

Universidade Federal do Ceará
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

**Produção Microbiológica de Betacaroteno Usando
Suco de Caju Como Fonte de Carbono**

Humberto Cavalcante Gondim Neto

Fortaleza
2010

Universidade Federal do Ceará
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

**Produção Microbiológica de Betacaroteno Usando
Suco de Caju Como Fonte de Carbono**

Humberto Cavalcante Gondim Neto

Monografia apresentada à
coordenação do Curso de
Graduação em Engenharia
Química, da Universidade Federal
do Ceará como parte dos
requisitos necessários à obtenção
do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Andrea Lopes
de Oliveira Ferreira

Fortaleza

2010

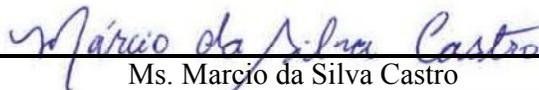
Humberto Cavalcante Gondim Neto

**PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE BETACAROTENO USANDO
SUCO DE CAJU COMO FONTE DE CARBONO**

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em 10 de Dezembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Ms. Marçio da Silva Castro
Universidade Federal do Ceará



Prof^a. Ms. Francisco Murilo Tavares de Luna
Universidade Federal do Ceará



Prof^a. Dr^o. Vitor Moreira da Rocha Ponte
Universidade Federal do Ceará

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado saúde para conseguir chegar até aqui.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e pelo compartilhamento de momentos triste e principalmente de momentos felizes.

Aos meus irmãos Lucas e Mateus, por proporcionar momentos de alegria e sempre nos tirar boas risadas desde o momento em que nasceram.

A todos os meus outros familiares, em especial minha tia Ana Lúcia.

A Ticiane pelo companheirismo, amor e amizade ao longo de toda essa trajetória. Por todos os momentos que passamos e aos que ainda virão.

Aos professores Hiluy e Hosiberto, pelos laços de amizade construídos.

A professora e orientadora Andrea, que além de tudo tornou-se uma amiga, pela sua paciência e ajuda ao longo desses 4 anos finais de curso.

A todos os amigos de graduação, pelos momentos compartilhados. Em especial aos amigos mais próximos, Anderson, Carol, Cícero, Daniel, Diego, Felipe Feitosa, Filipe Xavier, Felipe Sá, Gabriel, João, Marcelo, Régis, Regiane.

E a todos que contribuíram de alguma forma em minha vida.

Resumo

Carotenóides são pigmentos encontrados em plantas, fungos e algas. Dentre eles, o betacaroteno tem várias funções no organismo, é antioxidante e anticancerígeno (Cullen *et al.* 1996; Hennekens 1997) além de atuar no metabolismo da visão. Betacaroteno é amplamente empregado nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Assim, faz-se necessária obtenção de condições de cultivo que torne viável sua produção em escala industrial. Estudou-se produção microbiológica de betacaroteno usando como fonte de nutrientes, o suco de caju. Realizou-se um planejamento experimental e estudaram-se: temperatura (15 a 30°C), pH inicial (5 e 7), velocidade de agitação (70 a 100 rpm), adição de sulfato de amônio (0 a 4g/L) e de outras fontes de nitrogênio. Também foi realizado um estudo cinético da produção de betacaroteno. Utilizou-se levedura *Rhodotorula glutinis* (Bhosale *et al.* 2001) e os resultados mostraram que a produção do betacaroteno aumentou com: Temperatura (30°C), pH 7,0 e agitação de 100 rpm. A adição de sulfato de amônio não interferiu na produção e a adição das outras fontes nitrogenadas inibiu o crescimento da biomassa. A produção de betacaroteno variou de 5,0 a 120 µg/g de células secas.

Palavras – chave: Carotenóides, Betacaroteno, Vitamina A, suco de caju.

Lista de Figuras

Figura 1. Vitamina A em sua forma ativa de retinol.	1
Figura 2. Estrutura do betacaroteno.	1
Figura 3. Gráfico esquemático das fases do crescimento microbiano.	5
Figura 4. Representação esquemática da equação de Monod.	7
Figura 5. <i>Rhodotorula glutinis</i> em meio sólido.	12
Figura 6. curva de calibração do microrganismo.	13
Figura 7. Absorbância final x pH.	18
Figura 8. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo Submerso em suco de caju, aumento de 100 ×.	23
Figura 9. <i>Rhodotorula glutinis</i> após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 ×, em uma única etapa de extração.	23
Figura 10. Análise Cinética do Crescimento de <i>Rhodotorula glutinis</i> em meio de suco de caju.	24
Figura 11. Consumo de glicose ao longo do tempo.	25
Figura 13. Velocidade específica de crescimento, μX , ao longo do tempo.	26
Figura 13. Velocidade específica de consumo de substrato, μS , ao longo do tempo.	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Planejamento experimental para produção de betacaroteno a partir do cultivo submerso de <i>Rhodotorula glutinis</i> em suco de caju.	15
Tabela 2 - Resultado do Planejamento experimental para produção de betacaroteno a partir do cultivo submerso de <i>Rhodotorula glutinis</i> em suco de caju.	19
Tabela 3 - Avaliação do efeito do pH na produção de betacaroteno. Experimentos na temperatura de 30 °C.	20
Tabela 4 - Avaliação do efeito do pH na produção de betacaroteno. Experimentos na temperatura de 15 °C.	20
Tabela 5. Avaliação do efeito da adição de compostos nitrogenados, na concentração de 4g/l, na produção de betacaroteno.	22

Nomenclatura

HPLC:	“High Pressure Liquid Cromatograph”
K_s :	Constante de saturação de Monod
S:	Concentração de substrato
t_g :	tempo de geração
X:	Concentração de biomassa
$Y_{X/S}$:	Fator de conversão células/substrato
$Y_{X/P}$:	Fator de conversão células/produto
$Y_{P/S}$:	Fator de conversão produto/substrato

Letras gregas

λ :	Comprimento de onda
μ_x :	Velocidade específica de crescimento
μ_s :	Velocidade específica de consumo de substrato
$\mu_{m\acute{a}x}$:	Velocidade específica de crescimento máxima

Sumário

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Nomenclatura	vii
Letras gregas	vii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Breve Histórico	3
2.2. Processos Fermentativos	4
2.3. Cinética do Crescimento Microbiano	4
2.4. Fases do Crescimento Microbiano	5
2.5. Fatores de Conversão	8
2.6. Carotenóides	9
2.6.1. Betacaroteno	9
2.6.2. Produção de Carotenóides	10
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Microrganismo	12
3.2. Repiques	12
3.3. Concentração do meio de cultura	12
3.4. Esterilização do meio	13
3.5. Preparo do Inóculo	14
3.6. Cultivo do meio de suco de caju	14
3.7. Adição de outras fontes nitrogenadas	15
3.8. Extração do betacaroteno	16

3.9. Análises em HPLC	16
3.10. Estudo cinético da produção de betacaroteno	17
4. Resultados e Discussão	18
4.1. Efeito do método de esterilização	18
4.2. Efeito do pH na produção de betacaroteno	19
4.3. Efeito da velocidade de agitação na produção de betacaroteno	20
4.4. Efeito da Temperatura na produção de betacaroteno	21
4.5. Efeito da concentração de sulfato de amônio	21
4.6. Efeito da adição de outras fontes de nitrogênio	22
4.7. Separação do produto	22
4.8. Avaliação cinética da produção de betacaroteno	24
5. Conclusões	28
6. Referências Bibliográficas	39

1. Introdução

A vitamina A (Figura 1), um dos compostos mais importantes no mecanismo da visão, é encontrada principalmente em vegetais e algas marinhas sob a forma de provitaminas A.

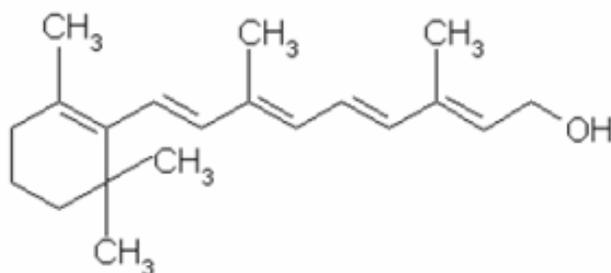


Figura 1 - Vitamina A em sua forma ativa de retinol

Os carotenóides são pigmentos responsáveis pela coloração amarelo avermelhada de certos vegetais. Apenas uma pequena parte dos carotenóides até hoje conhecidos tem a capacidade de se converter em vitamina A, isso os torna muito importantes, visto que a deficiência de vitamina A (hipovitaminose A), provocada principalmente pela subnutrição (Carvalho *et al.* 1995), é a causadora da xerofthalmia, doença que provoca dificuldades de visibilidade noturna e em casos mais severos cegueira total. Os casos mais graves ocorrem em crianças onde se pode observar a combinação de outros fatores como infecções, o que eleva os casos de mortalidade infantil. O carotenóide mais conhecido e que tem um grande potencial como uma provitamina A (Bauernfeind, 1981) é o betacaroteno (Figura 2).

