % e de 52,78 % na concentração de glicose no melaço de cana-

de-açúcar e da água de maceração de milho, respectivamente. Em relação à densidade ótica a redução foi de 88,72 % para o melaço de cana-de-açúcar e de 96,42 % para a água de maceração de milho. Deste modo, tem-se nestas condições uma redução de densidade ótica efetiva para viabilização da etapa de recuperação e extração dos carotenóides do caldo bruto fermentado.

Os pré-tratamentos com 4 % de carvão / 90°C / 60 min e com 8 % de carvão / 70°C / 60 min não se mostraram eficazes na remoção das impurezas principalmente do melaço de cana-de-açúcar; além de visivelmente não clarear o substrato, as partículas de carvão ativo permaneceram nos substratos após a etapa de filtração.

No pré-tratamento dos substratos com ácidos verificou-se uma redução de 7,17 % e de 38,19 % na concentração de açúcares redutores totais do melaço de cana-de-açúcar e da água de maceração de milho, respectivamente. Na densidade ótica, a redução foi de 22,10 % para o melaço de cana-de-açúcar e de 94,97 % para a água de maceração de milho. Demonstrando que o ácido fosfórico apresenta maior efeito complexante de substâncias pigmentadas e de impurezas, e assim contribuindo com a clarificação dos substratos agroindustriais.

As Figuras 3 e 4 apresentam as amostras de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho antes e depois dos pré-tratamentos realizados nesta etapa, respectivamente.

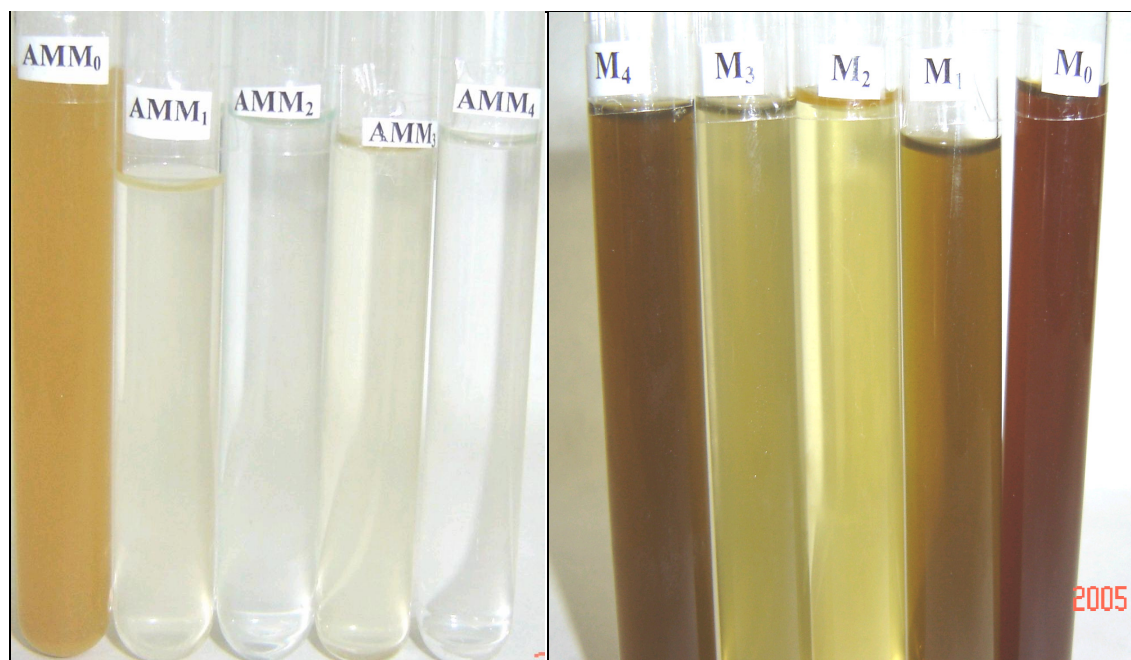


Figura 3. Amostras de água de maceração de milho (AMM) e melação de cana-de-açúcar (M) pré-tratadas com carvão ativo (1 – 4 % de carvão/90°C; 2 – 8 % de carvão/90°C; 3 – 4 % de carvão/70°C e 4 – 8 % de carvão/70°C) e sem pré-tratamento (AMM₀ e M₀), respectivamente.

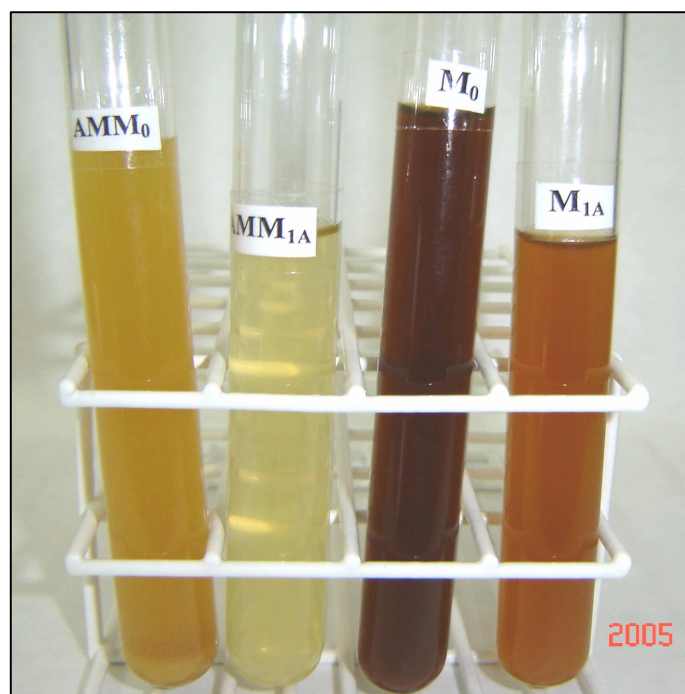


Figura 4. Amostras de água de maceração de milho (AMM) e melação de cana-de-açúcar (M) pré-tratadas com ácidos e sem pré-tratamento (AMM₀ e M₀), respectivamente.

Os resultados dos minerais (micro e macronutrientes) dos substratos antes e após os pré-tratamentos com carvão ativo e com ácidos (sulfúrico/fosfórico) encontram-se descritos nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

De acordo com as Tabelas 6 e 7, observa-se que o melaço bruto sem pré-tratamento (100 g/L, m/v) apresenta altos níveis, principalmente de potássio (1800 mg/L), cálcio (769 mg/L), sódio (435 mg/L), nitrogênio (428 mg/L), magnésio (246 mg/L) e ferro (13 mg/L). No entanto, a água de maceração de milho é rica em nitrogênio (3730 mg/L), potássio (1840 mg/L), magnésio (723 mg/L), manganês (55 mg/L) e zinco (11 mg/L).

Nos pré-tratamentos com carvão ativo (Tabela 6), verifica-se que de maneira geral, o aumento na concentração de carvão ativo e na temperatura de pré-tratamento apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos teores de minerais dos substratos agroindustriais. Analisando estes resultados, nota-se que o pré-tratamento com 8 % (m/m) de carvão ativo, a 90 °C por um período de 60 min acarretou perdas consideráveis nos teores de zinco (92 %), nitrogênio (80 %), fósforo (80 %), cobre (70 %) e ferro (70 %) para a água de maceração de milho. No melaço de cana-de-açúcar as diminuições foram superiores para o sódio (80 %), nitrogênio (79 %), zinco (54 %) e ferro (42 %). Em relação ao potássio e magnésio, considerados nutrientes importantes em processos fermentativos, as perdas foram de aproximadamente 18 % e de 24 % na água de maceração de milho, e de 35 % e 8 % no melaço, respectivamente.

No pré-tratamento dos substratos com ácidos (Tabela 7) verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de zinco para a água de maceração de milho, e nos teores de cobre e ferro do melaço de cana-de-açúcar. Constatou-se que a redução dos nutrientes foi inferior quando comparada aos pré-tratamentos com carvão ativo, com perdas inferiores a 30 %. Este resultado é razoável, uma vez que a maioria dos metais possuem elevada solubilidade em soluções ácidas (VOGEL, 1981) e não precipitam. As maiores reduções foram verificadas para o cobre (48 %) e manganês (43 %) na água de maceração de milho.

Tabela 6. Componentes minerais dos substratos agroindustriais antes e após os pré-tratamentos com carvão ativo.

Minerais	Pré-tratamentos				
	AMM ₀	AMM ₁	AMM ₂	AMM ₃	AMM ₄
N (mg/L)	3503,5 ± 77,7 ^a	2238,5 ± 69,6 ^b	705,4 ± 0,01 ^c	865,3 ± 45,3 ^d	1834,0 ± 0,01 ^c
Ca (mg/L)	239,8 ± 2,9 ^a	172,3 ± 3,8 ^b	151,2 ± 1,3 ^c	171,9 ± 1,3 ^b	173,9 ± 1,5 ^b
Na (mg/L)	206,2 ± 10,3 ^a	103, ± 4,6 ^c	111,7 ± 10,4 ^b	127,5 ± 9,3 ^b	109,5 ± 9,1 ^{bc}
K (mg/L)	2753,9 ± 69,7 ^a	2359,8 ± 69,7 ^{ab}	2261,3 ± 39,3 ^b	2409,1 ± 69,7 ^b	2281,9 ± 67,2 ^b
P (mg/L)	1,5 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,02 ^c	0,34 ± 0,02 ^d	1,2 ± 0,04 ^b	1,2 ± 0,04 ^b
Mg (mg/L)	723,8 ± 1,9 ^a	564,7 ± 16,6 ^{cd}	551,2 ± 10,3 ^d	570,5 ± 9,6 ^{bc}	591,8 ± 3,7 ^b
Mn (mg/L)	55,3 ± 1,0 ^a	47,8 ± 1,2 ^b	30,9 ± 0,11 ^c	46,6 ± 2,9 ^b	46,0 ± 1,4 ^b
Zn (mg/L)	10,7 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,1 ^c	0,84 ± 0,04 ^e	6,0 ± 0,04 ^b	1,5 ± 0,07 ^d
Cu (mg/L)	1,1 ± 0,3 ^a	0,18 ± 0,01 ^c	0,33 ± 0,11 ^{bc}	0,57 ± 0,11 ^b	0,64 ± 0,2 ^b
Fe (mg/L)	15,6 ± 8,1 ^a	7,6 ± 3,8 ^b	4,7 ± 5,4 ^c	11,9 ± 3,8 ^a	6,2 ± 4,1 ^{bc}
	M ₀	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
N (mg/L)	428,3 ± 20,0 ^a	282,2 ± 0,01 ^b	89,3 ± 8,1 ^d	-	131,7 ± 16,3 ^c
Ca (mg/L)	769,5 ± 16,9 ^a	650,1 ± 9,5 ^b	484,8 ± 18,8 ^c	-	670,8 ± 4,6 ^b
Na (mg/L)	435,3 ± 11,0 ^a	113,6 ± 25,8 ^b	88,1 ± 7,1 ^b	-	117,3 ± 25,9 ^b
K (mg/L)	1803,2 ± 28,0 ^a	1768,7 ± 69,7 ^a	1174,8 ± 0,01 ^b	-	980,5 ± 69,7 ^c
P (mg/L)	0,78 ± 0,007 ^a	0,75 ± 0,03 ^a	0,76 ± 0,03 ^a	-	0,59 ± 0,03 ^b
Mg (mg/L)	246,2 ± 4,5 ^a	218,0 ± 0,7 ^b	226,6 ± 8,9 ^b	-	228,4 ± 1,0 ^b
Mn (mg/L)	17,5 ± 0,02 ^a	14,9 ± 0,3 ^b	10,8 ± 0,55 ^c	-	14,8 ± 0,41 ^b
Zn (mg/L)	0,82 ± 0,33 ^a	0,55 ± 0,04 ^a	0,38 ± 0,01 ^a	-	0,75 ± 0,004 ^a
Cu (mg/L)	0,43 ± 0,04 ^a	0,45 ± 0,03 ^a	0,33 ± 0,05 ^b	-	0,21 ± 0,02 ^b
Fe (mg/L)	12,7 ± 1,3 ^a	8,2 ± 0,9 ^b	7,5 ± 0,2 ^b	-	11,0 ± 2,4 ^a

* Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa a 5 % (Teste Tukey); Amostras de água de maceração de milho (AMM) e melação de cana-de-açúcar (M) pré-tratadas com carvão ativo (1 – 4 % de carvão/90°C; 2 – 8 % de carvão/90°C; 3 – 4 % de carvão/70°C e 4 – 8 % de carvão/70°C) e sem pré-tratamento (AMM₀ e M₀)).

Tabela 7. Componentes minerais dos substratos agroindustriais antes e após o pré-tratamento com ácido.

Minerais	Pré-tratamentos*	
	AMM ₀	AMM _{1A}
N (mg/L)	3729,2 ± 73,9 ^a	2697,42 ± 40,10 ^b
Ca (mg/L)	239,8 ± 2,9 ^a	173,12 ± 2,52 ^b
Na (mg/L)	206,2 ± 10,3 ^b	237,75 ± 0,07 ^a
K (mg/L)	1836,2 ± 16,2 ^a	1603,42 ± 28,21 ^b
P (mg/L)	1,5 ± 0,01 ^a	0,7 ± 0,04 ^b
Mg (mg/L)	723,83 ± 1,9 ^a	554,7 ± 6,2 ^b
Mn (mg/L)	55,3 ± 31,7 ^a	31,7 ± 2,8 ^b
Zn (mg/L)	10,7 ± 0,1 ^a	10,3 ± 0,04 ^a
Cu (mg/L)	1,1 ± 0,3 ^a	0,57 ± 0,06 ^b
Fe (mg/L)	8,2 ± 0,09 ^a	6,2 ± 0,57 ^b
	M ₀	M ₁
N (mg/L)	428,3 ± 20,0 ^a	358,9 ± 20,0 ^b
Ca (mg/L)	769,5 ± 16,9 ^a	692,8 ± 17,0 ^b
Na (mg/L)	435,3 ± 11,0 ^a	457,2 ± 8,0 ^a
K (mg/L)	1803,2 ± 28,0 ^a	1715,2 ± 51,5 ^b
P (mg/L)	0,78 ± 0,007 ^a	0,3 ± 0,05 ^b
Mg (mg/L)	246,2 ± 4,5 ^a	188,0 ± 1,3 ^b
Mn (mg/L)	3,8 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,08 ^b
Zn (mg/L)	0,59 ± 0,04 ^a	0,46 ± 0,07 ^b
Cu (mg/L)	0,44 ± 0,04 ^a	0,43 ± 0,05 ^a
Fe (mg/L)	12,8 ± 1,3 ^a	11,0 ± 1,1 ^a

* Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa a 5% (Teste Tukey); Amostras de água de maceração de milho (AMM_{1A}) e melão de cana-de-açúcar (M_{1A}) pré-tratadas com ácido e sem pré-tratamento (AMM₀ e M₀).

