

MAURÍCIO PASSOS

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO HIDROLISADO  
FOSFÓRICO DE AMIDO DE MANDIOCA:  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA  
UTILIZANDO A LEVEDURA  
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2002

MAURÍCIO PASSOS

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO HIDROLISADO  
FOSFÓRICO DE AMIDO DE MANDIOCA:  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA  
UTILIZANDO A LEVEDURA  
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2002

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**MAURÍCIO PASSOS**

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO HIDROLISADO FOSFÓRICO DE AMIDO DE MANDIOCA: PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA UTILIZANDO A LEVEDURA *Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana  
Departamento de Bioquímica e Biologia Celular- UFPR

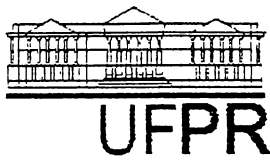
Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias  
Departamento de Engenharia Química - UFPR

Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Departamento de Química - UFPR

Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Departamento de Fitotecnia - UFSC

Prof. Dr. Oscar Edberto Molina  
Universidad Nacional de Tucuman - Argentina

Curitiba, 26 de abril de 2002



## RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO


Aos vinte seis dias do mês de abril de 2002 no Salão Nobre do Setor de Tecnologia - Centro Politécnico da UFPR, foi instalada pelo Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias, coordenador do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a oitava Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração Agroindústria. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do curso Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Oscar Edberto Molina (PROIMI-UNT-Argentina), Marcelo Maraschim (UFSC), Brás Heleno Oliveira (UFPR), Álvaro Luiz Mathias (UFPR), Jose Domingos Fontana (UFPR).

Às 09:00 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidato **Mauricio Passos** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **“VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO HIDROLISADO FOSFÓRICO DE MANDIOCA: Produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*”** Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de argüição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a argüição, a banca atribuiu os seguintes conceitos: Prof. Dr. Oscar Edberto Molina A; Prof. Dr. Marcelo Maraschim; A; Prof. Dr. Brás Heleno Oliveira, A; Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias, A; Prof. Dr. Jose Domingos Fontana A.

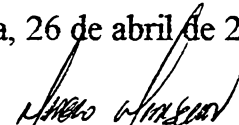
A média obtida resultou na ABROVACAÇÃO do candidato, com conceito final A (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Oscar Edberto Molina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Brás Heleno Oliveira

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jose Domingos Fontana

Curitiba, 26 de abril de 2002

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Maraschim

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Álvaro Luiz Mathias

Aos meus pais, Griseldis e Arthur, a  
minha esposa Jaqueline e ao meu filho  
Gabriel com amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Domingos Fontana, pela oportunidade, amizade, apoio, e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Luiz Pereira Ramos pela orientação e inestimável colaboração prestada.

Ao Dr. Oscar Molina do PROIMI – Universidad Nacional de Tucuman, Argentina, pela doação das cepas de *Lactobacillus* e *Pediococcus*.

A Mitzi Paschoalino Thomé, pela valiosa contribuição, carinho e apoio no decorrer deste trabalho.

Às Professoras Tânia Bonfim e Miriam Blumel Chociai por terem cedido as instalações e infra-estrutura de seu laboratório e colaborado com a realização do trabalho.

Aos colegas de turma pelas experiências compartilhadas, em especial ao Márcio Chimelli, José Trindade e Alessandro Nogueira pela grande amizade.

Aos colegas Sabrina Mendes, Daniel Breyer, Juliana Adelman e Marcos Pessatti, do LQBB – Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa, pela ajuda e amizade demonstrada.

Às funcionárias das bibliotecas do Setor da Tecnologia e das Biológicas, em especial a Izabela, Telma e Mariza pela colaboração.

Aos colegas do departamento de Bioquímica, que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pelo apoio, e aos seus professores, pelos ensinamentos ministrados.

Ao Professor Sandro Germano e a Fátima pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Professor David Mitchel pela colaboração.

Em especial, a toda minha família, pela constante colaboração e incentivo nos momentos de dificuldade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1. O AMIDO</b> .....	3
2.1.1 Estrutura química do amido .....	3
2.1.2 Hidrólise do amido .....	5
2.1.2.1 Histórico da hidrólise do amido .....	8
2.1.2.2 Hidrólise ácida .....	9
2.1.2.2.1 Efeito do ácido no grão de amido .....	9
2.1.2.2.2 Reações de reversão paralelas da hidrólise ácida .....	11
2.1.2.2.3 Formação do 5-Hidroximetilfurfural (HMF) e outras reações destrutivas .....	12
2.1.2.2.4 Considerações determinantes sobre o processo de hidrólise ácida.....	13
2.1.2.2.5 Emprego do ácido clorídrico e ácido sulfúrico .....	14
2.1.2.2.6 Emprego do ácido fosfórico como catalisador alternativo .....	15
2.1.2.2.7 O Processo industrial da hidrólise ácida .....	16
2.1.2.2.8 Xaropes obtidos da hidrólise ácida .....	17
2.1.2.3 Hidrólise enzimática .....	17
<b>2.2 A MANDIOCA</b> .....	19
2.2.1 Considerações gerais .....	19
2.2.2 Alternativa para produção de amido no Brasil: o uso industrial da mandioca.....	19
2.2.3 Produção da mandioca .....	21
2.2.4 Manipueira .....	21
2.2.5 Utilização biotecnológica da mandioca .....	23

2.3	ASTAXANTINA .....	26
2.3.1	Ocorrência .....	26
2.3.2.	Propriedades químicas .....	26
2.3.3.	Emprego da astaxantina .....	27
2.4.	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ( <i>Phaffia rhodozyma</i> ) .....	29
2.4.1.	Características gerais .....	29
2.4.2	Biossíntese da astaxantina .....	30
2.4.3.	Cultivo .....	32
2.4.4	Aplicações de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	35
2.5	ÁCIDO LÁTICO .....	37
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
3.1.	MATERIAIS.....	40
3.2	MÉTODOS .....	40
3.2.1	Métodos analíticos .....	40
3.2.1.1	Métodos colorimétricos .....	40
3.2.1.1.1	Carboidratos totais (CT) .....	40
3.2.1.1.2	Carboidratos redutores (CR) .....	41
3.2.1.1.3	Proteínas totais .....	41
3.2.1.1.4	Hidroximetilfurfural (HMF).....	41
3.2.1.2	Métodos cromatográficos .....	41
3.2.1.2.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	41
3.2.1.2.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	42
3.2.1.3	Método densitométrico .....	43
3.2.1.4	Métodos eletroforético .....	43
3.3	HIDRÓLISE .....	43
3.3.1	Cálculo da dextrose equivalente – DE .....	44
3.3.2	Comparação entre hidrólise clorídrica, sulfúrica e fosfórica do amido de milho e do amido de mandioca.....	44
3.3.3	Efeito do pH e do tempo na hidrólise fosfórica do amido de mandioca .....	45
3.3.4	Efeito do pH na hidrólise de mandioca, nas condições de temperaturas	

de 176°C(8atm) por 15 minutos e 160°C (5atm) por 20 minutos.....	46
3.3.5 Efeito da concentração de ácido (pH) e temperatura nas hidrólises fosfórica e clorídrica de amido de mandioca .....	47
3.3.6 Hidrólise do amido de mandioca para fins de cultivo e produção de astaxantina pela levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	48
3.4 MICRORGANISMO .....	48
3.5 MEIOS DE CULTURA .....	48
3.5.1 Meio para manutenção de cepas .....	48
3.5.2 Meios do cultivo para inóculo .....	49
3.6 PREPARO DO INÓCULO .....	50
3.7 CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM HIDROLISADOS FOSFÓRICOS DE AMIDO DE MANDIOCA (HFAM) .....	50
3.7.1 Influência do álcali utilizado na neutralização do HFAM na produção de astaxantina em cultivos de <i>X.dendrorhous</i> .....	51
3.7.2 Efeito do hidrolisado no cultivo e na produção de astaxantina pela levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	51
3.7.3 Efeito da suplementação dos hidrolisados fosfóricos de amido de mandioca com diferentes fontes de nitrogênio .....	52
3.7.4 Otimização do meio de cultura para produção celular e astaxantinogênese pela levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	55
3.7.5 Efeito do pH no crescimento e produção de astaxantina de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	56
3.7.6 Efeito do HMF no crescimento e produção de astaxantina de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	57
3.7.7 Variação do crescimento e astaxantinogênese em <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> em função do tempo de cultivo.....	57
3.7.8 Comparação do crescimento e astaxantinogênese nos cultivos de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> realizados com hidrolisados de mandioca em frascos de 125ml e 250ml (influência da taxa de oxigenação).....	58

3.7.9	Comparação entre diferentes HFAM no crescimento e astaxantinogênese em <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	58
3.8	SEPARAÇÃO E SECAGEM DAS CÉLULAS .....	59
3.9	EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA .....	59
3.10	OBTENÇÃO DE MANIPUEIRA .....	60
3.11	UTILIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS DE AMIDO DE MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO PELAS BACTÉRIAS <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
4.1	HIDRÓLISE DO AMIDO .....	62
4.1.1	Comparativo entre a hidrólise do amido de mandioca e o de milho utilizando HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> como agentes catalíticos.....	63
4.1.1.1	Análise do HMF nos hidrolisados clorídrico, sulfúrico ou fosfórico de milho e mandioca.....	66
4.1.2	Hidrólise fosfórica do amido de mandioca .....	70
4.1.2.1	Efeito do pH e do tempo de residência na hidrólise fosfórica do amido de mandioca a 152 °C (4 atm) .....	70
4.1.2.2	Comparação entre as HFAM realizadas a 176°C (8 atm) por 15 min e a 160°C (5atm) por 20min.....	73
4.1.2.2.1	Efeito do pH na formação de produtos de degradação na hidrólise de amido de mandioca realizados a 160 e 176°C.....	79
4.1.2.3	Efeito das condições de pH e temperatura nas hidrólises (clorídrica ou fosfórica) do amido de mandioca .....	80
4.1.2.3.1	Efeito do pH e da temperatura (140, 150 ou 160°C) na degradação de açúcares durante a hidrólise fosfórica de amido de mandioca.....	86
4.2	Utilização do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca (HFAM) para cultivo de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	90
4.2.1	Efeito do HFAM no crescimento e astaxantinogênese de <i>X. dendrorhous</i> suplementado com extrato de levedura.....	91

4.2.2	Efeito do álcali utilizado na neutralização do HFAM no crescimento e astaxantinogênese da <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	95
4.2.3	Efeito da fonte de nitrogênio no crescimento e astaxantinogênese de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> cultivada em HFAM.....	97
4.2.4	Otimização das fontes de nitrogênio (manipueira e nitrato de amônia) e taxa de inoculação no crescimento e produção de astaxantina para o cultivo de <i>Xanthophyllomyces</i> em HFAM.....	111
4.2.5	Otimização da relação manipueira / HFAM (C:N) para produção de biomassa e astaxantinogênese em cultivo de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	116
4.2.6	Efeito do pH no crescimento e astaxantinogênese de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> suplementado com extrato de levedura (EL) ou manipueira..	117
4.2.7	Efeito do HMF no crescimento e astaxantinogênese de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> cultivado em HFAM .....	121
4.2.8	Variação do crescimento e produção de astaxantina de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> em função do tempo de cultivo.....	124
4.2.9	Efeito das condições de oxigenação na produção de biomassa e astaxantina em <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	131
4.2.10	Comparação da produtividade dos cultivos com diferentes HFAM suplementados com manipueira e NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	134
4.3	Utilização do HFAM para produção de ácido láctico (AL) pelas bactérias <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	137
5.	CONCLUSÃO .....	140
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	142

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO AMIDO - AMIOLOSE (LINEAR) E AMILOPECTINA (RAMIFICADA) .....	05
FIGURA 02 - HIDRÓLISE DA CADEIA DE AMIDO .....	06
FIGURA 03 - REAÇÕES DO AMIDO NA PRESENÇA DE ÁCIDO .....	11
FIGURA 04 - FORMAÇÃO DO 5-HIDROXIMETILFURFURAL (B), ÁCIDO LEVULÍNICO (C) E DO ÁCIDO FÓRMICO (D) A PARTIR DA DESIDRATAÇÃO DA GLUCOSE (A) .....	12
FIGURA 05 - ESTRUTURA DA ASTAXANTINA .....	27
FIGURA 06 - AVALIAÇÃO DE MERCADO EM INTERVALOS QUADRIENAIS PARA A PRODUÇÃO MUNDIAL POR ANO DE ASTAXANTINA MAIS CANTAXANTINA...	29
FIGURA 07 - BIOSSÍNTESE DA ASTAXANTINA .....	31
FIGURA 08 - REATOR UTILIZADO NAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE .....	44
FIGURA 09 - MICROGRAFIA ÓTICA E ELETRÔNICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO DE MANDIOCA .....	62
FIGURA 10 - CCD DOS HIDROLISADOS (pH 1,75, 152°C E 10min) CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DOS AMIDOS DE MILHO E MANDIOCA.....	64
FIGURA 11 - DENSITOGRAMAS DOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE AMIDO DE MILHO E DE MANDIOCA .....	65
FIGURA 12 - CCD COMPARATIVA ENTRE AS EXTRAÇÕES COM ACETATO DE ETILA DOS HIDROLISADOS (pH 1,75, 152°C E 10 min) CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DOS AMIDOS DE MILHO E MANDIOCA .....	68
FIGURA 13 - DENSITOMETRIA DA EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROLISADOS (pH 1,75, 152°C E 10min) CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DO AMIDO DE MILHO E MANDIOCA .....	69
FIGURA 14 - ESPECTROFOTOMETRIA DA EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROLISADOS (pH 1,75, 152°C E 10min) CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE MILHO E MANDIOCA .....	69

FIGURA 15 - PERFIS DENSITOMÉTRICOS DOS HFAM OBTIDOS A 152°C EFEITO DO pH E DO TEMPO DE HIDRÓLISE. GRÁFICOS: A) 5min. B) 10 min e C) 15min.....	72
FIGURA 16 - FOTOGRAFIA DOS HFAM OBTIDOS NAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE A 176°C / 15 min OU A 160°C / 20 min .....	74
FIGURA 17 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS HIDRÓLISES FOSFÓRICAS DO AMIDO DE MANDIOCA NAS CONDIÇÕES DE 176°C/8ATM -15 min E 160°C/5 ATM – 20 min. ....	75
FIGURA 18 - DENSITOGRAMA DO PERFIL DE AÇÚCARES DOS HFAM NA CONDIÇÃO DE 176°C E 15 min. ....	76
FIGURA 19 - DENSITOGRAMA DO PERFIL DE AÇÚCARES DOS HFAM NA CONDIÇÃO DE 160°C E 20 min. ....	76
FIGURA 20 - EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA DE DOS HFAM .....	78
FIGURA 21 - DENSITOMETRIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HFAM (pH 2,0, 2,25, 2,5, 2,75 E 3,0). GRÁFICO A) 176°C e B) 160°C.....	80
FIGURA 22 - EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NOS HFAM ANALISADO POR CLAE.....	83
FIGURA 23 - EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICOS DO AMIDO DE MANDIOCA ANALISADO POR CLAE .....	84
FIGURA 24 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA DE NOS HFAM EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH DE HIDRÓLISE .....	85
FIGURA 25 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA “DE” NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICOS DE MANDIOCA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH DE HIDRÓLISE .....	85
FIGURA 26 - CONCENTRAÇÃO DE HMF E DO ÁCIDO FÓRMICO PRODUTOS DA HIDRÓLISE CLORÍDRICA E FOSFÓRICA .....	87
FIGURA 27 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE VARREDURA DO COMPRIMENTO DE ONDA DOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS E CLORÍDRICOS. (160°C, pH =1,4 – 1,6 – 1,8 E 5 min) .....	89
FIGURA 28 - CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO HFAM COMO FONTE DE CARBONO, 96 h DE CULTIVO. ....	91

FIGURA 29 - CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>Xanthophyllomyces</i> CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO HFAM PRODUZIDOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA .....	94
FIGURA 30 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES EM CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces</i> EM DIFERENTES HFAM OBTIDO A 160°C ....	94
FIGURA 31 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES EM CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces</i> EM DIFERENTES HFAM OBTIDO A 176°C ....	95
FIGURA 32- EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (COMPLEMENTO + EL) NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CULTIVADO EM HFAM (HIDRÓLISE pH 2,0, 152°C/4atm) .....	99
FIGURA 33 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CONSUMO DE AÇUCAR REDUTOR (AR) E CRESCIMENTO DE BIOMASSA DA <i>Xanthophyllomyces</i> CULTIVADA EM HFAM (HIDRÓLISE pH2,0 , 152°C/4 atm e 10min.) .....	100
FIGURA 34 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (COMPLEMENTO + EXTRATO DE LEVEDURA) NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>X. dendrorhous</i> CULTIVADO EM HFAM (HIDRÓLISE pH2,75, 160°C/5atm, 20min), (CULTIVO A) .....	105
FIGURA 35 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (COMPLEMENTO +EL) NO CRESCIMENTO E CONSUMO DE AR DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CULTIVADO EM HFAM (pH 2,75 , 160°C/ 5atm e 20 min).....	106
FIGURA 36- EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (pH 2,75, 160°C/5atm ) (CULTIVO B) .....	110
FIGURA 37 - EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES OTIMIZADAS DE NITROGÊNIO E TAXA DE INOCULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CULTIVADOS EM HFAM .....	113
FIGURA 38 - GRÁFICO DE CONTORNO PARA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA E BIOMASSA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CULTIVADOS EM HFAM EM FUNÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO .....	114

FIGURA 39 - CCD DA EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES DE 3 CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> OBTIDOS COM HFAM E SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	115
FIGURA 40 - GRÁFICO DE CONTORNO PARA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA E BIOMASSA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO MANIPUEIRA E HFAM .....	118
FIGURA 41 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>Xanthophyllomyces</i> CULTIVADA EM HFAM SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA OU MANIPUEIRA .....	120
FIGURA 42 - EVOLUÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces</i> SUPLEMENTADO COM MANIPUEIRA e NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (M) OU EXTRATO DE LEVEDURA (EL) .....	120
FIGURA 43 - EFEITO DO HMF NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CULTIVADO EM HFAM .....	122
FIGURA 44 - EFEITO DO HMF NO CONSUMO DE AR E PRODUÇÃO DE BIOMASSA NOS CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces</i> .....	123
FIGURA 45 - VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO HFAM SUPLEMENTADO COM MANIPUEIRA 0,25g% E NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0,05g% .....	125
FIGURA 46 - CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS E AÇÚCARES REDUTORES DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO HFAM .....	125
FIGURA 47 - CCD DO PERFIL DO CONSUMO DE AÇÚCARES EM FUNÇÃO DO TEMPO DO CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM HFAM .....	127
FIGURA 48 - DENSITOMETRIA DO PERFIL DE CONSUMO DOS AÇÚCARES EM FUNÇÃO DO TEMPO DO CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM HFAM .....	128
FIGURA 49 - PERFIL DO CONSUMO DE CADA AÇÚCAR DO HFAM EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DE <i>Xanthophyllomyces</i> .....	129

FIGURA 50 - COMPARAÇÃO DO TEMPO DE 120 E 168 h NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA EM CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces</i> EM MEIOS CONTENDO HFAM .....	131
FIGURA 51 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> EM HFAM EM FUNÇÃO DAS TAXAS DE AERAÇÃO 5:1 E 10:1.....	133
FIGURA 52 - CULTIVOS AGITADOS DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	133
FIGURA 53 - CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS, PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA EM CULTIVOS DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> OBTIDOS EM DIFERENTES HFAM SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	136
FIGURA 54 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO PELAS BACTÉRIAS <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus pentosaceus</i> EM HFAM .....	138
FIGURA 55 - CLAE DOS CULTIVOS DE <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pediococcus pentosaceus</i> EM HFAM PARA PRODUÇÃO DE AL.....	139

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - CONTEÚDO DE AMIDO E PERCENTUAL DE AMIOSE EM VÁRIOS VEGETAIS .....	04
TABELA 02 - COMPOSIÇÃO DE SACARÍDEOS (%) EM XAROPES OBTIDOS POR HIDRÓLISE ÁCIDA COM HCL DE AMIDO DE MILHO .....	19
TABELA 03 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA MANIPUEIRA .....	22
TABELA 04 - CONCENTRAÇÃO DE HMF (mg/ml) NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE MILHO E MANDIOCA, ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA (pH 1,75, 152°C e 10 min.) .....	70
TABELA 05 - EFEITO DO pH E DO TEMPO NO PERFIL DOS AÇÚCARES DOS HFAM (g%) (TEMPERATURA CONSTANTE DE 152°C/ 4atm) .....	71
TABELA 06 - COMPARAÇÃO DO PERFIL DOS AÇÚCARES (g%) DOS HFAM, DAS HIDRÓLISES 176°C 15min E 160°C 20min. ....	77
TABELA 07 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS CARBOIDRATOS NOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS E CLORÍDRICOS ANALISADOS POR CLAE (VARIAÇÃO DE pH E TEMPERATURA) .....	82
TABELA 08 - INFLUÊNCIA DO ÁLCALI NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA DE <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	96
TABELA 09 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA EFEITO DE ÍONS NA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA .....	96
TABELA 10 - MATRIZ DA OTIMIZAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO E TAXA DE INOCULAÇÃO NO CULTIVO DA <i>X. dendrorhous</i> EM HFAM .....	113
TABELA 11 - MATRIZ DA OTIMIZAÇÃO DA RELAÇÃO MANIPUEIRA E HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE <i>Xanthophyllomyces</i> .....	117
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS DOS HFAM UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO .....	135
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS CULTIVOS COM DIFERENTES HFAM SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	136

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	- absortividade específica
$A_{283\text{nm}}$	- absorbância lida no comprimento de onda de 283 nanômetros
AL	- ácido láctico
AMG	- amiloglucosidase
AR	- açúcar redutor
AT	- açúcar total
CCD	- cromatografia em camada delgada
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
d.C.	- depois de Cristo
DE	- equivalente em dextrose
DMSO	- dimetilsulfóxido
DO	- densidade ótica
EAE (-)	- hidrolisado submetido ao pré-tratamento com acetato de etila
EAE (+)	- hidrolisado onde foi incorporado o material extraído no pré-tratamento com acetato de etila do hidrolisado EAE (-)
EL	- extrato de levedura
FAO	- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
g%	- gramas por cento
G2	- maltose
G3	- maltotriose
G4	- maltotetraose
G5	- maltopentaose
G6	- maltohexaose
GP	- grau de polimerização
HFAM	- hidrolisado fosfórico de amido de mandioca
HMF	- hidroximetilfurfural
$\lambda$	- comprimento de onda
<i>Lp</i>	- <i>Lactobacillus plantarum</i>
lag	- fase do crescimento onde não há aumento no número de células
log	- fase logarítmica; fase onde ocorre a maior velocidade de crescimento
mM	- milimolar
M	- molaridade

MU - matéria úmida  
N - normalidade  
pK - ponto de tamponamento  
p - peso  
*Pp* - *Pediococcus pentosaceus*  
TCA - ciclo do ácido tricarboxílico  
TSB - caldo de soja tratado com tripsina produzida pela Hoffmann-La Roche  
valor-p - nível de significância

## RESUMO

Tradicionalmente as hidrólises ácidas de materiais amiláceos são realizadas utilizando o ácido clorídrico. O ácido fosfórico foi empregado com sucesso, alternativamente, como agente catalítico nos procedimentos de hidrólise do amido de mandioca, com a vantagem de diminuir a formação de produtos de degradação ou desidratação da glucose, como o HMF (hidroximetilfurfural). Além do mais, a neutralização do hidrolisado fosfórico com hidróxido de amônia, gerou vantajosamente o fosfato de amônio, um co-nutriente amplamente utilizado nos processos biotecnológicos. Parâmetros cinéticos, como temperatura / pressão (entre 152 a 176°C / 4 a 8 atm), concentração do ácido (entre pH 1,4 a 3,0) e tempo de hidrólise (entre 5 a 20 minutos), foram aplicados para a depolimerização de pasta concentrada de amido (40% de sólidos totais como fécula) em maltooligossacarídeos e/ou xarope de glucose. Os xaropes obtidos da hidrólise fosfórica do amido foram empregados como fonte de carbono em processos fermentativos, na produção da levedura carotenogênica *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes, *Phaffia rhodozyma*) produtora do pigmento intracelular astaxantina. Cultivos realizados com hidrolisados apresentando DE (equivalente em dextrose) em torno de 50, revelaram a habilidade bioquímica da *Xanthophyllomyces dendrorhous* em metabolizar além da glucose e/ou maltose, maltooligossacarídeos, com grau de polimerização maior do que 3 unidades de glucose, com alto rendimento de produção de astaxantina. Várias fontes de nitrogênio alternativas tais como alguns aminoácidos, farinha de soja, caseína hidrolisada, uréia, nitrato de potássio, manipueira e nitrato de amônio foram utilizadas na suplementação dos meios de cultivos. A manipueira, subproduto poluente e definida como a água residual do processo de extração do amido de mandioca (feculagem), foi adicionada ao hidrolisado fosfórico de mandioca, e proporcionou incremento na produção de biomassa (948mg%). A adição de nitrato de amônia ao meio de fermentação contendo manipueira resultou em aumento da astaxantinogênese em *Xanthophyllomyces dendrorhous* (477µg/g de células secas) obtido com o hidrolisado fosfórico pH 1,75, 152 °C/4atm e 15min. Condições mais severas de hidrólise, como temperatura de 176°C (8 atm), levaram a formação de produtos de degradação causadores de inibição do crescimento da *X. dendrorhous*. Experimentos preliminares de produção de ácido láctico pelas bactérias *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* também foram testados como modelo biotecnológico, para os hidrolisados fosfóricos de amido de mandioca, onde foram produzidos aproximadamente 21g/l de ácido láctico.

Palavras-chave: amido, hidrolisado fosfórico de mandioca, astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous*

## ABSTRACT

Even though starch materials are usually hydrolysed using hydrochloric acid as the catalytic agent, phosphoric acid has also been used as a suitable catalyst for the hydrolysis of cassava starch. As such, phosphoric acid has the advantage of reducing the formation of dehydration by-products such as HMF (hydroxymethylfurfural). In addition, the neutralization of the reaction mixture with ammonium hydroxide advantageously generates ammonium phosphate, a co-nutrient largely used in biotechnology processes. In this work, the kinetic parameters used in this procedure, such as temperature / pressure (152°C - 176°C / 4 – 8 atm ), acid concentration (pH 1.4 - 3.0) and length of hydrolysis (5 - 20 minutes), were optimized for the conversion of concentrated starch slurries (40% total solids, w/v) to maltooligosaccharides and/or glucose syrups. The syrup obtained from the starch phosphoric acid hydrolysis was used as a source of carbon for the production of the intracellular pigment asthaxantin by the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly, *Phaffia rhodozyma*). Cultures resulting from these hydrolysates, showing a DE (dextrose equivalent) of approximately 50, revealed the biochemical ability of *Xanthophyllomyces dendrorhous* to metabolize, beyond glucose and maltose, maltooligosaccharides with a DE greater than 3 to asthaxantin in high yields. Various alternative nitrogen sources such as some amino acid mixtures, soybean flour, casein hydrolysate, urea, potassium nitrate, "manipueira" and ammonium nitrate were evaluated as suitable supplements for the culture media. Manipueira, a pollutant by-product defined as the residual water derived from the industrial production of cassava starch (fecula), produced an increase of yeast biomass production (948 mg / %) when added to the fermentation media together with phosphoric acid-hydrolyzed starch. On the other hand, addition of ammonium nitrate to the fermentation media containing manipueira resulted in an increase of asthaxantinogenesis in *X. dendrorhous* (477µg/g of dry cell) from phosphoric hydrolysate (pH1.75, 152°C/4 atm and 15 min). More drastic conditions for hydrolysis, such as temperatures of 176°C (8atm), triggered formation of degrading subproducts that inhibited yeast growth. Preliminary experiments for the production of lactic acid by bacteria such as *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* indicated that, for the phosphoric acid-hydrolyzed starch, approximately 21g/l of lactic acid was produced.