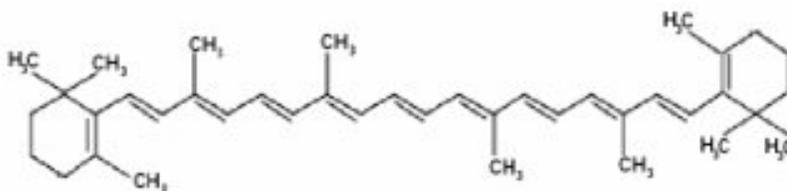


Figura 2 - Estrutura do betacaroteno

Betacaroteno vem sendo empregado de diversas formas em vários ramos da indústria, como por exemplo, seu uso potencial na indústria farmacêutica como provitamina A, na

indústria de cosméticos na produção de cremes, bronzeadores e diversos produtos para pele e ainda, após certos entraves em relação ao uso de corantes artificiais, é usado na indústria alimentícia como um corante natural. Na medicina, já são bem conhecidas as suas propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas, além do seu auxílio na absorção de nutrientes e vitaminas lipossolúveis.

A ingestão em excesso de betacaroteno não é prejudicial ao organismo, visto que o mesmo é convertido em vitamina A (retinol) apenas quando há uma real necessidade, o que confere a ele mais uma vantagem, pois em um possível consumo em excesso de suplementos contendo vitamina A, existe risco inerente de intoxicação, já que o fígado pode não suportar armazenar esta substância. Outro fator importante é a dificuldade na produção direta da vitamina A. Primeiro, sua molécula é instável, facilmente oxidada pela luz, ar, agentes oxidantes e calor, além de ser insolúvel em meio aquoso (Hong e Itri, 1994); (Layrisse *et al.* 1997). Assim a utilização de betacaroteno se mostra viável por sua maior estabilidade relativamente ao retinol.

No nordeste do Brasil, especialmente no estado do Ceará, a agroindústria do caju apresenta um papel de destaque na economia local. Considerando-se que o pseudofruto corresponde a 90 % da massa do caju, calcula-se que o país produz cerca de 1,5 milhão de toneladas desse produto. Entretanto, somente 12 % do pseudofruto são consumidos “in natura” ou processados industrialmente. Os produtos industriais são consumidos basicamente pelo mercado local e não desempenham um papel importante na economia do estado ou do Brasil. Além disso, grande parte do caju é perdida na colheita acumulando-se no solo. Esses fatores tornam o suco de caju um substrato interessante e de baixo custo para diversas aplicações potenciais, como por exemplo, meio nutricional para produção de betacaroteno (Campos *et al.* 2002)

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Breve Histórico

Processos fermentativos convencionais, tais como a produção de bebidas alcoólicas e alimentos são conhecidos desde a antiguidade, entretanto apenas 150 anos atrás as bases científicas para esses tipos de processos foram formadas. O nascimento da microbiologia industrial ocorreu com os estudos de Pasteur por volta de 1857, onde o mesmo demonstrou que a fermentação alcoólica de cervejas e vinhos era resultado de atividade microbológica.

Com o passar dos anos, os processos fermentativos foram se desenvolvendo e inovações no desenvolvimento microbológico foram assimiladas. Um grande desenvolvimento foi notado nos anos 40, devido a esforços para produzir o antibiótico penicilina, que é sintetizado pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Seu consumo foi estimulado nesse período pela vital necessidade dessa droga durante a Segunda Guerra Mundial. Esse fato não apenas acelerou a produção desse fármaco, mas também contribuiu para o desenvolvimento de processos em larga escala e no desenvolvimento de meios fermentativos e melhoramento dos microrganismos, e assim, o conhecimento adquirido teve grande impacto no desenvolvimento de vários processos fermentativos industriais (BIOCHEMICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, 2006).

Os maiores avanços no desenvolvimento de processos fermentativos ocorreram nos últimos 20 anos com o desenvolvimento da engenharia genética e com a tecnologia do DNA recombinante. Esta técnica permite que os genes sejam transferidos de uma célula para outra, assim sequências de genes específicos, que carregam consigo alguma característica, são transferidas de uma célula doadora para outra receptora.

Hoje em dia, com o grau de desenvolvimento na área microbológica, alguns processos que outrora eram exclusivamente produzidos por rotas químicas têm sua produção por rota microbológica, os quais estão hoje economicamente mais viáveis. Essa viabilidade é devido a diversos fatos, dentre eles pode-se citar o rápido crescimento celular, o uso de rejeitos e produtos de baixíssimo custo como substrato, a diversidade de possíveis produtos produzidos e a possibilidade de manipulação genética como técnica de melhoramento.

2.2. Processos Fermentativos

Há basicamente quatro tipos de operação para processos fermentativos quando se fala de cultivo em meio líquido: Fermentação em batelada, batelada alimentada, semicontínua e contínua. O crescimento em batelada ocorre em sistema fechado, onde todos os componentes são alimentados no início e a fermentação vai até um certo ponto desejado. No sistema batelada alimentada, os componentes são adicionados no início e no decorrer da fermentação até um dado ponto da fermentação. Esse tipo de modelo normalmente é usado quando há inibição do microrganismo pelo substrato. Na fermentação semicontínua o substrato é alimentado a uma taxa diferente daquela com a qual o meio de cultura é retirado, fazendo assim com que haja uma variação volumétrica no reator. No sistema contínuo alimentação e saída tem as mesmas taxas mantendo o volume do meio constante (BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, VOL. 1, 2001).

2.3. Cinética do Crescimento Microbiano

Crescimento microbiano pode ser definido como o crescimento ordenado dos componentes celulares resultando em crescimento celular e eventualmente em divisão celular.

Há uma grande variedade de métodos de medição direta ou indireta do crescimento microbiano. Como exemplos desses métodos de medição podem-se citar: células secas, densidade óptica celular, contagem do número de total de indivíduos, contagem de microrganismos viáveis, turbidimetria, respiração celular, taxa metabólica, consumo de substrato, formação de produtos, dentre outros.

A cinética microbiana pode ser modelada fazendo uso de equações diferenciais, quando se considera um meio homogêneo, unicelular em culturas suspensas. O uso desse equacionamento torna-se ineficiente quando se modela o crescimento celular em meios heterogêneos como biofilmes, onde o comportamento é muito mais complexo (PRINCIPLES OF FERMENTATION TECHNOLOGY, 1995).

Na divisão celular binária são produzidas células idênticas a célula mãe em certo período de tempo, que é o chamado tempo de geração (t_g). A cada intervalo de tempo (t_g) ocorre a duplicação de todas as células e a isso chamamos de geração. Normalmente o que se observa

na realidade é um crescimento assíncrono, ou seja, nem todas as células daquele meio estão na mesma fase de crescimento e logo se subdividem em períodos diferentes, devido ao fato do crescimento microbiano não estar associado apenas à divisão celular. Entretanto sob certas condições o crescimento assíncrono pode ser aproximado pelo síncrono, onde se observa a divisão celular simultânea.

2.4. Fases do Crescimento Microbiano

Durante a fermentação em batelada, observa-se que a população microbiana passa por diversas fases de crescimento, as quais estão diretamente relacionadas com a concentração de substrato. Construindo-se um gráfico do crescimento microbiano ao longo do tempo, consegue-se distinguir melhor as fases do crescimento microbiano, que são: Fase Lag, Exponencial, Estacionária e Declínio ou Morte como esquematizadas na Figura 3.