3.2. Bioprodução de carotenóides em meio agroindustrial: Efeitos da composição do meio e do pré-tratamento dos substratos

3.2.1 Substratos agroindustriais sem pré-tratamento

O primeiro planejamento realizado consistiu em utilizar os substratos melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho sem o pré-tratamento de clarificação, para que fosse possível verificar o comportamento da produção de carotenóides. A matriz do planejamento completo 2³, com os substratos agroindustriais sem pré-tratamento, e os respectivos resultados em termos de produção de carotenóides, biomassa e pH final estão apresentados na Tabela 8, que mostra também os valores codificados de cada nível utilizado.

O valor de carotenóides totais máximo obtido foi de 479,12 µg/L para o ensaio 6. Porém, verificou-se nos ensaios (Figura 5), também a extração de pigmentos dos substratos agroindustriais (clorofila, xantofilas, melanoidinas, etc.), o que indica a necessidade de pré-tratamento de remoção de impurezas e/ou metais pesados da água de maceração de milho e do melaço de cana-de-açúcar, para que estes substratos sejam utilizados na bioprodução de carotenóides. Segundo ROUKAS (1998) altas concentrações de metais pesados e de impurezas no meio causam problemas críticos durante a fermentação, tais como inibição do crescimento microbiano, influenciam no pH do substrato e do meio de fermentação, e estão envolvidos na inativação das enzimas associadas com a biossíntese do produto.

Tabela 8. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas da produção de carotenóides, biomassa e pH_{final}.

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	Carotenóides totais (µg/L)	Produção específica de carotenóides (µg/g)	Biomassa (g/L)	pH _{final}
1	10 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	149,62	130,10	1,15	2,51
2	40 (1)	0 (-1)	0 (-1)	197,06	137,80	1,43	4,30
3	10 (-1)	10 (1)	0 (-1)	390,29	116,16	3,36	3,26
4	40 (1)	10 (1)	0 (-1)	227,65	41,02	5,55	4,32
5	10 (-1)	0 (-1)	10 (1)	230,98	61,59	3,75	8,68
6	40 (1)	0 (-1)	10 (1)	479,12	71,19	6,73	5,26
7	10 (-1)	10 (1)	10 (1)	278,38	80,46	3,46	8,75
8	40 (1)	10 (1)	10 (1)	265,64	47,35	5,61	4,92
9	25 (0)	5 (0)	5 (0)	154,95	33,32	4,65	6,88
10	25 (0)	5 (0)	5 (0)	185,00	52,71	3,51	7,75
11	25 (0)	5 (0)	5 (0)	174,51	36,06	4,84	7,75

X₁ = Melão de cana-de-açúcar (g/L); X₂ = AMM (g/L); X₃ = Prodex Lac® (g/L).

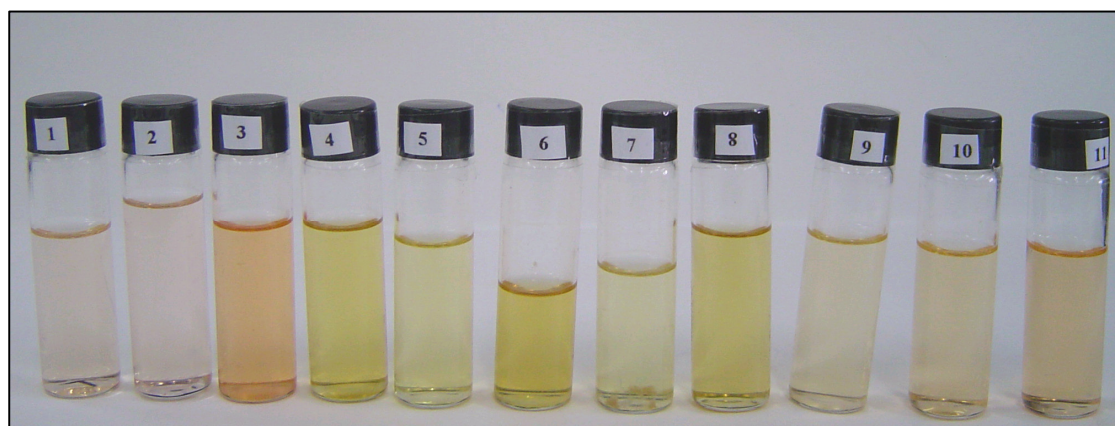


Figura 5. Aspecto visual dos carotenóides totais extraídos nos ensaios do planejamento experimental completo 2³ – sem pré-tratamento.

3.2.2 Substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo

Inicialmente, realizou-se um planejamento completo 2^3 , com os substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo (4 %, 70 °C, 1 h e 150 rpm), seguidos de centrifugações (10.000 \times g, 5°C, 15 min) e filtrações (celulose, Whatman n°1). Observou-se que as micropartículas de carvão ativo permanecem no meio mesmo após a filtração, podendo ter ocasionado um efeito inibidor na produção de biomassa e carotenóides, uma vez que estas micropartículas permaneceram aderidas nas células, conforme se verifica na Figura 6, dificultando as etapas de recuperação e extração dos carotenóides totais. Nesse sentido, o pré-tratamento com carvão ativo mais adequado para os meios industriais melaço e água de maceração de milho, foi com 8 % de carvão ativo ANF – Carvorite, 1 hora de agitação em frascos agitados (150 rpm) à 90 °C, seguidos de centrifugações (10.000 \times g, 5°C, 15 min), filtração em papel (Whatman n°1) e membranas de acetato de celulose de 0,8 e 0,2 μ m.

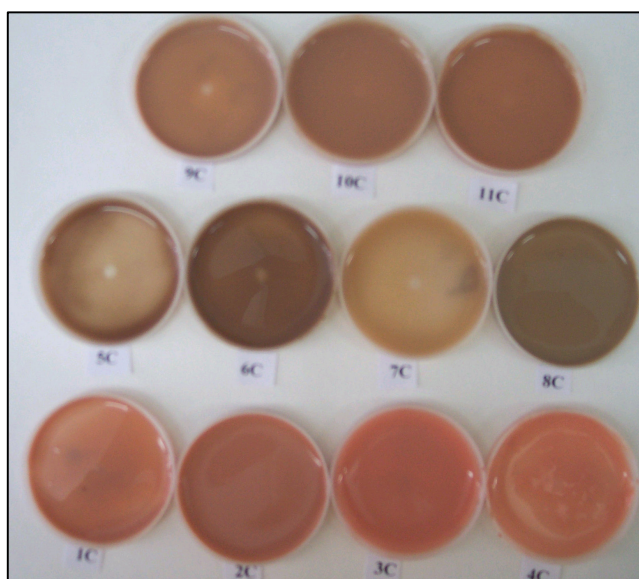


Figura 6. Aspecto visual das células nos ensaios do planejamento experimental completo 2^3 – pré-tratamento com carvão ativo (4 %/ 70 °C/ 1h/ 150 rpm) .

A matriz do segundo planejamento completo 2^3 , com os substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo (8 %, 90 °C, 1 h e 150 rpm) e os respectivos resultados em termos de concentração de carotenóides (totais e específica), biomassa e pH_{final} estão apresentados na Tabela 9, que mostra também os valores codificados de cada nível utilizado.

Tabela 9. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de carotenóides totais, produção específica de carotenóides, biomassa e pH_{final} .

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	Carotenóide Totais (µg/L)	Produção específica de carotenóide (µg/g)	Biomassa (g/L)	pH _{final}
1	10 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	39,71	34,53	1,15	7,75
2	40 (1)	0 (-1)	0 (-1)	87,84	61,43	1,43	7,81
3	10 (-1)	10 (1)	0 (-1)	62,70	18,66	3,36	8,00
4	40 (1)	10 (1)	0 (-1)	78,04	14,06	5,55	7,40
5	10 (-1)	0 (-1)	10 (1)	152,40	40,64	3,75	8,65
6	40 (1)	0 (-1)	10 (1)	141,47	21,02	6,73	8,84
7	10 (-1)	10 (1)	10 (1)	208,63	60,29	3,46	8,71
8	40 (1)	10 (1)	10 (1)	202,21	36,04	5,61	8,62
9	25 (0)	5 (0)	5 (0)	120,64	25,94	4,65	8,69
10	25 (0)	5 (0)	5 (0)	119,75	34,12	3,51	8,62
11	25 (0)	5 (0)	5 (0)	118,43	24,47	4,84	8,71

X₁ = Melaço de cana-de-açúcar (g/L); X₂ = AMM (g/L); X₃ = Prodex Lac® (g/L).

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de p e t, para os carotenóides totais. Observa-se que todas as variáveis independentes estudadas exercem influência significativa positiva ($p < 0,05$), o que indica que um deslocamento dos níveis de concentrações de Prodex Lac®, água de maceração de milho e melaço de cana-de-açúcar para valores superiores acarretaria num incremento no teor de carotenóides totais. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Assim, a concentração de melação foi fixada em 40 g/L, por esta variável independente apresentar interação significativa negativa ($p < 0,05$) com água de maceração de milho e Prodex Lac®, sobre a produção de carotenóides totais. Os níveis das variáveis independentes água de maceração de milho e Prodex Lac® foram deslocados para valores superiores (terceiro planejamento fatorial completo 2², conforme descrito no descritos na Tabela 3, item 2.3), no sentido de otimizar a concentração de carotenóides totais em meio agroindustrial pré-tratado com carvão ativo.

Tabela 10. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para os carotenóides totais.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	121,07	0,335	361,67	0,00001
(1) Melação (L)*	11,53	0,785	14,69	0,00463
(2) AMM (L)*	32,54	0,785	41,44	0,00058
(3) Prodex Lac® (L)*	109,10	0,785	138,97	0,00005
1L. 2L*	-7,07	0,785	-9,00	0,01210
1L. 3L*	-20,21	0,785	-25,74	0,00150
2L. 3L*	25,94	0,785	33,04	0,00091

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 1 apresenta o modelo codificado não linear de primeira ordem, que descreve a resposta concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas (melação de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 11. O coeficiente de correlação obtido (0,99) e o F calculado (16,6 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 7.

Tabela 11. Análise de variância para os carotenóides totais.

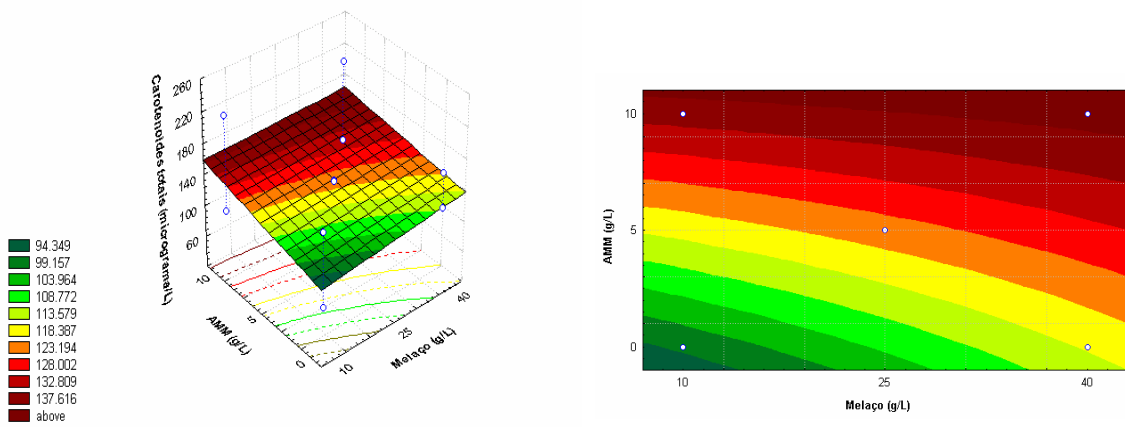
Fontes de Variação	Somas dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	28454,12	6	4742,35	102,38
Resíduos	185,28	4	46,32	
Falta de ajuste	182,81	2		
Erro puro	2,46	2		
Total	28639,4	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 6,16$; Coeficiente de correlação: $R = 0,99$.

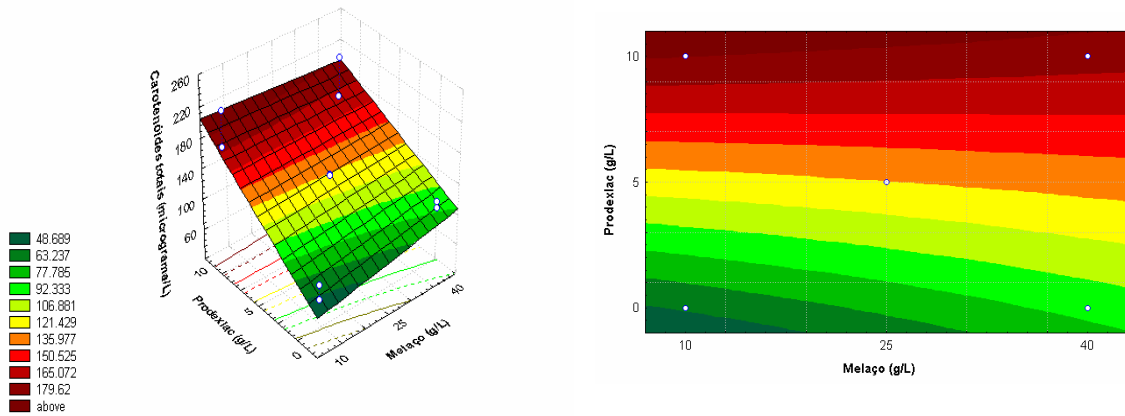
Equação 1:

$$C_{\text{totais}} = 121,07 + 11,53.X_1 + 32,54.X_2 + 109,10.X_3 - 7,07.X_1.X_2 - 20,21.X_1.X_3 + 25,94.X_2.X_3 \quad (1)$$

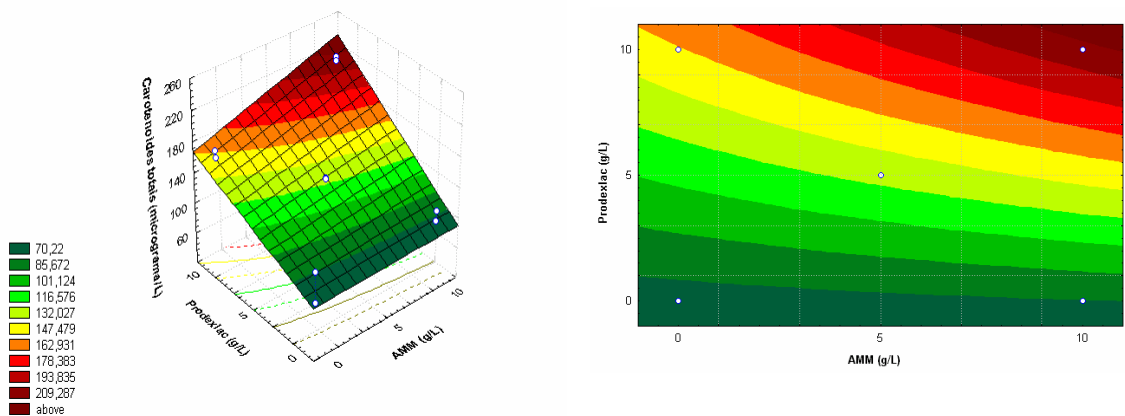
Onde: C_{totais} = Carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$); X_1 = Melaço de cana-de-açúcar; X_2 = AMM; X_3 = Prodex Lac®



(a)



(b)



(c)

Figura 7. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de AMM e melao de cana-de-açúcar (a) e Prodex Lac® e melao de cana-de-açúcar (b), Prodex Lac® e AMM (c).