## 1. INTRODUÇÃO

Polímeros de fitobiomassa primária, ao par da sacarose de caldo de cana (Brasil) ou de beterraba (Europa), são insumos naturais de sustentação da maior parte dos procedimentos industriais aplicados na biotecnologia clássica. É o caso do amido, seja de gramíneas (trigo, milho) ou de tubérculos (mandioca, batata). Dos quatro produtos agrícolas amiláceos, o Paraná é o maior produtor nacional de trigo, milho e mandioca, e o terceiro em batatas, na safra 2001 (SEAB, 2001).

O processamento enzimático do amido, as clássicas amilólises que requerem dispêndio energético de pré-gelatinização dos grânulos nativos intactos, apresenta limitações econômicas nas aplicações industriais devido os altos custos da enzima.

No Brasil, persiste ainda o emprego de hidrólises ácidas minerais clássicas baseadas no ácido clorídrico, com vistas à produção de xaropes de glucose ou de maltose/ maltodextrinas com DE (equivalente em dextrose) igual ou superior a 42. Exemplos paranaenses são as plantas industriais da CPB – Corn Products do Brasil (Balsa Nova – PR), operando cerca de 500 ton/dia de milho, e da INDEMIL (Paranavaí e Guaíra – PR), operando em torno de 300 ton/dia de mandioca, neste caso gerando aproximadamente 40.000 ton/ano de xarope de glucose. Tal processo é sabidamente drástico e inevitavelmente conduz à geração de produtos de desidratação ou degradação de açúcares liberados na hidrólise, principalmente o HMF ou hidroximetilfurfural, incolor mas caracterizado por odor e sabor, ou ainda dependendo da severidade da hidrólise, derivados subsequentes deste, como os ácidos fórmico e levulínico. A remoção destes subprodutos requer a utilização de adsorventes especiais ou resinas, e implica num componente de custos significativo.

Desde 1984, o LQBB – Laboratório de Químio/Biotecnologia de Biomassa da UFPR, coordenado pelo Prof. Dr. José Domingos Fontana, tem estabelecido uma tecnologia inovadora para o processamento de biopolímeros de fitobiomassa, a tecnologia fosfórica, inicialmente explorada em outros polímeros de açúcares, tais

como xilanas ou hemiceluloses de bagaço de cana e sorgo ou como inulina ou polifrutose de raiz de dália. A propriedade intelectual está protegida com o pedido PI 0002001-0, publicado pelo INPI em 02 de janeiro de 2002 na Revista de Propriedade Industrial nº 1617, p 132.

A vantagem do emprego do ácido fosfórico como catalisador alternativo ácido mineral para o tratamento de biopolímeros da fitobiomassa, para a produção de xaropes enriquecidos em hexose ou pentose e/ou oligossacarídeos, consiste na produção de um hidrolisado com teores mais reduzidos de hidroximetilfurfural ou furfural, ou outros produtos da desidratação e/ou degradação da glucose ou xilose ou mesmo cor do que aqueles decorrentes da hidrólise clorídrica. Além disso, a formação do fosfato de amônio, vantajosamente gerado na neutralização dos hidrolisados fosfóricos com o hidróxido de amônia, pode ser utilizado como co-nutriente em quaisquer processos fermentativos.

O objetivo do presente trabalho é estender a tecnologia da hidrólise fosfórica ao amido de mandioca, e desenvolver processos biotecnológicos a partir dos gluco/ malto/ hidrolisados para o crescimento e produção de um carotenóide oxigenado, utilizando a levedura astaxantinogênica *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA.

### 2.1. O AMIDO

Depois da celulose, o amido é o principal carboidrato fotossintetizado pelas plantas. É a substância de reserva para a maioria das plantas superiores e constitui uma fonte de energia essencial para muitos organismos, especialmente o homem. As mais importantes fontes potenciais de amido são os grãos dos cereais (40 – 90% do seu peso seco), legumes (30 – 70% do seu peso seco) e os tubérculos (65 – 85% do seu peso seco). O grão de amido pode ser facilmente isolado através de procedimentos físicos e, devido à sua abundância, possibilitou o desenvolvimento de unidades de processamento industrial de grande capacidade.

#### 2.1.1 Estrutura química do amido

O amido está presente nas plantas como pequenos grânulos. Quando extraído e seco, apresenta-se como pó branco, insolúvel em água. A forma, tamanho dos grânulos e a resistência mecânica variam de acordo com a fonte particular de amido. Além do mais, durante o crescimento da planta podem ocorrer alterações tanto no tamanho médio e forma dos grãos como na sua composição química (ROBINSEN, 1991).

O amido consiste quimicamente de dois diferentes homopolímeros de glucose, a amilose e a amilopectina (Figura 1), com a fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . O primeiro consiste de cadeias longas, não ramificadas de unidades de D-glucose conectadas por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4). Tais cadeias variam em massa molecular desde umas poucas centenas a milhares de unidades (a massa molecular média é de aproximadamente 500.000). O teor de amilopectina no grão de amido varia

dependendo da espécie vegetal (Tabela 1). A amilopectina por sua vez, apresenta uma molécula de maior dispersão molecular podendo envolver até 1.500.000 unidades de glucose. A estrutura é altamente ramificada. As ligações glicosídicas unindo os resíduos de glucose nas cadeias básicas de amilopectina são  $\alpha(1\rightarrow4)$ , mas os pontos de ramificação, que ocorrem a cada 24 e 30 resíduos, são ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$  (LEHNINGER et al.,1995) (BLANCHARD, 1992). A proporção dos pontos de ramificação varia de acordo com cada espécie vegetal. De maneira sinóptica, a amilose tem a maltose como unidade estrutural básica enquanto para a amilopectina coexistem a maltose e em menor proporção a isomaltose.

Os dois componentes são facilmente diferenciáveis através da cromogenia frente ao lugol ( $I_2:K_2 / 1:10$ ), em meio neutro ou levemente acidificado: a amilose cora em azul profundo enquanto a amilopectina cora em violeta.

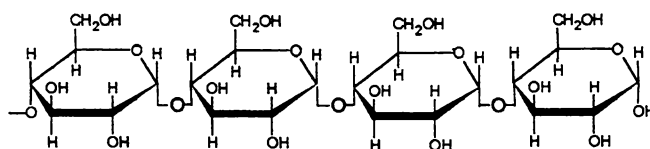
TABELA 1 - CONTEÚDO DE AMIDO E PERCENTUAL DE AMILOSE EM VÁRIOS VEGETAIS

Origem botânica	Amido (% base seca)	Amilose (% amido seco)
Trigo	67 - 68	26 - 28
Milho	71 - 74	28
Sorgo	32 - 79	21 - 34
Mandioca	85 - 86	17
Batata	65 - 85	23

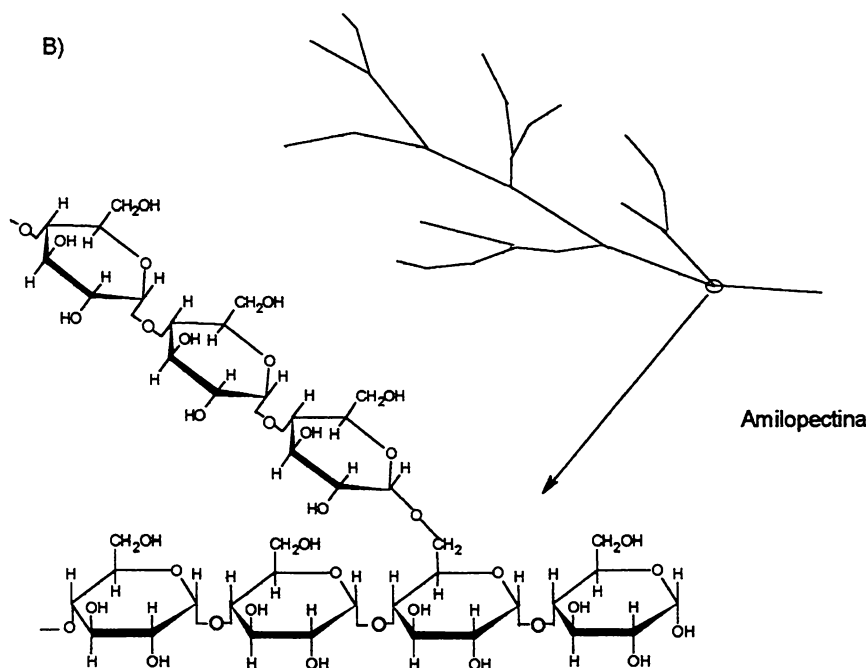
FONTE : GUILBOT (1985)

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS COMPONENTES DO AMIDO - AMIOLOSE (LINEAR) E AMILOPECTINA (RAMIFICADA)

A) amilose



B)

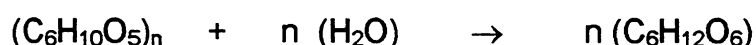


### 2.1.2 Hidrólise do amido

O amido pode ser hidrolisado através de processos catalíticos ácidos, tratamentos enzimáticos, ou através da combinação de ácido e enzimas amilolíticas. O resultado da hidrólise reúne um espectro amplo de produtos que vão desde monômeros como a glucose, a maltose e uma série de maltoligossacarídeos (misturas de maltose, maltotriose, maltotetraose e maltoligossacarídeos de maior

grau de polimerização) até maltodextrinas com grau de polimerização maior do que 20. Os hidrolisados encontram uma grande aplicação na indústria nos setores de alimentos, bebidas, surfactantes, farmacêutico, cosmético e polímeros auxiliares para as indústrias papeleira, têxtil e petrolífera.

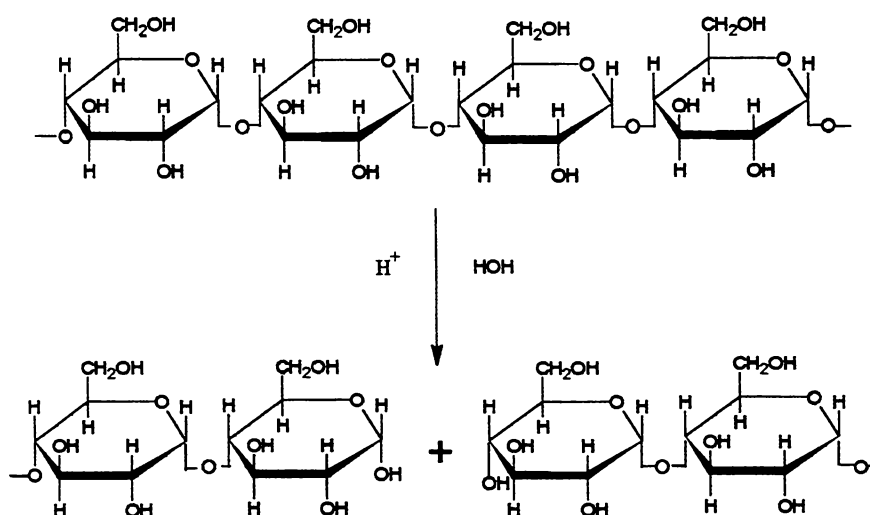
A hidrólise de cada ligação na cadeia envolve a quebra de uma ligação glicosídica (prévia protonação do oxigênio do anel piranosídico) e a incorporação da molécula de água nos fragmentos remanescentes (BLANCHARD, 1992). Com isto, cada ligação que é quebrada resulta no aumento da massa dos sólidos presentes e, para o caso hipotético da hidrólise completa até glucose temos:



onde o aumento da massa dos sólidos é de 11,11% (BLANCHARD, 1992).

Produtos da hidrólise do amido tais como xaropes de glucose (dextrose), maltose e/ou maltodextrinas são freqüentemente descritos na base de dextrose equivalente (DE). O DE proporciona uma estimativa do grau de hidrólise e é definido como o percentual de açúcar redutor presente, expresso como massa de dextrose (glucose) em base seca. Um xarope puro de maltose tem DE 50, e um xarope puro de maltotriose DE 33,33.

FIG 2 - HIDRÓLISE DA CADEIA DE AMIDO.



O amido exibe um DE obviamente igual a zero, desde que muito poucos grupos redutores estão presentes relativamente ao número total de unidades de dextrose. Uma hidrólise completa do amido produz dextrose, e desde que toda molécula de dextrose é um açúcar redutor (LEHNINGER et al., 1995), uma DE 100 é obtida. Dextrose é comercialmente definida como um produto de hidrólise de DE 99,5 ou maior, xaropes de maltose são produtos com DE entre 20 a 75, e maltodextrinas são produtos que apresentam DE menor que 20 (BLANCHARD, 1992) (HEBEDA, 1995). O DE, porém, nem sempre caracteriza adequadamente a natureza do produto hidrolisado a partir do amido. Isto é verificado, especialmente, naqueles casos de xaropes que são equivalentes em DE, mas variam amplamente na composição de sacarídeos, devido a diferenças do método de produção. Neste caso, o produto é melhor descrito em termos de distribuição de monômeros e oligômeros, ou seja, concentração de glucose (GP 1), maltose (GP 2), maltotriose (GP 3) e sacarídeos maiores (GP 4+), onde GP se refere ao grau de polimerização (HEBEDA, 1995)

As matérias-primas dos processos de hidrólise compreendem amidos de várias fontes. Amidos de trigo e batata são amplamente utilizados na Europa e podem ser preparados com um grau de pureza satisfatória. Nos Estados Unidos, o milho é utilizado como fonte de matéria prima. Amidos de mandioca, sorgo, arroz, trigo também podem ser utilizados industrialmente para produção de hidrolisados. (BLANCHARD, 1992) (HEBEDA, 1995). Conforme CABELLO (2000), o mercado de hidrolisados de amido no Brasil, na forma de xaropes de glucose, é obtido a partir do milho e é praticamente dominado por três grandes empresas, que utilizam tecnologia importada. A mencionada INDEMIL (paranaense) é de capital nacional, mas a tecnologia empregada, a hidrólise clorídrica, segue o padrão transnacional.

### 2.1.2.1 Histórico da hidrólise do amido

De acordo com WHISTLER (1965), Abu Mansur, um professor e farmacologista árabe, por volta de 975 d.C. descreveu a conversão do amido com a saliva como a geração de um mel artificial.

A história dos adoçantes à base de amido teve sua produção iniciada do século XIX, quando xaropes eram produzidos de amido de araruta, no Japão, pela ação natural de enzimas do malte (YOSHIZUMI et al., 1986).

Em 1811, Kirchoff descobriu que o açúcar podia ser produzido a partir da hidrólise ácida do amido de batata (WHISTLER et al., 1965). Quando o acesso ao açúcar de cana vindo da Índia foi restrito pela guerra napoleônica, esta tecnologia foi aplicada como desenvolvimento de adoçante alternativo, e utilizado na atividade vinícola alemã. Segundo MANSON(2001) por volta de 1876, 47 indústrias de hidrólise de amido já estavam operando somente nos Estados Unidos.

Importantes descobertas nas décadas de 20 e 30 alteraram radicalmente esta indústria. Em 1923, um processo industrial para produzir dextrose monoidratada cristalina foi desenvolvido. Quinze anos mais tarde em 1938, o primeiro processo enzimático industrial foi desenvolvido para produção de xarope de milho. O amido pré-hidrolisado por ácido foi tratado com preparado de amilase fúngica para produzir um produto com DE 65, mais doce e menos amargo que o xarope da hidrólise totalmente ácida (HEBEDA, 1995).

Os próximos passos, foram marcados por um grande desenvolvimento da indústria enzimática que se direcionou para o mais recente produto da indústria de amido, o xarope concentrado de frutose, que viria a substituir a sacarose como adoçante em várias aplicações industriais.

Por volta de 1960, a enzima glucoamilase, produzida por cepas do fungo *Aspergillus niger*, começou a ser utilizado industrialmente para produção de dextrose a partir do amido pré-liquefeito por via ácida (HEBEDA, 1995). Uma década mais

tarde, a enzima  $\alpha$ -amilase produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* substituiu o ácido na liquefação do amido. Como resultado, um processo totalmente enzimático foi implantado com sucesso no aumento de produção de dextrose e redução de requerimentos industriais (MANSON,2001).

Um processo industrial para isomerização da glucose para frutose foi desenvolvido e comercializado em 1966. Uma união de esforços entre Japão e Estados Unidos foi bem sucedida, impulsionando a produção nos Estados Unidos de um xarope contendo de 14 a 16% de frutose, em 1967, sendo a fabricação do xarope com 42% de frutose iniciada em 1968 (HEBEDA , 1995).

#### 2.1.2.2 Hidrólise ácida

Raros são os trabalhos científicos que relatam a aplicação da hidrólise ácida do amido nos últimos 10 anos. Todavia, tal procedimento, com exceção da produção do xarope concentrado de glucose, ainda é o procedimento padrão utilizado no segmento industrial para a produção de xaropes devido ao seu menor tempo de processamento e menor custo de produção.

##### 2.1.2.2.1 Efeito de ácido minerais no grão de amido

KERR (1950), estudou os mecanismos das reações de hidrólise ácida em que a D-glucose é liberada. Estes apresentavam principalmente três complicações: a dificuldade de reconhecer e avaliar a importância das reações secundárias, a falta de métodos analíticos apropriados para o estudo dos sistemas de reações e a falta de conhecimento a respeito da natureza físico- química do substrato, o amido.

COWIE et al.,(1958) realizaram estudos examinando o efeito do ácido clorídrico 0,2M a 45°C na estrutura granular do amido da batata, um amido de tubérculo. Nestas condições não houve inchamento dos grânulos, cujas

propriedades birrefringentes mantiveram-se inalteradas. O fato foi interpretado como se o tratamento ácido preferencialmente atacasse a região amorfa, antes da região cristalina do grânulo.

Segundo SWANSON (1948) e COWIE et al (1958), a amilopectina no grânulo de amido é degradada consideravelmente em taxas mais rápidas que a amilose. Mesmo que a taxa de hidrólise seja mínima as ligações  $\alpha$ -(1→4) são preferencialmente hidrolisadas quando comparadas com as ligações  $\alpha$ -(1→6). Os autores argumentaram que a amilopectina, que é preferencialmente degradada, deve estar mais distante do núcleo do grânulo e, conseqüentemente, mais acessível ao ataque do que a amilose. Além disso, a amilopectina deve estar mais associada com a região amorfa do que a amilose.

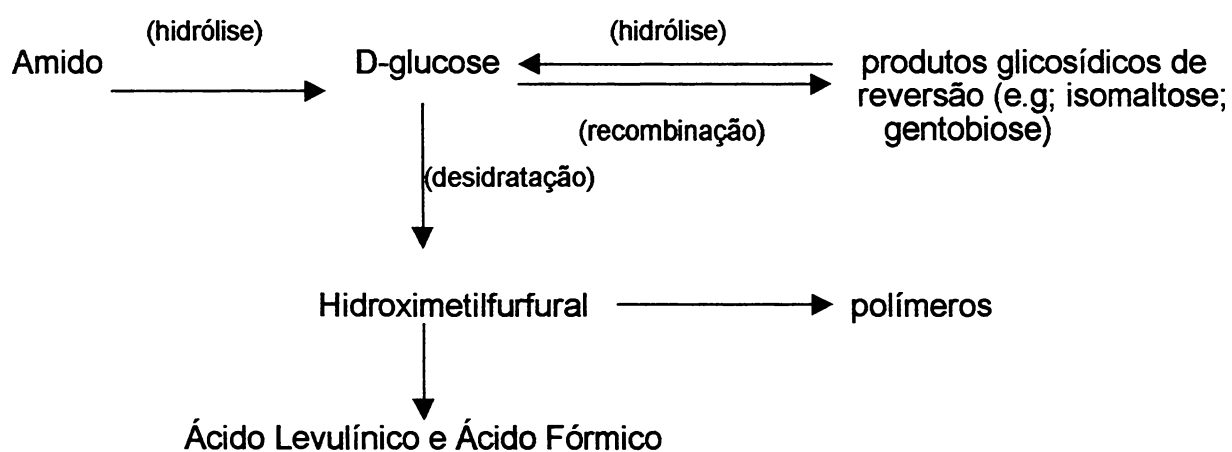
COWIE et al.,(1958) interpretaram estes dados como significando que a modificação ácida do grânulo ocorre em dois estágios, um rápido ataque na região amorfa, seguida por um ataque mais lento nas áreas mais cristalinas. De acordo com GUILBOT e MERCIER (1985) e BLANCHARD (1992), a hidrólise ácida produz clivagens essencialmente randômicas na molécula de amido, porém existem evidências que unidades terminais são mais facilmente hidrolisadas e que as ligações  $\alpha$ -(1→6) são as mais difíceis, confirmando os estudos de SWANSON (1948) e COWIE(1958).

O amido de trigo, oriundo da semente, mostrou uma relação semelhante entre as taxas de hidrólise da amilose e da amilopectina no grânulo (ARBUCKLE et al., 1958). Porém, a taxa de hidrólise de cada fração, foi 4 a 5 vezes mais lenta do que no amido da batata , sugerindo talvez uma estrutura mais compacta do que a encontrada no amido da batata e, com isso, proporcionando um aumento da resistência à dispersão (ARBUCKLE et al., 1958).

### 2.1.2.2.2 Reações paralelas à hidrólise ácida.

Produtos de recombinação da glucose também são formados sob as condições de hidrólise do amido (KERR, 1950). Conforme mostra a Figura 3, a recombinação da glucose é um equilíbrio e, portanto, é dependente da concentração da glucose (BEMILLER e ROBERTS., 1965). O tempo para alcançar o equilíbrio da reação de combinação também depende da concentração do ácido assim como da temperatura (BEMILLER e ROBERTS, 1965) (BLANCHARD, 1992).

FIGURA 3 - REAÇÕES DO AMIDO NA PRESENÇA DE ÁCIDO



Para BLANCHARD (1992), condições severas de hidrólise promovem reações laterais, incluindo as de recombinação da glucose para formar dissacarídeos, principalmente, isomaltose e gentobiose, e a degradação da glucose a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e outros produtos de decomposição.

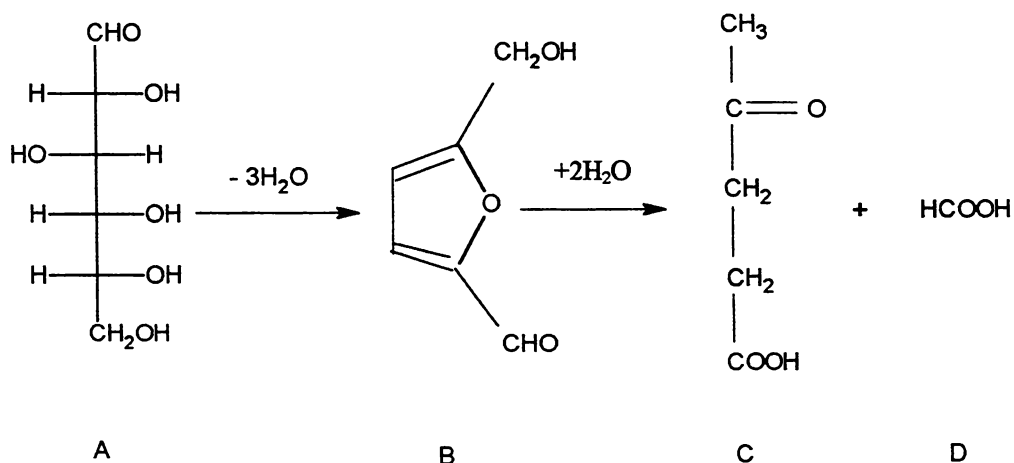
### 2.1.2.2.3 Formação do 5-Hidroximetilfurfural (HMF) e outras reações destrutivas

D-Glucose é desidratada na presença de ácidos produzindo principalmente HMF (Figura 4)(KERR, 1950; MILLER et al., 1952; AZHAR e HAMDY, 1981; KIM e HAMDY, 1985; SANCHEZ e BAUTISTA, 1988; BLANCHARD, 1992; LARSSON et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000) e menores quantidades de 2-hidroxiacetilfurano (MILLER et al., 1952).

KIM (1985), AZHAR e HANDY (1981), utilizando hidrólise ácida em batata doce para produção de etanol, verificaram que a formação de HMF aumenta em função do aumento da concentração de ácido, da temperatura e do tempo. De acordo com KIM (1985), na hidrólise do amido de batata doce, temperaturas entre 97 a 110 °C e HCl 1N foram mais efetivos em maximizar o nível de formação de açúcares redutores, com um mínimo de formação de HMF, se comparados com a hidrólise a 154 °C, com HCl 0,034N, proposta por AZHAR e HANDY (1981).

Uma das preocupações em se evitar a formação de HMF, é devido ao fato que 0,1% de HMF inibe o crescimento e a fermentação do álcool pelas leveduras (KIM, 1985).

FIGURA 4 - FORMAÇÃO DO 5-HIDROXIMETILFURFURAL (B), ÁCIDO LEVULÍNICO (C) E DO ÁCIDO FÓRMICO (D) A PARTIR DA DESIDRATAÇÃO DA GLUCOSE (A)



FONTE : LARSON et al., (1999)  
KUSTER (1990)

O ácido levulínico (C) e o ácido fórmico (D) também são formados a partir da do 5-hidroxiacetilfurfural (B) ( KERR, 1950; BEMILLER e ROBERTS, 1965; KUSTER, 1990; LARSSON et al., 1999). Segundo KERR (1950), a reação de decomposição é proporcional à concentração efetiva de ácido e a perda de glucose por recombinação ou destruição aumenta mais rapidamente com o aumento da temperatura. Segundo KUSTER (1990), o ácido levulínico e o fórmico são formados em reações consecutivas, onde ocorre a incorporação de duas moléculas de água.

#### 2.1.2.2.4 Considerações determinantes sobre o processo de hidrólise ácida.

A química da hidrólise ácida do amido tem sido extensivamente estudada ( KERR,1950; MILLER et al.,1952; WHISTLER et al.,1965; BEMILLER et al.,1965; TEGGE e RICHTER, 1980; KIM e HAMDY,1985; BLANCHARD, 1992).

Os principais fatores envolvidos na hidrólise ácida são:

- A) Densidade da solução amido: a quantidade de amido usada na solução a ser hidrolisada é tradicionalmente definida em função de sua densidade, e medida em escala Baumé. A densidade conveniente para o processo de hidrólise ácida é a de 22,5° Baumé, o que corresponde a aproximadamente a 40% (p/v). A DE máxima que pode ser alcançada nesta concentração de amido padrão é de aproximadamente 85. Segundo BLANCHARD (1992) para a produção de xarope atingir DE 90, é necessário diluir a solução de amido para 10 – 12° Baumé.
- B) Quantidade de ácido: expressa como logarítmo da atividade do íon hidrogênio (pH). A relação entre pH e a quantidade de ácido não é em sua totalidade constante, dependendo do poder tamponante da solução de amido (e.g., contaminação protéica de fécula inicial).
- C) Temperatura: uma taxa de conversão a uma temperatura acima da ebulição é extremamente lenta, então a hidrólise é pressurizada e ajustada para aquecer

seu conteúdo na temperatura desejada na faixa entre 130 e 160°C, condição de pressão correspondente a 1,6 e 5,1 atm.

D) Tempo de residência na temperatura máxima: para xaropes normais, o tempo de residência é geralmente de 5 a 10 minutos na temperatura máxima desejada. Hidrolisados com DE muito altos requerem um tempo maior na temperatura, de 15 a 20 minutos. Para minimizar a formação de coloração, o tempo de hidrólise deve ser o menor possível.