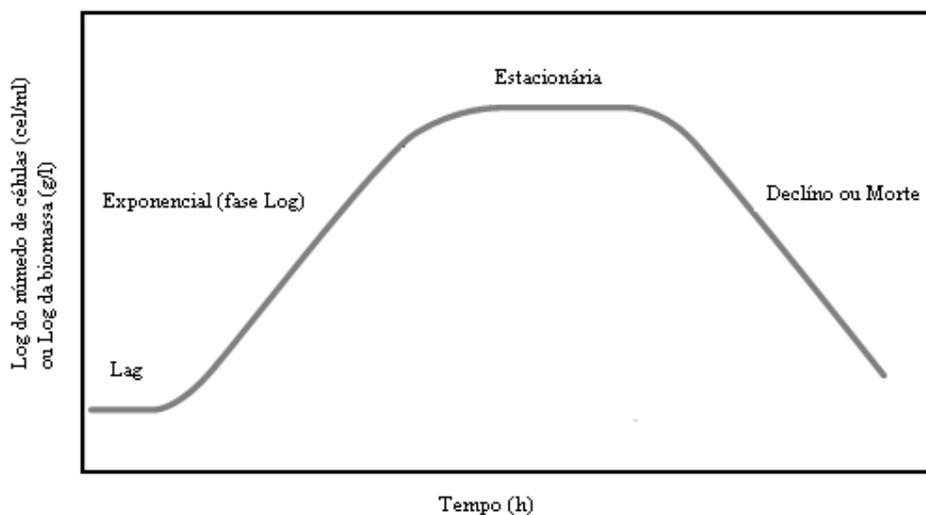


Figura 3 – Gráfico esquemático das fases do crescimento microbiano

Na fase Lag de crescimento, aparentemente nenhum crescimento é observado e o número total de células permanece relativamente constante, embora ocorra um aumento relativo à massa celular total. Esse fato ocorre devido à intensa atividade metabólica durante a adaptação do microrganismo ao meio de cultivo. Após a adaptação do microrganismo ao meio, é iniciada a fase Exponencial de crescimento ou fase Log. Na transição da fase Lag para a fase Log, há um período no qual as células iniciam a sua divisão. Essa taxa de divisão celular aumenta até chegar a uma taxa de crescimento máximo, $\mu_{\text{máx}}$, que será observada

durante toda a fase Log. Quando a velocidade específica de crescimento atinge o seu máximo é dado início a fase Log.

Uma forma geral de se modelar sistemas biológicos é levar em consideração que a variação da massa celular com o tempo é proporcional a sua própria massa, assim:

$$\frac{dX}{dt} \propto X \quad (1)$$

e

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2)$$

Em que X é biomassa e a constante de proporcionalidade μ representa a fração em que a população cresce em relação ao tempo e é conhecida como velocidade específica de crescimento.

Isolando se μ e integrando de X_0 a um valor de X qualquer e de um $t_0 = 0$ a um t qualquer, obtém-se a seguinte equação:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (3)$$

e

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (4)$$

A equação 04 também pode ser encontrada em logaritmo base 10, assim, a equação 4 fica na forma:

$$\log X = \log X_0 + \frac{\mu t}{2,3} \quad (5)$$

Dessa forma, obtém-se a equação de uma reta de t em função de $\log X$, com coeficiente angular de reta igual à $\mu/2,3$, o que é característica do crescimento exponencial.

Observando-se a equação 2, tem-se a idéia de que o crescimento microbiano aumenta indefinidamente, mas é sabido fisicamente que isso não ocorre. Normalmente ocorre uma depleção no crescimento microbiano, seja devido a uma limitação de substrato ou uma inibição por produtos formados ou ainda uma combinação dos dois. Monod, 1942, mostrou que a taxa de crescimento é aproximadamente uma função hiperbólica da concentração do reagente limitante e propôs uma equação muito próxima daquela usada por Michaelis-Menten para descrever a taxa de reação para catálise enzimática. Uma representação gráfica é mostrada na Figura 4 e pela equação 6 (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY: AN INTRODUCTION., 2001).

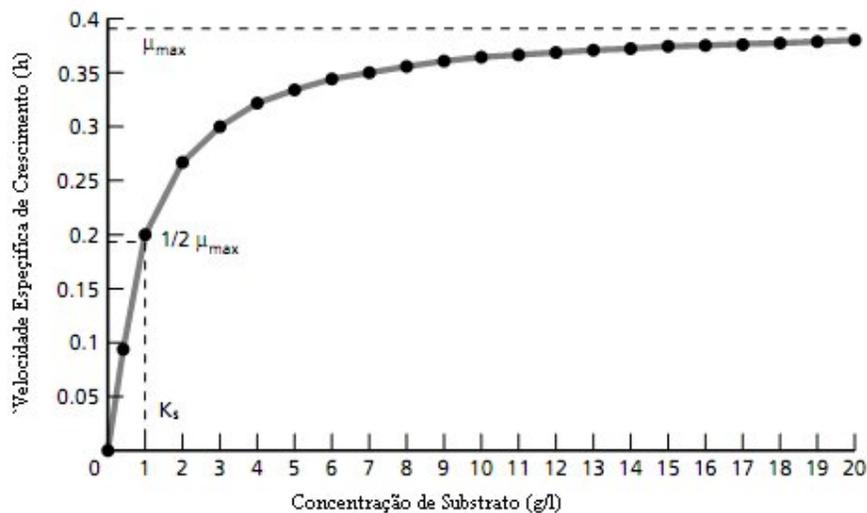


Figura 4 – Representação esquemática da equação de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{k_s + S}$$

(6)

Em que, $\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidade específica de crescimento máxima;

S = Concentração de substrato e

K_s = Constante de saturação, a qual é a concentração de substrato quando $\mu = 1/2\mu_{máx}$.

A constante de saturação K_s representa nada mais que um grau de afinidade do microrganismo com o substrato. Se imaginarmos uma situação na qual se tem uma concentração de substrato muito elevada, $S \gg K_s$ e então $\mu = \mu_{máx}$ e esse fato nos diz que o microrganismo irá crescer exponencialmente na sua taxa de crescimento máximo. Entretanto, com o consumo do substrato, o valor de k_s passa a ser representativo e a taxa de crescimento que anteriormente era igual a $\mu_{máx}$ agora tende a ser uma fração deste. Esta fase de desaceleração é o início da fase estacionária de crescimento. Quando k_s se torna muito grande em relação a S , a taxa de crescimento não consegue mais ser sustentada e o microrganismo entra na fase estacionária de crescimento. Nesta fase o número de novos indivíduos é igual ao número de mortos, assim o número global de indivíduos permanece constante. Quando o número de indivíduos mortos passa a ser maior que o de novos indivíduos, entramos na fase de declínio ou morte.

2.5. Fatores de Conversão

O rendimento de um processo fermentativo pode ser definido como a razão entre a biomassa e a massa de substrato, e pode ser matematicamente expresso da seguinte forma:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dX}{ds} \frac{ds}{dt} = -Y_{X/S} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

Em que,

$$-Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (8)$$

Onde, $Y_{X/S}$ representa o fator de conversão células/substrato.

O sinal negativo se deve ao fato de que substrato é consumido enquanto biomassa é formada. Analogamente, pode-se expressar biomassa em função do produto formado e produto em função do substrato, expressos respectivamente nas equações 9 e 10.

$$-Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (9)$$

$$-Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (10)$$

Onde, $Y_{X/P}$ representa o fator de conversão células/produto e $Y_{P/S}$ representa o fator de conversão produto/substrato.

2.6. Carotenóides

Os Carotenóides compõem uma classe de mais de 600 pigmentos naturais que são normalmente sintetizados por plantas, algas e bactérias fotossintéticas. São esses pigmentos os responsáveis por colorir certos vegetais, de tons que vão de vermelho até laranja (IARC, 1998). Carotenóides são micronutrientes de extrema importância, e são nos vegetais onde se pode encontrar a maior parte dos carotenóides que podem ser inseridas na dieta humana. De todos os carotenóides conhecidos até hoje, aproximadamente 50 destes tem atividade de provitaminas A (Olson, 1995 e Parker, 1996). Provitaminas A são compostos que tem a capacidade de se converter em retinol.

2.6.1. Betacaroteno

Dentre todos os carotenóides encontrados até hoje apenas 50 destes são provitaminas A. Dentre estes, o betacaroteno é sem dúvida o mais importante carotenóide, devido ao fato da vitamina A ser tão essencial para desenvolvimento do ser humano. A atividade do betacaroteno em alimentos é 1/12 da atividade do retinol ingerido como suplemento. O segundo melhor carotenóide, quando levando em consideração esse parâmetro, é o alfa-caroteno e sua atividade é de 1/24 da atividade do retinol (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2000).

Estudos mostram que o betacaroteno age de diferentes formas no organismo humano. Foi sugerido que a atividade antioxidante do betacaroteno é transformada pela eliminação de radicais de oxigênio e dessa forma, a sua ingestão seria eficaz na prevenção do câncer,

doenças cardiovasculares dentre outras doenças (Slaga, 1995 e Stahl, 2003). Dessa forma, o consumo de alimentos ricos em betacaroteno, ou até mesmo sob forma de suplemento, está associado com uma redução no risco câncer de pulmão e outros tipos de câncer (Halliwell, 2000)

2.6.2. Produção de Carotenóides

Além da suplementação humana, os carotenóides têm hoje em dia um vasto leque de aplicações que vão desde seu uso na indústria farmacológica, no uso de produtos para pele, na indústria química e de alimentos, como um corante natural além de servir para repor as quantidades de carotenóides perdidas durante as etapas de processamento dos alimentos na indústria (Giovannucci, 1999). Tradicionalmente, os carotenóides têm sido comercializados como pós secos ou extratos de plantas, como urucum, páprica e açafrão. Entretanto, a produção de corantes de origem vegetal enfrenta problemas devido a instabilidades climáticas e instabilidade no suprimento de matérias primas, o que leva a uma variação no poder de coloração e diminuição na qualidade do produto final.