Constatou-se que quando os níveis de Prodex Lac® e água de maceração de milho foram aumentados (terceiro planejamento fatorial completo 2²), não foi possível otimizar a concentração de carotenóides totais, pois ocorreu inibição do crescimento celular e da produção de carotenóides totais. Possivelmente a inibição está relacionada à composição destes substratos e/ou a bioprodução de compostos secundários, pois a água de maceração de milho e o melaço de cana-de-açúcar (variável fixada) possuem uma composição bastante complexa (Tabela 6) que contém nutrientes (nitrogênio, potássio, magnésio, manganês, ferro, etc), que individualmente podem influenciar positivamente na bioprodução de carotenóides, porém a interação e o aumento da concentração destes pode resultar em um excesso de alguns destes nutrientes e causar uma inibição indesejada, tanto no crescimento microbiano como sobre as enzimas associadas com a biossíntese de carotenóides. Isto também pode ter ocorrido devido à quantidade de micropartículas de carvão que permanecem no meio, mesmo após a filtração em membranas (0,2 µm), o que pode ter dificultado a transferência de nutrientes, potencializando o efeito inibidor do crescimento e da bioprodução de carotenóides.

Quando se utilizaram substratos agroindustriais pré-tratados com carvão ativo (8 % /90 °C /60 min), a máxima concentração de carotenóides totais obtida foi de 208,63 µg/L, no ensaio número 7 (Tabela 9), com concentração de melaço de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho de 10 g/L, Prodex Lac® de 10 g/L, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e um pH_{inicial} de 4,0. Verifica-se ainda que a concentração de carotenóides totais alcançada está bastante abaixo do meio convencional otimizado que foi de 1019,12 µg/L (Capítulo 4).

Em relação à biomassa, verifica-se que as concentrações de melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e Prodex Lac® não foram estatisticamente significativas, no intervalo de confiança de 95 %, dentro da faixa estudada.

A Tabela 12 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para a concentração específica de carotenóides. Observa-se que a produção específica de carotenóides foi influenciada significativamente (p<0,05) pelos efeitos de interação entre os substratos. Nota-se que o melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac® interagem de forma negativa, e a água de maceração de milho e Prodex Lac® de forma

positiva, já a interação do melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho não foi significativa, no intervalo de confiança de 95 %, dentro da faixa estudada. As interações entre as variáveis podem ser melhor visualizadas pelas superfícies de resposta. (Figura 8). No entanto, as variáveis independentes isoladas não apresentam efeito significativo. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 12. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a produção específica de carotenóides.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*	33,75	1,57	21,53	0,0021
(1) Melaço (L)	-2,69	1,84	-1,47	0,2800
(2) AMM (L)	-3,57	1,84	-1,94	0,1916
(3) Prodex Lac® (L)	3,66	1,84	1,99	0,1842
1L. 2L	-4,52	1,84	-2,46	0,1332
1L. 3L*	-8,27	1,84	-4,50	0,0459
2L. 3L*	12,24	1,84	6,66	0,0218

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 2 apresenta o modelo codificado não linear de primeira ordem, que descreve a resposta produção específica de carotenóides em função das variáveis independentes analisadas (melaço de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 13. O coeficiente de correlação obtido (0,94) e o F calculado (7,2 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 8.

Tabela 13. Análise de variância para a produção específica de carotenóides.

Fontes de Variação	Somas dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	2176,60	2	1088,30	31,98
Resíduos	272,21	8	34,03	
Falta de ajuste	218,17	6		
Erro puro	54,03	2		
Total	2448,81	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,46$; Coeficiente de correlação: $R = 0,94$.

Equação 2:

$$C_{\text{especifico}} = 33,75 - 8,27.X_1.X_3 + 12,24.X_2.X_3 \quad (2)$$

Onde: $C_{\text{especifico}}$ = produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$); X_1 = Melaço de cana-de-açúcar; X_2 = AMM; X_3 = Prodex Lac®

A Tabela 14 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e limites de confiança para o pH_{final} . A concentração de melaço apresentou efeito negativo sobre o pH_{final} . No entanto, ao de Prodex Lac® demonstrou um efeito positivo, indicando que nesta faixa estudada o aumento de sua concentração no meio acarretou um acréscimo no pH_{final} . É importante salientar que o pH_{final} também foi influenciado significativamente ($p < 0,05$) pelos efeitos de interação entre os substratos, nota-se que o melaço e Prodex Lac® interagem de forma positiva, e o melaço de cana-de-açúcar com a água de maceração de milho de forma negativa, sobre o pH_{final} do meio de fermentação. Porém, a água de maceração de milho e a interação desta com o Prodex Lac® não foram significativas, no intervalo de confiança de 95 %, dentro da faixa estudada. As interações entre as variáveis podem ser melhor visualizadas pelas superfícies de resposta Apresentadas na Figura 9. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

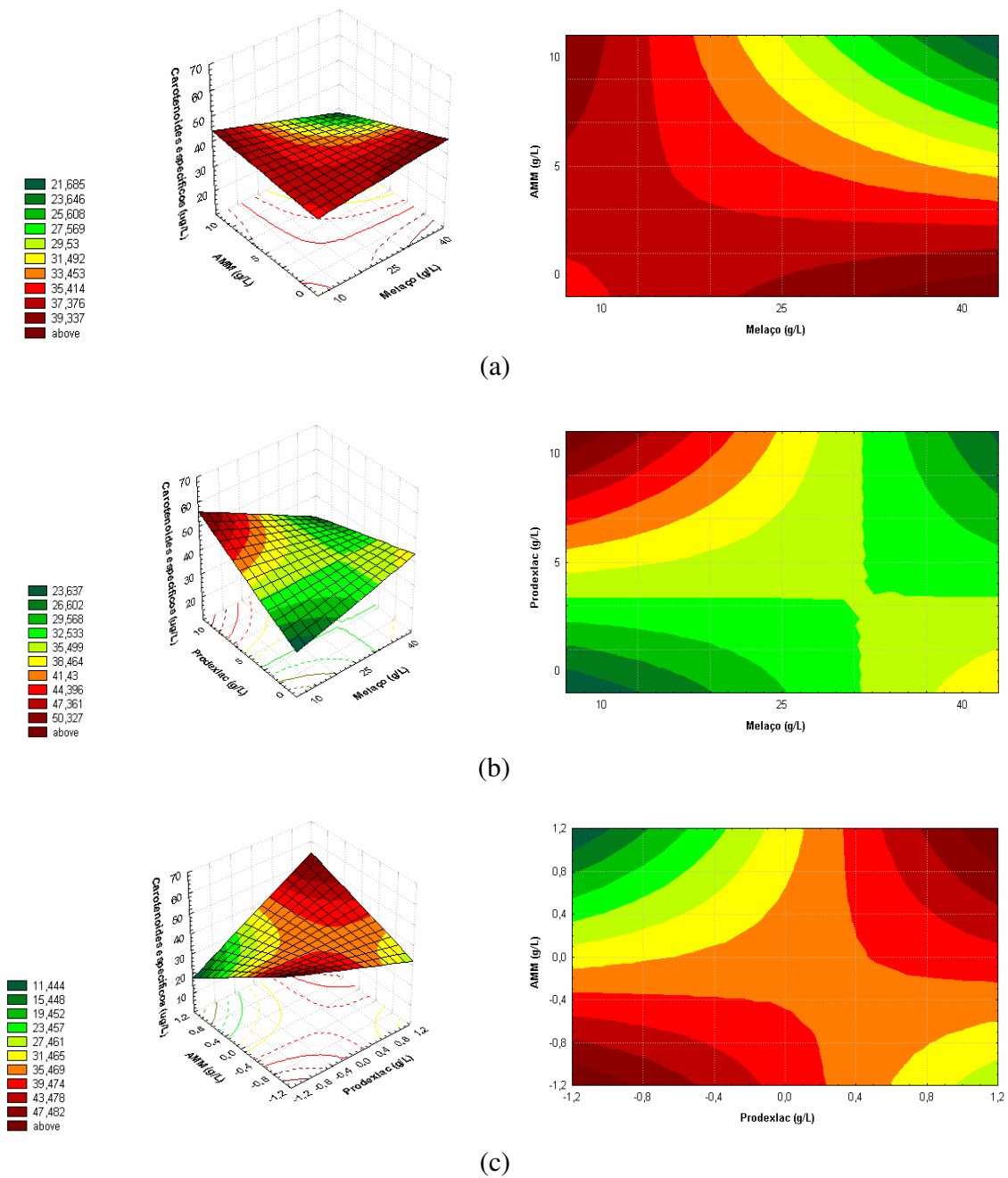


Figura 8. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de AMM e melaço de cana-de-açúcar (a) e prodex Lac® e melaço de cana-de-açúcar (b), Prodex Lac® e AMM (c)

Tabela 14. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para o pH_{final}.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	8,34	0,014	585,69	2,92E-06
(1) Melão (L)	-0,05	0,017	-3,29	0,0812
(2) AMM (L)	-0,04	0,017	-2,39	0,1390
(3) Prodex Lac® (L)*	0,48	0,017	28,88	0,0012
1L. 2L*	-0,12	0,017	-7,03	0,0196
1L. 3L*	0,08	0,017	4,79	0,0409
2L. 3L	0,00	0,017	0,00	1,0000

*fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

A Equação 3 apresenta o modelo codificado não linear de primeira ordem, que descreve a resposta do pH_{final} em função das variáveis independentes analisadas (melão de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 15. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o F calculado (2,40 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 9.

Tabela 15. Análise de variância para o pH_{final}.

Fontes de Variação	de	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão		2,06	3	0,69	10,45
Resíduos		0,46	7	0,066	
Falta de ajuste		0,46	5		
Erro puro		0,0045	2		
Total		2,53	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; F_{tab,95%} = 4,35; Coeficiente de correlação: R = 0,90.

Equação 3:

$$\text{pH}_{\text{final}} = 8,34 + 0,48 X_3 - 0,12.X_1.X_2 + 0,08.X_1 X_3 \quad (3)$$

Onde: X₁ = Melão de cana-de-açúcar; X₂ = AMM; X₃ = Prodex Lac®

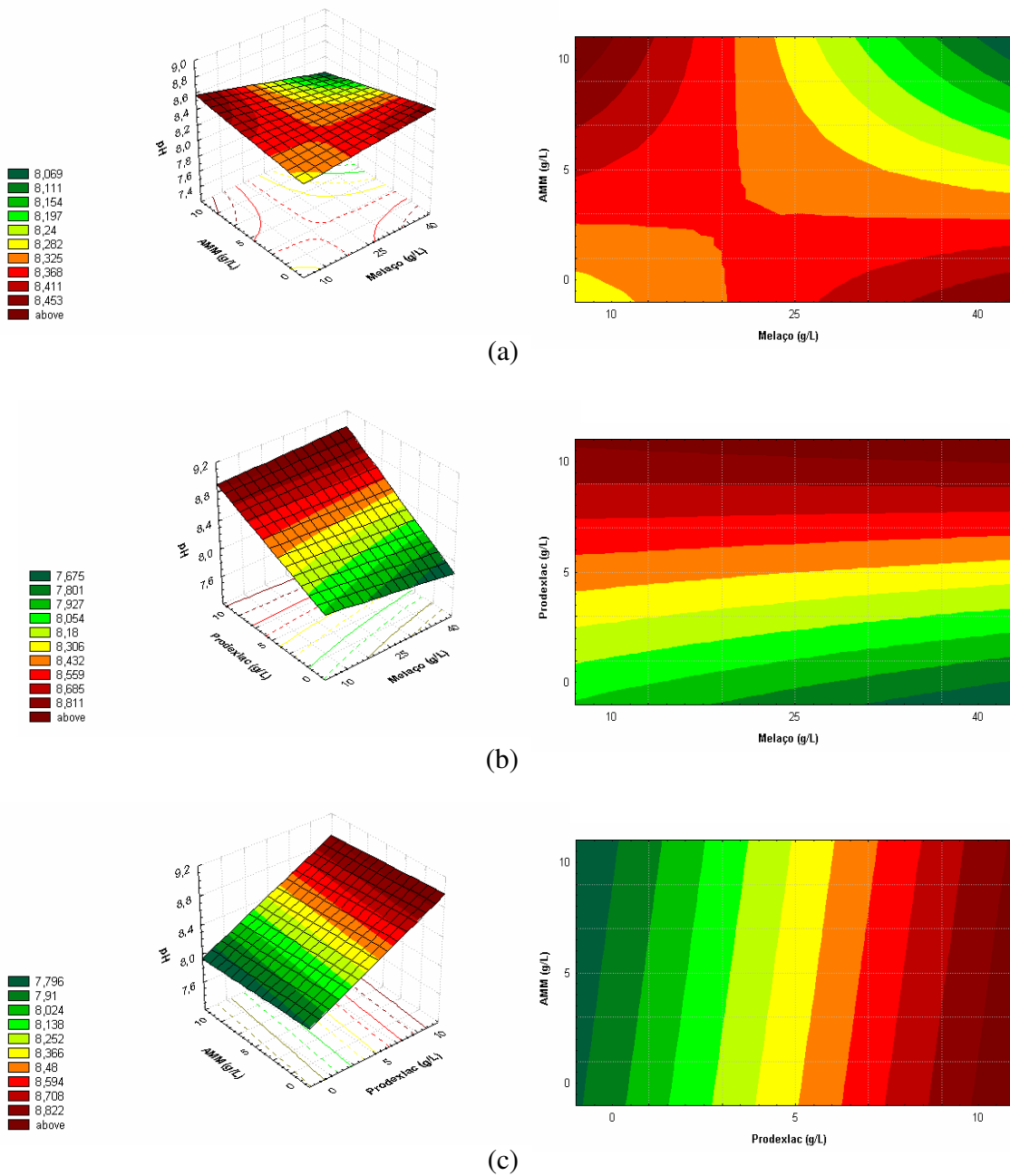


Figura 9. Superfície de resposta e curva de contorno para o pH_{final} em função da concentração de AMM e melço de cana-de-açúcar (a) e Prodex Lac® e melço de cana-de-açúcar (b), Prodex Lac® e AMM (c).

3.2.3 Substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos

A matriz do primeiro planejamento completo 2^3 , com os substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos, e os respectivos resultados em termos de concentração de carotenóides, biomassa e pH_{final} estão apresentados na Tabela 16, que mostra também os valores codificados de cada nível utilizado.

Tabela 16. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas de concentração de carotenóides totais, produção específica de carotenóides, biomassa e pH_{final} .