TEGGE e RICHTER (1980) examinaram os produtos de DE similares produzidos de diferentes procedimentos, para um determinado tempo de hidrólise. A formação de cor e destruição da glucose foram reduzidas numa condição de menor temperatura, mantendo o grau de hidrólise pelo aumento da concentração de ácido, todavia, a taxa de filtração foi aumentada quando uma temperatura de hidrólise maior foi usada, e a mesma taxa de conversão pôde ser mantida pela redução da concentração de ácido.

#### 2.1.2.2 5 Emprego do ácido clorídrico e ácido sulfúrico

Com base nas enciclopédias Concisa de Tecnologia Química Kirk-Othmer (GRAYSON, 1985) e no Índice Merck (WINDHOLZ, 1983) e para os efeitos de qualificação comparativa de catalisadores convencionais utilizados na hidrólise ácida de amidos, seja do ponto de vista estritamente químico seja daquele da segurança do trabalho e ambiental, o ácido clorídrico (HCl) é um monoácido gasoso. É comercializado normalmente em solução gasosa saturada, que atinge até 37% (p/v). Esta mistura fumegante é tóxica ou irritante ao trato respiratório, podendo provocar edema pulmonar. Pode causar queimadura dérmica e dermatite.

O ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é um diácido comercializado normalmente xaroposo, com um teor entre 93 – 98% (p/v), correspondendo uma densidade em

torno de 1,84. É estável desde que não esteja em equilíbrio com seu anidrido, o  $\text{SO}_3$ , ainda mais tóxico e altamente corrosivo. Pode causar injúrias a pele, mucosas e olhos. Provoca fortes reações exotérmicas, até com violência explosiva quando colocado em contato brusco com a água, como no caso de vazamentos para locais molhados e úmidos ou ainda na tentativa de lavagens.

Segundo BEMILLER e ROBERTS (1965), a atividade catalítica do ácido clorídrico é 40% maior comparada ao ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), em condições de temperatura de  $100^\circ\text{C}$  e concentrações de 0,1N. Este fato foi atribuído à capacidade do ácido sulfúrico formar sais com as substâncias não amiláceas e estes sais inibirem as reações de hidrólise. Devido à sua maior eficiência catalisadora, o ácido clorídrico (HCl) está consagrado como agente catalisador utilizado nos procedimentos de hidrólise do amido em preferência ao ácido sulfúrico, embora tal processo seja sabidamente drástico e inevitavelmente conduz à co-geração de produtos de degradação de açúcares como o HMF, e dependendo das condições de severidade da hidrólise, à geração de produtos detectáveis pela cor (“browning”) e alteração da palatabilidade (“bittering”) (BLANCHARD, 1992) (LARSSON et al. 1999) (TAHERZADEH et al. 2000) (CABELLO, 2000). No jargão industrial, o subproduto colorido e amargo da hidrólise de amido, insolubilizado na série do xarope açucarado é designado de “mud” (lama).

#### 2.1.2.2.6 Emprego do ácido fosfórico como catalisador alternativo

Segundo as enciclopédias Concisa de Tecnologia Química Kirk-Othmer (GRAYSON, 1985) e Índice Merck (WINDHOLZ, 1983) o ácido fosfórico, mais precisamente ácido ortofosfórico, é comercializado mais freqüentemente com cerca de 85% (p/v), densidade entre 1,69 e 1,71, xaroposo. É estável, relativamente inerte à temperatura ambiente, e sendo um triácido apresenta  $\text{pK}_{a1} = 2,15$ ,  $\text{pK}_{a2} = 6,82$  e  $\text{pK}_{a3} = 12,38$ .

Desde 1984, o Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa da UFPR, sob a coordenação do Professor José Domingos Fontana, tem estabelecido uma tecnologia inovadora para o processamento de glicopolímeros de fitobiomassa, através do uso catalítico do ácido fosfórico, inicialmente explorada com xilana de bagaços (FONTANA et al., 1984) e inulina de dália (HAULY; BECK; FONTANA, 1992). A vantagem adicional desse processo é a maior digestibilidade para a lignocelulose residual na alimentação de ruminantes (FONTANA et al., 1995) (DESCHAMPS et al., 1996) além do fosfato de amônio, vantajosamente gerado na neutralização do catalisador, e que é co-nutriente em inúmeros processos fermentativos.

A tecnologia fosfórica também foi estendida ao pré-tratamento de grãos amiláceos nativos, sendo testada com sucesso como catalisador alternativo para depolimerização do amido a glucose e maltoligossacarídeos. Inclusive para procedimentos fermentativos específicos dos gluco- e/ou malto-hidrolisados fosfóricos a produtos de alto valor agregado, como é o caso da astaxantina, obtida com *Xanthophyllomyces dendrorhous*, que é um carotenóide utilizado em aquicultura e avicultura (FONTANA et al., 2001). A vantagem deste ácido em comparação com o método clássico, HCl, é que a manutenção do ácido fosfórico no hidrolisado, após neutralização com amônio, proporciona a geração dos nutrientes fundamentais (fontes de carbono, nitrogênio e fósforo) para as fermentações industriais .

#### 2.1.2.2.7 O processo industrial da hidrólise ácida .

Industrialmente a hidrólise de amido para produção de xarope padrão é realizada em tanque pressurizado com capacidade para milhares de litros, operando em processos de batelada. Mais modernamente, se opera em conversores contínuos, mais eficientes. O amido é bombeado para o compartimento contendo a solução de água acidificada com ácido clorídrico a pH 1,8, 2,0, com simultânea

injeção de vapor. Quando cheio, o tanque é mantido na pressão de vapor na temperatura média de 140°C por alguns minutos. O conteúdo é então retirado e passa por um processo de refino onde são removidos proteínas, lipídios, peptídios, aminoácidos, minerais e substâncias contaminantes, as quais causam odores e sabores não desejados. São utilizados carvão ativado e diatomáceas que eliminam parte destes contaminantes, mas não os removem totalmente. É necessário utilizar colunas trocadoras de cátions e ânions para desmineralizar o hidrolisado, pois a maioria dos agentes que produzem cor são compostos iônicos. Após o refinamento, ocorre o processo de concentração para um valor de 80-84% de teor de sólidos, pela remoção da água em evaporadores (BLANCHARD, 1992).

#### 2.1.2.2.8 Xaropes obtidos da hidrólise ácida.

A série normal de produtos da hidrólise ácida compreende xaropes que apresentam DE 28, 36, 42 e 45, sendo que o DE 42 é considerado tradicionalmente o xarope regular. (BLANCHARD, 1992).

A hidrólise ácida pode proporcionar hidrolisados muito maior que DE 55, mas acima desta DE várias reações laterais (item 2.1.2.2.2) podem produzir um sabor amargo de difícil remoção e restringindo então a aplicação do xarope para alimentação humana (BLANCHARD, 1992).

#### 2.1.2.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é o procedimento industrialmente utilizado quando o objetivo é um produto mais refinado como a glucose ou xarope concentrado de maltose, devido a maior especificidade e produtividade das enzimas e menor geração de produtos da degradação, embora o custo do processo enzimático seja

bem mais elevado se comparado à hidrólise ácida, devido ao alto custo destes catalizadores protéicos e o maior custo operacional de processamento.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DE SACARÍDEOS (%) EM XAROPES OBTIDOS DA HIDRÓLISE ÁCIDA COM HCl DE AMIDO DE MILHO.

DE	Mono	Di	Tri	Superiores
10	2.3	2.8	2.9	81.7
20	5.5	5.9	5.8	63.3
30	10.4	9.3	8.6	45.1
40	16.9	13.2	11.2	28.3
50	25.8	16.6	12.9	15.9
60	36.2	19.5	13.2	8.5
67	45.1	21.4	12.5	4.5

FONTE: CORN REFINERS ASSOCIATION (1969)

A primeira etapa num processo típico é a produção de uma suspensão de amido de 30 a 40%, contendo enzima  $\alpha$ -amilase termoresistente, íons cálcio (50 a 100 ppm) e pH ajustado a 6,0-6,3. A mistura é rapidamente aquecida num reator tipo *jet cooker* a 106-108°C por 5-6 minutos. A seguir a temperatura do hidrolisado é reduzida à 90-100°C e o mesmo é mantido num reator agitado por 2 horas ao final dos quais terá um valor de DE em torno de 12. Numa segunda etapa, o pH é ajustado a 4,5, e a temperatura a 60°C. Amiloglucosidase (*Aspergillus niger*) é adicionada sob agitação lenta. Após 48-72 horas, obtém-se uma conversão de 93 – 96% do amido inicial em glucose (CABELLO, 2000).

## 2.2 A MANDIOCA

### 2.2.1. Considerações gerais

De acordo com informações do Centro de Raízes Tropicais -CERAT da Universidade Estadual de São Paulo, a mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) cultura de alto teor de amido, é cultivada na América tropical há mais de 5000 anos. A planta é originária da região amazônica e se constitui em alimento energético para mais de 400 milhões de pessoas no mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento. A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos: fácil propagação, elevada tolerância a longas estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouco exigente em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, permite consórcio com inúmeras plantas alimentícias e industriais, e sua folha tem alto teor de vitamina A e B. Industrialmente, seu processamento gera uma série de produtos e subprodutos para alimentação humana, animal ou outros usos industriais.

### 2.2.2 Alternativa para produção de amido no Brasil : o uso industrial da mandioca.

De acordo com CABELLO (2000), as maiores unidades processadoras de amido no Brasil utilizam o milho como fonte de matéria-prima, e a mandioca poderia ser uma fonte alternativa economicamente viável para a produção de xaropes de glucose, uma vez que apresenta características de competitividade frente ao milho, incluindo custo de produção. As etapas de extração de amido e processamento de mandioca dispensam tratamentos de pré-condicionamento, pois este vegetal apresenta teores reduzidos de proteína e de matéria graxa, dispensando operações de extração dispendiosas. Isto representa menor

quantidade de equipamento e maior capacidade operacional dos equipamentos e conseqüentemente menores investimentos de capital em bens permanentes industriais.

O custo da tonelada do amido de milho no mercado nacional em 2001, foi em média de R\$ 130,00 (U\$ 54,00) a tonelada, e o da mandioca R\$ 35,00 (U\$ 14,50) (SEAB, 2002). De acordo com CABELLO (2000), com uma tonelada de milho (grão seco) é possível produzir até 625 Kg de amido, enquanto que, na mandioca o rendimento é de aproximadamente 255 Kg de amido por tonelada de raiz (úmida). Considerando os respectivos preços da safra 2001, o custo da matéria-prima para produzir 1 tonelada de amido de milho seria de aproximadamente R\$ 208,00, 50% acima dos custos da mandioca, em torno de R\$ 138,00. Além do mais, um hectare de terra paranaense (e.g., oeste do Estado) produz respectivamente, 6 toneladas de milho e até 25 toneladas de mandioca.

O que torna a mandioca promissora como fonte de amido para a produção de hidrolisados, é a possibilidade de redução de custos de produção de raiz ser ainda muito grande, por conta do emprego de tecnologia e do aumento de produtividade em algumas regiões, sem contar com o melhoramento genético para desenvolver espécies mais produtivas e adequadas ao processamento industrial.

Outro fator seria a tecnologia de extração do amido contido nas raízes da mandioca, que necessita pesquisa e desenvolvimento de equipamentos que permitam aumentar dos atuais 25% em média para 28%, ou mais, já obtidos em indústrias extratoras na Tailândia (LEBOURG et al., 1996). Novas plantas industriais, mais racionais e otimizadas, determinariam um preço final da fécula abaixo do patamar aonde se encontra, pois qualquer redução no seu custo, realizaria uma significativa redução no preço final do hidrolisado.

Em função destas premissas, o uso da mandioca poderia possibilitar que agroindústrias de pequeno e médio porte, acoplassem unidades de modificação, gerando outras vantagens do ponto de vista sócio-econômico.

### 2.2.3 Produção da mandioca

A mandioca ocupa o 7º lugar no mundo e o 4º nos trópicos em área cultivada (FAO, 2001). Segundo a FAO, a safra mundial de mandioca no ano de 2000 foi de 174.460.125 toneladas e o Brasil foi responsável por 23.335.974 toneladas da produção cultivada em 1.721.739 ha, correspondendo a 13% da produção mundial. Na safra de 2001, a produção estimada foi de 24.177.715 t, cultivadas em 24.177.715 ha correspondendo na produtividade de 13.601 Kg/ha (SEAB, 2001). No cenário nacional, o Paraná se destaca como o maior produtor de mandioca, com safra estimada em 4.462.905 t, cultivados em 213.974 ha, ou seja, 18,46 % da produção total brasileira e com uma produtividade de 20.857 Kg/ha, 50% acima da média nacional (SEAB, 2001).

### 2.2.4 Manipueira

A manipueira é o resíduo líquido da industrialização da mandioca, resultado da prensagem da massa ralada durante o processo de fabricação da farinha ou da fécula de mandioca. Para cada tonelada processada são produzidos 300 litros de líquido residual por uma fábrica de farinha e cerca de 60 litros por uma fábrica de extração de fécula. Apresenta potencial poluidor equivalente a um índice populacional de 150 a 250 habitantes dia, que expressos em termos de DBO pode chegar a 30.000 mg/l (CEREDA, 1994).

De acordo com CABELLO (1994), o custo do tratamento das águas residuárias é elevado, sendo pouco viável para indústrias de médio e grande porte e totalmente inviável para pequenas indústrias, daí a grande importância da busca de aplicações que transformem a manipueira, de resíduo a subproduto, portanto, gerando também lucros e minimizando seu impacto ambiental na fabricação de farinhas e féculas de mandioca.

A manipueira tem composição variável, principalmente no que diz respeito ao teor de cianeto (característica da cultivar) e da carga orgânica, dependendo também do processamento industrial. Uma análise das características físico-químicas da manipueira é mostrada na tabela 3.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA MANIPUEIRA

VARIÁVEIS	CONCENTRAÇÃO
Umidade (%)	90,60
Sólidos totais (% MU)	9,39
Sólidos voláteis (% MU)	1,10
Amido (%MU)	5,67
Fibra (%MU)	0,45
Proteína (%MU)	1,60
Carbono (%MU)	4,76
Potássio (ppm)	4.200,00
Nitrogênio (ppm)	2.646,00
Magnésio (ppm)	640,00
Fósforo (ppm)	401,00
Cálcio (ppm)	385,00
Enxofre (ppm)	151,00
Cianeto total (ppm)	130,00
Ferro (ppm)	7,80
Zinco (ppm)	4,20
Manganês (ppm)	3,90
DQO (ppm)	46.000,00
pH	6,4

FONTE : CABELLO, C ; LEONEL, M (1994)

### 2.2.5 Utilização biotecnológica da mandioca.

Os fungos geralmente apresentam sistema enzimático capaz de utilizar o amido como fonte de energia (NIGAM, et al.,1995). Vários trabalhos relatam a utilização de microrganismos amilolíticos cultivados em meios à base de amido de mandioca não hidrolisado. No LQBB – UFPR, uma cepa de *Lactobacillus plantarum* foi caracterizada como produtora de um interessante complexo  $\alpha$ -amilolítico, modulável por proteólise (FLORÊNCIO et. al., 2000)

CANIATTI-BRAZACA et al., (1994) consideram a mandioca, por apresentar um elevado teor de carboidratos e baixo teor protéico, como substrato adequado alternativo para uso em fermentação microbiana, no qual o nitrogênio não protéico é convertido em proteína microbiana.

AZOULAY (1980) estudou o crescimento de *Candida tropicalis* em mandioca em pó, via fermentação submersa, objetivando um enriquecimento protéico. Obteve como resultado a produção de um pó enriquecido com 18,8% de proteína. Trabalho realizado com *Aspergillus fumigatus* tendo como substrato farinha de mandioca apresentou 34,4% de proteína bruta (SANTOS et al.,1983).

SALES (1983) estudou o crescimento de sete linhagens de fungos (*Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. fumigatus* e *Neurospora sitophila*) para a produção de biomassa em meio de mandioca via fermentação submersa e encontraram teores de proteína variando de 27,3 a 37,8%.

Carboidratos das plantas amiláceas não são diretamente fermentescíveis pela maioria das leveduras e bactérias. Este material precisa ser pré-tratado através de hidrólise química ou enzimática até açúcares mais simples. Segundo MARTINS (1977), das 400 espécies de levedura, cerca de 25% são capazes de assimilar as moléculas de amido suplementado em meio de cultura, embora muitas vezes, de forma parcial e com baixa taxa de crescimento neste substrato.

A mandioca pode ser considerada um bom substrato para a fermentação alcóolica devido a sua alta concentração de amido. A pré-sacarificação é, todavia, um pré-requisito mandatório para *Saccharomyces*.

COLOMBO (1975) realizou trabalho verificando a influência das condições de hidrólise ácida do amido de mandioca como pré-tratamento, visando a formação de açúcares fermentescíveis para produção de etanol, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Variou o tempo de hidrólise entre 1,5 e 3,0 horas, estabeleceu a pressão do processo (vapor fluente) em 1 atm (autoclave), fixou a relação de amido em relação a solução de ácido 1:3 ou 1:5 (p/v) nas concentrações de HCl de 0,1 ou 0,2N. Os melhores rendimentos de açúcares redutores foram obtidos nas condições mais drásticas das variáveis. Todavia, a maior produção de etanol foi alcançada nas mesmas condições, com exceção à relação amido/ácido, o melhor resultado foi obtido na relação 1:3 (100gr de amido + 300mL solução HCl 0,2N ). O autor não forneceu dados das condições experimentais utilizadas na fermentação do etanol.

ABRAHAM (1987), comparando três sistemas de hidrólises: ácida, ácido-enzimática e enzimática, também constatou como fator significativo a concentração de glucose no hidrolisado para a produção do etanol por *S. cerevisiae*. O autor estudou os parâmetros de concentração de HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tempo de hidrólise de 0,5 a 5 horas desenvolvidos na temperatura fixa de 121°C. A hidrólise enzimática foi desenvolvida utilizando 1% da enzima Termamyl<sup>®</sup>, complementando o pré-tratamento com aplicação de 1% da enzima AMG 200L<sup>®</sup> (amiloglucosidase). Para a hidrólise ácido-enzima, o HCl foi usado numa primeira etapa como agente catalítico e posteriormente 1% da enzima AMG 200L<sup>®</sup> foi adicionado após neutralização. ABRAHAM demonstrou que a melhor produção de etanol 51,10 g/l ocorreu no hidrolisado do sistema enzimático, contra 46,0 g/l da hidrólise ácida e 47,71 g/l para a ácido-enzimática. A maior taxa de conversão também foi obtida via hidrólise enzimática ( 97,4 % dos açúcares consumidos) em função da maior produção de

glucose (96% dos açúcares redutores) contidos no hidrolisado inicial. A hidrólise ácida e ácida-enzimática, com respectivamente 92,9 e 95,7% de conversão, produziram quantidades um pouco inferiores de glucose inicial. Não obstante os melhores resultados com hidrólise enzimática, ABRAHAM considera o custo das enzimas crítico para sua adoção.

## 2.3 ASTAXANTINA

### 2.3.1 Ocorrência

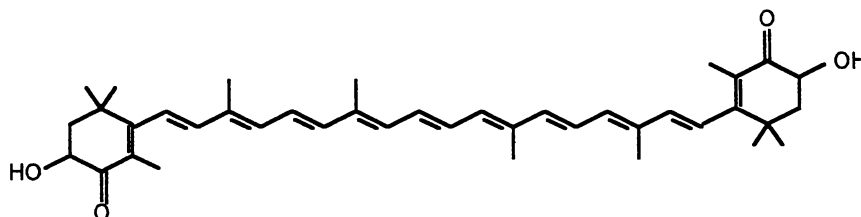
A astaxantina é um pigmento carotenóide vermelho-alaranjado, e está presente no meio marinho, provavelmente originário de algas verdes do subfilo *Chlorophyceae*, a microalga *Haematococcus pluvialis* (JOHNSON; AN, 1991; VÁZQUEZ e MARTIN, 1998), e pequenos crustáceos como o camarão (*Pandalus borealis*) e o krill (*Euphansia pacifica*) (JOHNSON; AN, 1991). Estes organismos compõem uma cadeia alimentar que leva à pigmentação de animais maiores, incluindo salmonídeos (JOHNSON; AN, 1991), animais invertebrados tais como lagostas (*Homarus gammarus*), caranguejos, e até pássaros tais como o flamingo (AN et al., 2001; JOHNSON; AN, 1991; REYNDERS et al., 1996).

Alguns outros microrganismos que sintetizam a astaxantina são as bactérias *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* (MEYER; PREEZ, 1994) e alguns fungos basidiomicetos do gênero *Peniophora* (ACHEAMPONG; MARTIN, 1995). A levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) tem sido objeto de estudos nos últimos anos pela sua considerável produção de pigmentos carotenóides, em especial a astaxantina.

### 2.3.2. Propriedades químicas

A astaxantina (3,3'-diidroxib,β-caroteno-4,4'-diona, Figura 5) é um oxicarotenóide (xantofila) com a fórmula molecular  $C_{40}H_{50}O_4$  e uma massa molecular de 596,86 g/mol. A astaxantina cristalina tem a aparência de um pó fino de coloração violeta-marrom escuro, o qual, em soluções diluídas de solventes orgânicos, aparece como róseo-alaranjado.

FIGURA 5. ESTRUTURA DA ASTAXANTINA



O ponto de fusão da astaxantina é aproximadamente 224°C. É insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano (~ 30g/l), clorofórmio (~ 10 g/l), acetona (~ 0,2 g/l), dimetilsulfóxido (DMSO) (~ 0,5 g/l) e outros solventes apolares (hexano) ou polares (álcoois). Seu espectro de absorção representa a sua estrutura poliênica conjugada, com  $\lambda_{\text{máx}} = 489$  nm em clorofórmio, 478 nm em etanol, e 480 nm em acetona (DAVIES, 1976; JOHNSON; AN, 1991).

A astaxantina é especialmente sensível a luz, calor, ácidos, bases e oxigênio, e sua destruição química ou enzimática pode ocorrer durante o processo de extração a partir de amostras biológicas. A astaxantina sob a forma de solução, deve ser estocada a -20°C e acondicionada em atmosfera inerte, para excluir o oxigênio. O vácuo ou atmosfera de nitrogênio ou argônio são geralmente utilizados. Estes cuidados tem a finalidade de evitar a sua oxidação pelo ar atmosférico (SCHIEDT; LIAAEN-JENSEN, 1995).

### 2.3.3. Emprego da astaxantina

A principal aplicação da astaxantina é na aquicultura de peixes, tais como salmão e truta, e na criação de crustáceos, como lagosta, de elevado valor comercial (STOREBAKKEN; NO, 1992). Um fator importante que afeta o consumo, a aceitação e o preço final de salmonídeos ou crustáceos é a coloração da carne ou carapaças.

A cor rosa natural da carne do salmão e das cascas de crustáceos cozidas é devido à presença de pigmentos carotenóides, principalmente a astaxantina. Estes pigmentos carotenóides também contribuem para o aroma do salmão após o cozimento. Na criação de salmonídeos e crustáceos em cativeiro, é necessário um alimento que contenha astaxantina para obter a pigmentação adequada (BONFIM, 1999).

Segundo TORRISSEN e CHRISTIANSEN (1995), a astaxantina pode servir como precursor de vitamina A em algumas espécies de peixes e crustáceos, ou pelo menos como hormônio de fertilização e promotor de crescimento (SIGURGISLADOTTIR, 1994).

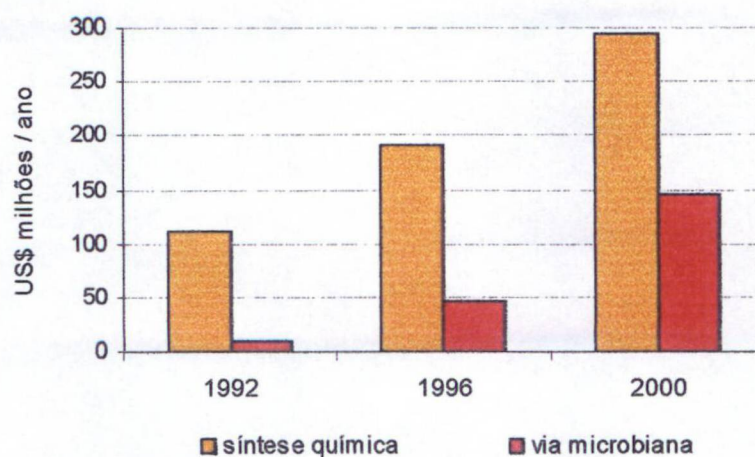
A astaxantina também é amplamente empregada na avicultura, visando aumento na produção e coloração de carne de frango e gema de ovos. (DIKE; LETTNER.; ZOLLITSCH, 1992; BONFIM, 1999). Quando incluída na alimentação de aves, a astaxantina da dieta foi relatada como fator melhorador da produção de ovos e da saúde geral das galinhas (LIGNELL, 1998). O aumento percentual de eclosão dos ovos, da resistência à infecção por *Salmonella* e da vida de prateleira dos ovos também são atribuídos à alimentação suplementada com astaxantina (LIGNELL, 1998).

Os produtores mundiais de alimentos para peixes e aves domésticas utilizam entre 40 e 60 toneladas/ano de corantes carotenóides sintéticos cantaxantina e astaxantina. O uso destes pigmentos sintéticos em rações para peixes contribui aproximadamente 10 a 15% no custo total do alimento (MEYER; PREEZ, 1993; MEYER; PREEZ, 1994). A Figura 5 mostra o crescimento da produção microbológica de astaxantina em relação à contrapartida obtida por síntese química.

Enquanto os efeitos positivos da astaxantina nas criações de aves, peixes e crustáceos tem sido reconhecidos há anos, o benefício como poderoso antioxidante para a saúde humana tem sido revelada nos últimos anos (AQUATECH, 2001). Segundo FONTANA et al. (2000), a astaxantina apresenta capacidade 250 vezes

superior em combater os radicais livres (como por exemplo, espécies ativas do oxigênio) do que o  $\alpha$ -tocoferol.

FIGURA 6. AVALIAÇÃO DE MERCADO EM INTERVALOS QUADRIENAIS PARA A PRODUÇÃO MUNDIAL POR ANO DE ASTAXANTINA MAIS CANTAXANTINA.



FONTE: DEAN (1997)

## 2.4. *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

### 2.4.1. Características gerais

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi isolada no início dos anos 70, por PHAFF, de exudatos que se desprenderam prematuramente de árvores em regiões montanhosas do Japão e Alasca ( MILLER et al.,1976). Inicialmente, a levedura foi designada por *Phaffia rhodozyma*, em homenagem a Herman Jan Phaff, pelos anos dedicados à pesquisa no campo da taxonomia de leveduras e ecologia.

GOLUBEV (1995) isolou outras cepas durante investigações realizadas entre os anos 1969 e 1975 de amostras de seiva de bétula coletadas na região de Moscou (Rússia) e propôs mudanças no gênero e espécie para *Xanthophyllomyces*

*dendrorhous* Golubev sp nov. Atualmente muitos autores ainda usam a terminologia *Phaffia rhodozyma*.

*Xanthophyllomyces dendrorhous* é uma levedura basidiomiceta, com células vegetativas elípticas, com dimensões que variam de 3,8 a 7,5 por 5,5 a 10,5  $\mu\text{m}$ , e podem ocorrer isoladas, em pares ou, ocasionalmente, em cadeias curtas. Não apresentam micélio verdadeiro, mas podem apresentar um feixe de células ou pseudomicélio rudimentar, que consiste de um número limitado de células em cadeia (MILLER et al. 1976).