Embora quase todo carotenóide usado hoje na indústria seja sintetizado por métodos químicos, há um interesse crescente por carotenóides de origem biológica devido ao fato dos consumidores sentirem-se mais seguros em consumir produtos com corantes naturais ao invés do uso de corantes artificiais. Essa preferência por corantes naturais fez com que se iniciasse a busca por fontes naturais desses compostos (Cerdá-Olmedo, 1989).

Desde a década de 60, processos de produção em larga escala de betacaroteno por fungos e algas foram desenvolvidos. Estes processos foram abandonados devido a sua falta de competitividade com as rotas sintéticas de produção. Hoje, com o uso de materiais de baixo custo e a otimização da produção, seja por melhoramento genético ou modificação de parâmetros de produção como concentração de substrato, pH, adição de minerais, grau de agitação dentre outros, betacaroteno de microalgas (*Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*) é produzido comercialmente na Austrália, Israel e Estados Unidos (Johnson *et al.*, 1979).

Outros microrganismos têm a capacidade de produzir carotenóides, como as leveduras “vermelhas” dos gêneros *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*. A composição de

carotenóides nesses microrganismos é bem similar e consiste de basicamente 4 compostos, são eles: betacaroteno, γ -caroteno, toruleno e torularodeno (Simpson *et al.*, 1971).

Iriani *et al.*(2006), isolaram e identificaram leveduras encontradas no Brasil, capazes de produzir carotenóides. Classificaram 5 linhagens de leveduras do gênero *Rhodotorula* capazes de produzir carotenóides. (Perrier *et al.*, 1995) realizaram trabalho similar isolando 13 linhagens do gênero *Rhodotorula* e a produção de carotenóides totais variou consideravelmente, de 10 $\mu\text{g/g}$ até 100 $\mu\text{g/g}$. Nos dois estudos, acima mencionados, betacaroteno sempre foi o carotenóide em maior percentagem, em torno de 70% dos carotenóides produzidos.

A produção de carotenóides é característica de leveduras do gênero *Rhodotorula* e estudos esclarecendo a biossíntese de carotenóides (Sympson *et al.*, 1964) e mais especificamente a biossíntese de carotenóides em leveduras do gênero *Rhodotorula glutinis* (Hayman *et al.*, 1974), fez com que o interesse nessa linhagem de leveduras aumentasse, pois seu uso industrial era restrito devido principalmente a falta de informação dos mecanismos de biossíntese.

Um grande número de estudos mostram o uso de leveduras para a produção de carotenóides, podendo-se citar Buzzini *et al.* (1999); Buzzini. (2000) e Bhosale *et al.* (2001). Uma grande variedade de meios foi testada e a produção de betacaroteno sempre se mostrou apreciável em vistas da versatilidade do microrganismo de adaptar-se aos meios de produção facilmente.

3. Materiais e Métodos

3.1. Microrganismo

Neste trabalho foi utilizada a levedura *Rhodotorula glutinis*, que foi mantida sob refrigeração em um meio sólido contendo agar, peptona e dextrose.

3.2. Repiques

Os repiques foram feitos com o preparo de um meio sólido contendo agar, peptona e dextrose. Separaram-se tubos contendo essa solução, que foram posteriormente esterilizados em autoclave. Após a esterilização, os tubos foram inclinados e esperou-se a solidificação do meio. Com a total solidificação foi possível levá-los para câmara de fluxo laminar e fazer o repique a partir de células com boa atividade. Os tubos foram mantidos em estufa até que fosse possível notar um crescimento apreciável.



Figura 5 - *Rhodotorula glutinis* em meio sólido

3.3. Concentração do meio de cultura

Para se medir a concentração do meio de cultura usou-se a curva de calibração do microrganismo conforme mostrado na Figura 6.

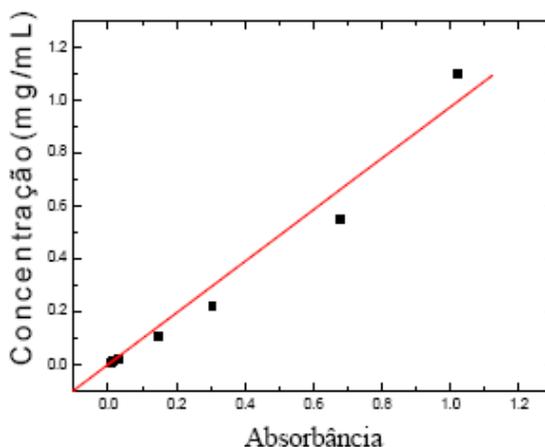


Figura 6 – curva de calibração do microrganismo

A absorbância foi medida após centrifugação de uma alíquota do meio, 3500 rpm por 10 minutos, em espectrofotômetro (Genesys série 20) com comprimento de onda de $\lambda = 600$ nm. O sobrenadante foi desprezado. Após a centrifugação a massa seca foi aferida e, em seguida, a biomassa foi diluída de 5 a 100 vezes. Foi feita a leitura em espectrofotômetro das amostras diluídas. Concentração e absorbância foram correlacionados na curva de calibração do microrganismo. Assim com o fator de diluição, a absorbância e o fator da curva foi possível medir a concentração de biomassa total na solução através da equação 11:

$$\text{Concentração} = \text{Absorbância} \times \text{Diluição} \times a^{-1} \quad (11)$$

Onde: a é o coeficiente angular da curva de calibração do microrganismo

3.4. Esterilização do meio

Duas formas de esterilização do substrato foram testadas nesse trabalho. Esterilização por ultrafiltração por membrana e esterilização por autoclave.

Primeiramente foi analisada a viabilidade da esterilização por ultrafiltração por membrana. O procedimento era realizado fazendo uso de uma câmara de fluxo laminar, que mantinha o isolamento e a esterilização em relação ao meio exterior. O aparato de filtração era formado por: funis, bomba de vácuo, membranas e etc.

Todo e qualquer aparato de filtração que entrasse em contato direto com o substrato, necessitava de esterilização anterior em autoclave, 121 °C por 15 minutos.

Inicialmente a câmara de fluxo laminar era esterilizada, e este processo passava por uma etapa de limpeza manual do interior da câmara com a aplicação de álcool 70 % e posterior exposição da câmara a luz UV por um período de 10 minutos. Com o término dessa etapa, a filtração do substrato era realizada com o auxílio de bomba de vácuo. Com o término da filtração uma alíquota de 100 ml de meio era transferida para erlenmeyer de 250 ml e esta estaria pronta para a etapa de inoculação.

O processo de esterilização por autoclave foi o outro analisado. Inicialmente preparava-se o meio de cultura, com o ajuste de pH ou adição de sais. 100 ml de meio eram transferidos para erlenmeyer de 250 ml e estes eram esterilizados em autoclave por um período de 15 minutos e temperatura de 121 °C para o meio do inóculo. Para o meio de suco de caju, um período de 10 minutos a uma temperatura de 110 °C eram utilizados. Após a retirada dos frascos da autoclave, os mesmos eram expostos a temperatura ambiente até que o equilíbrio térmico fosse estabelecido, só então a inoculação prosseguia. Esse procedimento foi adotado para evitar a morte das células no contato com o meio a temperatura elevada.

3.5. Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado em uma solução de peptona e dextrose. 100 ml dessa solução foram colocados em um erlenmeyer de 250 ml e esterilizados. As células foram transferidas na câmara de fluxo laminar, após devida esterilização da mesma, para o erlenmeyer, que posteriormente foi incubado em mesa agitadora por um período de 24 horas.