Ensaio	Variáveis Independentes*			Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	Carotenóide totais (µg/L)	Produção específica de carotenóide (µg/g)	Biomassa (g/L)	pH _{final}
1	10 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	174,56	111,90	1,56	4,56
2	40 (1)	0 (-1)	0 (-1)	251,67	108,01	2,33	4,32
3	10 (-1)	10 (1)	0 (-1)	244,31	94,33	2,59	7,68
4	40 (1)	10 (1)	0 (-1)	152,25	73,20	2,08	4,96
5	10 (-1)	0 (-1)	10 (1)	247,60	76,18	3,25	8,75
6	40 (1)	0 (-1)	10 (1)	121,62	40,40	3,01	7,59
7	10 (-1)	10 (1)	10 (1)	162,65	59,58	2,73	8,68
8	40 (1)	10 (1)	10 (1)	183,63	81,61	2,25	6,29
9	25 (0)	5 (0)	5 (0)	219,31	44,85	4,89	7,81
10	25 (0)	5 (0)	5 (0)	210,10	46,07	4,56	7,65
11	25 (0)	5 (0)	5 (0)	213,68	45,95	4,65	7,87

X₁ = Melão de cana-de-açúcar (g/L); X₂ = AMM (g/L); X₃ = Prodex Lac® (g/L).

Através dos resultados apresentados na Tabela 16, na faixa de concentração investigada, verifica-se que o teor de carotenóides totais diminui com o aumento das

concentrações de melação de cana-de-açúcar e Prodex Lac®. Este fato pode ser melhor observado na Figura 10 (Gráfico de pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados. Observa-se que o melação de cana-de-açúcar foi a variável de maior influência na produção de carotenóides, seguida do Prodex Lac® e da interação destas duas variáveis independentes. Estas três variáveis tiveram efeito negativo significativo no intervalo de confiança de 95%, o que indica que um deslocamento dos níveis de concentrações de melação e Prodex Lac® para valores inferiores acarretaria num incremento na produção de carotenóides totais.

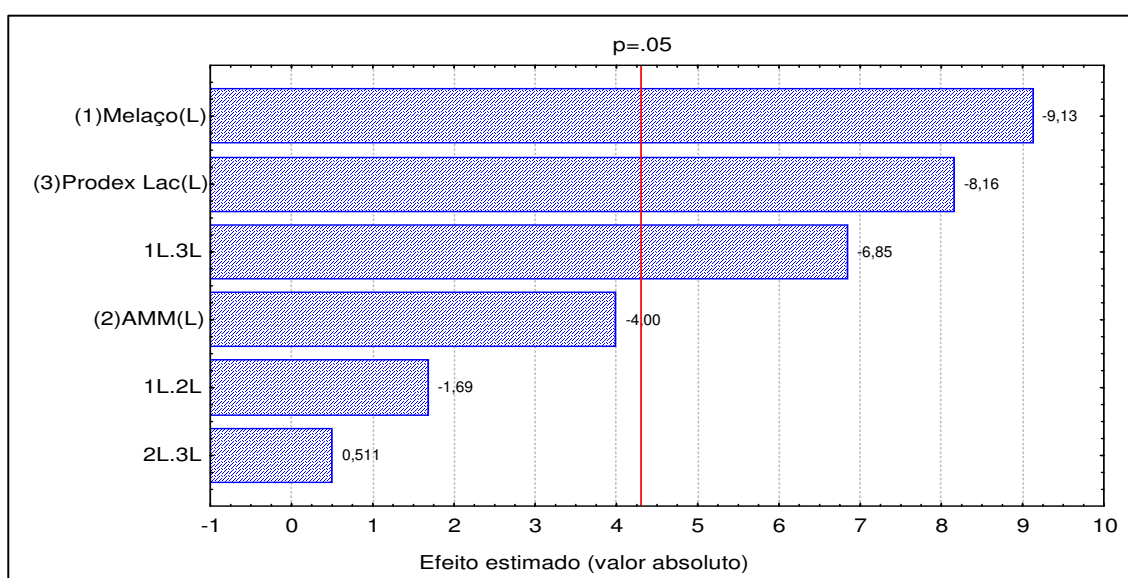


Figura 16. Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental 2^3 – pré-tratamento com ácido, para os carotenóides totais.

Como o objetivo principal desta etapa foi de incrementar a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$), o planejamento fatorial completo 2^2 foi baseado nas respostas desta variável dependente. Os resultados das variáveis dependentes concentração específica de carotenóides, biomassa, pH_{final} e glicose residual serão discutidas no próximo planejamento fatorial completo 2^2 de otimização da bioprodução de carotenóides.

Portanto, a concentração de água de maceração de milho foi fixada em 5 g/L, por esta variável independente não apresentar significância ($p < 0,05$), sobre a concentração de carotenóides totais. Os níveis das variáveis independentes melação de cana-de-açúcar e Prodex Lac® foram deslocados para valores inferiores.

A matriz do segundo planejamento fatorial completo 2^2 , com os substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos, e os respectivos resultados em termos de concentração de carotenóides, biomassa, pH_{final} e glicose residual ($\text{GLI}_{\text{residual}}$) estão apresentados na Tabela 17, que mostra também os valores codificados de cada nível utilizado.

Tabela 17. Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) com as respostas concentração de carotenóides totais, produção específica de carotenóides, biomassa, pH_{final} e glicose residual (GLI_{R}).

Ensaio	Variáveis Independentes*		Respostas				
	X_1	X_3	Carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$)	Produção específica de carotenóide ($\mu\text{g/g}$)	Biomassa (g/L)	pH_{final}	GLI_{R} (g/L)
1	2.9 (-1)	1.4 (-1)	88,48	73,73	1,20	8,56	0,06
2	17.1 (1)	1.4 (-1)	246,80	94,20	2,62	7,71	0,53
3	2.9 (-1)	8.5 (1)	131,42	76,41	1,72	8,78	1,18
4	17.1 (1)	8.5 (1)	195,95	94,21	2,08	8,46	1,40
5	0 (-1.41)	5 (0)	232,99	187,90	1,24	8,84	0,01
6	20 (1.41)	5 (0)	155,24	52,63	2,95	8,31	0,58
7	1(0)	0(-1.41)	36,57	17,25	2,12	7,71	0,07
8	1(0)	10 (1.41)	102,03	42,16	2,42	8,68	0,64
9	10 (0)	5 (0)	524,41	170,26	3,08	8,28	0,10
10	10 (0)	5 (0)	580,59	196,81	2,95	8,37	0,09
11	10 (0)	5 (0)	519,95	173,90	2,99	8,4	0,09

X_1 = Melação de cana-de-açúcar (g/L); X_2 = AMM (5 g/L); X_3 = Prodex Lac® (g/L).

A Tabela 18 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de t e p, para a concentração de carotenóides totais. Observa-se que a produção de carotenóides totais foi influenciada significativamente pelos efeitos quadráticos do melaço de cana-de-açúcar e do Prodex Lac®. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 18. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a concentração de carotenóides totais.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	541,51	19,51	27,75	0,0013
(1) Melaço (L)	28,39	23,93	1,19	0,3573
Melaço (Q)*	-331,15	28,56	-11,60	0,0073
(2) Prodex Lac® (L)	21,16	23,93	0,88	0,4699
Prodex Lac® (Q)*	-456,72	28,56	-15,99	0,0039
1L. 2L	-46,89	33,79	-1,39	0,2996

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 4 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas (melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 19. O coeficiente de correlação obtido (0,97) e o F calculado (12,78 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 12.

A máxima concentração de carotenóides totais encontra-se nos ensaios correspondendo ao ponto central de concentração dos dois substratos que compõem o meio de fermentação e com concentração de água de maceração de milho fixada em 5 g/L, caracterizando a otimização da produção de carotenóides em substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos.

Tabela 19. Análise de variância para a concentração de carotenóides totais.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	352171,4	2	176085,7	57,00
Resíduos	24713,47	8	3089,19	
Falta de ajuste	22429,28	6		
Erro puro	2284,19	2		
Total	376884,9	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{tab,95\%} = 4,46$; Coeficiente de correlação: $R = 0,97$

Equação 4:

$$C_{\text{totais}} = 541,51 - 331,15.(X_1)^2 - 456,72.(X_3)^2 \quad (4)$$

Onde: C_{totais} = concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$); X_1 = Melaço de cana-de-açúcar; X_3 = Prodex Lac®

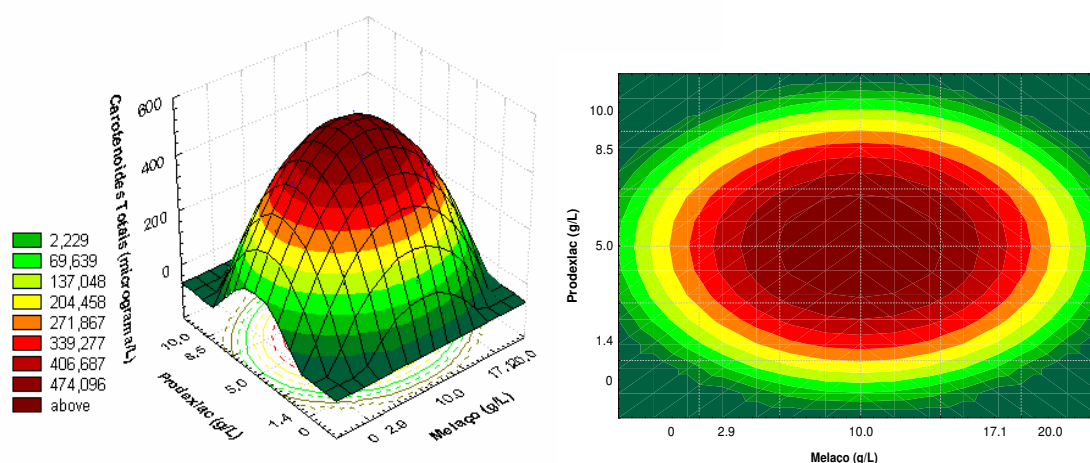


Figura 12. Superfície de resposta e curva de contorno para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de Prodex Lac® e melaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

A Figura 13 apresenta o aspecto visual dos carotenóides totais extraídos nos ensaios do planejamento experimental completo 2^2 – substratos pré-tratados com ácidos.



Figura 13. Aspecto visual dos carotenóides totais extraídos nos ensaios do planejamento experimental completo 2^2 – pré-tratamento com ácido.

Em relação aos substratos pré-tratados com ácidos, observa-se que a concentração de carotenóides totais ao final da fermentação (120 h) é superior aos pré-tratados com carvão, de 541,51 e 208,63 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Isto pode ter ocorrido devido à quantidade de micropartículas de carvão que permanecem no meio, mesmo após a filtração em membranas (0,2 micra), o que pode ter ocasionado um efeito inibidor, conforme já comentado anteriormente. Durante os pré-tratamentos com carvão ativo pode ocorrer não somente a retirada de compostos indesejáveis (Cu, Zn e impurezas), mas também a remoção de nutrientes importantes para a fermentação (nitrogênio, magnésio, manganês, potássio e açúcares), como foi verificado na Tabelas 6.

Na literatura, alguns trabalhos relatam a utilização de substratos agroindustriais na bioprodução de carotenóides. SHIH & HANG (1996) usaram resíduo da produção de chucrutes como substrato para o meio de fermentação de *Rhodotorula rubra* e a produção de carotenóides totais foi de 1041 $\mu\text{g/L}$. MANTZOURIDOU et al. (2002) avaliaram o efeito da aeração (0.5 – 1.5 vvm) e agitação (150 – 500 rpm) na produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* em biorreator, em meio de fermentação composto por água de maceração de milho (80 g/L), óleo de oliva (10 g/L) e óleo de soja (10 g/L) suplementado

com glicose (50 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), hidrolisado de caseína (2,0 g/L), asparagina (2,0 g/L), KH_2PO_4 (1,5 g/L), MgSO_4 (0,5 g/L) e tiamina (0,5 g/L). A máxima produção de β -caroteno foi de $1,6 \text{ kg/m}^3$ após 19 dias de fermentação, a 150 rpm, 1,5 vvm de aeração, 26 °C e pH inicial de 7,0. SIMOVA et al. (2004) estudaram a produção de carotenóides por *Rhodotorul rubra* GED8 co-cultivada com *Lactobacillus bulbaricus* 2-11 e *Streptococcus thermophilus* 15HA, em meio de fermentação composto de ultrafiltrado de soro de leite (45 g/L de lactose), suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6,0 g/L), KH_2PO_4 (5,5 g/L), NA_2HPO_4 (3,0 g/L), Mg SO_4 (0,5 g/L) e extrato de levedura (5,0 g/L). A máxima produção de carotenóides totais foi de 4,7 mg/L. Em outro estudo BUZZINI & MARTINI (1999) avaliaram a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em diferentes substratos agroindustriais (mosto de uva, xarope de glicose, melão de beterraba, hidrolisado de farinha de milho e soja). A máxima concentração de carotenóides foi de 5,95 mg/L ou 630 $\mu\text{g/g}$ em relação ao peso celular seco, após 120 h de crescimento a 30 °C e 180 rpm, quando se utilizou mosto concentrado de uva (820 g/L carboidratos totais).

A Tabela 20 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de t e p, para a biomassa. De acordo com a análise de significância, observa-se que a biomassa (g/L) foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelos efeitos lineares e quadráticos do melão; efeito quadrático da concentração de Prodexlac e interação entre melão e Prodexlac, dentro da faixa estudada. É importante salientar que somente o melão apresentou efeito linear positivo, as demais variáveis influenciaram negativamente na concentração de biomassa. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

A Equação 5 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta da biomassa em função das variáveis independentes analisadas (melão de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 21. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,97) e o F calculado (6,45 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 14. A máxima produção de biomassa, em substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos, encontra-se localizada na

faixa do ponto central de concentração dos dois substratos que compõem o meio de fermentação e com concentração de água de maceração de milho fixada em 5 g/L.

Tabela 20. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a biomassa.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	3,01	0,038	78,24	0,00016
(1) Melão (L)*	0,52	0,023	22,29	0,00201
Melão (Q)*	-0,53	0,028	-18,76	0,00283
(2) Prodex Lac® (L)	0,050	0,023	2,14	0,16535
Prodex Lac® (Q)*	-0,44	0,028	-15,63	0,00407
1L. 2L*	-0,26	0,033	-7,96	0,01542

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 21. Análise de variância para a biomassa.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	4,56	4	1,14	29,23
Resíduos	0,233	6	0,039	
Falta de ajuste	0,224	4		
Erro puro	0,0088	2		
Total	4,79	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{tab,95\%} = 4,53$; Coeficiente de correlação: $R = 0,97$.