Os critérios utilizados na identificação desta levedura imperfeita como basidiomiceto, incluíram o modo de formação do broto, a estrutura da parede celular, a natureza dos polissacarídeos que fazem parte das cápsulas das leveduras, sua habilidade de sintetizar pigmentos carotenóides e propriedades metabólicas, como a capacidade de utilizar a uréia .

GOLUBEV (1995) verificou que polialcóis induzem a conjugação entre a célula mãe e o broto e a subsequente formação (sem produção de micélio) de um longo holobasídio com basidiósporos terminais (esporos ovais apicais), que germinam por brotamento. Além do processo sexual, as características principais de identificação de *Xanthophyllomyces dendrorhous* são a presença de xilose e ramnose em polissacarídeos extracelulares e a síntese de astaxantina intracelular.

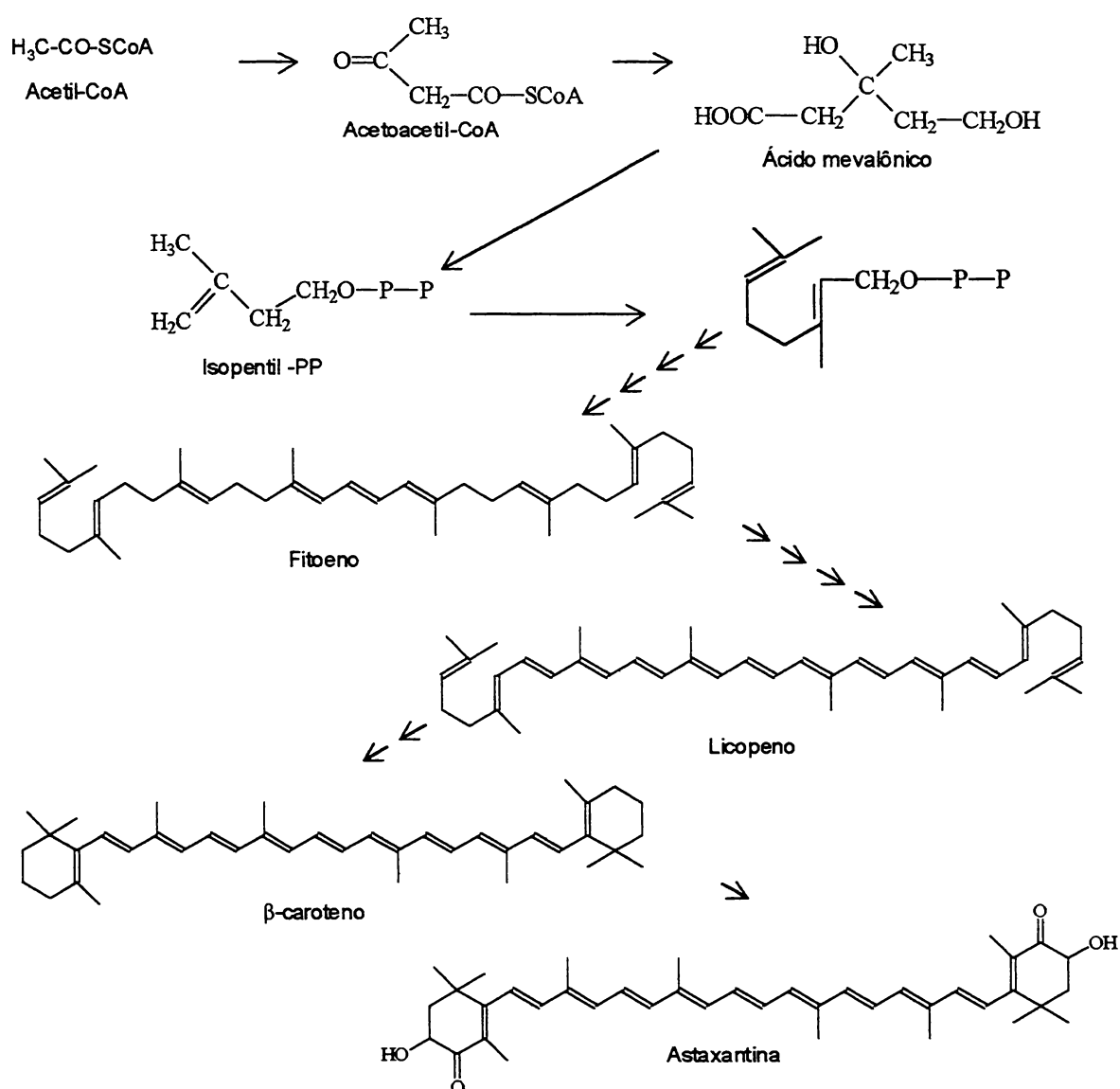
#### 2.4.2 Biossíntese da astaxantina

Embora muitos trabalhos tenham sido feitos sobre a química dos carotenóides, muito pouco é conhecido sobre sua biossíntese, particularmente das xantofilas (BREITENBACH et al., 1996), ou seja, os derivados oxigenados.

A astaxantina é um tetraterpenóide ( $\text{C}_{40}$ ) produzido a partir da via do mevalonato, conforme mostra resumidamente a Figura 7. O ácido mevalônico, formado a partir da acetil-CoA e acetoacetil-Coa, é o primeiro precursor da unidade

isopreno, que é a unidade construtora fundamental para a biossíntese de isoprenóides. As unidades isoprenóides contendo 5 átomos de carbono são enzimaticamente combinadas em polímeros, os quais podem adquirir muitas estruturas espaciais e ter muitas funções biológicas. Os produtos polimerizados a partir do isopreno (C<sub>5</sub>) são os monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), giberelinas (C<sub>20</sub>), esteróides (C<sub>30</sub>), carotenóides (C<sub>40</sub>) e outros polímeros (borracha) (C<sub>n</sub>) (JOHNSON; AN, 1991).

FIGURA 7. BIOSÍNTESE DA ASTAXANTINA



FONTE: LATSCHA (1990)

A biossíntese da astaxantina em cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* parece iniciar na fase de crescimento exponencial e continua durante a fase estacionária (ACHEAMPONG; MARTIN, 1995). Isto está de acordo com a descoberta de JOHNSON e LEWIS (1979), que determinaram que a produção de astaxantina está associada ao crescimento, mas que a sua formação não coincide exatamente com o aumento da biomassa. Tem sido relatado que mesmo na ausência da glucose, a concentração de xantofilas continua a aumentar (JOHNSON; LEWIS, 1979). Isto pode ser explicado pelo fato de *Xanthophyllomyces dendrorhous* excretar um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo, ácido acético, um álcool ou um intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, o qual é reassimilado posteriormente e estimula a carotenogênese (JOHNSON; AN; 1991)

#### 2.4.3. Cultivo

Poucos trabalhos estão disponíveis a respeito do cultivo industrial de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e alguns autores têm estudado vários métodos de produção com o objetivo de desenvolver um método de cultura industrial de baixo custo. O cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em fermentadores é caro quando comparado com outros cultivos de leveduras, uma vez que são necessários fermentações por um longo período de tempo (aproximadamente 5 ou 6 dias) a baixa temperatura. Quantidades consideráveis de astaxantina podem ainda ser produzidas após o término de crescimento da levedura. Uma boa capacidade de resfriamento e aeração do meio são requerimentos importantes, o que eleva o custo de produção (JOHNSON; AN, 1991). Assim, a utilização de fontes alternativas, de baixo custo, para o cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* seria uma maneira de reduzir o custo da produção industrial.

*Xanthophyllomyces dendrorhous* pode ser produzida sem grandes despesas, usando muitos sucos, abundantes nos países Mediterrâneos, tanto quanto o material

cru. Esses sucos vegetais, sem nenhum tratamento posterior ou adição química, são excelentes substratos para o crescimento da levedura e produção da astaxantina (CALO; GONZALES, 1995). Da mesma forma, é comum o uso de resíduos, obtidos do processamento de alimentos, como substrato para o cultivo de microrganismos. Eles apresentam a vantagem de produzir uma biomassa útil, além de ajudar a aliviar os problemas de poluição com os depósitos de resíduos.

O suco residual de alfafa (parte solúvel da alfafa) é um produto derivado do processo de extração de proteínas das folhas da planta. OKAGBUE e LEWIS (1984) utilizaram este suco como substrato para *Xanthophyllomyces dendrorhous* e observaram a manutenção de um bom crescimento e a inibição da formação de astaxantina. A adição de nutrientes a este meio não reverteu a inibição, indicando que o suco provavelmente contém algum inibidor da biossíntese da astaxantina, embora componentes cromogênicos do suco possam ser adsorvidos na superfície da célula da levedura e aparecer como um artefato de análise da astaxantina. Em paralelo, ocorre um aumento da susceptibilidade a autólise da massa celular de *Xanthophyllomyces* crescida no suco de resíduo de alfafa, o que poderia ser atribuído à presença de grandes quantidades de material proteináceo. A suplementação do suco com glucose minimizou o fenômeno autolítico e aumentou a massa celular. Desde que a liberação de enzimas proteolíticas é considerada ser a primeira etapa na autólise de leveduras, o efeito adverso da glucose no fenômeno pode ser devido a seu efeito inibidor do efeito autolítico. Estes dois efeitos (aumento de rendimento celular e a inibição da autólise) podem ser úteis se a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* é para uso como fonte de proteína.

O melaço de cana-de-açúcar, um resíduo originário da fabricação do açúcar branco, é produzido pelas usinas nas proporções que variam entre 25 e 40 litros/tonelada de cana processada. O melaço contém aproximadamente 62% de açúcares (32% de sacarose, 14% dextrose e 16% de levulose), 3% de materiais nitrogenados e outros, como gomas e ácidos (ALMEIDA-LIMA et al., 1975). Apesar

da dificuldade encontrada por alguns pesquisadores em utilizar o melão como substrato para cultivar a levedura *Xanthophyllomyces*, HAARD (1988) determinou as condições em que este proporciona bom crescimento e produção de astaxantina. REYDERS, RAWLINGS e HARRISON (1996) também empregaram o melão para o cultivo de *Xanthophyllomyces*.

A turfa é um material lignocelulósico abundante e barato. Além do seu uso no crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, o hidrolisado de turfa tem sido usado como substrato para uma variedade de microrganismos, por mais que os carboidratos presentes na turfa e seus extratos não sejam todos facilmente assimilados pelos mesmos (VÁZQUEZ; MARTIN, 1998). A turfa é uma matéria esponjosa, constituída de restos vegetais em variados graus de decomposição, e que se forma dentro da água, em lugares pantanosos, onde o oxigênio é escasso. É muito freqüente nas regiões de temperatura mais baixa, onde é originada maciçamente de musgos do gênero *Sphagnum*. A turfa retém grande quantidade de água, e forma um meio pobre e ácido (MARTIN et al., 1992). A hidrólise da turfa produz uma variedade de açúcares na fase líquida, entre os quais a celobiose, e a fração lipossolúvel (betume) contém precursores de astaxantina. Tem sido relatado que a presença de celobiose e precursores carotenóides no meio de crescimento aumenta a produção de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous* (MARTIN et al., 1992 e 1993; ACHEAMPONG; MARTIN, 1995).

PARAJÓ e CRUZ (1998) também utilizaram a celobiose e a glucose, açúcares obtidos através do pré-tratamento alcalino seguido da depolimerização da celulose de *Eucalyptus* utilizando celulasas, como meio de cultura para a produção de astaxantina e crescimento de *Xanthophyllomyces*.

MEYER E PREEZ (1994) demonstraram que *Xanthophyllomyces dendrorhous* pode ser cultivada em meio mínimo de suco de uva e assimilar glucose e frutose como fontes de carbono, embora a suplementação com vitaminas ou extrato de leveduras tenha sido essencial para a produção de biomassa e astaxantina.

A xilose, um carboidrato que pode ser obtido a partir de alguns materiais lignocelulósicos, por hidrólise de hemiceluloses, foi usada como meio de cultivo (solução a 4,2 g% p/v), como fonte de carbono, resultando em um aumento na produção de astaxantina. Durante o processo fermentativo, foi detectado o xilitol, um intermediário do metabolismo da xilose, que foi assimilado após a depleção da xilose (PARAJÓ; SANTOS; VAZQUEZ, 1997).

BON, LEATHERS E JAYASWAL (1997) utilizaram uma substância a base de milho proveniente da destilação do álcool etílico para o crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e obtiveram baixos rendimentos de astaxantina.

FONTANA et al. (1996) relataram os primeiros resultados empregando o caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono (aproximadamente 175 g de sacarose por litro de caldo fresco), suplementado com uréia e fosfato de sódio, obtendo um aumento do conteúdo de astaxantina e do rendimento celular.

*Xanthophyllomyces dendrorhous* pode utilizar uma variedade de fontes de carbono, incluindo mono e dissacarídeos. VÁZQUEZ et al., (1997) testaram a glucose, a xilose e a sacarose como fonte de carbono, para o crescimento de *Xanthophyllomyces*. Estes carboidratos podem ser obtidos em grande escala, respectivamente a partir do amido, materiais lignocelulósicos, beterraba e cana-de-açúcar.

#### 2.4.4 Aplicações da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* é um suplemento de dieta promissor para o cultivo de peixes, camarões e frangos em virtude de ser uma fonte natural de astaxantina e uma fonte alternativa de proteína ("Single Cell Protein", SCP) (HAARD, 1988). As leveduras também fornecem nutrientes necessários para o crescimento dos animais, a exemplo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GOLDBERG, 1985). O alto conteúdo de lipídeos de *Xanthophyllomyces*

*dendrorhous* ( JOHNSON et al., 1980) e seu conteúdo de carotenóides que são precursores da astaxantina podem melhorar comercialmente o aroma e a cor do salmão cultivado mais efetivamente do que outros aditivos alimentares sintéticos. Os consumidores podem preferir produtos carotenóides naturais a pigmentos sintéticos, devido as regulamentações rigorosas com relação à segurança de produtos químicos como aditivos de alimentos e a pouca absorção de carotenóides sintéticos comparados com os de fontes biológicas (FANG; CHENG, 1993).

Em 1995, o mercado estimado para a astaxantina foi de aproximadamente US\$ 100 milhões, e várias companhias se engajaram no desenvolvimento de *Xanthophyllomyces* como uma fonte de pigmento industrial. Entre elas a Universal Bioventures, uma empresa americana, desenvolveu o produto composto de *Xanthophyllomyces* ( Red Star Phaffia yeast product), que foi introduzido ao alimento do salmão comercial no mercado. A companhia holandesa Gist também comercializa um produto de *Xanthophyllomyces* de alta qualidade e que está no mercado com o nome de Natupink (SCHROEDER; JOHNSON, 1995).

Para a astaxantina ser absorvida pelo peixe ela deve estar disponível. A parede celular da levedura *Xanthophyllomyces* é um obstáculo para a absorção da astaxantina, e por isso, antes da suplementação dos pigmentos na dieta dos peixes, esta deve ser rompida. A astaxantina proveniente a partir das células de *Xanthophyllomyces* quebradas é rapidamente absorvida pela truta, resultando em uma alta pigmentação (JOHNSON et al.,1980; MEYER; PREEZ, 1994). Em experimentos de pigmentação de tecidos animais feitos com *Xanthophyllomyces dendrorhous*, foram alcançados altos níveis de deposição de astaxantina em trutas, lagostas ou gemas de ovos de galinha (DIKE et al., 1992) se as paredes celulares da levedura foram rompidas antes do uso (JOHNSON et al.1977; JOHNSON et al.,1980). A ruptura pode ser lograda tanto enzimaticamente (enzimas de *Bacillus circulans*) (JOHNSON et al.,1977; OKAGBUE; LEWIS, 1984) ou mecanicamente por moagem a seco (CALO; GONZALEZ, 1995).

## 2.5 ÁCIDO LÁTICO

O ácido láctico é uma substância versátil, utilizada como acidulante e preservativo nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e têxteis. Recentemente, muitas indústrias têm mostrado interesse na produção do ácido láctico para produção de plástico biodegradável (SREENATH, et al. 2001). O ácido láctico existe como dois isômeros óticos, o ácido L- e o D-láctico. Ambas as formas isoméricas podem ser polimerizadas e polímeros com diferentes propriedades podem ser produzidos dependendo de sua composição.

De acordo com HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL (2000), a produção de ácido láctico mundial é de aproximadamente 80.000 toneladas ano. Cerca de 90% são produzidos pela fermentação bacteriana e o restante produzido sinteticamente pela hidrólise da lactonitrila. A produção fermentativa tem a vantagem de poder produzir apenas um dos isômeros, um produto óticamente puro pode ser obtido, enquanto que a produção sintética sempre resulta numa mistura racêmica de ácido láctico.

É possível produzir o ácido láctico a partir de recursos renováveis como amido e celulose via procedimentos fermentativos. Segundo HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL (2000), a produção de ácido láctico de recursos renováveis compreende os seguintes passos: pré-tratamento do substrato incluindo hidrólise até açúcares livres, fermentação dos açúcares até ácido láctico, separação das bactérias e partículas sólidas do meio e purificação do ácido láctico.

Atualmente, as bactérias lácticas mais utilizadas consistem nos seguintes gêneros Gram-positivo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. As bactérias lácticas são esféricas, com exceção do *Lactobacillus* e *Carnobacteria* que são bastões, incapazes de sintetizar ATP através da respiração, e que produzem o ácido láctico como principal produto final da

fermentação de açúcares. A maioria das bactérias lácticas é anaeróbia facultativa. Elas não apresentam mobilidade e formação de esporos, e apresentam grande tolerância ao meio ácido. A temperatura ótima de cultivo varia conforme o gênero entre 20 e 45°C (HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL, 2000).

As bactérias lácticas requerem meios com nutrientes complexos, devido à sua falta de habilidade de sintetizar vitamina B e aminoácidos. Além do mais, elas são encontradas naturalmente em ambientes ricos em nutrientes, como plantas, leite e no interior dos humanos e nos corpos dos animais (HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL, 2000).

As bactérias lácticas fermentam açúcares, através de diferentes vias metabólicas resultando em homo-, hetero-, ou fermentações ácidas mistas. A homofermentação produz apenas ácido láctico como produto final da degradação da glucose, utilizando a via de Embden-Meyerhof-Parnas (THOMAS; ELLWOOD; LONGYEAR, 1979). Na heterofermentação, quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glucose através da via da fosfocetolase.

Um número de diferentes substratos tem sido usado para produção fermentativa do ácido láctico como soro de leite, melão, amido e material lignocelulósico. O produto mais puro é obtido quando o açúcar puro é fermentado, resultando em diminuição dos custos de purificação. Porém, isto é economicamente desfavorável, porque açúcares puros são caros e o ácido láctico é um produto relativamente barato (SREENATH et al., 2001).

A adição de nutrientes e concentrações altas de nutrientes geralmente apresentam um efeito positivo na produção de ácido láctico. O meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), o qual contém extrato de levedura, peptona e extrato de carne é superior aos meios contendo apenas extrato de levedura, ou peptona ou extrato de malte. Isto reflete a demanda de nutrientes complexos das bactérias lácticas, exigidas devido à capacidade limitada de biosíntese. O pH ótimo para

produção das bactérias lácticas varia entre 5 e 7 (HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL, 2000).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS.

Relação dos materiais utilizados nos experimentos e sua procedência:

- a) o amido de mandioca utilizado, comercialmente denominado de polvilho doce, foi procedente da empresa YOKI - Indústria de Alimentos, adquirido no comércio local;
- b) o amido de milho utilizado foi gentilmente cedido pela empresa CPB – Corn Products do Brasil, Balsa Nova, Paraná;
- c) a mandioca (*Manihot utilissima*) para produção da manipueira foi adquirida no comércio local;
- d) microrganismo *Phaffia rhodozyma* cepa ATCC 24202; foi adquirido da American Type Culture Collection, Rockville Mariland, Estados Unidos da América;
- e) Todos reagentes utilizados foram considerados quimicamente puros, isto é, produtos p.a.

#### 3.2. MÉTODOS

##### 3.2.1 Métodos analíticos

##### 3.2.1.1 Métodos colorimétricos

##### 3.2.1.1.1 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por DUBOIS et al.,1956. O complexo colorido resultante da conjugação do hidroximetilfurfural com o fenol, foi lido a 490nm, usando-se a D-

Glucose como padrão, na faixa de sensibilidade de 10 a 30 $\mu$ g/ensaio, com volume final de 3,5 mL.

#### 3.2.1.1.2 Carboidratos redutores

Os carboidratos redutores foram determinados pelo método do 3,5-dinitrossalicilato, descrito por Miller (1959), usando-se a D-glucose como padrão, na faixa de 0,18 a 3,6mg/ensaio, com volume de 10mL, leitura a 540nm.

#### 3.2.1.1.3 Proteínas totais

As concentrações de proteínas totais foram determinada pelo método do biureto, descrito por Gornall, Bardawill, e David (1949), usando-se a soroalbumina bovina como padrão, na faixa de sensibilidade de 1 a 10 mg/ensaio, com volume de 5ml, leitura 540nm.

#### 3.2.1.1.4 Hidroximetilfurfural (HMF)

A determinação da concentração do HMF nos hidrolisados ácidos por espectrofotometria foi feita através da absorbância em UV,  $A_{283}$  (TAHER e CATES, 1974), sendo o padrão de HMF utilizado na faixa de sensibilidade de 0,01 a 0,001 mg/ml.

#### 3.2.1.2 Métodos Cromatográficos

##### 3.2.1.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada foram desenvolvidas em cromatoplasmas de sílica gel 60 prontas, da Merck .

Para a determinação do perfil de açúcares nos hidrolisados e no meio de cultura no decorrer dos cultivos foi desenvolvido no início da realização desse trabalho, um sistema de fase móvel contendo os seguintes solventes : acetona : acetonitrila : acetato de etila : 1-propanol : água , na proporção de (5:10:5:20:10, v/v/v/v/v), seguido de uma segunda corrida com os mesmos solventes, apenas com as proporções modificadas para (5:30:5:30:10, v/v/v/v/v). A visualização dos açúcares foi feita com orcinol a 1% em metanol: ácido sulfúrico (90:10 v/v), após aquecimento a 105°C por 2 a 4 minutos.

Para a determinação do hidroximetilfurfural, foi utilizada apenas uma corrida utilizando a fase móvel acetona : acetonitrila : acetato de etila : 1-propanol : água (5:10:5:20:10). O revelador utilizado também foi o orcinol a 1%.

A cromatografia de carotenóides foi desenvolvida utilizando-se como fase móvel o sistema de solventes : hexano : acetona : acetato de etila : nitroetano : metanol : água, na proporção (79:19:5:3,5:3,5:0,25, v/v/v/v/v/v), mantida a mesma fase estacionária.

### 3.2.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises do perfil dos açúcares dos hidrolisados de amido e do ácido láctico feitas por CLAE foram realizadas em equipamento Shimadzu, módulos RID 10A detector de índice de refração e SPD-M10A detector DAD " Diode Array detector". A coluna de troca iônica utilizada foi uma Aminex HPX – 87H da Bio-Rad. A fase móvel utilizada foi o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8mM, fluxo de 0,6 ml/min e a temperatura da coluna 65°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µl injetados automaticamente pelo módulo SIL 10A. A detecção por refratometria diferencial foi feita com a célula do detector a 40°C. O detector DAD foi utilizado para análise de hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico, com geração de cromatogramas com comprimentos de ondas de 202 e 283nm.

### 3.2.1.3 Método densitométrico

Para a quantificação dos cromatogramas em camada delgada (CCD) foi utilizado o densitômetro Shimadzu CS-9301PC de alta resolução, com os parâmetros de *scanner* no modo fotométrico de reflexão, delta Y de 0,04 a 0,1mm e amplitude de leitura de 4mm.

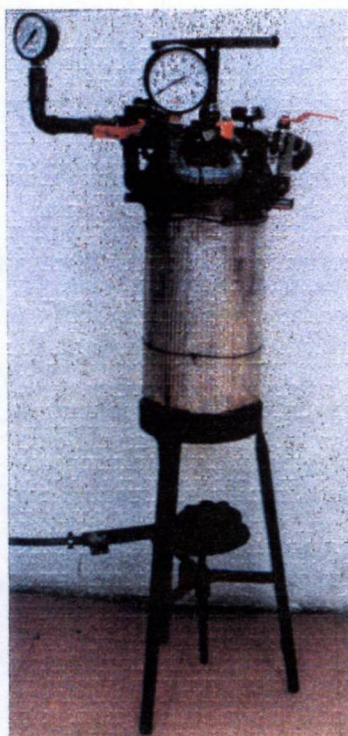
### 3.2.1.4 Método eletroforético

As proteínas da manipueira foram previamente precipitadas com ácido tricloroacético 20%, centrifugadas e lavadas com etanol, para então serem analisadas por eletroforese em acetato de celulose (Cellogel) . Padrões de 10mg/ml de soroalbumina bovina e  $\alpha$ -amilase de *Bacillus subtilis* foram usados como referência. Como indicador de corrida foi usado o corante xilenocianol. Após o tempo de corrida de 40 minutos, a 200 volts em tampão borato de sódio 50mM, pH 8,0, foi feita o tingimento das proteínas com o corante Coomassie Blue.

## 3.3. HIDRÓLISE

As hidrólises ácidas foram realizadas em reator para média pressão, de chapa de aço inoxidável reforçada, dotado de múltiplas válvulas de admissão e saídas, válvula de balancim de segurança e monitoramento manométrico e termométrico das condições de operação entre 1 e 10 atm . O reator mostrado na Figura 8, foi concebido na própria UFPR e construído pelo metalúrgico Constante Schbyor (Curitiba,PR).

FIGURA 8 REATOR UTILIZADO NAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE FOSFÓRICA



### 3.3.1 Cálculo do dextrose equivalente – DE

Uma vez estabelecido o perfil e a quantificação dos açúcares do hidrolisado (base seca) seja por CLAE ou CCD / densitometria, foi possível calcular a DE, utilizando a seguinte fórmula :

$$DE = \%glucose + \%maltose \cdot 1/2 + \%maltotriose \cdot 1/3 + \%maltotetraose \cdot 1/4 + \\ \%maltopentaose \cdot 1/5 + \%maltohexaose \cdot 1/6 + \%maltoheptaose \cdot 1/7$$

### 3.3.2 Comparação entre hidrólise clorídrica, sulfúrica e fosfórica do amido de milho e do amido de mandioca.

Para avaliar a substituição do tradicional amido de milho pelo amido de mandioca no processo de hidrólise ácida , foi feito um estudo comparativo da hidrólise dos dois modelos amiláceos, utilizando como agentes catalíticos o ácido

clorídrico, ácido sulfúrico e também o ácido fosfórico, todos normalizados para pH de 1,75 (após homogeneização na pasta de amido) e temperatura de 152°C (4 atm) durante 10 minutos

Em 33g de amido de milho foram acrescentados 50mL de água destilada (solução de amido 40% p/v). A solução foi deixada sob agitação com barra magnética por 30 minutos. Três frascos com 20mL da solução de amido cada, foram separados e titulados com respectivamente ácido clorídrico (37%), sulfúrico (98%) e fosfórico (85%) diluídos 1:10 (v/v) de forma a se obter soluções com o pH 1,75. O volume de ácido clorídrico, sulfúrico e fosfórico diluídos adicionado foi de 270 $\mu$ L, 130 $\mu$ L e 470 $\mu$ L, respectivamente.

O mesmo procedimento foi executado para o amido de mandioca. Os volumes de ácido clorídrico, sulfúrico e fosfórico diluídos 1:10 (v/v) necessários para titular as soluções de amido de mandioca ao pH de 1,75 foram respectivamente de 285 $\mu$ L, 150 $\mu$ L e 565 $\mu$ L.