3.6. Cultivo do meio de suco de caju

100 ml do suco de caju foram colocados em um erlenmeyer de 250 ml, e esterilizados. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, fez-se a inoculação do microrganismo em uma concentração de 0,01 mg/ml. Foi medida a concentração do inóculo em espectrofotômetro e a partir daí ajustou-se o volume necessário para a inoculação no meio de suco de caju. Após a inoculação do meio de suco de caju o crescimento ocorreu em mesa agitadora, variando-se os valores de temperatura, pH inicial do meio, da velocidade de agitação e concentração de sulfato de amônia, de acordo com o planejamento experimental apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental para produção de betacaroteno a partir do cultivo submerso de <i>R. glutinis</i> em suco de caju.									
Ensaio	Agitação (rpm)	pH	Sulfato de Amônia (g/l)	Temp. (°C)	Ensaio	Agitação (rpm)	pH	Sulfato de Amônia (g/l)	Temp. (°C)
1	70	5	4	30	9	70	5	4	15
2	70	7	4	30	10	70	7	4	15
3	100	5	4	30	11	100	5	4	15
4	100	7	4	30	12	100	7	4	15
5	70	5	0	30	13	70	5	0	15
6	70	7	0	30	14	70	7	0	15
7	100	5	0	30	15	100	5	0	15
8	100	7	0	30	16	100	7	0	15

3.7. Adição de outras fontes nitrogenadas

A adição de fontes nitrogênio além de sulfato de amônia também foi avaliada. Os componentes utilizados nos testes foram peptona, peptona e nitrato de cálcio, peptona e nitrato de sódio, nitrato de cálcio e nitrato de sódio. A concentração utilizada para todos os reagentes foi de 4g/l. Este procedimento foi realizado com parâmetros de temperatura, pH e agitação constantes, afim de avaliar apenas a adição de diferentes fontes de nitrogênio.

Análises Pós-crescimento – Após o crescimento do microrganismo foram feitas medições de absorbância, que foi medida após centrifugação de uma alíquota de 10 ml do meio, 3500 rpm por 10 minutos. Na primeira centrifugação, separava-se a biomassa do sobrenadante. Com o sobrenadante foram feitas medições de pH final do meio e quantificação de açúcares, onde foi utilizada cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

Depois da separação de sobrenadante e biomassa, este último passava ainda por duas etapas de lavagem que ocorriam da seguinte forma: Completava-se o volume do tubo de ensaio até a marca de 10 ml com água destilada e este seguia para um período de agitação em vortex até que toda a biomassa se apresentasse diluída. Após este processo seguia-se mais uma etapa de centrifugação, 3500 rpm por 10 minutos. Terminada a centrifugação separavam-se mais uma vez a biomassa do sobrenadante e o procedimento era repetido. Ao final desta etapa a biomassa era diluída, normalmente uma diluição de 25 vezes, e só então

teria sua leitura feita no espectrofotômetro. Dessa forma mensurávamos a concentração de biomassa.

3.8. Extração do betacaroteno

Os carotenóides produzidos por *Rhodotorula glutinis*, são intracelulares e necessitam de uma etapa de extração para que possam ser medidos. A etapa de extração foi realizada em conjunto com colaboradores do grupo de pesquisa e não abordaremos o processo de extração a fundo, tendo em vista que apenas a produção de betacaroteno foi o escopo deste trabalho. Para os diferentes solventes estudados (acetona, etanol, acetona-etanol, hexano e acetona-hexano) adotou-se o procedimento a seguir: centrifugou-se 5 ml do fermentado puro por 10 minutos a 3000 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e se adicionou os solventes acima citados, na razão de 1:1 (v/v) biomassa/solvente. Colocou-se a amostra no sistema de ultrassom para rompimento celular e em intervalos de 15 minutos retirava-se uma amostra para análise em espectrofotômetro.

3.9. Análises em HPLC

Após o processo de extração dos carotenóides, estes foram mensurados como betacaroteno. Nesta etapa outra curva de calibração foi construída. O procedimento foi semelhante ao adotado para a construção da curva de calibração de biomassa com a diferença que aqui foi utilizado um padrão de betacaroteno que foi diluído em várias concentrações e teve sua leitura feita tanto em espectrofotômetro como em HPLC.

A fase móvel utilizada na curva de calibração e na quantificação das amostras foi composta de uma mistura de álcool isopropílico e metanol em uma razão de 1:1 (v/v), vazão de 1 mL/min, temperatura ambiente, utilizando uma coluna C18 Waters: Nova-Pak, 60Å, 4 µm de diâmetro, 3,9 × 150 mm. Para leitura do espectro de absorção dos carotenóides foi utilizado um espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda = 450$ nm.

Os carotenóides extraídos foram medidos como betacaroteno. Realizou-se um branco (2,9 mL do solvente com 0,1 mL de água destilada) e as amostras (2,9 mL do solvente com 0,1 mL do fermentado centrifugado) foram medidas em espectrofotômetro a 450 nm após

realização de curva de calibração. O solvente aqui utilizado foi o mesmo utilizado na fase móvel do HPLC.

3.10. Estudo cinético da produção de betacaroteno

Uma avaliação cinética da produção de betacaroteno foi realizada. O procedimento para inoculação foi o mesmo adotado para o cultivo do meio de suco de caju citado anteriormente. 10 (dez) erlenmeyer de 250 ml foram inoculados e incubados sob as mesmas condições e mesmo período de tempo em mesa agitadora. Os parâmetros utilizados no cultivo foram de temperatura, 30 °C, pH 7 e agitação de 100 rpm. A retirada dos pontos com o passar do tempo seguiu o seguinte procedimento: Os erlenmeyers foram numerados de 1 à 10. Dessa forma foi possível a coleta de 5 pontos em duplicata. Os pontos foram retirados de 8 em 8 horas. Quando os primeiros 5 pontos foram retirados, começando pelos erlenmeyers 1 e 2, 3 e 4 até 9 e 10, a coleta de pontos era repetida e se iniciava pelos erlenmeyers 1 e 2 até 9 e 10. Esse procedimento foi repetido até o final do tempo de cultivo. O volume retirado em cada ponto foi de apenas 1 ml. Este volume de meio era centrifugado, 3000 rpm por 10 min, e tinha o sobrenadante separado da biomassa. Com o sobrenadante foi realizada leitura de açúcares em HPLC e a biomassa passou por duas lavagens com água destilada e então teve sua concentração medida.

4. Resultados e Discussão

O cultivo submerso da levedura *Rhodotorula glutinis* usando suco de caju como meio de cultivo foi estudado como função da temperatura de cultivo, da variação do pH inicial do meio, da concentração inicial de sulfato de amônio e da velocidade de agitação. Os resultados foram mostrados utilizando como variável resposta a concentração de betacaroteno e concentração de biomassa obtida durante o cultivo.

4.1. Efeito do método de esterilização

Antes de se fazer qualquer teste de produção do Betacaroteno, foi necessário conhecer o método de esterilização a ser utilizado, assim foram testadas duas formas de esterilização, uma delas foi por autoclave e a outra ultrafiltração por membrana. Ocorreu uma pequena diferença na produção de betacaroteno, visto que na esterilização por membrana não ocorre a caramelização do suco. Esse processo é bastante visível na esterilização por autoclave, escurecimento do meio, devido às temperaturas elevadas. Para a escolha do melhor método de esterilização dois ensaios em duplicata foram realizados. A única variável analisada neste teste foi o pH inicial do meio que foi variado entre pH 5 e pH 7. As outras variáveis como temperatura e velocidade de agitação foram mantidas iguais nos dois experimentos e foram respectivamente de 30 °C e 150 rpm. O tempo de cultivo foi de 48 horas. Após o final do período de cultivo, alíquotas de 10 ml de meio foram centrifugadas. Biomassa e sobrenadante foram separados e seguiu-se o processo de lavagem e leitura de concentração de biomassa como mencionado anteriormente. Os dados obtidos encontram-se na Figura 7.

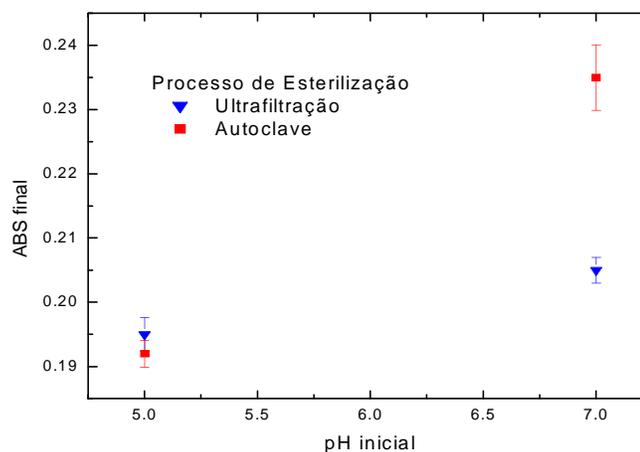


Figura 7 – Absorbância final x pH

Analisando a Figura 7, observa-se que os dados de absorvância final no método de ultrafiltração por membrana rendeu melhores resultados em pH 7. Em pH 5 praticamente os mesmos resultados foram colhidos. Por ser um método relativamente caro e tedioso e ter apenas uma pequena diferença de absorvância em pH 7 em relação a esterilização por autoclave, a esterilização por membrana foi abandonada mesmo tendo obtido melhores resultados.