Equação 5:

$$\text{Biomassa} = 3,01 + 0,5 \cdot X_1 - 0,53 \cdot (X_1)^2 - 0,44 \cdot (X_3)^2 - 0,26 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (5)$$

Onde: Biomassa = Biomassa (g/L); X_1 = Melão de cana-de-açúcar; X_3 = Prodex Lac®

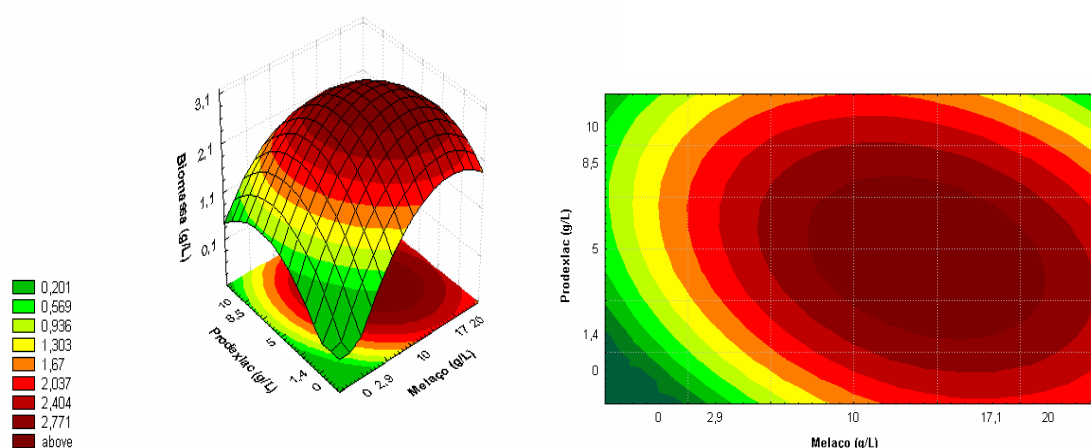


Figura 14. Superfície de resposta e curva de contorno para a biomassa (g/L) em função da concentração de Prodex Lac® e melaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

A Tabela 22 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de t e p, para a concentração específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$). De acordo com a análise de significância, observa-se que a concentração específica de carotenóides foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pelos efeitos negativos quadráticos do melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®, dentro da faixa estudada. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados a falta de ajuste para a análise de variância.

A equação 6 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) em função das variáveis independentes analisadas (melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 23. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido (0,90) e o F calculado (4,06 vezes maior que o valor tabelado) permitiram a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 15.

Tabela 22. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para a produção específica de carotenóides.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	180,28	8,31	21,69	0,00212
(1) Melaço (L)	-19,11	5,09	-3,75	0,0643
Melaço (Q)*	-27,60	6,08	-4,54	0,0453
(2) Prodex Lac® (L)	4,74	5,09	0,93	0,4505
Prodex Lac® (Q)*	-73,15	6,08	-12,03	0,0068
1L. 2L	-0,67	7,19	-0,093	0,9346

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A máxima produção específica de carotenóides, utilizando substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos, encontra-se localizada na faixa do ponto central de concentração dos dois substratos que compõem o meio de fermentação e com concentração de água de maceração de milho fixada em 5 g/L. HAARD (1988) otimizou a produção de astaxantina por *P. rhodozyma* a partir da fermentação com melaço. Utilizando 1 % de açúcar, a concentração de astaxantina foi de 552 µg/g. Em outro estudo FRENGOVA et al. (1994) estudaram a produção de carotenóides por *R. glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, em meio de fermentação composto de ultrafiltrado de soro de leite (3,9 a 7,1 % de lactose), sendo que a máxima concentração específica de carotenóides foi de 268 µg/g, no meio contendo 3,9 % de fonte de carbono.

Tabela 23. Análise de variância para a produção específica de carotenóides.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	33315,02	2	16657,51	18,11
Resíduos	7357,86	8	919,73	
Falta de ajuste	6943,57	6		
Erro puro	414,29	2		
Total	40672,89	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{tab,95\%} = 4,46$; Coeficiente de correlação: $R = 0,90$

Equação 6:

$$C_{\text{específico}} = 180,28 - 27,60.(X_1)^2 - 73,15.(X_3)^2 \quad (6)$$

Onde: $C_{\text{específico}}$ = produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$); X_1 = Melão de cana-de-açúcar; X_3 = Prodex Lac®

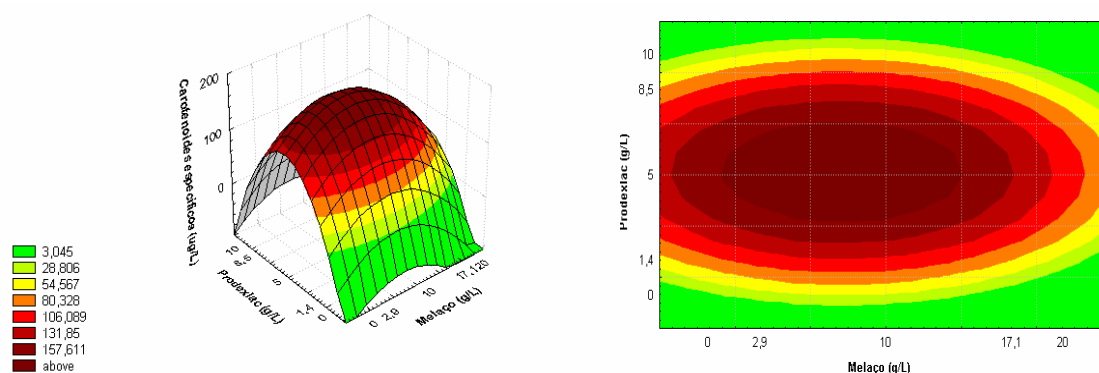


Figura 15. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção específica de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) em função da concentração de Prodex Lac® e melão de cana-de-açúcar, respectivamente.

A Tabela 24 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão e valores de t e p, para o pH_{final}. Verifica-se que o aumento na concentração de melação de cana-de-açúcar proporcionou uma diminuição significativa (p<0,05) no pH_{final}, o contrário foi verificado em relação ao Prodex Lac®, estes efeitos podem ser melhor visualizados na Figura 16. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 24. Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para o pH_{final}.

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t (2)	p
Média*.	8,35	0,036	231,59	1,86E-05
(1) Melação (L)*	-0,24	0,022	-10,87	0,0084
Melaço (Q)	0,11	0,026	4,21	0,0519
(2) Prodex Lac® (L)*	0,29	0,022	13,25	0,0056
Prodex Lac® (Q)	-0,079	0,026	-3,03	0,0939
1L. 2L	0,13	0,0312	4,24	0,0513

*fatores estatisticamente significativos (p<0,05).

Observa-se que ao utilizar substratos agroindustriais (água de maceração de milho, melação de cana-de-açúcar e Prodex Lac®) para a bioprodução de carotenóides, ocorreu um aumento do pH_{final} (~8,3) do meio de fermentação. Possivelmente isto esteja associado à degradação de aminoácidos da água de maceração de milho e Prodexlac, ocasionando a formação de compostos amoniacais, pois foi detectado um intenso odor característico de amônia no final da fermentação (120 h). O mesmo foi verificado por MANTZOURIDOU et al. (2002) ao produzir carotenóides por *Blakeslea trispora*, em meio de fermentação composto por água de maceração de milho, óleo de oliva, óleo de soja e suplementos (extrato de levedura, hidrolisado de caseína, asparagina, KH₂PO₄, MgSO₄ e tiamina), onde o pH_{final} foi de 7,5, após 19 dias de fermentação.

A equação 7 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta do pH_{final} em função das variáveis independentes analisadas (melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 25. O coeficiente de correlação obtido (0,98) e o F calculado (24,20 vezes maior que o valor tabelado) permitiu a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 16.

Tabela 25. Análise de variância para o pH_{final} .

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	1,36	2	0,68	107,94
Resíduos	0,050	8	0,0063	
Falta de ajuste	0,042	6		
Erro puro	0,0078	2		
Total	1,41	10		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 4,46$; Coeficiente de correlação: $R = 0,98$.

Equação 7:

$$\text{pH}_{\text{final}} = 8,35 - 0,24.X_1 + 0,29.X_3 \quad (7)$$

Onde: X_1 = Melaço de cana-de-açúcar; X_3 = Prodex Lac®

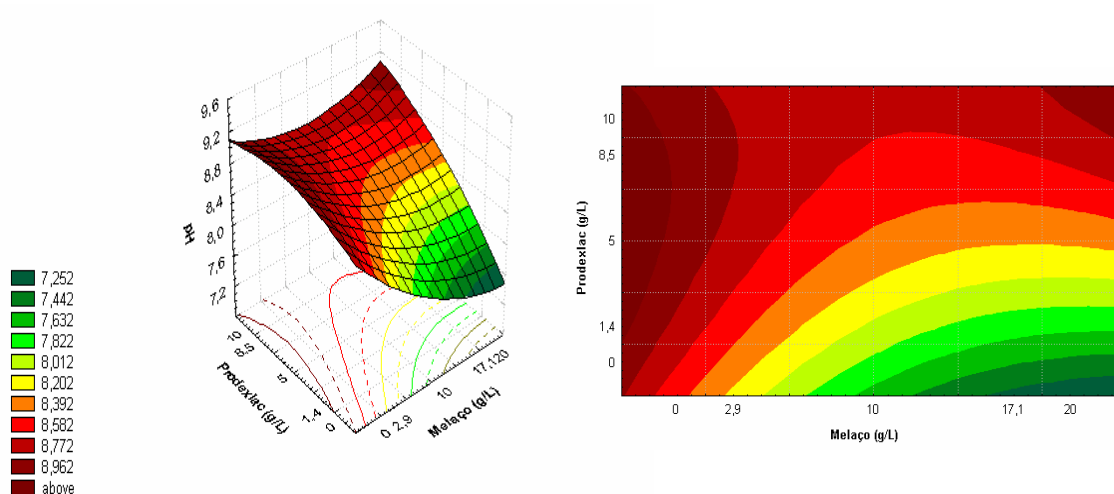


Figura 16. Superfície de resposta e curva de contorno para o pH_{final} em função da concentração de Prodex Lac® e melço de cana-de-açúcar, respectivamente.

Em relação à glicose residual - $\text{GLI}_{\text{residual}}$ (Figura 17) observa-se que todas as variáveis tiveram influência significativa ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada. O Prodex Lac® e o melço de cana-de-açúcar apresentaram efeitos lineares e quadráticos positivos e a interação entre os dois substratos efeito negativo, no teor glicose residual do meio de fermentação. O fato do efeito de um substrato industrial isolado ser positivo e a interação entre eles ser negativa ocorre devido à composição destes substratos.

Conforme os resultados da Tabela 17, observa-se que cerca de 98,3 % dos açúcares redutores totais foram metabolizados pela célula nos substratos agroindustriais pré-tratados com ácidos, nos ensaios correspondendo ao ponto central do planejamento. Resultado semelhante foi obtido por ROUKAS (1998) ao testar o pré-tratamento do melço de beterraba com ácido sulfúrico, onde mostraram que cerca de 98,5 % da glicose foi metabolizada pela células (*Aureobasidium pullulans*) no melço pré-tratado, enquanto que apenas 79 % da glicose foi metabolizado no melço não tratado. O pré-tratamento com ácido sulfúrico foi o que gerou as máximas concentrações de polissacarídeos (25 g/L de pululona), quando comparados aos tratamentos com resinas catiônicas, tratamento com tricálcio fosfato, ferrocianeto de potássio e EDTA. Em outro estudo KASSENKO & KOKUGAN (1997) testaram os efeitos do pré-tratamento do melço através da

microfiltração com uma membrana de cerâmica (0,05 μm) na fermentação de etanol. Os resultados mostraram que cerca de 99,5 % de glicose poderiam ser metabolizados pelas células no melaço pré-tratado, enquanto apenas 83,1 % de glicose são metabolizados pelas células no melaço não tratado.

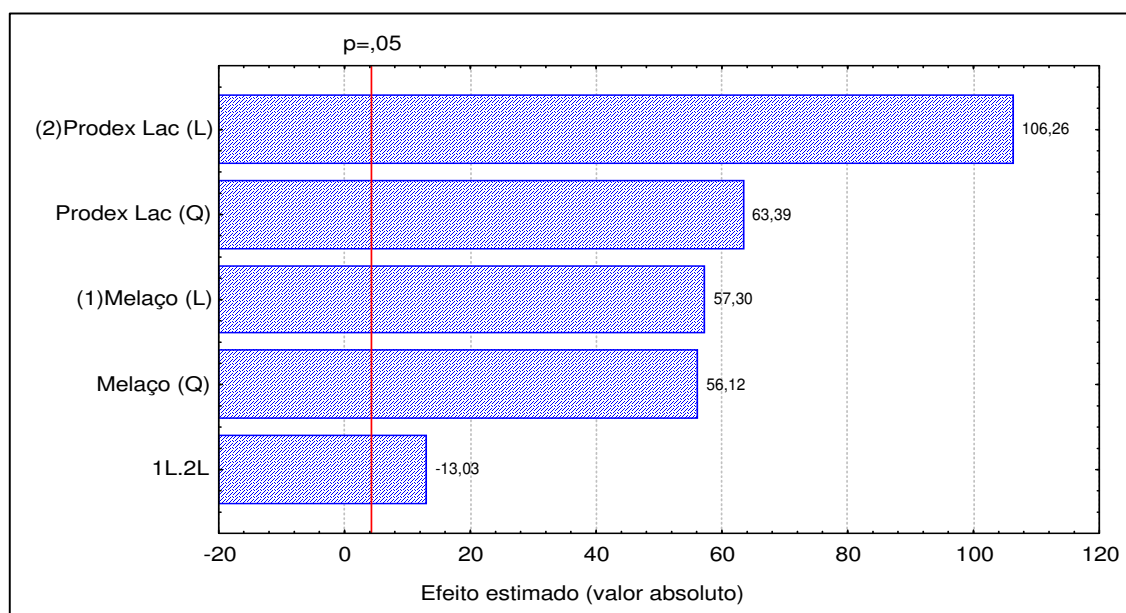


Figura 17. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) das variáveis estudadas no planejamento experimental completo 2^2 , para a GLI_{residual} .

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, propôs-se a otimização da produção de carotenóides em meios industriais pré-tratados com carvão ativo e com ácidos (sulfúrico e fosfórico). O pré-tratamento com carvão ativo mais adequado para os substratos agroindustriais melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho foi com 8 % de carvão ativo ANF – Carvorite, 1 hora de agitação (150 rpm) em frascos agitados a 90 °C, seguidos de

centrifugação (10.000 xg, 5 °C, 15 min) e filtração (celulose, Whatman nº 1 e membrana de acetato de celulose 0,2 µm).

Na bioprodução de carotenóides com substratos pré-tratados com carvão ativo, a máxima concentração de carotenóides totais obtida foi de 208,63 µg/L, com concentrações de melão de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho de 10 g/L, e Prodex Lac® de 10 g/L, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial de 4,0.

O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da concentração de carotenóides em substratos industriais pré-tratados com ácidos (sulfúrico e/ou fosfórico), obtendo-se um teor de carotenóides totais de 541,51 µg/L, com concentrações de melão de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho 5 g/L e Prodex Lac® de 5 g/L, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial de 4,0.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16. Ed. Washington, 1995.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresearch Technology**, v. 71, p.41-44, 2000.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**, s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v.43, p. 228-265, 2004.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1001-1006, 1995.