As hidrólises foram realizadas no tempo de residência de 10 minutos na temperatura máxima de 152°C (pressão de 4 atm). Após hidrólise, alíquotas dos xaropes de hidrolisados foram retiradas para determinação de açúcar redutor, açúcar total, extração com acetato de etila e dosagem de HMF e análise do perfil de açúcares da hidrólise (cromatografia).

### 3.3.3 Efeito do pH e do tempo na hidrólise fosfórica do amido de mandioca.

Para a determinação do efeito do pH na hidrólise fosfórica foram escolhidas três faixas de pH: 1,5, 1,75 e 2,0. Em 74,5g de amido de mandioca foram acrescentadas 112,5 mL de água destilada (solução de amido 40% p/v), deixadas sob agitação por 30 minutos. O volume de ácido fosfórico diluído 1:10 (v/v) necessário para a titulação até os respectivos pH foi de 11,7ml , 4,5ml e 2,6ml .

A segunda variável, o tempo, foi estipulada em 5, 10 e 15 minutos, correspondentes ao tempo de residência na temperatura máxima durante a hidrólise.

Em todas as hidrólises a temperatura /pressão máxima do reator permaneceu constante em 152°C (4 atm). Após resfriamento, alíquotas dos xaropes dos hidrolisados foram retiradas para determinação de açúcar redutor, açúcar total e análise do perfil de açúcares do hidrolisado (cromatografia).

### 3.3.4 Efeito do pH na hidrólise de mandioca, nas condições de temperaturas de 176°C(8atm) por 15 minutos e 160°C (5atm) por 20 minutos.

Neste experimento foram feitas duas séries de hidrólises em condições de temperaturas e tempos diferentes.

A 200g de amido de mandioca foram acrescidos 300mL de água destilada (solução de amido 40% p/v) e deixados sob agitação com barra magnética por 30 minutos. A solução apresentando volume aproximado de 430mL foi subdividida em Erlenmeyers de 125 ml, contendo cada um 40mL da solução original. Volumes de 650 $\mu$ L, 320 $\mu$ L, 260 $\mu$ L, 140 $\mu$ L e 110 $\mu$ L de ácido fosfórico diluído 1:10 (v/v) foram utilizados para titulação das soluções aos pH desejados: 2,0 - 2,25 - 2,5 - 2,75 e 3,0 respectivamente..

Na primeira série de hidrólises, as soluções de amido foram hidrolisadas no reator na temperatura máxima de 176 °C ( pressão correspondente de 8 atm), durante 15 minutos. Um saldo da solução original com volume menor, 15 ml, foi titulada até pH 3,2 com 35 $\mu$ L de ácido fosfórico 1:10 (v/v) e, também, incluído nesta série.

Na segunda série de hidrólises, as soluções de amido foram hidrolisadas no reator sob temperatura de 160°C (5 atm), durante 20 minutos.

Após resfriamento, alíquotas dos xaropes dos hidrolisados foram retiradas para determinação de açúcar redutor, açúcar total e análise do perfil de açúcares do hidrolisado (cromatografia).

### 3.3.5 Efeito da concentração de ácido (pH) e temperatura nas hidrólises comparativas fosfórica e clorídrica de amido de mandioca.

Para o estudo do efeito do pH nas hidrólises fosfórica e clorídrica, foram estipuladas três faixas de pH: 1,4, 1,6 e 1,8. As temperaturas de hidrólise utilizadas foram 140(2,6atm), 150(3,7atm) e 160°C (5,1atm).

Para cada série de hidrólises (fosfórica e clorídrica) foram utilizados 250g de amido de mandioca acrescidos de 375 ml de água destilada (solução de amido 40% p/v) e deixadas sob agitação por 30 minutos. Para a titulação de cada faixa de pH, foram utilizados 70ml da solução de amido inicial e soluções de ácido fosfórico e ácido clorídrico, ambas diluídas 1:10 (v/v).

O pH 1,4 na solução de amido (70 ml) foi obtido com a titulação de 5000 $\mu$ l da solução diluída de ácido fosfórico. Para os pH 1,6 e 1,8 os volumes de ácido fosfórico adicionados foram de 2750 $\mu$ l e 1500 $\mu$ l respectivamente.

As soluções de pH 1,4, 1,6 e 1,8, da série clorídrica foram obtidas com a titulação de 1780 $\mu$ l, 1250 $\mu$ l e 870 $\mu$ l respectivamente da solução diluída de ácido clorídrico.

Foram realizadas três hidrólises, uma para cada faixa de temperatura, contendo soluções de 20 ml de cada faixa de pH dos respectivos ácidos. O tempo de residência na temperatura máxima foi de 5 minutos para todas as hidrólises.

Após resfriamento do xarope hidrolisado foram feitas as análises de composição de açúcares, HMF, ácido fórmico e ácido levulínico determinados por CLAE (amostras diluídas 1:200). A concentração de HMF também foi analisada por espectrofotometria (diluição 1:10 da série a 150°C e 1:100 na 160°C).

### 3.3.6 Hidrólise do amido de mandioca para fins de cultivo e produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Foram pesadas 200g de amido de mandioca, aos quais foram adicionados 300mL de água destilada (solução de amido 40% p/v). A mistura foi colocada sob agitação com barra magnética por 30 minutos.

A solução foi titulada até o pH 2,75 utilizando um volume de 1800µL de ácido fosfórico diluído 1:10 (v/v).

A hidrólise foi desenvolvida em reator nas condições de temperatura máxima de 160°C (5 atm), por um período de tempo de 20 minutos. Após resfriamento do xarope hidrolisado foram feitas as análises de açúcares total e redutor.

## 3.4 MICRORGANISMOS

A cepa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* usada foi de referência ATCC 24202. A cepa de *Lactobacillus plantarum* foi de referência CRL 1081 e a cepa de *Pediococcus pentosaceus* CRL 910, ambas cedidas pelo Dr. Oscar Molina, do PROIMI, São Miguel de Tucuman, Argentina.

## 3.5 MEIOS DE CULTURA

### 3.5.1 Meio para manutenção de cepas

A composição do meio de cultura empregado para a manutenção da cepa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi a seguinte:

Glucose	1,0 g
Maltose	1,0 g
Extrato de levedura	0,1g
Água destilada q.s.p.	100 ml

Água destilada q.s.p. 100 ml

Para tornar o meio sólido foram acrescentados 2,0 g de ágar. A esterilização foi feita em autoclave a 121 °C e a 1 atm de pressão durante 20 minutos.

### 3.5.2 Meios do cultivo para inóculo :

#### Meio(1)

Glucose	1,0 g
Maltose	1,0 g
Extrato de levedura	0,1g
Água destilada q.s.p.	100 ml

#### Meio(2)

Hidrolisado fosfórico de amido de mandioca	10mL
Extrato de levedura	0,1 g
Manipueira	0.1g
Água destilada q.s.p.	100mL

O pH foi ajustado para 6,0 com solução de hidróxido de amônia 10% (v/v).

Meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) para cultivo dos microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *pediococcus pentosaceus*

caseína peptona	1,0g
extrato de carne	1,0g
extrato de levedura	0,5g
glucose	2,0 g
tween 80	0,1g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
acetato de sódio	0,5g
citrato de amônia	0,2g

sulfato de magnésio	0,02g
sulfato de manganês	0,05g
água destilada q.s.p.	100ml

O pH foi ajustado para 6,2 a 6,5 com solução de hidróxido de amônia 10%.

### 3.6 PREPARO DO INÓCULO

Células de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivadas em meio de manutenção, com auxílio de uma alça, foram transferidas para Erlenmeyer de 125mL contendo meio líquido para inóculo, incubadas em agitador rotatório a 200 rpm e 22°C . Após período de 36 a 48 horas, a biomassa celular foi centrifugada a 8.000 rpm durante 5 minutos, descartado o sobrenadante e as células ressuspendidas em solução salina 0.9%. Com auxílio de uma pipeta estéril foi transferido para frasco contendo 25mL de água destilada um volume de suspensão de modo a obter uma densidade ótica (DO) entre 0,15 a 0,2 de absorbância a 650nm. Estabelecido o volume de suspensão apropriado as células foram transferidas para o meio de cultivo.

### 3.7 CULTIVO DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM HIDROLISADOS FOSFÓRICOS DE AMIDO DE MANDIOCA (HFAM)

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25 ml de meio de cultura, (relação ar: meio aproximadamente 5:1), sendo o meio esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos e inoculados assepticamente em câmara de fluxo laminar, de modo a obter A650nm final de 0,2 – 0,25. Os cultivos foram incubados e mantidos em agitador rotatório a 200rpm e temperatura 22°C. A cada intervalo de 24 horas foram retiradas alíquotas para análises de açúcar redutor e produção de biomassa.

Após interrupção do cultivo, o meio foi centrifugado, e o precipitado de células foi para liofilização as células liofilizadas para determinação de biomassa e extração de astaxantina e o meio sobrenadante foi analisado quanto aos açúcares redutores e totais.

### 3.7.1 Determinação da influência do álcali utilizado na neutralização do HFAM na produção celular e de astaxantina em cultivos de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Para verificar a influência dos íons amônio, potássio, sódio e cálcio, utilizados na neutralização do hidrolisado fosfórico, sobre o crescimento e produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, foram utilizados HFAM pH 2,0 obtidos a 152°C por 10 min (item 3.3.3) na concentração de 10% (v/v), complementado com 0,2% (p/v) de extrato de levedura. Os valores de pH foram corrigidos para 6,0 utilizando respectivamente hidróxido de amônio diluído 1:10 (v/v), hidróxido de potássio 0,5mol/l, hidróxido de sódio 0,5mol/l e solução saturada de hidróxido de cálcio.

A taxa de inoculação nos cultivos foi correspondente à densidade ótica de 0,2 lida em espectrofotômetro a 650nm. Os cultivos foram realizados em duplicatas e interrompidos após 120 horas.

### 3.7.2 Efeito do hidrolisado no cultivo e na produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Para este experimento foram utilizados os HFAM das seguintes hidrólises:

- a) pH 2,0 – 2,5 – 2,75 e 3,0 , temperatura 160°C e tempo de 20 min. (ítem 3.3.4);
- b) pH 2,0 – 2,5 e 3,0, temperatura 176°C e tempo de 15 min. (item 3.3.4)

Todos os HFAM foram utilizados na concentração de 10 % (v/v) e corrigidos para pH 6,0 com hidróxido de potássio 0,5M.

Para minimizar o efeito da degradação do hidrolisado mais drástico, pH 2,0 do item 3.3.4, 176°C, foram realizados mais dois cultivos :

Primeiro foram acrescentados 100 mg de carvão ativo numa solução de 12,2 ml contendo o hidrolisado diluído 1:5 com água destilada, agitado intensamente, e filtrado em papel de filtro quantitativo, para então, ser utilizado nos procedimentos fermentativos.

No segundo procedimento, em 2,2 ml de hidrolisado foi adicionado o mesmo volume de acetato de etila, agitado vigorosamente e centrifugado . A fase superior, contendo acetato de etila foi separada. A operação de extração foi repetida mais uma vez, juntando-se as fases de acetato de etila. O hidrolisado após extração com acetato de etila foi utilizado para procedimentos fermentativos .

Para maximizar o efeito degradativo nos hidrolisados foi feito um cultivo utilizando o hidrolisado mais drástico (pH 2,0 176°C), acrescido do produto de extração da fase do acetato de etila do cultivo similar. O acetato de etila foi evaporado em placa de Petri e a substância residual dissolvida no próprio meio de cultivo.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado para todos os cultivos o extrato de levedura a 0,1g%. O tempo de cultivo foi de 144 horas.

### 3.7.3 Efeito da suplementação dos hidrolisados fosfóricos de amido de mandioca com diferentes fontes de nitrogênio

#### 3.7.3.1 complementado com extrato de levedura (hidrólises A e B)

##### Experimento A

O HFAM obtido da hidrólise a pH 2,0, 152°C e 10 minutos (item 3.3.3) foi utilizado como fonte de carbono nos cultivos na concentração final de 9%. O pH foi ajustado para 6,0 com hidróxido de potássio 0,5M. e preparados os seguintes cultivos suplementados com diferentes fontes de nitrogênio:

- a) peptona 0,05%
- b) manipueira desidratada 0,05%
- c) uréia 0,05%
- d) farinha de soja 0,05%
- e) caseína hidrolisada 0,05%
- f) TSB (caldo de soja tratado com tripsina produzida pela Hoffmann-La Roche ) 0,05%
- g) triptofano, cisteína e tirosina (0,0163% cada x 3 = 0,05%)
- h) ácido glutâmico + glicina + asparagina + alanina (0,0125% cada x 4 = 0,05%)

Para facilitar o crescimento da levedura, foram acrescentados uniformemente 0,05% de extrato de levedura em todos os meios, totalizando 0,1% de fonte de nitrogênio em cada cultivo.

A taxa de inoculação foi correspondente à densidade ótica de 0,2 a 650nm. O cultivo foi interrompido após 96 horas.

### Experimento B

Nestes cultivos foi utilizado o HFAM pH 2,75/160°C (item 3.3.4) na concentração de 10% v/v, neutralizado com uma solução contendo uma mistura de hidróxidos de amônia (10%), potássio (0,5M), sódio (0,5M) e cálcio (saturada) até o pH 6,0.

Os seguintes cultivos foram preparados com diferentes fontes de nitrogênio:

- a) (-) nenhuma suplementação com nitrogênio (controle do hidrolisado)
- b) extrato de levedura 0,05% (controle do extrato de levedura)

- c) extrato de levedura 0,05% + 25µl do complexo vitamínico Centrum®
- d) extrato de levedura 0,05% + ácido glutâmico 0,025% + glicina 0,025%
- e) extrato de levedura 0,05% + asparagina 0,025 + alanina 0,025%
- f) extrato de levedura 0,05% + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05%
- g) extrato de levedura 0,05% + cisteína 0,025% + tirosina 0,025%
- h) extrato de levedura 0,05% + KNO<sub>3</sub> 0,05%
- i) extrato de levedura 0,05% + triptofano 0,025% e metionina 0,025%
- j) extrato de levedura 0,05% + manipueira 0,05%
- k) extrato de levedura 0,05% + manipueira hidrolisada 0,05% (hidrólise com a enzima trypsin por 48h)
- l) extrato de levedura 0,05% + uréia 0,05%
- m) extrato de levedura 0,05% + uréia 0,05% + manipueira 0,05%
- n) extrato de levedura 0,05% + citrato de sódio 0,2%
- o) extrato de levedura 0,05% + soja 0,05% + caseína 0,05%
- p) extrato de levedura 0,05% + suco de cítricos comercial Tampico 1ml + proteína do soro do leite 0,1% (precipitado com etanol 2 volumes)

A taxa de inoculação foi correspondente à densidade ótica de 0,2 a 650nm. O cultivo foi interrompido após 120 horas.

### 3.7.3.2 Sem complementação com extrato de levedura

O HFAM (item 3.3.6) foi utilizado nestes cultivos na concentração de 16%. O pH foi corrigido para 6,0 com uma solução contendo mistura de hidróxidos de amônia (10%), potássio (0,5M) , sódio (0,5M) e cálcio (saturada).

Os seguintes meios de cultivos foram elaborados com as diferentes proporções e fontes de nitrogênio:

(-) → somente hidrolisado, sem suplementação de N

Y1 → extrato de levedura 0,1%

Y2 → extrato de levedura 0,15%

Y3 → extrato de levedura 0,2%

M1 → manipueira 0,1%

M2 → manipueira 0,15%

M3 → manipueira 0,2%

N1 →  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%

N2 →  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,15%

N3 →  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%

Y/M → extrato de levedura 0,075% + manipueira 0,075%

Y/N → extrato de levedura 0,075% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,075%

M/N → manipueira 0,075% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,075%

Y/M/N → extrato de levedura 0,05% + manipueira 0,05% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05%

A taxa de inoculação foi correspondente a densidade ótica de 0,2 a 650nm. O cultivo foi interrompido após 120 horas.

#### 3.7.4 Otimização do meio de cultura para produção celular e astaxantinogênese pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Com o objetivo de determinar a melhor composição do meio de fermentação para produção de biomassa e de astaxantina pela *Xanthophyllomyces*, foram realizados dois planejamentos experimentais estatísticos, com análise de dados pelo programa "Statistica " versão 5.

O efeito das concentrações das fontes de nitrogênio (manipueira e nitrato de amônio) e da taxa de inoculação dos meios de cultura, foi estudado utilizando um planejamento experimental, do tipo Box-Behnken, (3 fatores e 15 cultivos, sendo 3 pontos centrais).

Os valores mínimo (-1), central (0) e máximo(+1) para cada fator utilizado foram:

manipueira desidratada → 0,15 – 0,25 e 0,35%

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  → 0,02 – 0,04 e 0,06%

taxa de inoculação ( $A_{650\text{nm}}$ ) → 0,1 – 0,2 e 0,3

A fonte de carbono utilizada foi o HFAM pH 2,75/160°C (item 3.3.6) na concentração de 16%. O pH foi ajustado para 6,0 com uma solução contendo mistura de hidróxidos de amônia, potássio, sódio e cálcio. Os cultivos foram interrompidos com 120 horas.

No segundo experimento foi feito uma otimização das concentrações do HFAM pH2,75/160°C (item 3.3.6) e da manipueira, utilizando um planejamento experimental do tipo  $3^2$  completo com nove experimentos.

Os valores mínimo (-1), médio(0) e máximo(+1) utilizados na matriz experimental para cada fator, foram respectivamente de 0,15, 0,25 e 0,35% para a concentração da manipueira e 8, 12 e 16% para o HFAM . Os cultivos foram interrompidos em 120 horas.

### 3.7.5 Efeito do pH no crescimento e produção de astaxantina da *Xanthophyllomyces dendrorhous*

No estudo da influência do pH, foram usados como fonte de carbono o HFAM - pH2,75/160°C (item 3.3.6) a 7,5% (v/v). Com relação a suplementação da fonte de nitrogênio duas séries foram realizadas. Em uma das séries foi utilizado apenas extrato de levedura 0,1% e na outra série, manipueira 0,25% e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05%.

Os valores de pH dos meios de cultura foram ajustados para 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 com solução de hidróxido de potássio 0,5mol/l. As fermentações foram interrompidas com 120 horas.

### 3.7.6 Efeito do HMF no crescimento e produção de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Estes experimentos foram realizados utilizando como fonte de carbono o HFAM - pH2,75/160°C (item 3.3.6) a 7,5% v/v, suplementado com manipueira 0,25 g% e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05 g%. O pH foi corrigido para 6,0 com solução de hidróxido de potássio 0,5M.

Para verificar o efeito do HMF no metabolismo da levedura, foram adicionados nos meios de cultivos 25, 50 e 100 µl de uma solução etanólica de HMF a 40mg/ml . Dois cultivos controle foram feitos sem acréscimo de HMF. Todos os meios tiveram seus volumes de etanol normalizados. Os cultivos foram interrompidos em 120 horas.

### 3.7.7 Variação do crescimento e astaxantinogênese em *Xanthophyllomyces dendrorhous* em função do tempo de cultivo.

Para este experimento foram utilizados Erlenmeyers de 125ml, contendo 25 ml de HFAM - pH2,75/160°C (item 3.3.6) numa concentração de 8% (v/v) , suplementados com manipueira 0,25g% e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05g%. O pH foi corrigido para 6,0 com solução de hidróxido de amônio 1M.

A quantidade de inóculo introduzida nos cultivos foi correspondente a densidade ótica de 0,2 a 650nm. A cada período de 24 horas foi interrompido um cultivo e sua duplicata, até o tempo final de 144 horas.

### 3.7.8 Comparação no crescimento e astaxantinogênese dos cultivos de *Xanthophyllomyces* realizados com HFAM em frascos de 125ml e 250ml (influência da taxa de oxigenação)

Para verificar se diferentes condições de aeração apresentam efeito na produção de astaxantina e crescimento celular, um cultivo em duplicata foi feito junto com a série de cultivos do experimento anterior (item 3.7.7), substituindo apenas o Erlenmeyer de 125ml por outro de 250ml, mantendo o volume padrão de 25 ml adotado nos demais cultivos

Este cultivo foi interrompido em 120 horas e comparado com o cultivo simultâneo, realizado em Erlenmeyer de 125ml .

### 3.7.9 Comparação entre diferentes HFAM no crescimento e astaxantinogênese em *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Este experimento foi feito com a finalidade de comparar diferentes HFAM suplementados com manipueira e nitrato de amônia. Os HFAM obtidas da hidrólise a pH1,5 e 1, 75 e temperatura de 152°C (item 3.3.3) e HFAM da hidrólise pH 2,75 a 160°C( item 3.3.6), foram diluídos a 8% v/v e suplementados com manipueira 0,25g% e nitrato de amônio 0,05g%. O pH dos cultivos foi corrigido para 6,0 com hidróxido de amônia 1M. A taxa de inoculação introduzida nos cultivos foi correspondente a densidade ótica de 0,2 a 650nm. Ao final de 120 horas, os cultivos foram interrompidos e analisados. Os experimentos foram feitos em duplicatas.

### 3.8 SEPARAÇÃO E SECAGEM DAS CÉLULAS

A biomassa celular, contida no final dos cultivos, foi separada por centrifugação a 8.000 rpm por 5 minutos, em seguida as células foram lavadas rapidamente duas vezes com água destilada, centrifugadas para separação do sobrenadante. As células separadas foram congeladas e desidratadas em liofilizador, até peso constante. Após a determinação do peso seco as células dos cultivos com a *Xanthophyllomyces dendrorhous* foram submetidas ao processo de extração de astaxantina.

### 3.9 EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA

A um tubo de ensaio, contendo as células secas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (=100 mg), provenientes da separação e secagem descritas no item anterior (item 3.8), foram adicionados 2ml de dimetilsulfóxido (DMSO). O tubo foi agitado vigorosamente e deixado em repouso por 30 minutos, a seguir, foram acrescentados 6 ml de acetona. A suspensão foi homogenizada e centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e recolhido em um tubo e no sedimento foi repetido o processo de extração anterior, reunindo-se os sobrenadantes. Aos sobrenadantes reunidos foram adicionados 10ml de solução aquosa de cloreto de sódio 20% p/v e 10ml de éter de petróleo. Agitou-se o tubo vigorosamente e as fases foram separadas. Este processo foi repetido duas vezes, empregando-se 5ml de éter de petróleo. As fases etéreas foram reunidas, desidratadas por filtração através de sulfato de sódio anidro, transferidas para um balão volumétrico de 25ml e o volume foi completado com éter de petróleo. A absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro a 474 nm, contra um "branco" simulando a mesma proporção de organosolventes.

O cálculo da concentração de astaxantina foi feito a partir de dados da literatura (ANDREWES et al., 1976; JOHNSON; LEWIS, 1979), da absorvidade específica para as xantofilas a 474 nm:  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.600$ .

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.600 \quad \text{Solução } 1\text{g}/100\text{ml} - \text{Absorbância} = 1.600$$

$$1\text{g}/100 \text{ ml} - 1.600$$

$$1\mu\text{g}/\text{ml} - 0.16$$

$$X \mu\text{g}/\text{ml} - A_{\text{amostra}}$$

$$X \mu\text{g} - 1 \text{ ml}$$

$$Y \mu\text{g} - 25 \text{ ml}$$

$$Y \mu\text{g} - Z \text{ g de células seca (peso seco)}$$

$$W \mu\text{g} - 1\text{g de célula seca}$$

$$W = \mu\text{g de astaxantina}/\text{grama de célula seca}$$

### 3.10 OBTENÇÃO DE MANIPUEIRA

Aproximadamente 1Kg de raízes de mandioca foram descascadas, cortadas em pedaços e trituradas em água gelada. A mistura foi filtrada em gaze dobrada para separar as fibras e restos de tecido vegetal dos grânulos de amido. A camada de espuma formada juntamente com a água sobrenadante após decantação dos grânulos de amido foram congeladas e liofilizadas para evitar possíveis degradações. Análises de açúcar redutor, açúcar total, determinação de proteína pelo método de biureto e eletroforese, foram feitas para caracterizar a manipueira.

### 3.11 UTILIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS DE AMIDO DE MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO PELAS BACTÉRIAS *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*

Para o cultivo das bactérias *Lactobacillus plantarum* CRL 1081 e *Pediococcus pentosaceus* CRL 910, foi utilizado o meio MRS (item 3.5.2), substituindo a glucose na concentração de 2g% por 2 ml HFAM pH 1,5 e 2,0 (item 3.3.3) resultando na concentração de 8% v/v. O pH foi ajustado para 5,8 com hidróxido de sódio 0,5N.

O inóculo, desenvolvido em meio de mesma composição acrescido de 1,5% de ágar, foi suspenso em solução salina 0,9% estéril. A taxa de inoculação foi de 0,054, correspondente à absorbância a  $A_{650\text{nm}}$  em espectrofotômetro. O cultivo foi desenvolvido anaerobicamente em estufa microbiológica a 37°C durante um período de tempo de 144 horas, sem agitação.

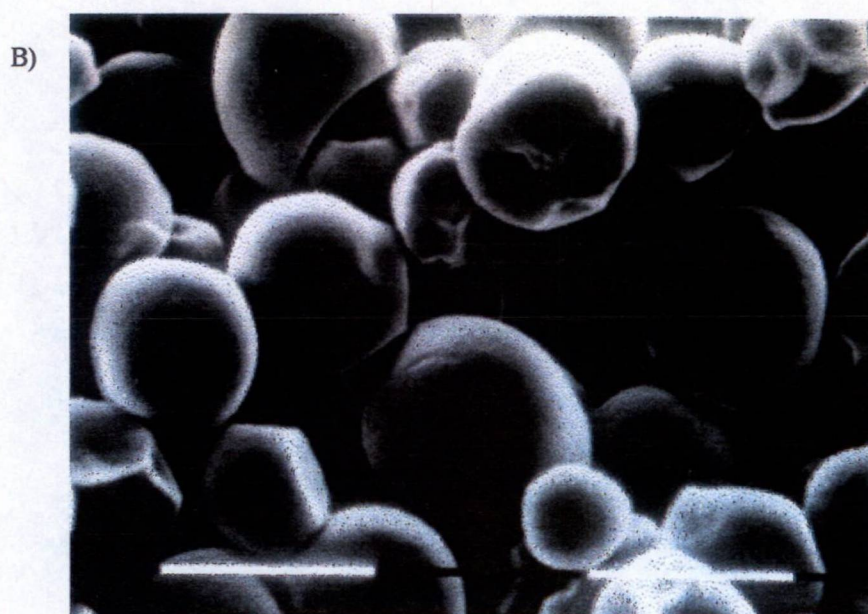
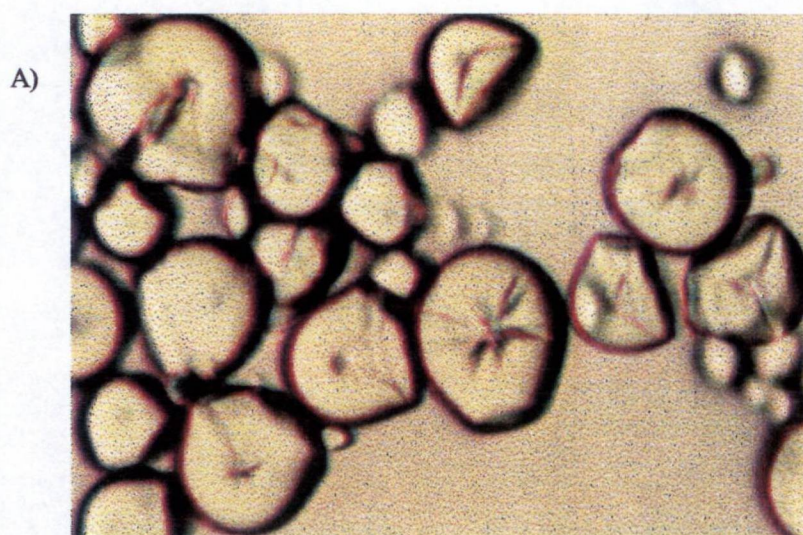
Após interrupção, o cultivo foi centrifugado, as células liofilizadas para determinar biomassa e a fase aquosa analisada por CLAE para determinação do ácido lático.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 HIDRÓLISE DO AMIDO

A forma e o tamanho do grânulo de amido varia conforme a origem vegetal (GUILBOT e MERCIER, 1985). Imagens de microscopia ótica e eletrônica do amido de mandioca, utilizado nas hidrólises ácidas, podem ser vistas na Figura 9.