4.2. Efeito do pH na produção de betacaroteno

O valor do pH no meio de crescimento influenciou não só a atividade de biossíntese da cultura, como também a velocidade decrescimento da biomassa. O pH inicial de cultivo afetou significativamente o crescimento e as propriedades da produção de carotenóides totais de *R. glutinis* como mostra a Tabela 2. (analisar ensaios 1 com 2, 3 com 4, 5 com 6 e 7 com 8).

Ensaio	Absorbância	Concentração (g/l)	Ensaio	Absorbância	Concentração (g/l)
1	0,370	9,20	9	0,070	1,75
2	0,390	9,70	10	0,077	1,92
3	0,345	8,59	11	0,062	1,54
4	0,393	9,78	12	0,071	1,77
5	0,291	7,24	13	0,099	2,45
6	0,340	8,47	14	0,116	2,89
7	0,320	7,97	15	0,111	2,76
8	0,380	9,47	16	0,157	3,39

Pode-se observar que sob todas as condições experimentais testadas, quando o pH inicial do meio passou de 5,0 para 7,0, a biomassa e a produção de betacaroteno aumentaram, indicando que um meio ácido de cultivo não favoreceu a produção de betacaroteno. Podemos ver os resultados na Tabela 2.

As Tabelas 3 e 4, mostram o pH final do meio de cultivo nas respectivas temperaturas analisadas, 30 °C e 15 °C. Analisando essas tabelas observou-se que a diminuição do pH final do meio esteve diretamente relacionada com a produção de betacaroteno. Observando as diferenças de pH entre os ensaios de 30 °C e 15 °C, vê-se que neste último, onde foi

observada uma produção de betacaroteno bem menor que no primeiro, a redução do pH do meio não foi tão brusca. Podemos citar os experimentos com parâmetros iguais e que diferiram apenas a temperatura, como por exemplo os ensaios 1 e 9, 2 e 10.

Ensaio	pH final	pH inicial	Concentração (g/l)	Ensaio	pH final	pH inicial	Concentração (g/l)
1	3.5	5	9,2	5	4.7	5	7,24
2	4.1	7	9,7	6	5.9	7	8,47
3	4.7	5	8,59	7	5.15	5	7,97
4	4.6	7	9,78	8	5.9	7	9,47

Ensaio	pH final	pH inicial	Concentração (g/l)	Ensaio	pH final	pH inicial	Concentração (g/l)
9	4.8	5	1,75	13	4.8	5	2,45
10	5.7	7	1,92	14	6.0	7	2,89
11	4.9	5	1,54	15	5.2	5	2,76
12	5.7	7	1,77	16	6.4	7	3,39

Estudos divergem em relação a um pH ótimo de meio para a levedura *R. glutinis* (Johnson *et al.*, 1992), (Martinez *et al.*, 2006), seja devido ao meio utilizado ou seja devido as condições da produção, mas todos os estudos tem mostrado que em pH extremos independente do meio de cultivo *R. glutinis* não apresentou desenvolvimento apreciável. Neste trabalho, observando-se as tabelas 3 e 4, vê-se que os resultados são coerentes com a literatura. Assim, pode-se afirmar que meios muito ácidos não favoreceram a produção de betacaroteno. O pH final nunca ultrapassou o valor de 7, mostrando que meios básicos/neutros não renderiam bons resultados.

4.3. Efeito da velocidade de agitação na produção de betacaroteno

R. glutinis é um microrganismo aeróbio e portanto, necessita de uma fonte de oxigênio. Dessa forma a velocidade de agitação do meio é extremamente importante para o sucesso do cultivo. A agitação neste caso tem a função de eliminar qualquer gradiente de temperatura e

concentração do meio e, além disso, uma agitação uniforme faz com que todas as células tenham acesso igual aos nutrientes e ao oxigênio dissolvido no substrato, fato este que é de extrema importância para o microrganismo em questão.

O efeito da velocidade de agitação no crescimento de biomassa e de betacaroteno pode ser observado na Tabela 2 (analisar ensaios 1 com 3, 2 com 4, 5 com 7 e 6 com 8). Pode-se observar que com exceção da comparação com os ensaios 1 com 3, a produção de biomassa e betacaroteno aumentou com o aumento da velocidade de agitação. A agitação tem um efeito benéfico no crescimento da biomassa e conseqüentemente, na produção do betacaroteno. Como uma agitação mais vigorosa faz com que se possa obter mais oxigênio no meio de cultivo, através do aumento do fluxo mássico de oxigênio e pela melhora do coeficiente de transferência de massa, logo se obteve uma melhora significativa na produção de biomassa e betacaroteno.

4.4. Efeito da Temperatura na produção de betacaroteno

Foram testadas duas temperaturas nos ensaios realizados, 15 e 30 °C, facilmente pode-se observar a melhor adaptação do microrganismo a temperaturas mais elevadas. Observando os resultados da Tabela 2, vemos que a produção de biomassa pode variar de 3 à 5 vezes mais apenas com a variação da temperatura.

4.5. Efeito da concentração de sulfato de amônio

A produção de betacaroteno a partir de *R. glutinis* usando suco de caju como meio para cultivo também foi estudada como uma função da concentração do sal sulfato de amônio. Sulfato de amônio foi simplesmente uma fonte de nitrogênio. Estudos anteriores do grupo mostraram a caracterização do suco de caju e se observou que este substrato apresenta um grau de carência de fonte de nitrogênio (Rocha *et al*, 2006), portanto, uma variável estudada foi a adição de sulfato de amônio ao meio de cultivo. A Tabela 2 mostra que a formação de betacaroteno e o crescimento do microrganismo não foram influenciados pela adição deste sal na concentração de 4 g/L (concentração citada na literatura para uso em suco de caju). Com esses resultados, pode-se observar que a determinação de um valor ótimo de pH e velocidade de agitação são parâmetros mais importantes para serem investigados na produção microbiológica de betacaroteno usando suco de caju como meio de cultivo.

4.6. Efeito da adição de outras fontes de nitrogênio

Outras fontes de nitrogênio também foram testadas e seguiu-se o mesmo procedimento adotado para a adição de sulfato de amônio. As variáveis escolhidas para os testes com outras fontes de nitrogênio, foram as variáveis ótimas do sistema para a produção do betacaroteno. Assim foram fixados parâmetros de temperatura, 30 °C, pH 7 e agitação de 100 rpm. Os componentes utilizados nos testes foram peptona, peptona e nitrato de cálcio, peptona e nitrato de sódio, nitrato de cálcio e nitrato de sódio. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nas condições de cultivo acima citadas.

Amostras	pH final	Absorbância	Concentração de Biomassa [g/l]
Peptona	6	0.084	2,09
Ca(NO ₃) ₂	5.95	0.103	2,56
NaNO ₃	5.89	0.072	1,80
Peptona + Ca(NO ₃) ₂	6.04	0.101	2,51
Peptona + NaNO ₃	6.05	0.110	2,74

O melhor resultado foi obtido quando peptona foi associada com nitrato de sódio, nas concentrações de 2g/l e 2g/l respectivamente. Analisando o experimento 4, que tem as mesmas condições de produção aqui usadas, observou-se que a utilização de outras fontes de nitrogênio não só não aumentaram a produção de betacaroteno mas também inibiram a sua formação. Se confrontarmos os dados finais de concentração do experimento 4, que produziu 9.78 g/l de biomassa com o melhor resultado obtido, vemos que a produção foi reduzida em mais de 1/3.

4.7. Separação do produto

A separação do betacaroteno de dentro da levedura foi realizada por extração com solvente usando ultrassom como técnica auxiliar. Testaram-se diferentes solventes para verificar com qual deles se obteria melhor rendimento de betacaroteno.

A despeito da natureza altamente lipolítica dos carotenóides, o betacaroteno é citosólico, ou seja, apresenta certo grau de hidrofília. Portanto, a seleção do sistema solvente que extrairia o betacaroteno produzido de cultivo submerso de *Rhodotorula glutinis* foi realizado em conjunto com colaboradores do grupo de pesquisa. O procedimento de extração do betacaroteno não será abordado neste trabalho.

O método de extração utilizado para romper a célula e deixar o betacaroteno em suspensão foi extremamente efetivo. As Figuras 8 e 9 mostram o quão eficiente foi o método de extração. A figura 8 mostra as células ainda viáveis de *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 ×.