HAARD, N. F. Astaxanthin formation by yeast on molasses. **Biotechnology Letter**, v. 10, p. 609-614, 1988.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v. 120, p. 1339-1343, 1974.

HAYMAN, E. P.; MANNARELLI, B. M.; LEATHERS, T. D. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* grown on media composed of corn wet-milling co-products. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 389-395, 1995.

IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e Físicos para Análise de Alimentos.** V I ,3ª edição. São Paulo. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 1985.

MALDONADE, I. R. **Produção de Carotenóides por Leveduras.** Campinas. 2003. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123-135, 2002.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, v. 33, n°8, p. 805-810, 1998.

KASSEN, L. & KOKUGAN, T. The effect of Molasses Pretreatment by Ceramic Micro filtration Membrane on Ethanol Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering.**, v. 83, n° 6, p. 577-582, 1997.

RYAN, D.; JOHNSON, R. Dialyses and ultrafiltration of molasses for fermentation enhancement. **Separation and Purification Technology**, v. 22-23, p. 239-245, 2001.

SHIH, C.T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. **Lebensm. –Wiss.U.-Technology**, v. 29, p. 570-572, 1996.

SILVA, C.; CABRAL, J.M.S.; KEULEN, F.V. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 257–262, 2004.

SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, D.M.; BESHKOVA, D.M. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v.31, p. 115-121, 2004.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; PHOTHILANGKA, P.; OHMOMO, S. Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 31-39, 2004.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Campinas. 2004. 111p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

VOGEL, A . I. **Química analítica qualitativa**. 5 ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981, 665p.

CAPÍTULO 6. PARÂMETROS CINÉTICOS E ESTEQUIOMÉTRICOS DE CRESCIMENTO E DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636

PARÂMETROS CINÉTICOS E ESTEQUIOMÉTRICOS DE CRESCIMENTO E DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor*

RESUMO

Com o objetivo de verificar o comportamento da cinética do processo fermentativo por *Sporidiobolus salmonicolor* em meio convencional (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona) e agroindustrial (5 g/L de água de maceração de milho, 10 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 5 g/L de Prodex Lac®) pré-tratado com ácidos (sulfúrico e fosfórico), foram conduzidas fermentações à 25 °C, 180 rpm, pH inicial de 4,0, 120 h e em ambiente sem iluminação, retirando-se amostras a cada 6 h. A partir dos dados levantados na cinética de fermentação foram calculados os parâmetros cinéticos: velocidades instantâneas e específica de consumo de substrato, de formação de biomassa e de formação de produto; fator de conversão de substrato em biomassa e de substrato em produto. A concentração máxima de carotenóides totais em meio convencional (913 µg/L) e agroindustrial (502 µg/L) é atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo. A bioprodução de carotenóides apresenta associação com o crescimento celular, sendo que a relação entre a produção de carotenóides e o crescimento celular foi de 176,1 µg/g para o meio comercial, bem próximo ao meio industrial que apresentou o 163,0 µg/g. O pH do meio agroindustrial de fermentação, variou de 4,2 a aproximadamente 8,5 durante o período de fermentação. A velocidade específica inicial de crescimento para a *S. salmonicolor* em meio convencional e agroindustrial é igual a 0,07 e 0,04 h⁻¹, respectivamente. O meio convencional permitiu a obtenção das maiores produtividades, sendo que a produtividade em células (P_x) máxima é de 0,08 g.L⁻¹.h⁻¹ e de 0,06 g.L⁻¹.h⁻¹ para o meio agroindustrial e a produtividade em carotenóides totais é de 14,2 e 10,4 µg.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: *Sporidiobolus salmonicolor*; carotenóides; parâmetros cinéticos.

1. INTRODUÇÃO

O interesse por carotenóides tem aumentado nos últimos anos, devido a crescente demanda destes compostos nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de ração. Também a procura por compostos com conotação natural tem resultado num aumento de pesquisas referentes à produção de carotenóides por via fermentativa. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de carotenóides visa um aumento do rendimento da concentração de carotenóide assim como a redução de custos relativos ao processo, através da utilização de substratos industriais de baixo custo e ricos em açúcares e matéria orgânica, sendo que no contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza.

Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura e condições operacionais (HAYMAN et al., 1974). TINOI et al. (2005) e FRENGOVA et al. (1994) observaram que a concentração de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em meio agroindustrial e *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, foi paralela ao crescimento celular, sendo que a máxima de células e de concentração de pigmentos ocorreram simultaneamente. No entanto, JOHNSON et al. (1991) e FANG & CHIYOU (1993 e 1996) verificaram que as condições ótimas para a produção de carotenóides não foram as mesmas para o crescimento celular. Os primeiros autores observaram que o pH ótimo de crescimento para *Phaffia rhodozyma* foi de 5,8, enquanto que a máxima produção de astaxantina foi a pH 5,0. Os últimos autores verificaram que a máxima produção de carotenóides observada ocorreu depois de 35 h de fermentação, enquanto o crescimento celular máximo ocorreu após 25 h.

O conhecimento da cinética do processo fermentativo é de extrema importância quando da transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial, além de possibilitar uma comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo, por intermédio de variáveis, obtidas também a partir das curvas de ajuste $X=X(t)$, $P=P(t)$ e $S=S(t)$ (HISS, 2001).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi obter parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e de bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* utilizando meio convencional e substratos agroindustriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo

A levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) foi utilizada nos ensaios para obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de crescimento, consumo de substrato, evolução de pH e produção de carotenóides utilizando meio convencional e substratos agroindustriais.

O inóculo foi preparado em frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM. Após esterilização, estes frascos foram inoculados com suspensão de células com alça de níquel-cromo da cultura dos tubos de ensaio, e incubados a 25 °C, 180 rpm por 48 horas.

Os ensaios foram realizados em agitador orbital (Nova Ética, RDB-430) com controle de temperatura e agitação, no qual foram colocados erlenmeyeres de 250 mL, contendo 100 mL de meio de fermentação e incubados a 25 °C, 180 rpm, pH inicial de 4,0, por 120 horas e sem iluminação, conforme condições otimizadas para o meio convencional (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona) e agroindustrial (5 g/L de água de maceração de milho, 10 g/L de melaço de cana-de-açúcar e 5 g/L de Prodex Lac®) pré-tratado com ácidos (sulfúrico e fosfórico), conforme apresentados nos Capítulos 4 e 5, respectivamente.

2.2. Cinética do processo fermentativo e parâmetros estequiométricos

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato, produção de biomassa, evolução de pH e produção de carotenóides para os diferentes meios estudados foram conduzidas fermentações a 25 °C, 180 rpm, 120 h e em ambiente sem iluminação, retirando-se amostras a cada 6 h, para o conhecimento da cinética do processo fermentativo.

A biomassa foi determinada diretamente por gravimetria, após secagem em estufa (Fanem, SE-320) a 105 °C até massa constante. O consumo de substrato foi medido através do conteúdo de glicose presentes no caldo de fermentação, sendo determinado pelo método pelo método enzimático – Glicose PAP, liquiform (LABTEST Diagnóstica, 2005). O pH foi medido usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed). A produção de carotenóides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 448 nm em espectrofotômetro (Agilent 8553), utilizando a equação descrita por DAVIES (1976), após a recuperação dos carotenóides empregando N₂ líquido combinado com dimetilsufóxido - DMSO (Nuclear) para ruptura celular e extração com mistura de acetona (Quimex)/metanol (7:3), conforme descrito no item 2.4 do Capítulo 5.

2.2.1. Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em produto, $Y_{p/s}$ (μg de carotenóides/ g de glicose), foi expresso por:

$$Y_{p/s} = r_x/r_s \quad (1)$$

O fator de conversão de substrato em biomassa, $Y_{x/s}$ (g de células/ g de substrato) , foi expresso por:

$$Y_{x/s} = r_x/r_s \quad (2)$$

A relação entre a produção de carotenóides e a produção de células, $Y_{p/x}$ (μg de carotenóides / g de células), foi expresso por:

$$Y_{p/x} = r_p/r_x \quad (3)$$

Onde:

r_x = velocidade de crescimento das células (g/L.h)

r_s = velocidade de consumo de substrato (g/L.h)

r_p = velocidade de produção de carotenóides ($\mu\text{g/L.h}$)

2.2.2. Produtividade

A produtividade instantânea tanto em células como em carotenóides é definida, para o sistema em batelada a volume constante, como a velocidade r_x e r_p .

2.2.3. Velocidades instantâneas e específicas

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto e consumo do substrato com o tempo, é possível por um balanço de massa para cada componente, determinar, em cada instante, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_s) como sendo.

$$r_x = dX/dt \quad (6)$$

$$r_p = dP/dt \quad (7)$$

$$r_s = -dS/dt \quad (8)$$

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s), que serão expressas por:

$$\mu_x = r_x/X \quad (9)$$

$$\mu_p = r_p/X \quad (10)$$

$$\mu_s = r_s/X \quad (11)$$

Para velocidades constantes, estas foram determinadas através do coeficiente angular da melhor reta ajustada nas curvas que representam as cinéticas de crescimento, consumo de glicose e produção de carotenóides.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1 e 2 apresentam as cinéticas de crescimento, consumo de substrato, evolução do pH e produção de carotenóides para o meio convencional e agroindustrial, respectivamente.

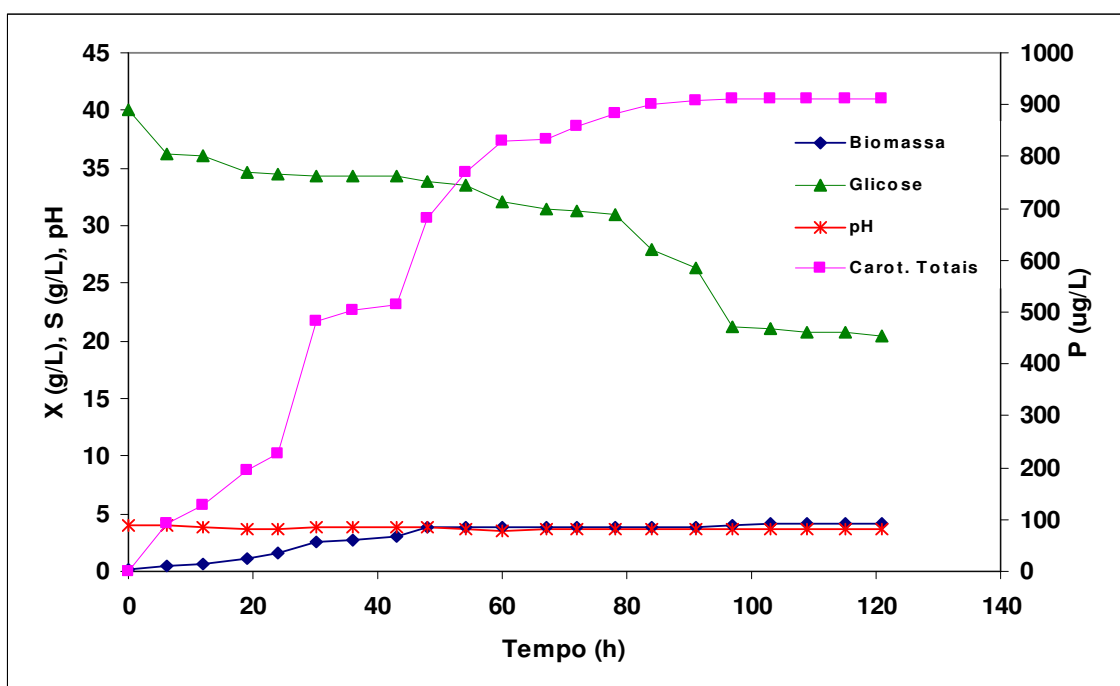


Figura 1. Cinética de crescimento da *S. salmonicolor* (CBS 2636), consumo de substrato, produção de carotenóides e evolução do pH, para o meio convencional (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona).

Conforme demonstram as Figuras 1 e 2 (Tabelas II e III com os dados experimentais, disponíveis no anexo II), a concentração máxima de carotenóides totais em meio convencional (913 µg/L) e agroindustrial (502 µg/L) é atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo. Neste ponto a concentração de glicose observada é de cerca de 20 g/L em meio convencional e 0,2 g/L em meio agroindustrial, respectivamente.

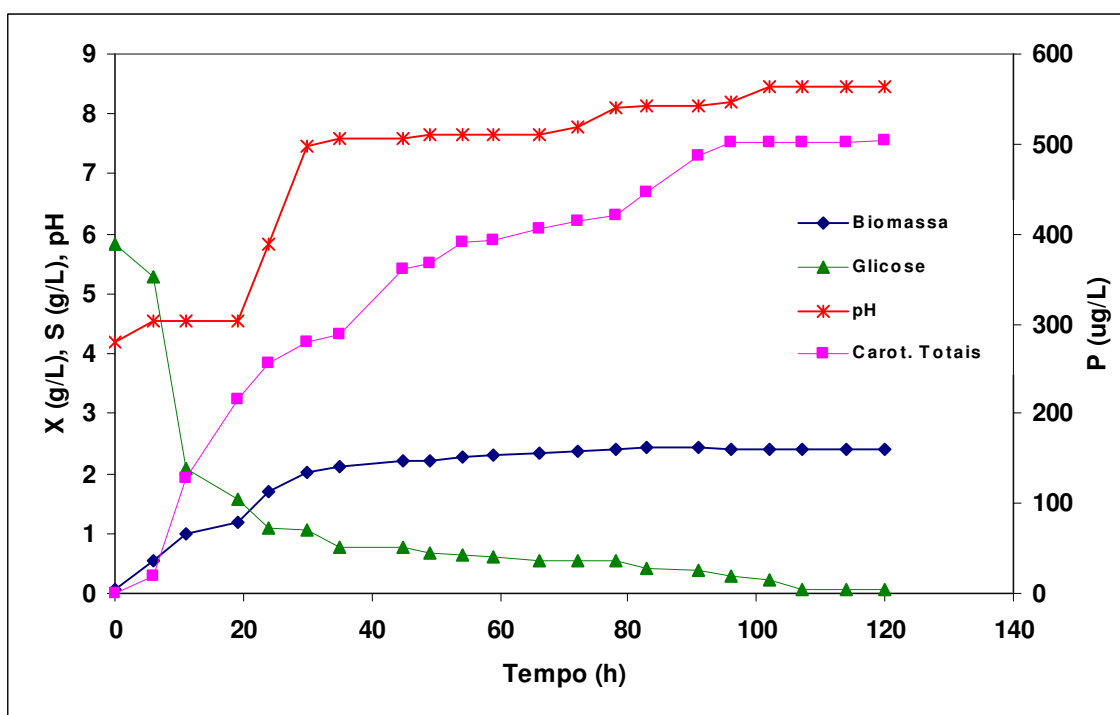


Figura 2. Cinética de crescimento da *S. salmonicolor* (CBS 2636), consumo de substrato, produção de carotenóides e evolução do pH, para o meio agroindustrial (5,84 g/L de glicose inicial à temperatura de 25 °C e 180 rpm)

O pH do meio de fermentação, em substratos convencionais (glicose, extrato de malte e peptona), apresentou apenas uma pequena variação no decorrer do processo fermentativo (120 horas), diminuindo de 4,0 para 3,7 (Figura 1). No entanto, observa-se que ao utilizar substratos agroindustriais (água de maceração de milho, melão de cana-de-açúcar e Prodex Lac®) para a bioprodução de carotenóides (Figura 2), ocorreu um aumento do pH_{final} (~8,5) do meio de fermentação, sendo que a evolução foi progressiva de 4,2 para 7,5 nas primeiras 30 h, seguindo de uma elevação lenta até valores 7,65 nas 36 h seguintes. Após 96 h de fermentação ocorreu uma elevação no pH para 8,46, mantendo-se até o final do processo fermentativo (120 h). Possivelmente, isto esteja relacionado à proteólise do microrganismo, fenômeno natural que ocorre após esgotamento completo de substrato, principalmente quando a linhagem não utiliza outra fonte de carbono; como consequência da degradação de aminoácidos, há formação de amônia e esta pode ser responsável pela

elevação no pH. Fato que já foi discutido anteriormente (capítulo 5), onde a concentração de Prodex Lac® demonstrou um efeito positivo significativo ($p < 0,05$), indicando que na faixa estudada o aumento de sua concentração no meio acarretou um acréscimo no pH durante o cultivo, sendo que este também foi influenciado significativamente pelos efeitos positivos de interação entre o melão e Prodex Lac®. MANTZOURIDOU et al. (2002) ao produzir carotenóides por *Blakeslea trispora*, em meio de fermentação composto por água de maceração de milho, óleo de oliva, óleo de soja e suplementos (extrato de levedura, hidrolisado de caseína, asparagina, KH_2PO_4 , MgSO_4 e tiamina), verificaram elevação do pH da fermentação de 5,0 para 7,5 durante os 19 dias de cultivo.