FIGURA 09 MICROGRAFIA ÓTICA E ELETRÔNICA DOS GRÂNULOS DE AMIDO DE MANDIOCA



A – grânulos de amido, aumento aproximado 500X (MO)

B – grânulos de amido, aumento aproximado de 1500X, microscópio eletrônico.

Os principais fatores que afetam o grau de conversão de uma hidrólise são: densidade do amido, temperatura, concentração de ácido e tempo na temperatura máxima (WHISTLER et al., 1965; BEMILLER e ROBERTS, 1965; TEGGE e RICHTER, 1980; KIM e HAMDY, 1985; BLANCHARD, 1992).

A densidade da solução de amido mais utilizada para as hidrólises corresponde a 22,5° Baume (BLANCHARD, 1992). Este valor corresponde, aproximadamente, a uma solução de amido a 40%, valor adotado como padrão em todas as hidrólises realizadas.

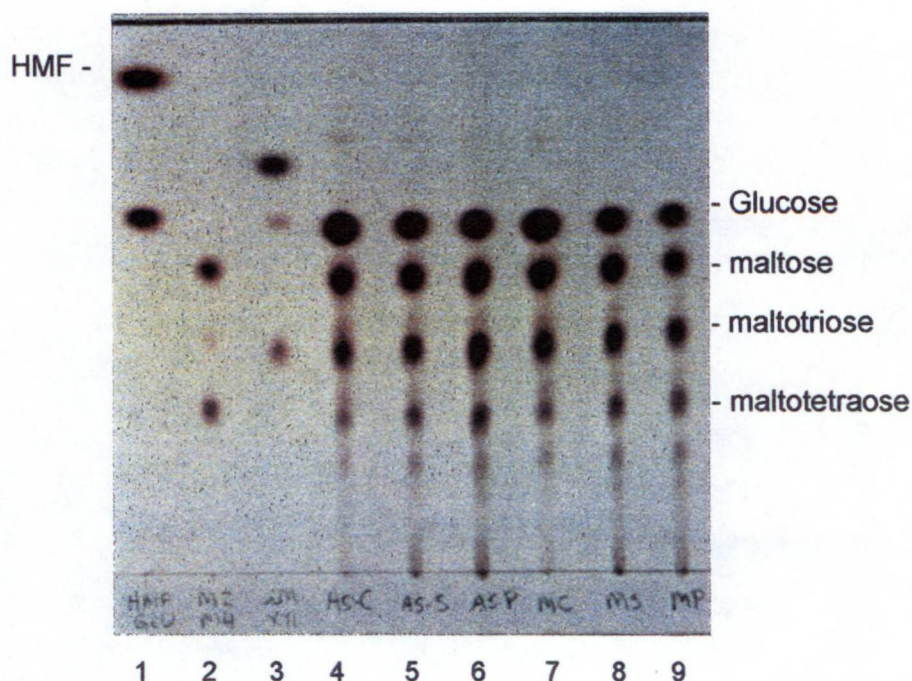
Os aspectos práticos de hidrólises ácidas de amiláceos têm sido muito pouco descritos na literatura. As condições de temperatura, tempo e pH que devem ser adotadas na hidrólise ácida dependem do perfil do hidrolisado desejado. O tipo de ácido também pode fornecer diferentes resultados, como maior ou menor teor de HMF ou dos oligômeros de amido produzidos. O estudo de diferentes tipos de ácidos e de dois tipos de amido vem contribuir no desenvolvimento tecnológico da hidrólise. Além disso, o caso do ácido fosfórico é uma alternativa inovadora e é a maior contribuição desta tese.

#### 4.1.1 Comparativo entre a hidrólise do amido de mandioca e o de milho utilizando HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como agentes catalíticos

O amido de mandioca foi submetido a hidrólise ácida à 152°C (4atm) e 10 min (conforme item 3.3) usando ácido clorídrico, sulfúrico e fosfórico pH 1,75. O amido de milho foi hidrolisado nas mesmas condições para estudo comparativo.

A CCD e os resultados dos densitogramas, mostrados nas figuras 10 e 11, demonstram não existir diferença significativa no perfil de açúcares, composição e distribuição da glucose e oligomaltoses no hidrolisado das duas matérias-primas amiláceas. Do ponto de vista da composição e rendimento do hidrolisado obtido, o amido de mandioca pode então substituir perfeitamente o tradicional amido de milho nos processos de produção de xaropes hidrolisados de amido.

FIGURA 10 - CCD DOS HIDROLISADOS (pH 1,75, 152°C E 10 MIN) CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DOS AMIDOS DE MILHO E MANDIOCA

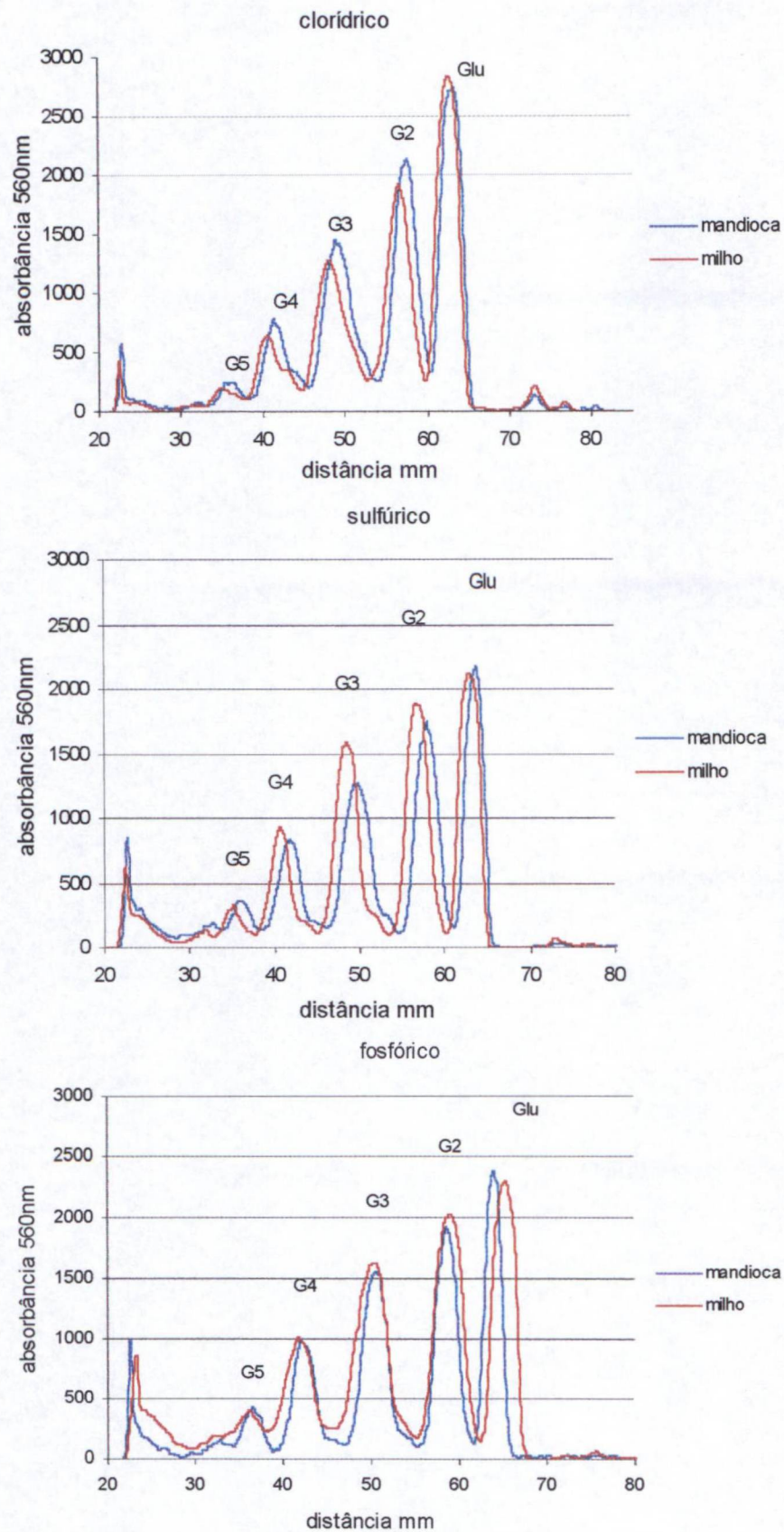


CCD realizada utilizando dois sistemas de eluentes. Primeira corrida, mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:10:5:20:10) e a segunda corrida com a mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:30:5:30:10). Diluição dos hidrolisados 1:10, aplicação das amostras 1µl. Revelação com orcinol.

Legenda das linhas:

- 1 - padrão de glucose e HMF
- 2 - padrão de maltose, maltotriose e maltotetraose
- 3 - padrão de isomaltose, glucose e xilose
- 4 - hidrolisado clorídrico de amido de milho
- 5 - hidrolisado sulfúrico de amido de milho
- 6 - hidrolisado fosfórico de amido de milho
- 7 - hidrolisado clorídrico de amido de mandioca
- 8 - hidrolisado sulfúrico de amido de mandioca
- 9 - hidrolisado fosfórico de amido de mandioca

FIGURA 11 - DENSITOGRAMAS DOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE AMIDO DE MILHO E DE MANDIOCA



Condições de hidrólise: pH 1,75, 152°C e 10 min. Glu (glucose), G2 (maltose) G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose), G5 (maltopentaose)

A estrutura do grânulo de amido depende da maneira como a amilose está associada com a amilopectina, através das pontes de hidrogênio intramoleculares (GUILBOT ; MERCIER; 1985). Embora o amido de mandioca apresente um percentual maior de amilopectina, se comparado ao amido de milho (83% e 72% respectivamente) (GUILBOT; MERCIER, 1985), e segundo SWANSON (1948) e COWIE (1958) a velocidade de hidrólise seja maior na amilopectina do que na amilose, este diferencial na composição do amido da mandioca não se traduziu em vantagens adicionais durante o processo de hidrólise, possivelmente devido à mandioca apresentar uma estrutura do amido ligeiramente mais compacta do que o milho, dificultando um pouco mais a penetrabilidade do ácido no grão de amido e, portanto, anulando a relação favorável amilose: amilopectina da mandioca.

Outros fatores como a variedade do cultivar e o estágio de maturação da cultura utilizada para a fabricação do amido podem modificar o rendimento da hidrólise, além do próprio processo de extração do amido (CABELLO, 2000).

Verificando o potencial de hidrólise de cada ácido, atuando em cada uma das fontes de amido, observa-se que o ácido clorídrico apresentou maior efetividade na formação de glucose, se comparado ao sulfúrico e fosfórico nestas condições do experimento, conforme demonstra a densitometria da Figura 11. Todavia, como ponto negativo do emprego do ácido clorídrico, pode-se observar aumento da formação de produtos de degradação da glucose, substâncias que podem ser visualizadas nos densitogramas (Figura 11) pelos pequenos picos situados ao lado direito do padrão da glucose, na faixa entre 70 e 80 mm de distância da corrida no densitograma.

#### 4.1.1.1 Análise do HMF nos hidrolisados clorídrico, sulfúrico e fosfórico dos amidos de milho e de mandioca.

A qualidade do hidrolisado depende, também, da presença ou não de produtos de degradação, principalmente o HMF. A comparação das hidrólises clorídrica, sulfúrica e fosfórica das duas matérias-primas, milho e mandioca, com relação a formação do HMF, pode ser analisada qualitativamente pela CCD da extração do HMF

dos hidrolisados (Figura 12) e sua respectiva densitometria (Figura 13). Os resultados demonstram que a hidrólise do milho apresentou níveis bem superiores de formação de HMF aos encontrados nos hidrolisados correspondentes de mandioca.

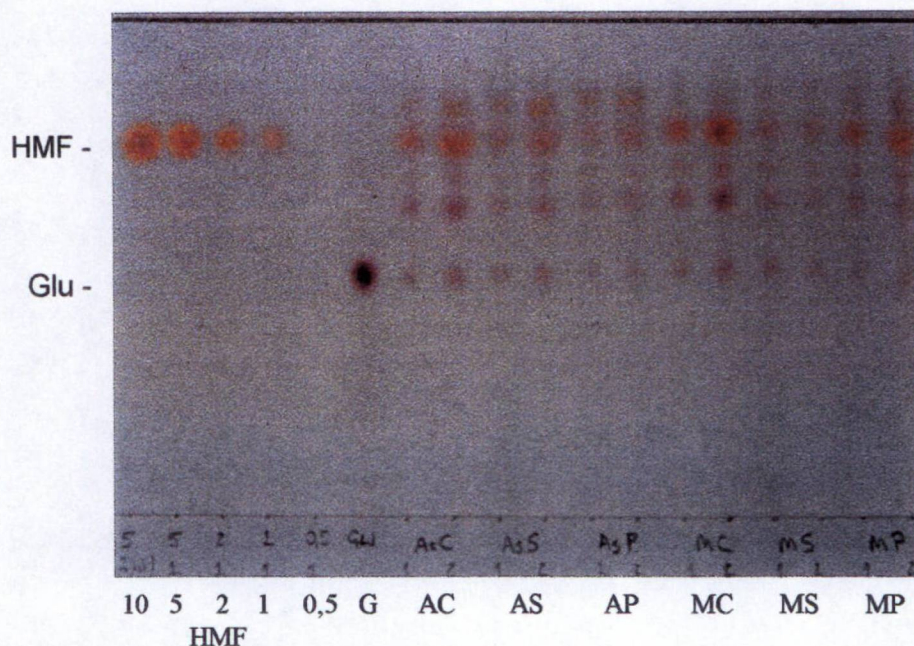
A Figura 14 mostra os espectros das varreduras nos comprimento de onda na faixa de 200 a 350nm das extrações de HMF dos hidrolisados. A região de 283nm apresentou a maior leitura de absorbância e corresponde ao comprimento de onda de maior absorvidade do HMF. As hidrólises clorídricas apresentam níveis mais elevados de HMF do que as hidrólises sulfúrica e fosfórica, como também, nas hidrólises do milho, a formação de HMF foi superior às hidrólises ácidas correspondentes da mandioca .

Outra diferença observada na CCD e nos densitogramas das extrações do HMF é a existência de uma substância, cuja presença é evidenciada mais intensamente nas hidrólises com amido de milho, conforme indicado pela ocorrência de uma banda na região entre 70 a 75 mm do densitograma, independentemente do agente catalítico utilizado, e muito pouco observada no hidrolisado com a mandioca .

A análise quantitativa da formação do HMF nos hidrolisados, realizada por espectrofotometria, Tabela 4, mostra que a formação de HMF no milho nas hidrólises clorídrica, sulfúrica e fosfórica (solução de amido a 40%) ocorrem nas concentrações de 0,261, 0,112 e 0,098 mg/ml respectivamente, enquanto que na mandioca, as hidrólises correspondentes apresentam HMF, nas concentrações de 0,185, 0,065 e 0,075 mg/ml respectivamente, confirmando a presença superior de HMF nos hidrolisados de milho.

Observando a Tabela 4, verifica-se o efeito de cada um dos ácidos na formação do HMF. Nas hidrólises realizadas com HCl, tanto no amido do milho como no amido da mandioca a concentração do HMF foi pelo menos duas vezes superior ao valor encontrado nas hidrólises correspondentes com o ácido sulfúrico e fosfórico.

FIGURA 12 – CCD COMPARATIVA ENTRE AS EXTRAÇÕES COM ACETATO DE ETILA DOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DOS AMIDOS DE MILHO E MANDIOCA (CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE : pH 1,75, 152°C E 10 MIN)



CCD realizada utilizando a mistura de solventes : acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:10:5:20:10). As amostras dos hidrolisados de amido de milho estão diluídas 1:3 e a amostra do hidrolisado clorídrico de amido de mandioca 1:2, aplicação das amostras 1 $\mu$ l e 2 $\mu$ l Revelação com orcinol.

Legenda:

HMF – padrões de hidroximetilfurfural 10, 5, 2, 1 e 0,5 mg/ml, aplicação 1 $\mu$ l

G - padrão de glucose

AC – extração do hidrolisado clorídrico de milho (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

AS – extração do hidrolisado sulfúrico de milho (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

AP – extração do hidrolisado fosfórico de milho (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

MC - extração do hidrolisado clorídrico de mandioca (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

MS - extração do hidrolisado sulfúrico de mandioca (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

MP - extração do hidrolisado fosfórico de mandioca (aplicações 1 e 2  $\mu$ l)

FIGURA 13 - DENSITOMETRIA DA EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DO AMIDO DE MILHO E MANDIOCA (CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE : pH 1,75, 152°C e 10min.)

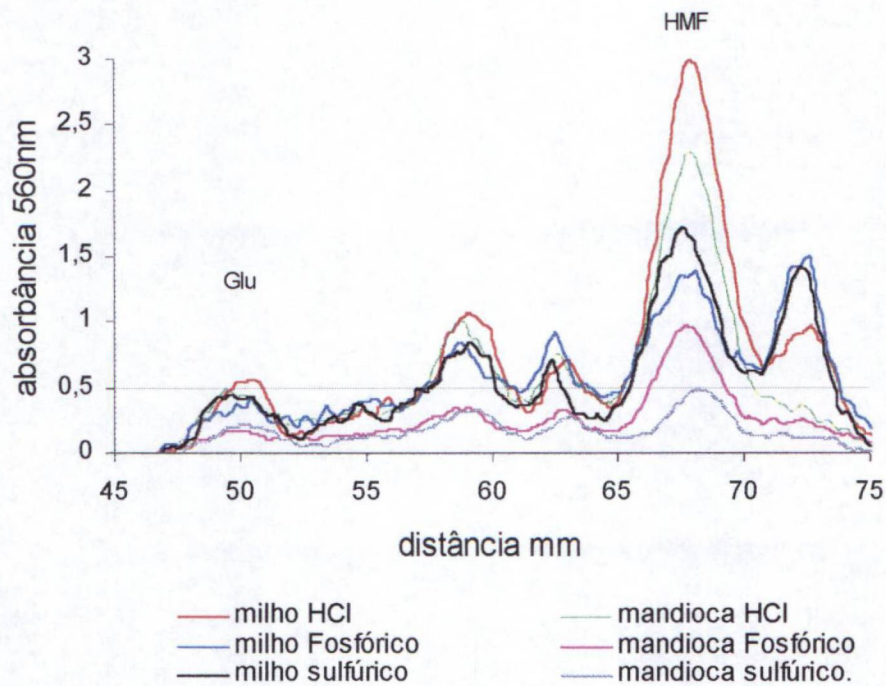


FIGURA 14 - ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA DA EXTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE MILHO E MANDIOCA (CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE : pH 1,75, 152°C e 10min)

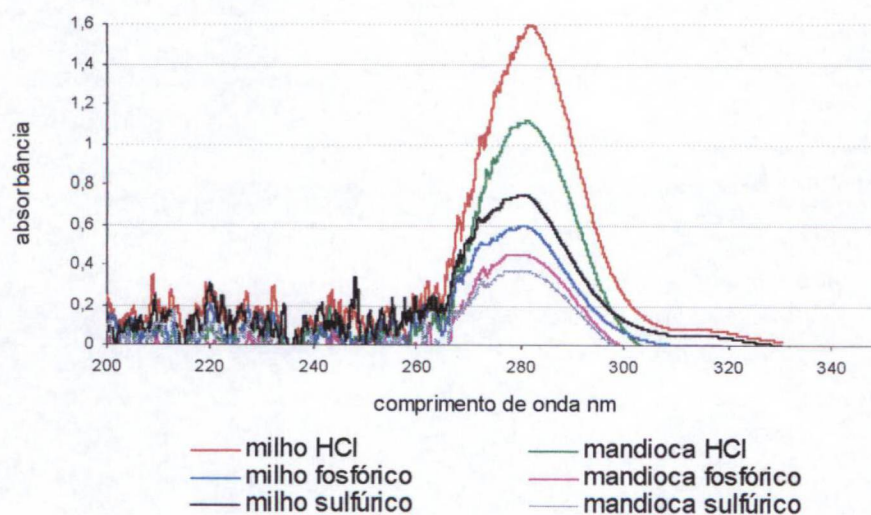


TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE HMF (mg/ml) NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICO, SULFÚRICO E FOSFÓRICO DE MILHO E MANDIOCA (SOLUÇÃO DE AMIDO A 40% p/v), ANALISADOS POR ESPECTROFOTOMETRIA . ( pH 1,75, 152°C e 10 min.)

Fonte	Ácido	HMF (mg/ml)
milho	clorídrico	0,261
milho	sulfúrico	0,112
milho	fosfórico	0,098
mandioca	clorídrico	0,185
mandioca	sulfúrico	0,065
mandioca	fosfórico	0,075

#### 4.1.2 Hidrólise fosfórica do amido de mandioca

##### 4.1.2.1 Efeito do pH e do tempo de residência na hidrólise fosfórica do amido de mandioca a 152 °C (4 atm)

As hidrólises foram realizadas utilizando pH 1,5, 1,75 e 2,0, combinados ao tempo de residência de 5, 10 e 15 minutos, durante a temperatura máxima de hidrólise de 152°C (pressão 4atm).

Baseado nas informações da tabela 5, verifica-se que quanto maior a concentração de ácido na hidrólise, maior é o efeito do aumento do tempo na monomerização do amido.

Nas hidrólises cujas concentrações de ácido fosfórico são maiores, no caso pH 1,5 e 1,75 , a elevação do tempo de 5 para 15 minutos proporcionou um aumento de aproximadamente 30% na formação da glucose e maltose, enquanto na hidrólise com menor concentração do ácido, pH 2,0, o aumento da formação de glucose e maltose não atingiu 20%. Este aumento de rendimento de hidrólise significa aumento da DE do

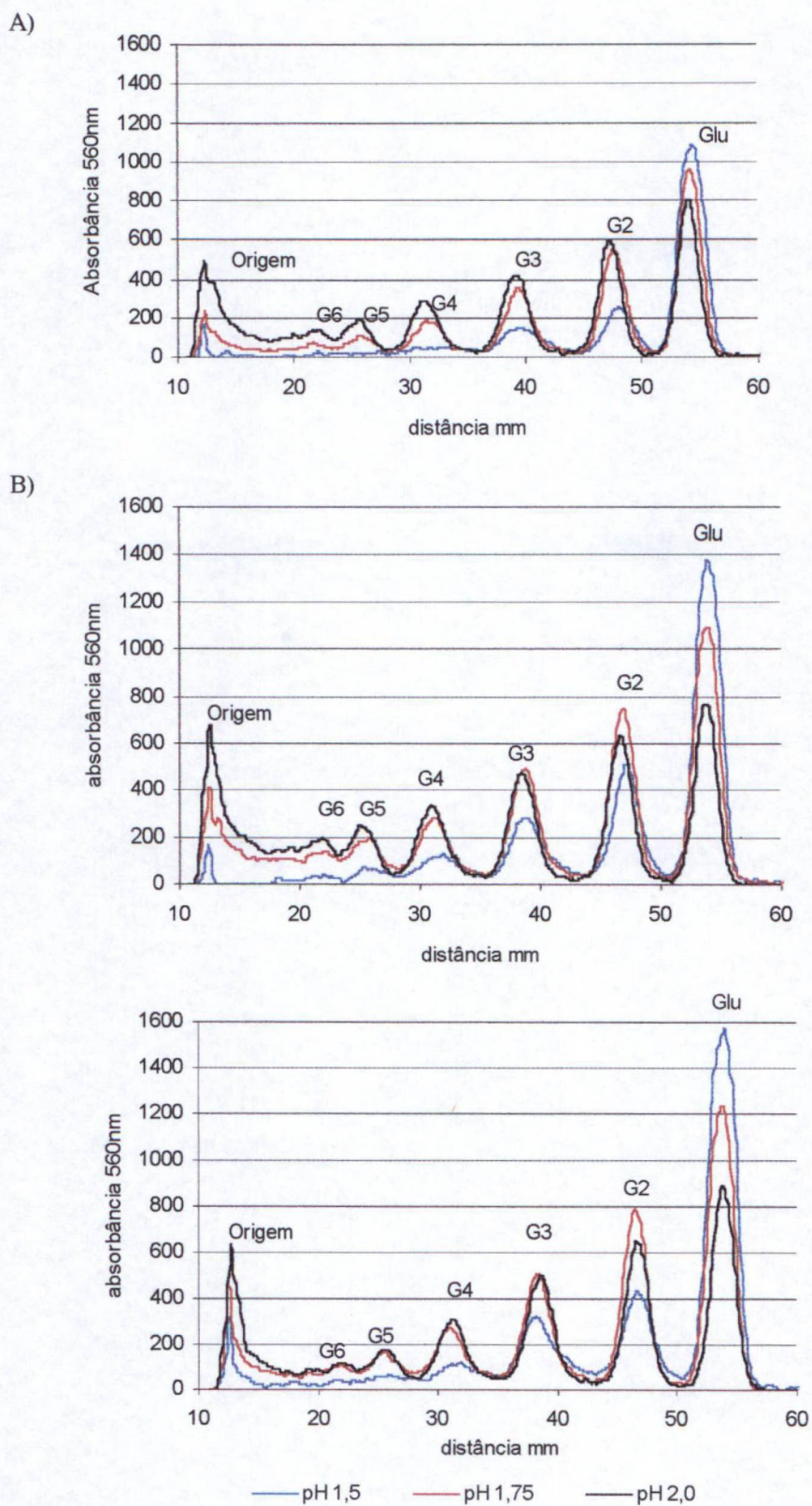
hidrolisado. Enquanto a DE no hidrolisado pH 1,5 aumentou de 40 para 56, no hidrolisado pH 2,0 este aumento foi de 34 para 39.

A Figura 15 mostra os densitogramas do perfil de açúcares dos hidrolisados obtidos em função da variação do tempo e da concentração de ácido na reação de hidrólise. Observa-se o aumento gradativo do pico da glucose nas hidrólises com maior concentração de ácido, à medida que o tempo vai aumentando, enquanto que, na hidrólise no pH 2,0, o pico da glucose permanece praticamente constante ao longo do tempo.

TABELA 5 - EFEITO DO pH E DO TEMPO (MIN) NO PERFIL DOS AÇÚCARES DOS HFAM ( em g%)  
(TEMPERATURA CONSTANTE DE 152°C )

pH	tempo	glucose	maltose	maltotriose	maltotetraose	maltopentaose	maltohexaose	DE
1,5	15	17,37	5,51	5,54	1,05	0,24	1,25	56
	10	14,40	5,87	4,52	1,47	0,09	0,00	48
	5	12,88	3,78	2,92	0,19	0,00	0,23	40
1,75	15	13,03	8,19	5,85	2,77	1,02	1,95	50
	10	11,49	8,04	5,78	2,49	1,11	0,76	46
	5	8,96	5,57	3,99	2,07	0,71	1,33	35
2,0	15	8,26	6,56	5,75	3,55	1,96	6,00	39
	10	7,06	6,23	5,25	3,95	2,56	7,51	36
	5	6,89	5,70	4,74	3,31	1,76	7,33	34

FIGURA 15 - PERFIS DENSITOMÉTRICOS DOS HFAM OBTIDOS A 152°C (4atm). EFEITO DO pH E DO TEMPO DE HIDRÓLISE. GRÁFICOS: A) 5min, B)10 min e C) 15min



Glu (glucose), G2 (maltose) G3( maltotriose), G4(maltotetraose), G5 (maltopentaose), G6 (maltohexaose). Origem (linha de aplicação das amostras)

#### 4.1.2.2 Comparação entre HFAM obtidos com diferentes pH a 176°C (8 atm) e tempo de 15 min e a 160°C (5 atm) por 20min.