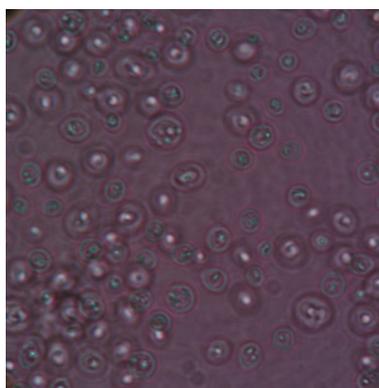


Figura 8 – *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 ×.

Após o primeiro processo de extração, as células já não mais se mostravam viáveis e assim evidenciou-se a eficiência do método de extração utilizado. A Figura 9 mostra as células rompidas de *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 x.



Figura 9 – *Rhodotorula glutinis* após cultivo submerso em suco de caju, aumento de 100 ×, em uma única etapa de extração.

Com o rompimento das células, betacaroteno é liberado no meio e o tinge com uma coloração de tons de rosa a laranja, que são cores características dos carotenóides. Ao final do processo de extração de uma amostra de betacaroteno conduzida em condições ótimas, temperatura, 30 °C, pH 7 e agitação de 100 rpm, a maior concentração de betacaroteno obtida foi de cerca de 33 µg/l, resultado este que é condizente com a literatura.

4.8. Avaliação cinética da produção de betacaroteno

Após a obtenção de todos os parâmetros ótimos de cultivo, foi realizado um ensaio cinético, tendo em vista colher dados cinéticos da produção de *Rhodotorula glutinis* em meio de suco de caju. O ensaio foi realizado nas condições ótimas de cultivo ao longo de um período de 144 horas. A Figura 10 mostra a variação da concentração de biomassa no período de tempo citado.

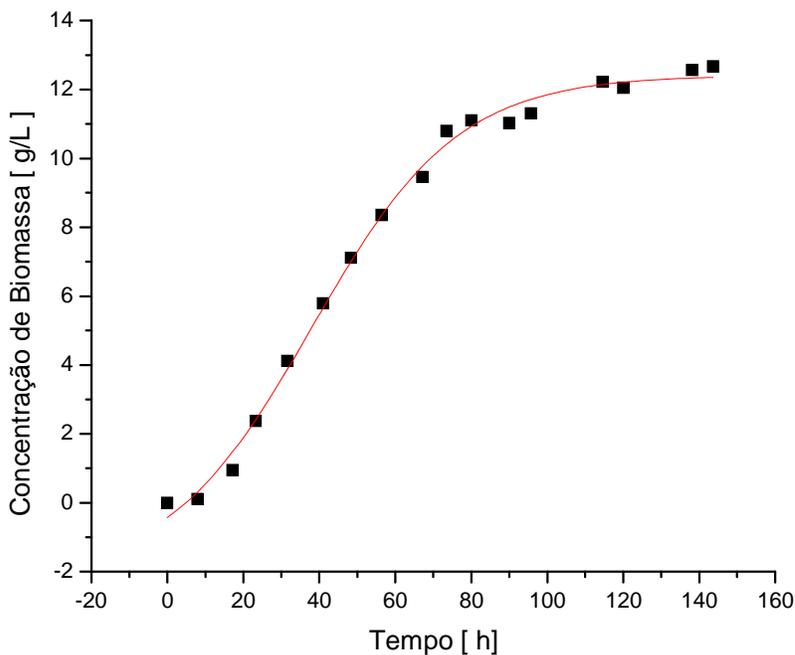


Figura 10 – Análise Cinética do Crescimento de *Rhodotorula glutinis* em meio de suco de caju

Uma linha de tendência foi adicionada a curva, e esta teve $R^2 = 0.99$. O parâmetro R^2 mostra a qualidade da regressão realizada. O software OriginPro versão 8.0, foi utilizado para realização da regressão.

Amostras de substrato também foram colhidas ao longo do tempo, e foram analisadas em HPLC. O substrato analisado teve suas concentrações de açúcares medidas ao longo do tempo. A Figuras 11 mostra o consumo de glicose contido no meio de suco de caju. O suco de caju também contém quantidades significativas de frutose, mas esta foi muito pouco consumida por *Rhodotorula glutinis* ao longo do tempo observado. A concentração de frutose caiu de 55.46 g/l para 54.2 g/l, uma variação de aproximadamente 2.2% ao longo de 144 horas de cultivo. A concentração de glicose caiu de 54 g/l para 39.2 g/l, uma variação considerável.

Por esse motivo apenas o consumo de glicose foi levado em consideração. A Figura 12 mostra o consumo de glicose ao longo do período de cultivo. Uma linha de tendência foi adicionada ao gráfico, mas infelizmente não representou os dados fielmente, visto que o valor de R^2 obtido foi de 0.925. Esse valor pode ser explicado por erros de medição de área e do seu correlacionamento com concentração. Esse processo, normalmente visual, pode levar a erros como os vistos aqui. Apesar dos erros encontrados, seguiu-se com o procedimento tendo em mente que os valores de concentração de glicose não mais são conservativos.

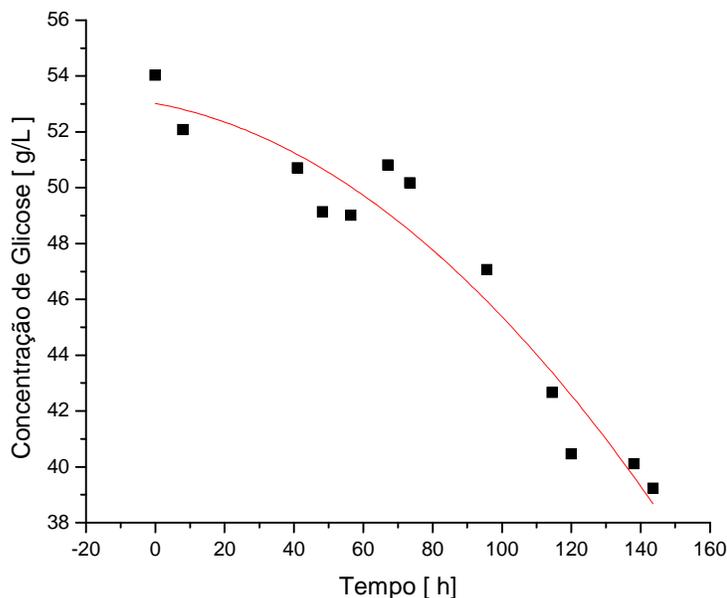


Figura 11 – Consumo de glicose ao longo do tempo.

A partir dos dados obtidos com o alisamento, foi possível a construção de gráficos para as velocidades específicas de crescimento, μ_x , e consumo de substrato, μ_s . O comportamento desses parâmetros ao longo do tempo é mostrado nas Figuras 12 e 13.

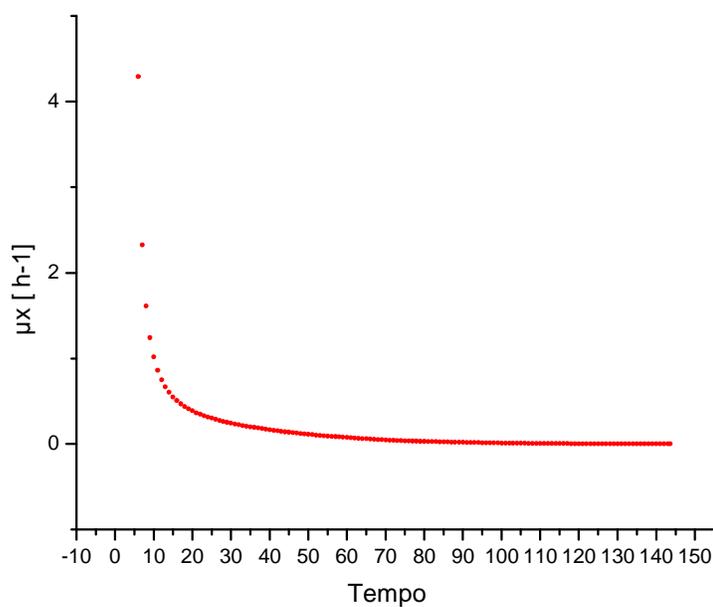


Figura 12 – Velocidade específica de crescimento, μ_x , ao longo do tempo

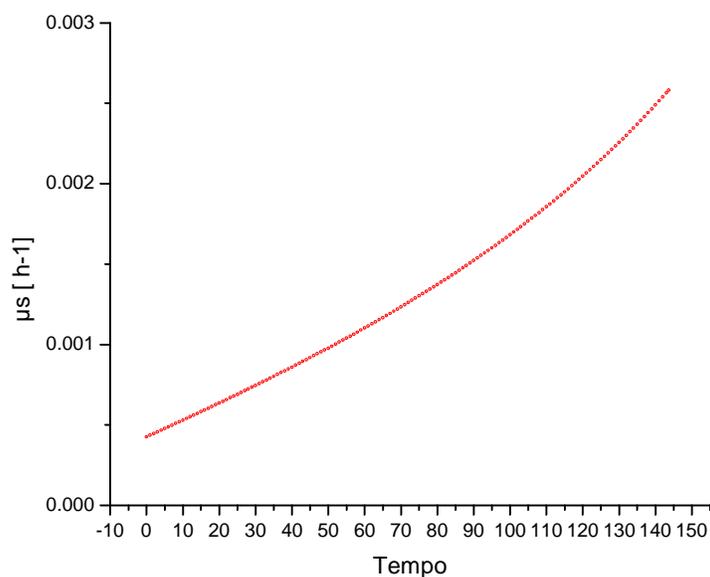


Figura 13 – Velocidade específica de consumo de substrato, μ_s , ao longo do tempo