De acordo com FRENGOVA et al. (1994) a biossíntese de carotenóides ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação, seguida de elevação durante a fase intensa da carotenogênese. A partir daí o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo.

Observa-se ainda nas Figuras 1 e 2 que o crescimento não é exponencial e assim a velocidade de crescimento é constante para as primeiras 54 horas no meio convencional e 30 horas no meio agroindustrial, posteriormente passando para uma fase de desaceleração e estacionária, respectivamente. A velocidade de crescimento é de 0,08 e 0,06 g/L.h para os meios considerados, respectivamente. A bioprodução de carotenóides apresenta associação com o crescimento celular (Figuras 3 e 4), sendo que a máxima concentração de células (4,1 e 2,4 g/L) e de carotenóides (913 e 502 $\mu\text{g/L}$) ocorreram simultaneamente no meio convencional e agroindustrial, respectivamente. Comportamento semelhante foi verificado por TINOI et al. (2005) onde a concentração de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em meio agroindustrial foi paralela ao crescimento celular, sendo que a máxima de células (10,3 g/L) e de concentração de pigmentos (3,5 mg/L) ocorreram simultaneamente. No entanto FRENGOVA et al. (1995) verificaram que a produção de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, também foi paralela ao crescimento celular, porém a produção máxima de células (31,9 g/L) e a máxima concentração de pigmentos (8,4 mg/L) não ocorreram simultaneamente. A máxima concentração de carotenóides ocorreu quando o crescimento já havia cessado.

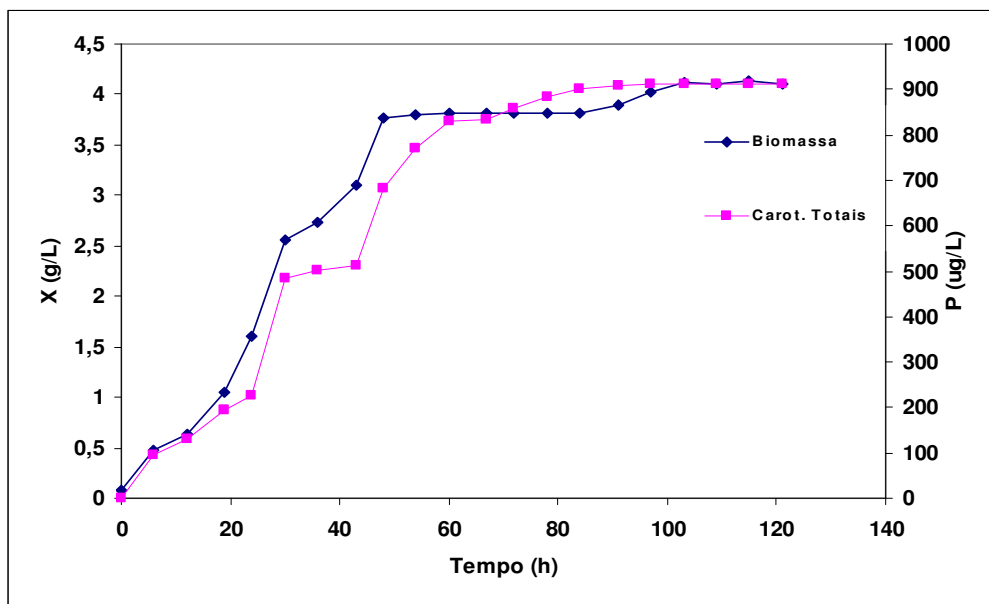


Figura 3. Associação da produção de carotenóides com o crescimento celular em meio convencional.

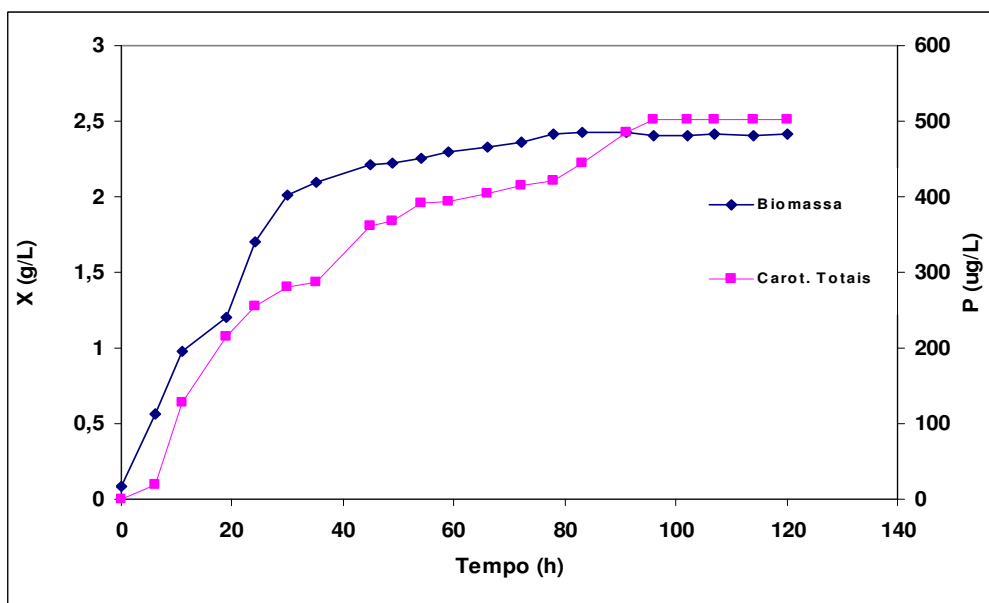


Figura 4. Associação da produção de carotenóides com o crescimento celular em meio agroindustrial.

A Figura 5 mostra a produtividade em carotenóides ao longo da fermentação. Observa-se que o meio convencional permitiu a obtenção das maiores produtividades. Desta forma, percebe-se novamente que o pré-tratamento com ácidos (sulfúrico e fosfórico) dos substratos agroindustriais pode ter levado à remoção de nutrientes essenciais para a produção, ou ainda, a remoção de inibidores presentes no meio pode não ter sido completa com o tratamento utilizado. Uma outra causa provável para a menor produção seria a metabolização de compostos nitrogenados, liberando grande quantidade de amônia ao meio, quando se utilizam substratos agroindustriais. Esta hipótese concorda com os resultados observados para o pH, onde se observa que há um grande aumento deste nos meios industriais ao contrário da fermentação utilizando meio convencional.

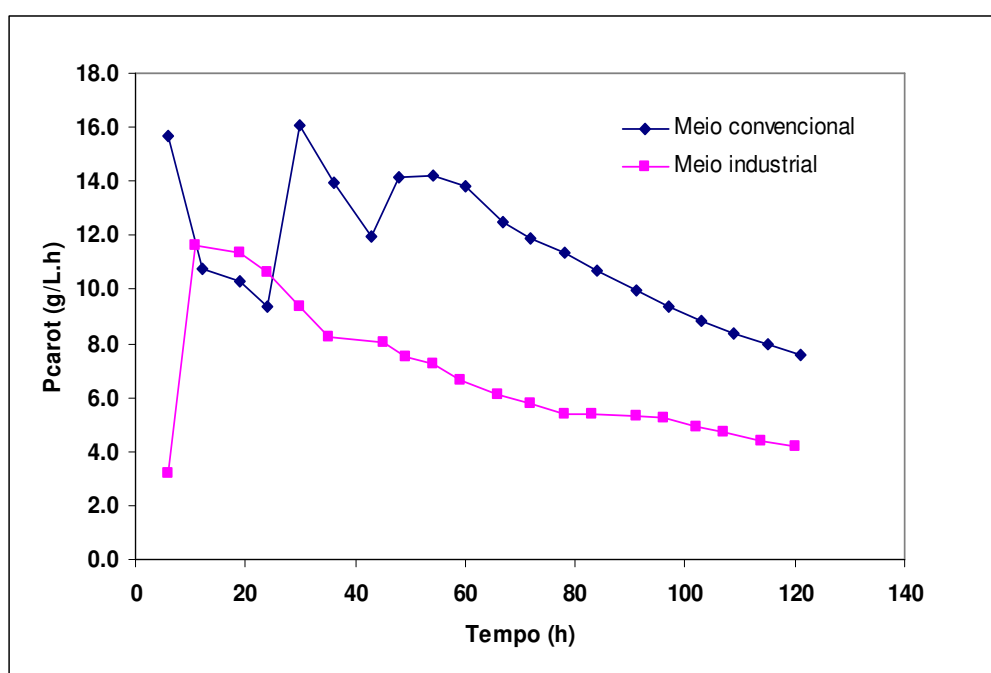


Figura 5: Comparação da produtividade em carotenóides ao longo da fermentação para os dois meios.

As velocidades de crescimento celular para a fase linear obtidas foram 0,08 e 0,06 h⁻¹ para os meios considerados, respectivamente. Isso faz com que as velocidades específicas de crescimento sejam decrescentes nesses intervalos, conforme pode ser

observado nas Figuras 6 e 7. Estes resultados sugerem que a glicose não é o substrato limitante, pois o comportamento é o mesmo para o meio convencional, onde se utiliza muita glicose. Esta limitação se acentua com o tempo, pois a velocidade específica está decrescendo. Assim, observam-se duas fases bem definidas, a de crescimento linear e a fase estacionária, onde a velocidade é praticamente zero. Há ainda uma fase de desaceleração bem definida para o meio industrial.

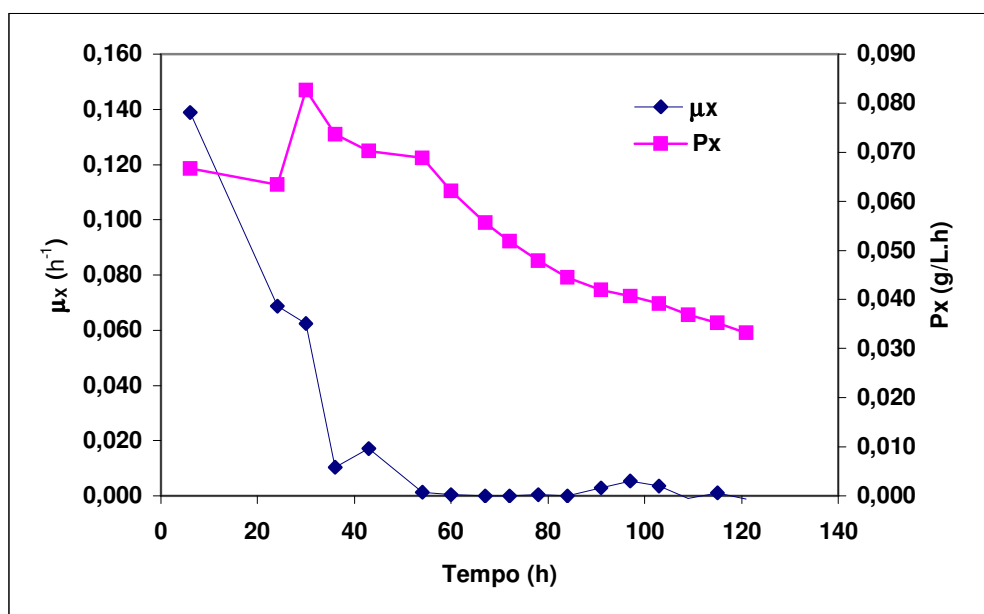


Figura 6. Evolução da velocidade específica de crescimento e da produtividade em células para o meio convencional.

A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros cinéticos para a *S. salmonicolor*, calculados para as três fases de fermentação observadas (linear, desaceleração e estacionária) no meio convencional e agroindustrial. Nestas condições, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para a *S. salmonicolor* é igual a 0,07 e 0,04 h^{-1} , respectivamente. A produtividade em células (P_x) máxima é de 0,08 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ e 0,06 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ e a produtividade em carotenóides totais é de 14,2 e 10,4 $\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, respectivamente.

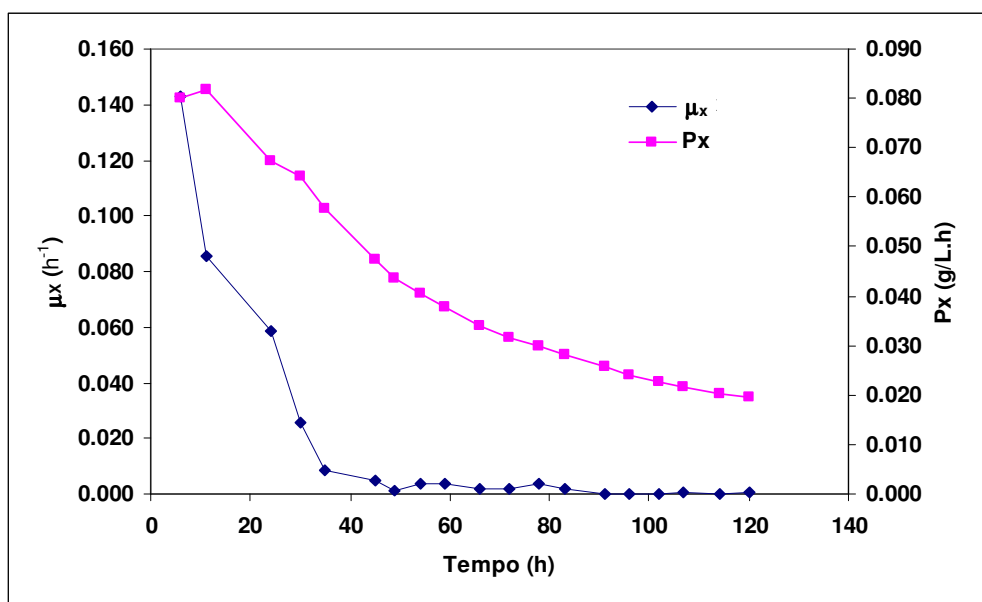


Figura 7. Evolução da velocidade específica de crescimento e da produtividade em células para o meio agroindustrial.