De acordo com FRENCH (1984) os grânulos de amido são degradados pela ação de uma solução aquosa de ácido clorídrico a 7,5% em temperatura ambiente por 7 dias ou a 40°C por 3 dias. As clivagens podem ocorrer em certas macromoléculas de amido, mas não ocorre formação significativa de moléculas de baixo peso molecular ou material solúvel.

A baixa reatividade do grânulo de amido pode ter origem da incapacidade do íon hidrogênio em alcançar as ligações glicosídicas nas regiões cristalinas. A elevação da temperatura de hidrólise desestabiliza as ligações intramoleculares da região cristalina, facilitando a difusão do ácido na molécula e, conseqüentemente, favorecendo a eficiência de hidrólise.

CALENTINE citado por LORENZ e JOHNSON (1972) estudou o efeito de temperaturas elevadas, entre 150 e 250°C, na hidrólise por uma hora de uma suspensão de amido a 1% em soluções aquosas com pH neutro. Glucose e outros açúcares foram identificados como produtos da hidrólise, além de furfural e HMF. Para LORENZ e JOHNSON, a coloração da solução escurece à medida que a temperatura da reação aumenta.

As hidrólises do amido de mandioca realizada nos pH 1,5 e 1,75 nos tempos de 10 e 15 minutos (experimento anterior) resultaram em xaropes com DE variando na faixa de 40 a 56, hidrolisados amplamente comercializado pelas indústrias processadoras de amido.

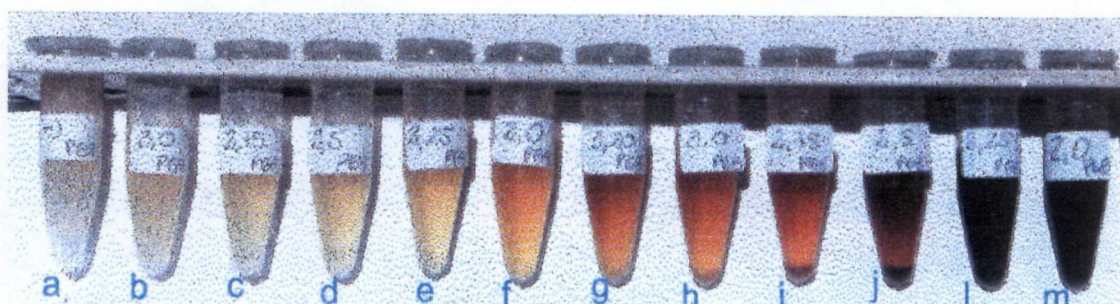
Como estratégia para produzir hidrolisados com DE mais elevado, ou seja, aumentar a quantidade de açúcares fermentescíveis, como glucose e maltose, foram realizadas hidrólises mais drásticas. Na primeira série de hidrólises de nosso estudo, elevou-se consideravelmente a condição de temperatura para 176°C durante 15 minutos (item 3.3.4). Na segunda série de hidrólises, a temperatura teve sua elevação menos acentuada, para 160°C, porém, o tempo de residência no reator foi ampliado para 20 minutos (item 3.3.4). Em ambas as séries de hidrólise, optou-se por utilizar

faixas mais diluídas de ácido : pH 2,0, 2,25, 2,5, 2,75, 3,0 e 3,2 (pH 3,2 somente para hidrólise a 176°C) para compensar o aumento da temperatura e o tempo mais longo de hidrólise .

A primeira observação já pode ser verificada no aspecto visual através da fotografia dos hidrolisados mostrado na Figura 16. Na série da hidrólise realizada a temperatura 176°C/8atm e tempo de 15 minutos (letras g até m), o efeito da temperatura provocou intensa formação de produtos de cor (caramelização), além da carbonização de parte do amido, o que pode ser observado como sedimento no fundo do tubo Eppendorf.

Nas hidrólises realizadas na temperatura de 160°C/5atm (letras a até f da Figura 16), o efeito da “caramelização” foi bem menos intenso, mesmo se compararmos a hidrólise de menor concentração de ácido, (pH 3,2) e maior temperatura (176°C), com o de maior concentração de ácido pH 2,0 da hidrólise 160°C. Além do mais, não foi possível visualizar a presença de amido carbonizado, como sedimento no fundo dos tubos nos HFAM obtidos a 160°C, como ocorreram nas hidrólises a 176°C. Para fins de interpretação dos fenômenos de geração de cor, há que se ter em conta que, não obstante a lavagem dos grânulos de amido para fins de feculagem, parte da matéria protéica persiste como residual no amido feculado.

FIGURA 16 - FOTOGRAFIA DOS HFAM OBTIDOS NAS CONDIÇÕES COMPARATIVAS DE HIDRÓLISE A 176°C(8atm) / 15 min. OU A 160°C(5atm) / 20 min.



Legenda : (condições de hidrólise)

> letras a até f série → 160°C / 20 minutos

a) amido sem adição de ácido,

b) pH 3,0 - c) pH 2,75 - d) pH 2,5 - e) pH 2,25 - f) pH 2,0

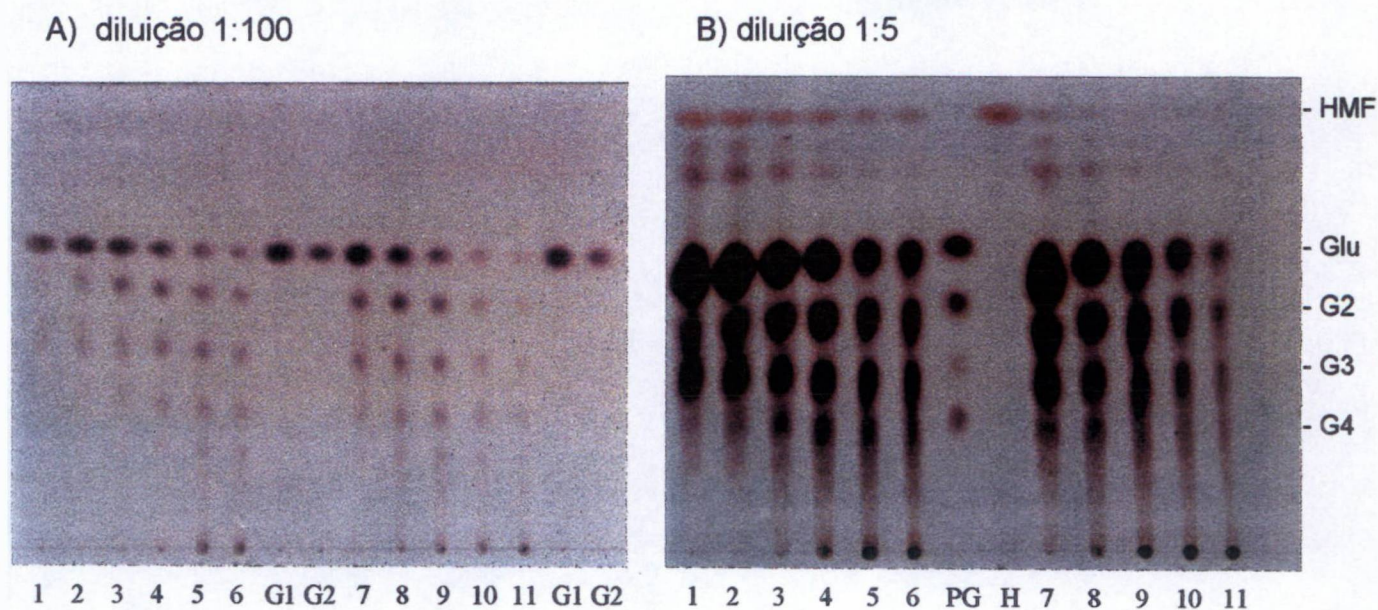
> letras g até m série → 176°C / 15 minutos

g) pH 3,20 h) pH 3,0 i) pH 2,75 j) pH 2,5 l) pH 2,25 m) pH 2,0

Esta proteína, intacta e a nível de resíduos livres ou parcialmente co-hidrolisada (gerando novos sítios  $\text{RNH}_2$  livres), é substrato de condensação com o C-1 redutor da glucose através da conhecida reação de Maillard (BLANCHARD, 1992). Os derivados glicopeptídicos são coloridos e portadores de odor, o que justifica os fenômenos observados.

No primeiro tubo (letra a, Figura 16), sem adição de ácido, ocorreu apenas a gelatinização do amido, não houve formação aparente de hidrolisado.

FIGURA 17 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS HIDRÓLISES FOSFÓRICAS DO AMIDO DE MANDIOCA NAS CONDIÇÕES DE 176°C (8 ATM) 15 min, OU DE 160°C (5ATM) 20min



CCD realizada utilizando dois sistemas de eluentes. Primeira corrida, mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:10:5:20:10) e a segunda corrida com a mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:30:5:30:10). Revelação com orcinol.

Legenda da figura:

1, 2, 3, 4, 5 e 6 → hidrólise a 176°C (8atm) e tempo de 15 min. pH 2,0 – 2,25 – 2,5 – 2,75 – 3,0 e 3,2 respectivamente. Aplicação das amostras 1 $\mu$ l.

7, 8, 9, 10, e 11 → hidrólise a 160°C (5atm) e tempo de 20 min. pH 2,0 – 2,25 – 2,5 – 2,75 e 3,0 respectivamente. Aplicação das amostras 1 $\mu$ l

G1 → padrão de glucose 2mg/ml. Aplicação 1 $\mu$ l

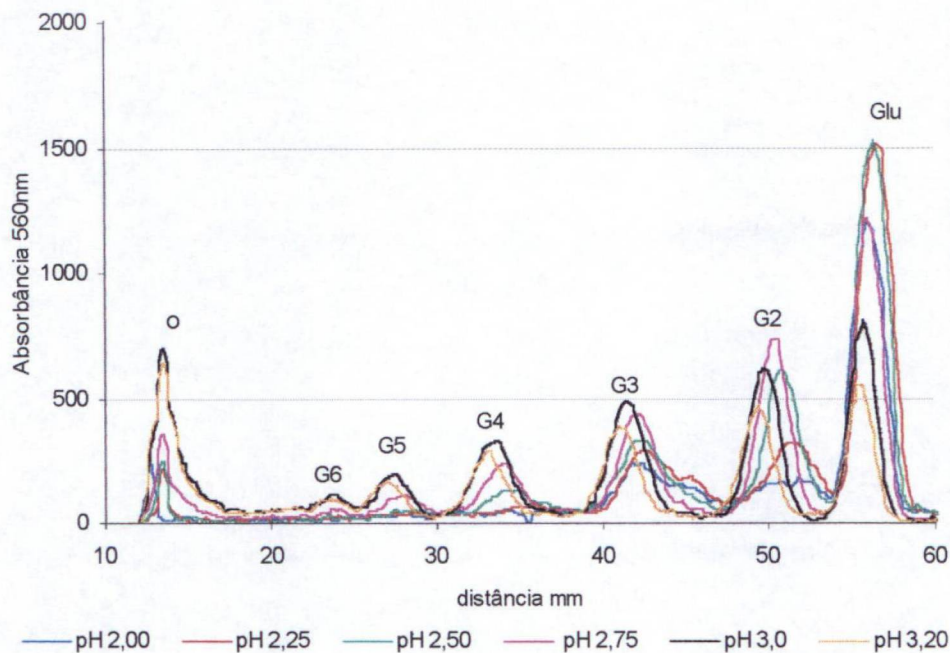
G2 → padrão de glucose 1mg/ml. Aplicação 1 $\mu$ l

PG → padrões de glucose (acima), maltose, maltotriose e maltotetraose (dispostos de cima para baixo)

H → padrão de HMF

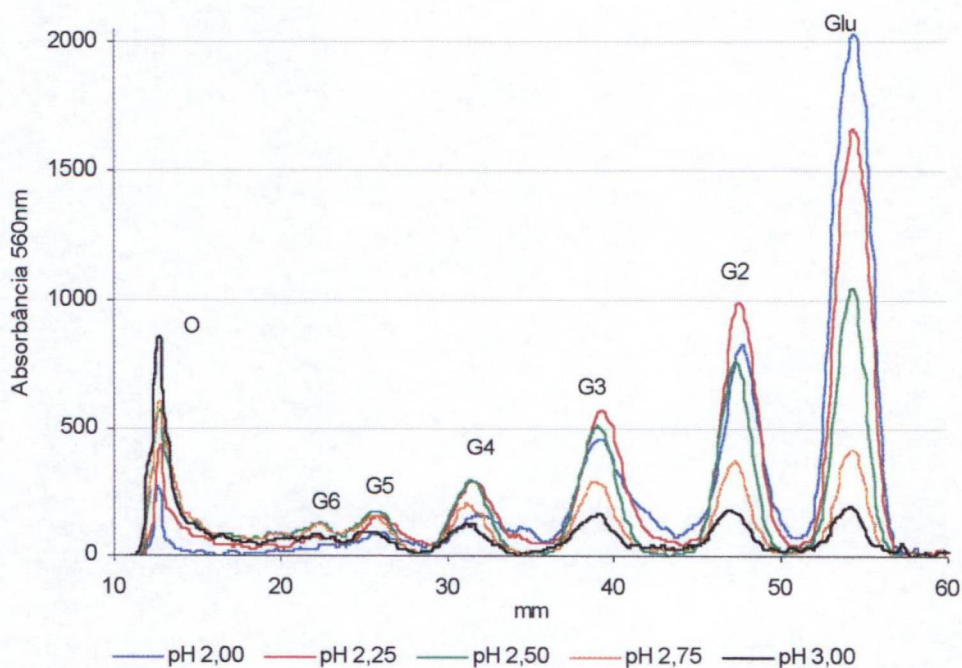
FIGURA 18 - DENSITOGRAMA DO PERFIL DE AÇÚCARES DOS HFAM NA CONDIÇÃO DE 176°C (8atm)

E 15 min.



Glu (glucose), G2(maltose), G3(maltotriose), G4(maltotetraose), G5(maltopentaose) e G6 (maltohexaose), O (origem / linha de aplicação das amostras).

FIGURA 19 - DENSITOGRAMA DO PERFIL DE AÇÚCARES DOS HFAM NA CONDIÇÃO DE 160°C(5atm) E 20 min.



Glu (glucose), G2(maltose), G3(maltotriose), G4(maltotetraose), G5(maltopentaose) e G6 (maltohexaose), O (origem / linha de aplicação das amostras).

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DO PERFIL DOS AÇÚCARES (g%) DOS HFAM OBTIDOS POR HIDRÓLISES 176°C(8atm) 15min E 160°C(5atm) 20min.

Hidrolisado	Glu	G2	G3	G4	G5	G6+	DE
pH 2,0	22,22	9,55	7,06	2,12	1	0,5	68,5
pH 2,25	16,63	10,22	7,4	3,37	1,63	2,6	58,7
<b>160°C</b>							
pH 2,5	9,19	7,05	5,24	2,83	1,46	5,2	37,1
<b>(5atm)</b>							
pH 2,75	3,48	3,39	3,08	1,77	1,29	5,5	17,8
pH 3,0	1,75	1,66	1,56	1	0,61	6	10,2
pH 2,0	12,06	3,41	4,55	0,13	0	0,37	36,5
pH 2,25	14,79	4,88	5,27	0,88	0,34	0,16	45,9
<b>176°C</b>							
pH 2,5	14,65	6,78	5,7	1,85	0	0,39	48,6
<b>(8atm)</b>							
pH 2,75	10,35	6,95	5,98	2,3	0,47	1,7	39,3
pH 3,0	6,23	6,1	4,96	2,71	0,9	3,88	28,1
pH 3,2	4,09	4,86	4,56	2,8	1,24	5,48	21,4

Legendas : Glu (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose), G5 (maltopentaose) e G6+ (maltohexaose e oligomaltoses maiores). Análise por densitometria das CCD. Açúcares expressos em g%.

O perfil da densitometria da CCD (Figura 17) da hidrólise realizada a 176°C é mostrado na Figura 18 e na Tabela 6. Pode-se notar que na condição mais drástica de hidrólise, no pH 2,0, o perfil de carboidratos do hidrolisado apresenta quantidades menores de glucose (Glu), maltose (G2) e maltotriose (G3), valores de 12,06, 3,41 e 4,55 g% respectivamente, se comparado com uma hidrólise com menor concentração de ácido, pH 2,5, contendo 14,65, 6,78 e 5,7 g% dos açúcares correspondentes.

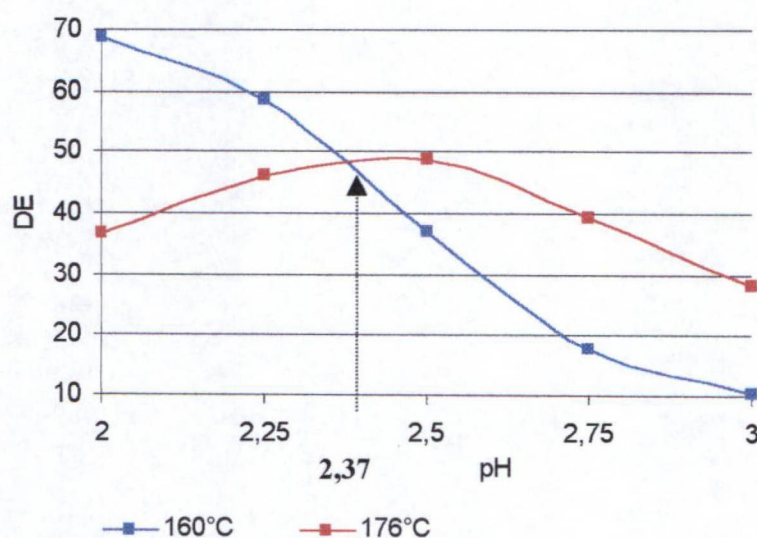
Esta perda de rendimento global, provocada pela carbonização e degradação dos açúcares, afetou os valores da DE. Para a hidrólise pH 2,0, a DE resultante nesta temperatura foi de 36,5 contra 48,6 para a amostra que apresentou a melhor taxa de hidrólise nesta temperatura de hidrólise, a de pH 2,5.

Nas hidrólises da série a 176°C, as reações que envolveram concentrações de ácido mais diluídas, acima de pH 2,5, a hidrólise foi menos eficiente, enquanto que, nas hidrólises cujas concentrações de ácido eram superiores, pH abaixo de 2,5, o efeito da temperatura associado à concentração de ácido foi mais destrutivo para o amido, ocorrendo algum grau de caramelização.

O perfil de açúcares da série de hidrólises realizadas a 160°C e tempo de 20min pode ser observado na tabela 6, e no densitograma da CCD das hidrólises mostrado na Figura 19. Nesta faixa de temperatura, as hidrólises no pH 3,0 – 2,75 – 2,5 – 2,25 e 2,0 produziram respectivamente 1,75 g%, 3,48g%, 9,19g%, 16,63g% e 22,22g% de glucose. Os resultados mostram um aumento progressivo da concentração de glucose, e por consequência, a elevação da DE, à medida em que a concentração de ácido aumenta nas reações de hidrólise.

As hidrólises efetuadas nos pH 3,0, 2,75, 2,5, 2,25 e 2,0 apresentaram os valores aproximados de DE 10, 18, 37, 59 e 68 respectivamente, para a série a 160°C e 28, 39, 49, 46 e 36 respectivamente para a série 176°C. A evolução da DE em função do pH nas duas séries de hidrólises é mostrada na Figura 20. Embora um mesmo valor de DE (=48) possa ser atingido tanto a 176°C quanto a 160°C em pH teórico de 2,375, a degradação a HMF é bem mais significativa na temperatura mais elevada (linhas 2 e 3 do cromatograma da Fig. 17-B). Compensatoriamente, a 176°C, não se detecta maltohexaose nos hidrolisados, o qual está claramente presente nos pontos isólogos da hidrólise a 160°C (linhas 8 e 9 da mesma Fig. 17-B).

FIGURA 20 - EFEITO DO pH (3 – 2,75 – 2,5 – 2,25 e 2,0) E DA TEMPERATURA (160 e 176°C) NA DE DOS HFAM



A co-geração de subprodutos de degradação da hexose livre (e.g. HMF) é facilmente constatável como efeito direto da temperatura e pH comparando-se os

cromatogramas das Figuras 17-A (aplicação normal) e 17-B (sobrecarga de amostra): o teor de HMF (mancha de maior Rf) decresce proporcionalmente do pH 2,0 até 3,2 e na série a 176°C é sobressaliente quando comparado com a série a 160°C.

#### 4.1.2.2.1 Efeito do pH na formação de produtos de degradação na hidrólise de amido de mandioca realizadas a 160(5atm) e 176°C(8atm)

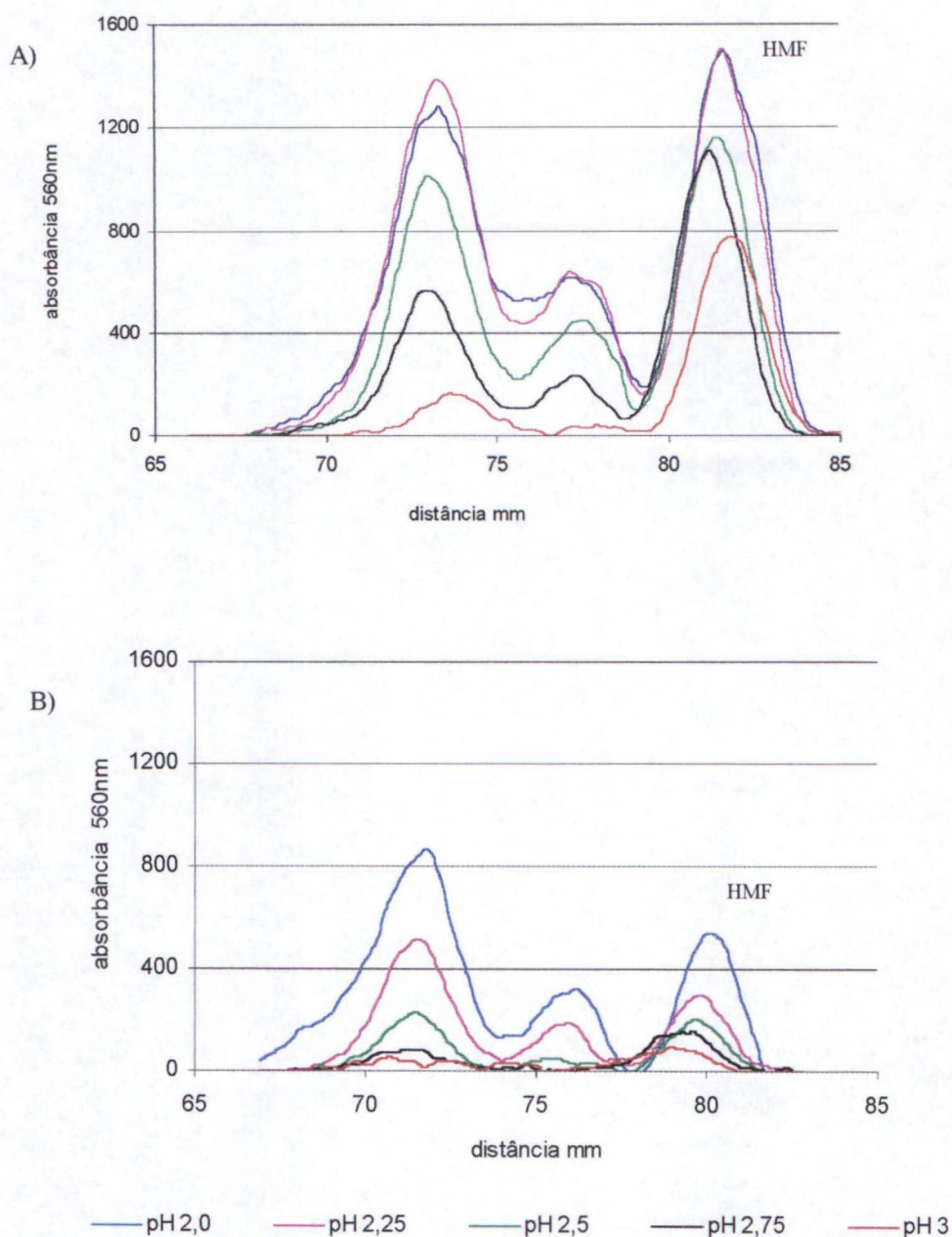
Vários trabalhos na literatura atribuem a formação do HMF, como resultante da degradação de açúcares em condições severas de hidrólise (KIM e HAMDY,1985; SANCHEZ e BAUTISTA,1988; BLANCHARD, 1992; LARSSON et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000).

A Figura 17B mostra a CCD das duas séries de hidrólises, 160 e 176°C. A diluição 1:5 foi utilizada, especificamente, para que os produtos de degradação pudessem ser visualizados e densitometrados, como mostra a Figura 21.

O resultado dos densitogramas demonstra que o efeito da temperatura de hidrólise à 176°C na formação dos produtos de degradação, como o HMF, além dos produtos de coloração, foi bem superior aos das hidrólises efetuadas a 160 °C . Pode-se verificar que o conteúdo de HMF na hidrólise de 176°C foi em torno de 200% superior daquele encontrado nas hidrólises correspondentes obtidas a 160 °C.

A baixa eficiência de conversão da hidrólise, aliado ao resultado indesejável dos produtos de degradação obtidos nos hidrolisados, descartam totalmente a utilização da temperatura de 176°C nos processos de hidrólise fosfórica do amido de mandioca, independentemente da concentração de ácido utilizada.

FIGURA 21 - DENSITOMETRIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DOS HFAM pH 2,0, 2,25, 2,5, 2,75 E 3,0. GRÁFICO A) 176°C(8atm) E B) 160°C(5atm)



#### 4.1.2.3 Efeito das condições de pH e temperatura nas hidrólises (clorídrica ou fosfórica) do amido de mandioca

De acordo com BLANCHARD (1992) o DE máximo obtido pela hidrólise ácida clorídrica corresponde a aproximadamente 85. O aumento da temperatura de hidrólise

fosfórica realizada no experimento anterior, (160°C e 176 °C) não alcançou eficiência satisfatória de hidrólise.

A nova estratégia para melhorar o rendimento de hidrólise foi trabalhar em condições de temperaturas mais amenas, 140 (2,6atm), 150 (3,7atm) e 160°C (5atm), diminuindo o tempo da hidrólise para 5 minutos, porém, aumentando a concentração de ácido fosfórico (pH 1,4, 1,6 e 1,8) ( ítem 3.3.5). Esta estratégia de diminuir a temperatura e aumentar a concentração de ácido para elevar a DE e minimizar a degradação foi adotada por KIM e HAMDY (1985) na hidrólise clorídrica do amido de batata doce. Comparativamente, aplicamos as mesmas condições de hidrólise para o ácido clorídrico.

Os resultados do perfil de açúcares dos hidrolisados analisados por CLAE estão descritos na tabela 7 e nas Figuras 22 e 23. As hidrólises feitas a 140°C dobram o valor de DE quando se eleva a concentração de ácido do pH 1,8 para pH 1,4. Esta medida passa de 29,3 para 62,1 respectivamente na hidrólise clorídrica e de 16,4 para 32,5 respectivamente na fosfórica.