As Figuras 12 e 13 mostram que o betacaroteno é um metabólito secundário. Este resultado é semelhante ao encontrado na literatura. No início da fermentação é encontrada a máxima velocidade específica de crescimento, dessa forma predomina a produção de energia com o aumento da concentração celular. Betacaroteno passa a ter sua produção aumentada quando a velocidade específica de crescimento se estabiliza e isso ocorreu por volta de 50 e 70 horas. Valores de produção máxima de betacaroteno por *Rhodotorula glutinis* foram encontrados na literatura (Shih and Hang, 1996); (Bhosale and Gadre, 2000) e são condizentes com os valores encontrados neste trabalho.

5. Conclusões

Betacaroteno foi produzido a partir do cultivo submerso de *R. glutinis* utilizando suco de caju como substrato. Estudaram-se variáveis de operação para obtenção de condições ótimas de produção. Estudaram-se temperatura, velocidade de agitação, pH inicial, adição de fontes de nitrogênio (sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de cálcio, peptona e combinações destes três últimos) ao meio de cultivo. Também foi realizado um estudo cinético da produção de betacaroteno. Quando o pH inicial do meio passou de 5,0 para 7,0 a biomassa e a produção de betacaroteno aumentou, indicando que um meio ácido de cultivo não favoreceu a produção de betacaroteno. A agitação teve um efeito positivo no crescimento da biomassa e conseqüentemente, na produção do betacaroteno, pois se obtiveram maiores produções em velocidades de agitação maiores. Finalmente, a formação de betacaroteno e o crescimento do microrganismo não foram influenciados pela adição de sulfato de amônia na concentração de 4 g/L. A adição das outras fontes nitrogenadas agiram como inibidores reduzindo a produção de biomassa para 33% da produção máxima nas mesmas condições. No estudo cinético realizado, percebeu-se que a frutose presente no suco de caju é consumida muito lentamente por *Rhodotorula glutinis*. A concentração de frutose foi reduzida em apenas 2,2% do seu valor inicial em um período de tempo de aproximadamente 144 horas. O outro açúcar presente no suco de caju, a glicose, teve sua concentração reduzida em torno de 28%, dessa forma a concentração que era de 54g/l caiu para 39.2 g/l. Betacaroteno foi reconhecido como metabolito secundário. Assim a produção máxima de betacaroteno por *Rhodotorula glutinis* foi alcançada por volta de 50 a 70 horas de cultivo. Os resultados obtidos mostraram que este substrato é viável, uma vez que pode ser uma boa fonte de nutrientes para a levedura *Rhodotorula glutinis*. Pelo seu baixo custo (resíduo da indústria do caju), o caju pode facilmente tornar-se um substrato para produção em escala industrial de carotenóides.

6. Referências Bibliográficas

- Aquarone, Eugênio; Borzani, Walter; Schmidell, Willibaldo; Lima, Urgel de A. (2001). *Biotechnologia Industrial*, Vol. 1. São Paulo: blucher.
- Bauernfiend, J. C. (1981) *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Nova Iorque: Academic Press, p. 835–836.
- Bhosale, P.; Gadre R. V. (2001) Beta-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, p. 327–32.
- Campos DCP, Santos AS, Wolkoff DB, Matta VM, Cabral LMC, Couri S (2002) Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination* 148:61–65 microfiltration. *Desalination* 148:61–65.
- Carvalho, C. M. R. G.; Farfan J. A.; Wilke, B. C.; Vencovsky, R. (1995). Prevalence of Hypovitaminosis A in Children of Peripheral Districts of Campinas São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (1): 85-96, Jan/Mar.
- Cerdá-Olmedo, E. (1989) Production of carotenoids with fungi, in *Biotechnology of Vitamin, Growth Factor and Pigment Production* (Vandamme, E. J., ed.), Elsevier Applied Science, London, pp. 27–42.
- Cullen, M. R.; Glass, A.; Keogh, J. P.; Meyskens, F. L.; Valanis, B.; Williams, J. H.; Barnhart, S.; Sammar, S. (1996). Effects of a combination of betacarotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *J. Med.* v. 334, p. 1150– 1155.
- Ghasem Najafpour. (2006). *BIOCHEMICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*. Amsterdam: Elsevier.
- Giovannucci, E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 17, 317–331.
- Halliwell, B. (2000) The Antioxidant Paradox, *Lancet* 355: 1179–1180.
- Hayman EP, H Yokoyama, CO Chichester and KL Simpson. (1974). Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J Bacteriol* 120: 1339–1343.
- Hennekens, C.H.; Buring, J.E.; Manson, J. E.; Stampfer, M.; Rosner, B.; Cook, N. R.; Belanger, C.; LaMotte, F.; Gaziano, J. M.; Ridker, P. M.; Willett, W.; Peto, R. (1996).
-

Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *J. Med.* v. 334, p. 1145–1149.

Hong, W.K.; Itri, M.I. (1994). *The retinoids, biology, chemistry and medicine*, 2.ed., p. 597-630, Editora Raven.

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Beta-carotene and other carotenoids*. (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington, D.C.: National Academy Press; 325-400.

Johnson, E.A.; Conklin, D.E.; Lewis, M.J. (1979). Astaxanthin formation by yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.*, 115,173-183.

Johnson, V., M. Singh, V.S. Saini, D.K. Adhikari, V.R. Sista and N.K. Yadav. (1992). Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP.30. *Biotech. Lett.* 14: 487-490.

Layrisse, M.; Garcia-Casal, M.N.; Solano, L. (1997). The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 08, n. 2, p. 61-67.

Martinez, Claudio et al. (2006). Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Electron. J. Biotechnol.* [online]. vol.9, n.4, pp. 0-0. ISSN 0717-3458.

Monod, J. (1942). Diauxie et respiration au cours de la croissance des cultures de *B. coli*. *Ann. Inst. Pasteur* 68, 548-450.

Olson, J.A., and Krinsky, N.I. (1995). The Colorful, Fascinating World of the Carotenoids: Important Physiologic Modulators, *FASEB J.* 9: 1547–1550.

Parker, R.S. (1996). Absorption, Metabolism, and Transport of Carotenoids, *FASEB J.* 10: 542–551.

Perrier, V.; Dubreucq, E.; Gayzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. *Arch. Microbiol.*, 164, 173-179.

Rocha, M. V. P.; Oliveira, A. H. S.; Souza, M. C. M.; Gonçalves, L. R. B. (2006). Natural cashew Apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World J MicrobBiot*, v. 22, p 295-1299.

Shih and Hang, 1996 C.T. Shih and Y.D. Hang. (1996). Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine, *Lebensm. Wiss. Technol.* 29, pp. 570–572

Simpson, K.L.; Chichester, C.O.; Phaff, H.J. (1971). Carotenoid pigments of yeast. In: Rose, A.H.; Harrison, J.S. (Ed.). *The Yeasts*, Vol. 2., Academic Press, New York, 493-515p.

Slaga, T.J. (1995). Inhibition of the Induction of Cancer by Antioxidants, *Adv. Exp. Med. Biol.* 369: 167–174.

Stahl, W., and Sies, H. (2003). Antioxidant Activity of Carotenoids, *Mol. Aspects Med.* 24: 345–351.

STANBURY, P F; Hall, S.; Whitaker, A. (1995). *Principles of Fermentation Technology*, Second Edition. Burlington: Elsevier.

Waites, Michael J.; Morgan, Neil L.; Rockey, John S.; Higton, Gary. (2001). *Industrial Microbiology: An Introduction*. London: Wiley-Blackwell.