Conforme os resultados da Tabela 1, observa-se que o fator de conversão $Y_{X/S}$ é igual a 1,2 g/g para o meio convencional. Este é um valor muito alto e sugere que há consumo de outro substrato, possivelmente as fontes de nitrogênio utilizadas, como o extrato de malte e peptona. Para o meio agroindustrial obtém-se um valor bem menor para este parâmetro (0,30 g/g), sugerindo um consumo preferencial da glicose presente no meio, neste caso.

Para o meio convencional, a partir de 54 h, o fator de conversão $Y_{X/S}$ diminui consideravelmente e permanece constante em 0,03 g/g. Nota-se que muito substrato é consumido gerando poucas células. Isso pode ser um indicativo de alguma bioconversão para outros produtos ou uma mudança muito forte no metabolismo. Essa queda brusca se observa no meio agroindustrial apenas após 78 h quando as células param completamente de crescer.

O mesmo comportamento pode ser observado para o fator de conversão $Y_{P/S}$, para o meio convencional. Há uma queda brusca, indicando que a velocidade de produção cai

mais rápido que a velocidade de consumo de substrato. Para o meio agroindustrial ainda há uma queda, mas intermediada por um aumento no período de 30 a 78 h de fermentação. Neste intervalo, o resultado sugere que a taxa de produção cai mais lentamente do que a velocidade de consumo de substrato.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos e estequiométricos do processo fermentativo em meio convencional e agroindustrial.

Parâmetros	Meio convencional			Meio agroindustrial		
	1ª fase (0-48 h)	2ª fase (48-78 h)	3ª fase (78-121 h)	1ª fase (0-30 h)	2ª fase (30-78 h)	3ª fase (78-120 h)
P_x (g/L.h)	0,08	0,01	0,01	0,06	0,01	0
P_{CAROT} (µg/L.h)	14,2	10,7	0,7	10,4	2,5	1,9
$Y_{P/S}$ (µg/g)	206,8	39,3	1,38	53,49	378,6	3,0
$Y_{X/S}$ (g/g)	1,20	0,03	0,03	0,30	0,91	0,06
$Y_{P/X}$ (µg/g)	176,1	5.722	35,1	163,0	295,8	-
μ_x (h ⁻¹)	0,073	0,001	0,001	0,041	0,036	0

* 1ª fase – Linear; 2ª fase – Desaceleração; 3ª fase - Estacionária

4. CONCLUSÕES

A concentração máxima de carotenóides totais em meio convencional (913 µg/L) e agroindustrial (502 µg/L) é atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo, apresentando uma concentração de glicose residual de aproximadamente 20 e 0,2 g/L, respectivamente.

A bioprodução de carotenóides apresenta associação com o crescimento celular, sendo que a relação entre a produção de carotenóides e o crescimento celular foi de 176,1 µg/g para o meio comercial, bem próximo ao meio industrial que apresentou o 163,0 µg/g.

O pH do meio de fermentação, em substratos convencionais (glicose, extrato de malte e peptona), apresentou apenas uma pequena variação no decorrer do processo

fermentativo (120 h), diminuindo de 4,0 para 3,7. No entanto, observou-se que ao utilizar substratos agroindustriais (água de maceração de milho, melação de cana-de-açúcar e Prodex Lac®) para a bioprodução de carotenóides ocorreu um aumento do pH_{final} (~8,5).

A velocidade específica inicial de crescimento para a *S. salmonicolor* em meio convencional e agroindustrial é igual a 0,07 e 0,04 h⁻¹, respectivamente.

O meio convencional permitiu a obtenção das maiores produtividades, sendo que a produtividade em células (P_x) máxima é de 0,08 g.L⁻¹.h⁻¹ e de 0,06 g.L⁻¹.h⁻¹ para o meio agroindustrial e a produtividade em carotenóides totais é de 14,2 e 10,4 µg.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**, s, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Optimization of cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, p. 466-469, 1993.

FANG, T. J.; CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p. 175-181, 1996.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA; GRIGROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 44, p.888-894, 1994.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Effect of temperature changes on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. **Biotechnology Letters**, v.17, p.1001-1006, 1995.

HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C.; SIMPSON, K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bacteriology**, v.120, p. 1339-1343, 1974.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. **In:** SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 2001, Cap. 6, p. 93-121.

JOHNSON, E. A.; GIL- HWAN AN. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review in Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1991.

LE DUY, A.; ZAJUC, J. E. A geometrical approach for differentiation of experimental function at a point: Applied to growth and product formation. **Biotechnol. Bioeng.**, v.25, p. 805-810, 1973.

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123-135, 2002.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, R. L.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolysed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2551-2557, 2005.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho foi estudada a bioprodução e recuperação de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) em agitador orbital. Inicialmente, realizou-se uma investigação exploratório da versatilidade da linhagem em produzir compostos voláteis e carotenóides em substratos contendo como precursores ricinoleato de sódio, ricinoleato de etila e metila, ácido ricinoléico e óleo de mamona. Desenvolveu-se metodologia para maximizar as condições de extração e recuperação de compostos voláteis e carotenóides de meios fermentados. Propôs-se a bioprodução de carotenóides em meio convencional e agroindustrial, de modo a serem realizados estudos desde a definição do pré-tratamento mais adequado para os substratos agroindustriais, de otimização da produção de carotenóides, empregando-se técnica de planejamento experimental, e estudo de parâmetros cinéticos de crescimento e da bioprodução de carotenóides das condições otimizadas. A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

- A técnica de microextração em fase sólida (SPME) - método *Headspace* (HS), demonstrou ser eficiente para extração de compostos voláteis de meios líquidos fermentados, pois quando comparada à técnica tradicional de extração com solvente a quantidade extraída foi 1,8 vezes superior. As condições que resultaram a máxima adsorção do analito (gama-decalactona) na fibra extratora (PDMS 100 µm, foram: temperatura de 60 °C, tempo de extração de 30 min, sem agitação, volume de amostra de 2,5 mL e solução salina de KCl saturada (1:10, v/v).
- O perfil cromatográfico dos compostos voláteis está diretamente relacionado com a composição do meio de fermentação, principalmente a fonte de carbono. No experimento empregando-se concentração de 0,02 % de ácido ricinoléico, a 28°C, 160 rpm e pH inicial 6,0, foi o que proporcionou maior produção de compostos voláteis, sendo identificados por cromatografia gasosa (CG/MS). 10 compostos

voláteis: 1,4-butanodiol; 1,2,2-trimetilciclopropilamina; beta-ionona; 2,3-butanodiona; pentanal; tetradecano; 2-isononenal; 4-octen-3-ona; ácido propanóico e octadecano.

- A formação de beta-ionona, possivelmente esteja relacionada à oxidação dos carotenóides, pois nos ensaios onde houve formação deste composto volátil, constatou-se também o aparecimento de compostos pigmentados, semelhantes a carotenóides. A síntese da beta-ionona por biotransformação é interessante devido ao seu valor de mercado, sua classificação como “natural” e o baixo custo de seu precursor, óleo de mamona e/ou seus derivados (ácido ricinoléico, ricinoleato de metila e etila), tornando-se desta forma uma alternativa à síntese química e à extração vegetal.
- A linhagem *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) produz carotenóides intracelulares com forte associação destes com as células, sendo que o tratamento empregando N₂ líquido combinado a dimetilsulfóxido (DMSO) possibilitou a ruptura celular e a extração com acetona/metanol (7:3, v/v), permitiu obter o máximo de recuperação de carotenóides totais.
- O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da bioprodução de carotenóides em meio convencional, obtendo-se um teor de carotenóides de 1019 µg/L (287,71 µg/g) com concentração de glicose 40 g/L, extrato de malte 10 g/L, peptona 14 g/L, agitação 180 rpm, temperatura 25 °C e pH inicial 4,0.
- Um dos carotenóides majoritários identificado nesta linhagem foi o β-caroteno, correspondendo a aproximadamente 32 % em relação aos carotenóides totais..
- O pré-tratamento com carvão ativo mais adequado para os substratos agroindustriais melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho foi com 8 % de carvão ativo ANF – Carvorite, 1 hora de agitação (150 rpm) em frascos agitados a 90 °C, seguidos de centrifugação (10.000 xg, 5 °C, 15 min) e filtração (celulose, Whatman nº 1 e membrana de acetato de celulose 0,2 µm).

- Na bioprodução de carotenóides com substratos pré-tratados com carvão ativo, a máxima concentração de carotenóides totais obtida foi de 208,63 $\mu\text{g/L}$, com concentrações de melaço de cana-de-açúcar de 10 g/L, água de maceração de milho de 10 g/L, e Prodex Lac® de 10 g/L, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial de 4,0.
- O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da concentração de carotenóides em substratos industriais pré-tratados com ácidos (sulfúrico e/ou fosfórico), obtendo-se um teor de carotenóides totais de 541,51 $\mu\text{g/L}$, com concentrações de melaço de 10 g/L, água de maceração de milho 5 g/L e Prodex Lac® de 5 g/L, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial de 4,0.
- A cinética de crescimento e da bioprodução de carotenóides em meio convencional e agroindustrial otimizados, indicou que: a concentração máxima de carotenóides é atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo; a bioprodução de carotenóides apresenta associação com o crescimento celular; o meio convencional permitiu a obtenção das maiores produtividades (P_x máxima é de 0,08 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e P_{cart} é de 14,2 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para a *S. salmonicolor* em meio convencional e agroindustrial é igual a 0,07 e 0,04 h^{-1} , respectivamente.

Através da experiência adquirida neste trabalho acerca da bioprodução de compostos voláteis e carotenóides em frascos agitados, pode-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

- Realizar ensaios da bioprodução de beta-ionona por biotransformação de precursores como óleo de mamona e/ou seus derivados (ácido ricinoléico, ricinoleato de metila e etila), tornando-se desta forma uma alternativa à síntese química e à extração vegetal.

- Otimizar a bioprodução de carotenóides em fermentador de bancada, sugerindo estudo de outras variáveis independentes tais como velocidade de agitação e aeração, com o intuito de aumentar a concentração e reduzir custos.
- Identificar e caracterizar os carotenóides produzidos por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), por cromatografia líquida (CLAE) Envolvendo, inicialmente a síntese e isolamentos de compostos a partir de fontes naturais, purificação e confirmação da estrutura por técnica de ressonância magnética (RMN), para utilização como padrão cromatográfico, já que a maioria destes compostos não estão disponíveis no mercado para aquisição.
- Avaliar a viabilidade econômica da bioprodução de carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), em meio convencional e agroindustrial.
- Investigar a possibilidade de utilização de outros substratos agroindustriais (soro de leite, extrato de bagaço de uva, óleo de mamona, etc) e linhagens na bioprodução de carotenóides.
- Encapsular os carotenóides utilizando tecnologias Supercrítica e/ou *spray drier*, utilizando diferentes materiais encapsulantes (maltodextrina, capsul, goma arábica, etc), avaliando a distribuição de tamanho de partículas, estabilidade dos pigmentos e aplicações industriais.

ANEXOS

Anexo I. Procedimento para determinação dos minerais dos substratos agroindustriais

Os parâmetros instrumentais para a determinação dos minerais dos substratos agroindustriais, referentes ao Capítulo 5, são apresentados na Tabela I.

Tabela I: Parâmetros instrumentais utilizados no FAAS.

Elemento	λ (nm)	Intensidade da lâmpada(mA)	Fenda (nm)	Concentração de trabalho (mg L⁻¹)
Ca	239,9	10	0,2	2 – 800
Na	303,2	5	0,2	2 – 400
Mg	202,6	4	1,0	0,15 – 20
Mn	403,1	5	0,2	0,5 – 60
Zn	213,9	5	1,0	0,01- 2.0
Cu	324,7	4	0,5	0,03 – 10
Fe	248,3	5	0,2	0,06 – 15
K	404	5	0,2	5 - 300

Anexo II. Cinética do processo fermentativo

Nas Tabelas II e III encontram-se os resultados da cinética do processo fermentativo em meio convencional e agroindustrial, referentes as Figuras 1 e 2 (Capítulo 6), respectivamente.

Tabela II. Cinética do processo fermentativo em meio convencional.

Período (h)	pH	Biomassa (g/L)	GLIC (g/L)	Carotenóides Totais (µg/L)
0	4,03	0,08	40,08	-
6	4,02	0,48	36,28	93,95
12	3,8	0,63	36,08	129,31
19	3,71	1,05	34,70	195,78
24	3,7	1,6	34,53	225,39
30	3,85	2,56	34,29	482,97
36	3,85	2,73	34,28	501,83
43	3,85	3,1	34,28	513,30
48	3,82	3,77	33,88	680,62
54	3,71	3,8	33,57	769,08
60	3,5	3,81	32,04	830,23
67	3,65	3,81	31,40	834,84
72	3,65	3,81	31,29	857,32
78	3,66	3,82	30,92	883,53
84	3,67	3,82	27,88	901,05
91	3,67	3,9	26,32	907,19
97	3,67	4,03	21,20	911,37
103	3,67	4,12	21,07	912,19
109	3,67	4,1	20,79	912,52
115	3,67	4,13	20,75	913,01
121	3,67	4,1	20,48	912,84

Tabela III. Cinética do processo fermentativo em meio agroindustrial.

Período (h)	pH	Biomassa (g/L)	GLIC (g/L)	Carotenóides Totais (µg/L)
0	4,2	0,08	5,84	-
6	4,55	0,56	5,78	19,24
11	4,55	0,98	2,08	128,14
19	4,55	1,20	1,58	215,86
24	5,82	1,70	1,08	255,60
30	7,46	2,01	1,06	280,15
35	7,6	2,10	0,78	287,72
45	7,6	2,21	0,78	361,20
49	7,65	2,22	0,67	367,23
54	7,65	2,26	0,63	391,27
59	7,65	2,30	0,61	392,70
66	7,65	2,33	0,55	405,05
72	7,78	2,36	0,54	413,97
78	8,09	2,41	0,54	420,76
83	8,13	2,43	0,40	445,47
91	8,15	2,43	0,38	485,93
96	8,21	2,40	0,29	501,96
102	8,46	2,40	0,22	502,65
107	8,46	2,41	0,08	502,50
114	8,46	2,40	0,08	502,84
120	8,46	2,41	0,08	502,89