Verificando as hidrólises realizadas à temperatura de 150°C, a diferença de DE diminui com relação às hidrólises clorídricas, DE de 49,6 para o pH 1,8 e 75,9 para o pH 1,4, e permanecem dobrando a diferença na hidrólise fosfórica, elevação da DE de 26,2 no pH 1,8 para 55,3 no pH 1,4.

O diferencial de DE é bem menos significativo quando as hidrólises são realizadas a temperatura de 160°C. No caso das hidrólises fosfóricas, as variações das DE, conseqüentes do aumento da concentração de ácido, são inferiores a 20%. No pH 1,8 o valor da DE, 71,1 elevou-se para 83,2 quando a hidrólise correspondente de pH 1,4 é verificada. Notar que este último valor de DE se aproxima do limite máximo anteriormente obtido por BLANCHARD (1992) mas empregando HCl (DE = 85).

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DOS CARBOIDRATOS NOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS E CLORÍDRICOS ANALISADOS POR CLAE (VARIAÇÃO DE pH E TEMPERATURA/PRESSÃO)

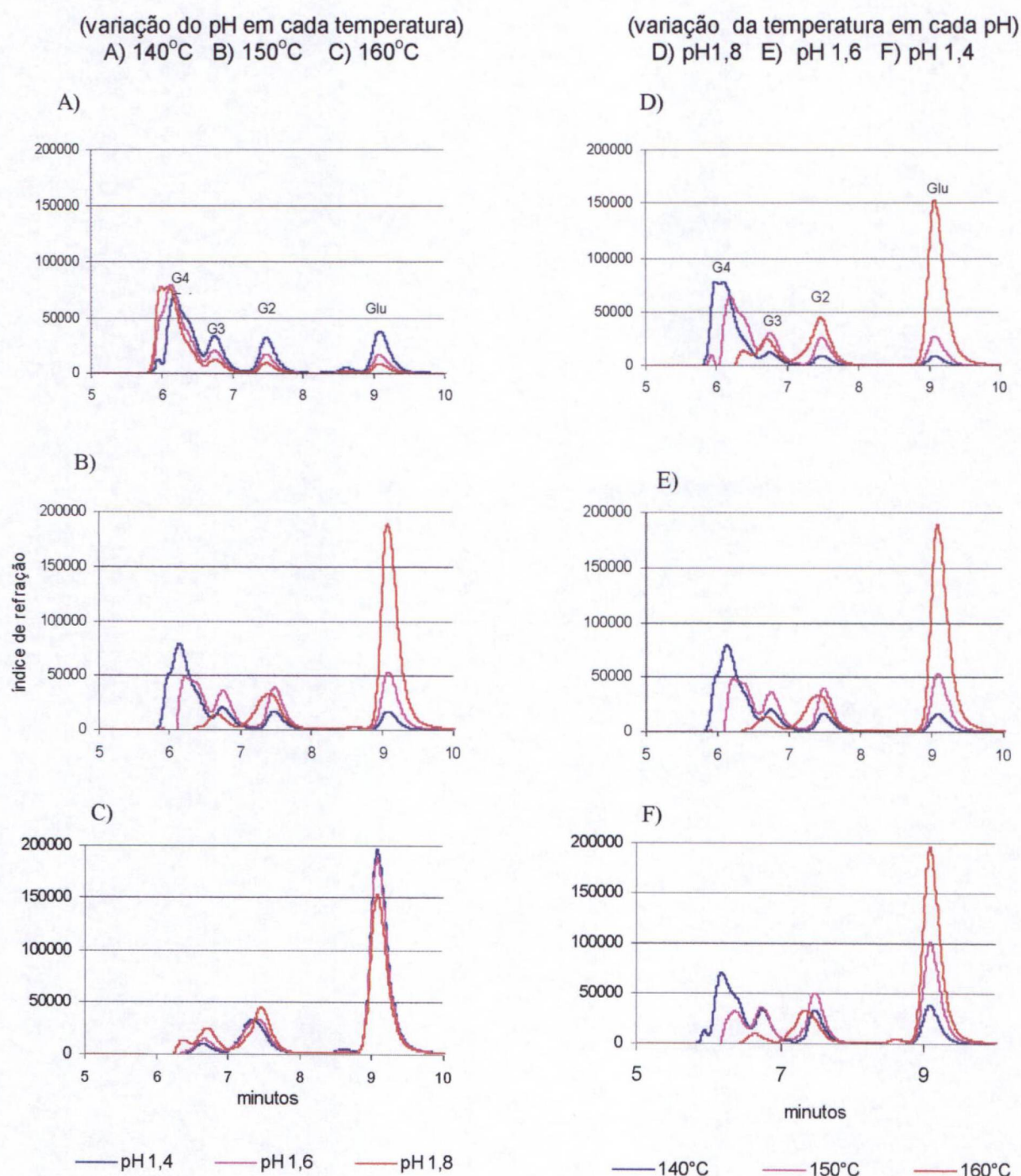
Hidrólise	°C/atm	G4+	G3	G2	Glu	DE
HCl pH 1,4	140/2,6	11,7	14,0	24,1	42,5	<b>62,1</b>
HCl pH 1,6	140/2,6	24,9	14,4	18,4	23,3	<b>43,5</b>
HCl pH 1,8	140/2,6	39,7	10,5	10,4	10,7	<b>29,3</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,4	140/2,6	32,7	11,8	12,5	14,1	<b>32,5</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,6	140/2,6	39,8	7,2	6,3	6,2	<b>21,7</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,8	140/2,6	40,2	4,5	3,3	3,2	<b>16,4</b>
HCl pH 1,4	150/3,7	0,0	7,2	18,7	64,2	<b>75,9</b>
HCl pH 1,6	150/3,7	6,2	11,2	24,4	53,7	<b>71,2</b>
HCl pH 1,8	150/3,7	16,5	14,3	20,7	30,3	<b>49,6</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,4	150/3,7	11,0	13,2	22,6	36,9	<b>55,3</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,6	150/3,7	21,7	12,8	16,4	19,5	<b>37,3</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,8	150/3,7	29,2	10,6	10,4	10,1	<b>26,2</b>
HCl pH 1,4	160/5	0,0	2,2	15,0	58,6	<b>69,9</b>
HCl pH 1,6	160/5	0,0	3,6	20,5	73,2	<b>84,6</b>
HCl pH 1,8	160/5	0,0	4,1	20,7	73,1	<b>84,7</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,4	160/5	0,0	3,5	19,4	72,3	<b>83,2</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,6	160/5	0,0	5,7	20,4	69,2	<b>81,3</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 1,8	160/5	3,4	9,5	22,1	56,0	<b>71,1</b>

Composição dos açúcares em %. Legenda : °C (graus centígrados), atm (atmosferas), G4 (maltotetraose e maltooligosacarídeos maiores), G3 (maltotriose), G2 (maltose), Glu (glucose) e DE (dextrose equivalente)

No caso das hidrólises com ácido clorídrico, um ácido mais forte, observou-se uma redução da DE, de 84,7 para 69,9, quando a concentração de ácido de pH 1,8 foi aumentada a pH 1,4. Esta redução de DE pode ser explicada pelo fato de ocorrer degradação dos açúcares na condição mais severa de hidrólise. Na reação a pH 1,8, a DE obtida já está próxima da capacidade de hidrólise da catálise ácida segundo BLANCHARD(1992), e o aumento significativo de concentração do ácido clorídrico para o pH 1,4 deve ter causado uma degradação dos açúcares hidrolisados e, conseqüentemente, perda do rendimento e redução da DE.

Este declínio da DE também foi observado por AZHAR e HAMDY (1981), trabalhando com a hidrólise de batata doce clorídrica 1mol/l a 154°C. A DE 60 alcançada aos 6 minutos de reação, apresentou queda para 42,5 após 12 minutos de hidrólise.

FIGURA 22 - EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NOS HFAM DETERMINADOS POR CLAE



Legenda utilizada nos gráficos superiores válido para os demais gráficos :

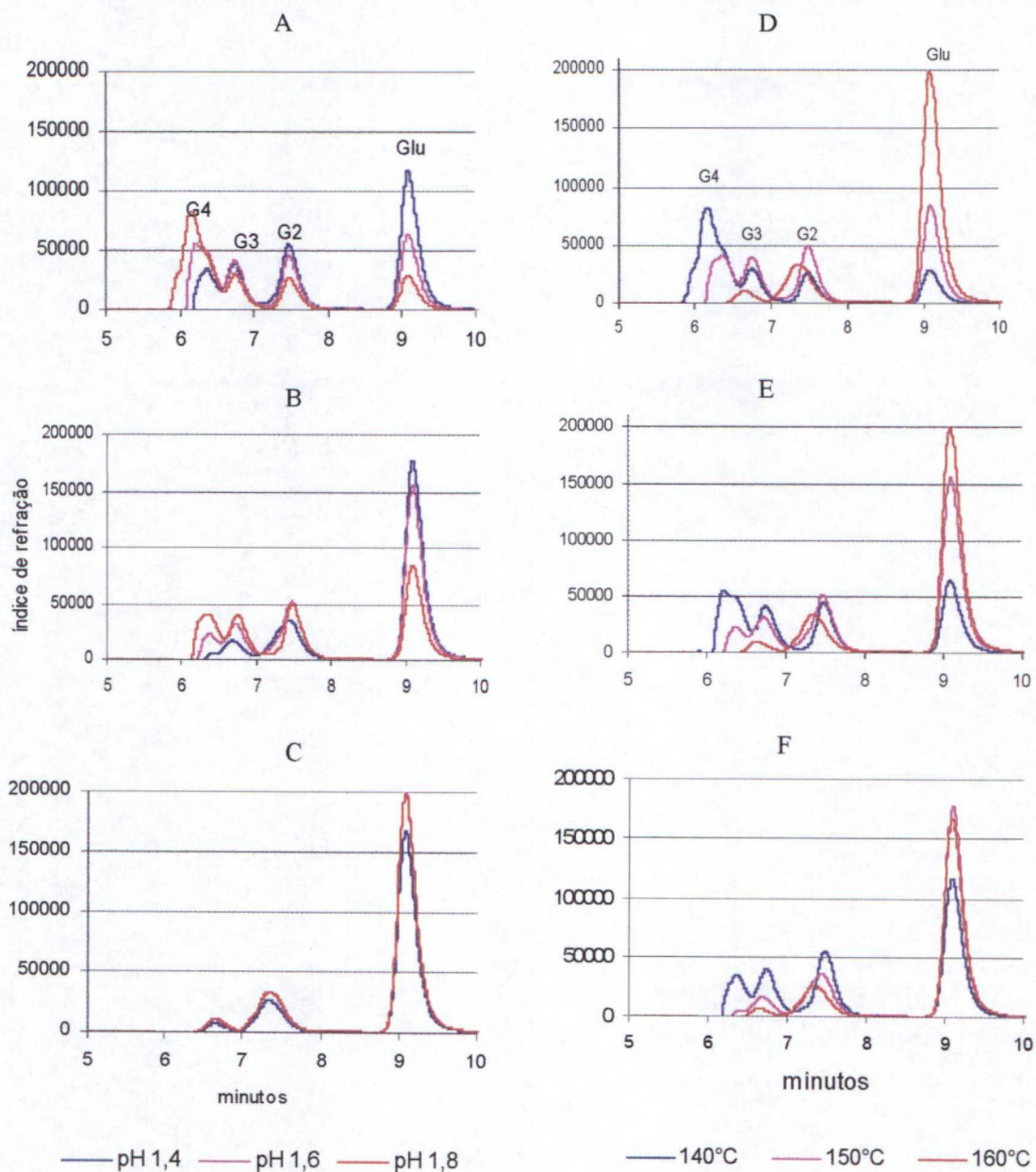
Glu (glucose), G2(maltose), G3 (maltotriose) e G4 (maltotetraose e oligossacarídeos maiores).

Variação das condições de hidrólise: pH (1,8 – 1,6 – 1,4) e temperatura (140 – 150 – 160 °C), e tempo de residência da hidrólise 5 minutos.

FIGURA 23 - EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICOS DO AMIDO DE MANDIOCA DETERMINADOS POR CLAE.

(variação do pH em cada temperatura)  
Gráfico: A (140°C), B (150°C), C (160°C)

(variação da temperatura em cada pH)  
Gráfico: D (pH 1,8), E (pH 1,6), F (pH 1,8)



Legenda utilizada nos gráficos superiores válido para os demais gráficos :

Glu (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose) e G4 (maltotetraose e oligossacarídeos maiores).

Variação das condições de hidrólise: pH (1,8 – 1,6 – 1,4) e temperatura (140 – 150 – 160 °C), e tempo de residência da hidrólise 5 minutos.

FIGURA 24 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA "DE" NOS HFAM EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH DE HIDRÓLISE.

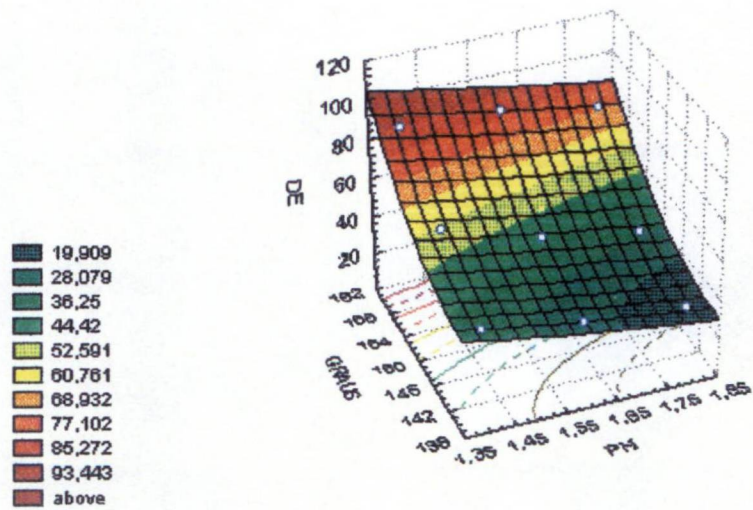
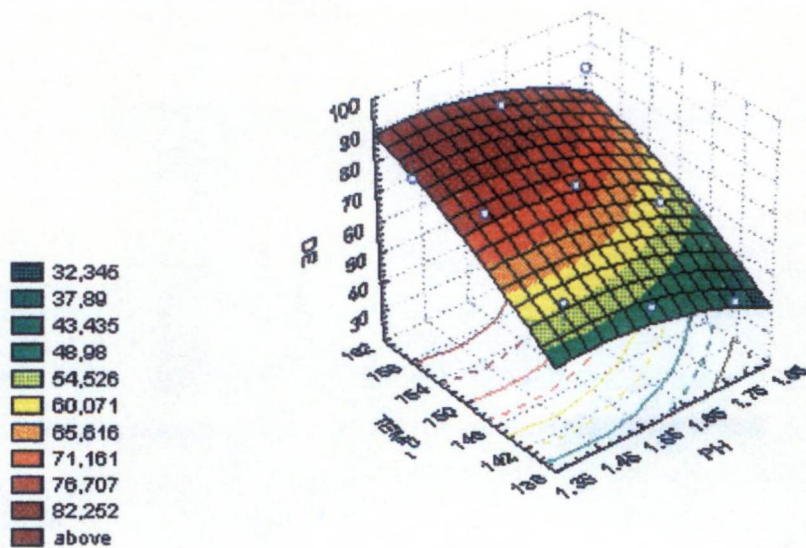


FIGURA 25 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA "DE" NOS HIDROLISADOS CLORÍDRICOS DE MANDIOCA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH DE HIDRÓLISE.



Da análise das Figuras 24 e 25, verificou-se que na hidrólise fosfórica ambos os fatores, pH e temperatura, apresentam influência significativa no valor da DE, ou seja, quanto maior a concentração de ácido e a elevação da temperatura, dentro da faixa dos parâmetros estudados, maior foi a eficiência de hidrólise. Na hidrólise clorídrica apenas o fator temperatura apresentou efeito significativo no resultado da hidrólise. O ponto de eficiência máxima de hidrólise do ácido clorídrico ocorreu próximo do pH 1,55. A partir deste pH, o aumento da concentração de ácido não modifica o resultado da hidrólise, apenas o aumento da temperatura.

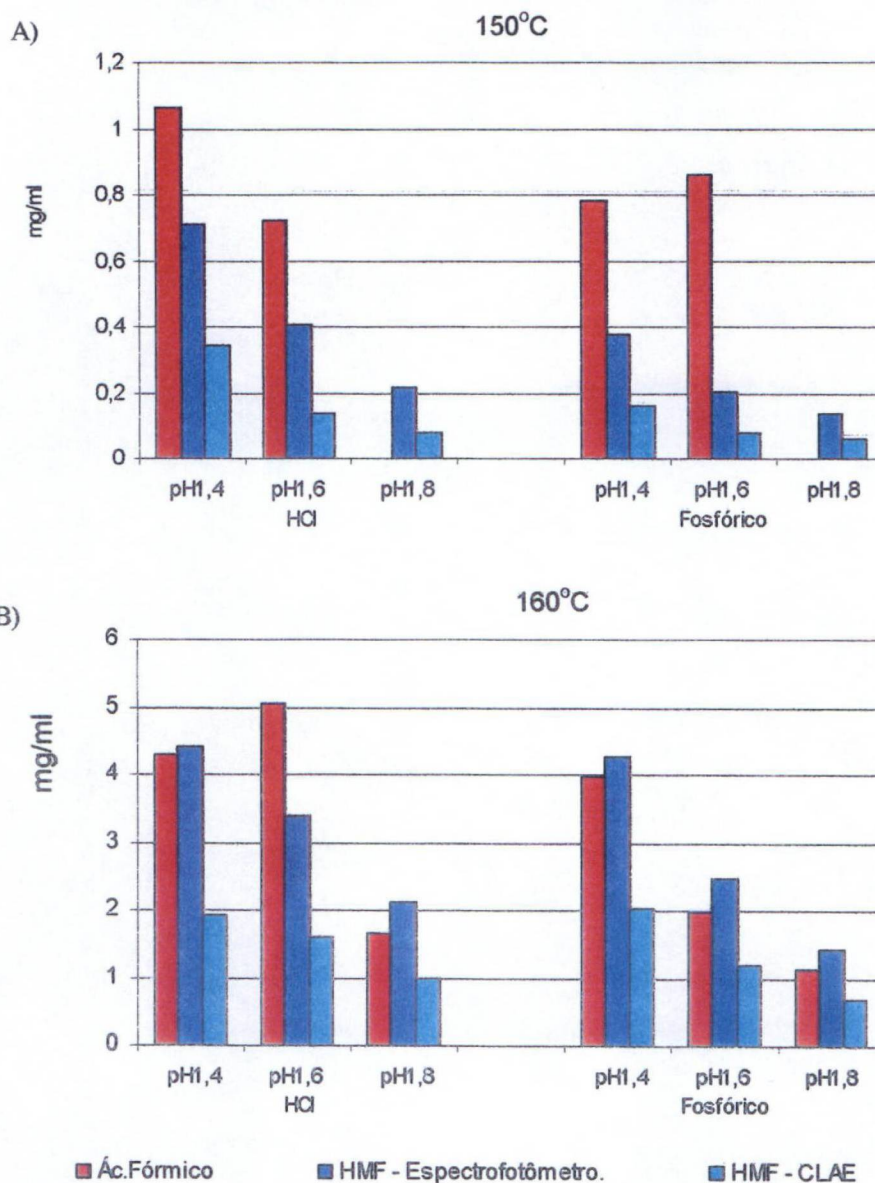
#### 4.1.2.3.1 Efeito do pH e da temperatura na degradação de açúcares durante a hidrólise fosfórica de amido de mandioca

As análises feitas por CLAE e por espectrofotometria com relação à formação de HMF nas temperaturas de 150°C e 160°C, resultados apresentados na Figura 26, mostram que a concentração de HMF nos xaropes, tem um aumento maior em função da elevação da temperatura do que do aumento da concentração de ácido.

As hidrólises a 140°C não apresentaram concentrações de HMF significativas. Nas reações feitas a 150°C, o teor de HMF formado durante as hidrólises clorídricas foi significativamente superior, se comparado às hidrólises fosfóricas correspondentes. Nas hidrólises de pH 1,4 por exemplo, o HMF formado na hidrólise clorídrica foi de 0,34 mg/ml na análise por CLAE e 0,7 mg/ml na espectrofotometria, enquanto a concentração de HMF obtida nas hidrólises fosfóricas foi de 0,16 e 0,37 mg/ml, respectivamente.

As mesmas análises realizadas nas hidrólises a 160°C também demonstram a concentração superior de HMF nos hidrolisados clorídricos em relação ao fosfórico, com exceção do pH 1,4. A hidrólise clorídrica no pH 1,4 apresentou concentração menor de HMF do que a fosfórica correspondente, 1,92 contra 2,04 mg/ml, quando analisadas por CLAE.

FIGURA 26 - CONCENTRAÇÃO DE HMF (ANALISADOS POR CLAE E ESPECTROFOTOMETRIA  $A_{283nm}$ ) E DO ÁCIDO FÓRMICO (CLAE), PRODUTOS DA HIDRÓLISE CLORÍDRICA E FOSFÓRICA . GRÁFICOS : A ( $150^{\circ}\text{C}/3,7\text{ atm}$ ), B ( $160^{\circ}\text{C}/5\text{ atm}$ )



De acordo com ( KERR, 1950; BEMILLER e ROBERTS, 1965; KUSTER, 1990; LARSSON et al., 1999) a degradação do HMF leva à formação dos ácidos levulínico e ácido fórmico. AZHAR E HAMDY (1981) realizando experimentos com a hidrólise de batata doce, *Ipomoea batatas*, observaram que numa hidrólise clorídrica 1mol/l a  $160^{\circ}\text{C}$ , a concentração de HMF aumentou rapidamente de 1,4 para 7,5 % em somente 3 minutos, após este tempo houve um declínio acentuado da concentração de HMF.

Por outro lado, numa hidrólise em condições mais moderadas, houve um aumento lento e gradual de HMF.

As condições em que são gerado o HMF também são degradativas para o mesmo. De acordo com KUSTER (1990) a energia de ativação para formação do HMF parece ser maior do que para sua degradação, conseqüentemente a concentração de ácido fórmico e/ou levulínico tendem a ser maiores do que a de HMF no decorrer da hidrólise. Neste trabalho, embora o ácido levulínico seja uma molécula estável (KUSTER, 1990), não ocorreu sua formação e, conseqüentemente, sua presença não foi detectada em nenhum dos hidrolisados.

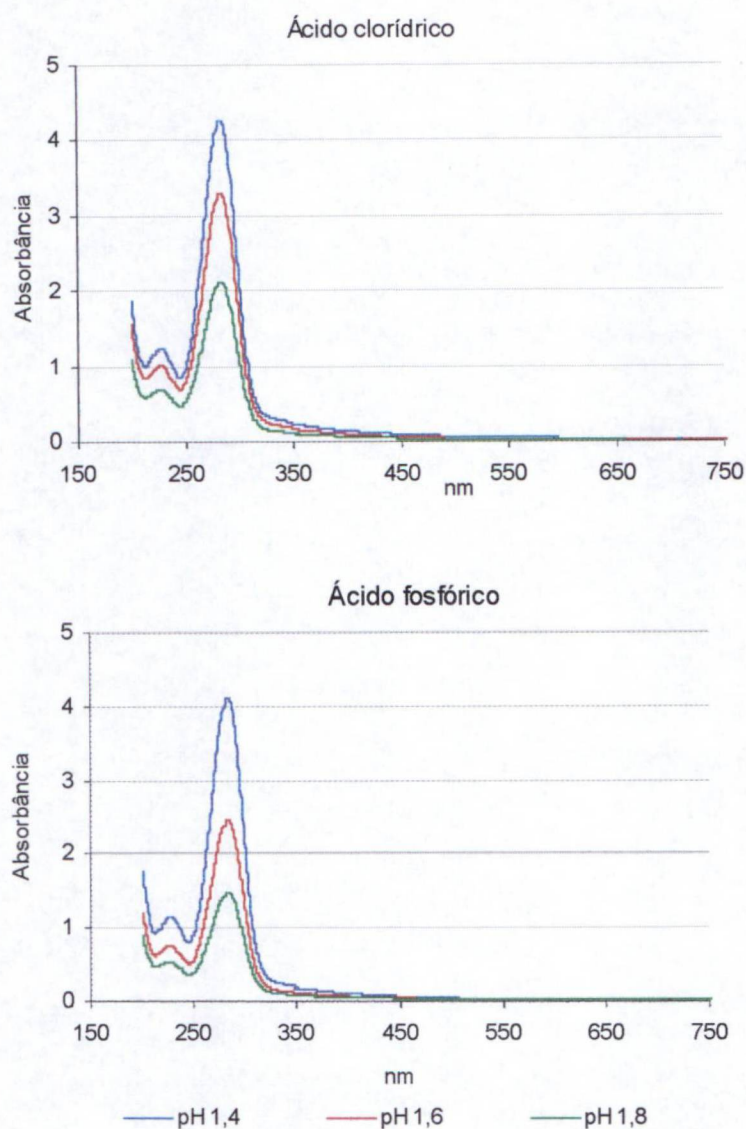
Com relação ao ácido fórmico nos hidrolisados clorídricos e fosfóricos a 160°C, observou-se que a formação deste produto também aumentou progressivamente, a medida que a concentração ácida era maior, com exceção da hidrólise clorídrica no pH 1,4, cuja concentração de ácido fórmico 4,3 mg/ml, foi inferior a da reação no pH 1,6, com 5,0 mg/ml.

Este comportamento diferencial da hidrólise clorídrica pH 1,4 pode ser explicado devido as condições drásticas desta hidrólise, que pode estar degradando o próprio ácido fórmico a outros produtos como por exemplo gás carbônico e água.

As diferenças existentes entre os dois métodos, CLAE e espectrofotometria, para a análise de HMF, podem estar relacionadas à existência de alguma outra substância, produto de degradação da hidrólise, por exemplo, produtos da reação de Maillard, que podem apresentar absorvância na faixa de leitura utilizada de 283nm. Logo, a CLAE que prevê resolução cromatográfica ou individualização do HMF frente ao detector, é uma medida mais precisa.

Os espectros da varredura da faixa de comprimento de onda de 200 a 750, dos hidrolisados fosfóricos e clorídricos estão representados na Figura 27. Observa-se que no pH 1,4 ambos os hidrolisados apresentam as absorvâncias na região de 283 nm equivalentes, enquanto que nos espectros dos hidrolisados pH 1,6 e 1,8 a absorvância correspondente foi em torno de 50 % maior nos hidrolisados clorídricos.

FIGURA 27 - ESPECTROS DE VARREDURA DOS HIDROLISADOS FOSFÓRICOS E CLORÍDRICOS.  
(160°C / 5 atm, pH =1,4 – 1,6 – 1,8 E 5 min) NAS ZONAS UV E VISÍVEL



Do somatório de experimentos hidrolíticos comparativos entre os catalisadores fosfórico e clorídrico, conclusivamente pode-se apontar o primeiro como mais vantajoso se o critério é a geração de menor teor de produtos de degradação (e.g. HMF), e cor, já que estes demandam parcela significativa de custos de filtração e clarificação nas linhas industriais.

#### 4.2 UTILIZAÇÃO DO HIDROLISADO FOSFÓRICO DE AMIDO DE MANDIOCA (HFAM) PARA O CULTIVO DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*

O pH, o tempo de reação e a temperatura são fatores fundamentais nos processos de hidrólise do amido. São responsáveis diretamente pela DE ou seja, determinam o perfil e a concentração dos açúcares livres nos hidrolisados. Quanto maior a DE maior a quantidade de açúcares fermentescíveis. A combinação das condições destes três fatores de hidrólise também é responsável pela intensidade da degradação dos carboidratos quando as condições de hidrólise são severas, sendo o HMF o principal subproduto formado.

Meios de fermentação compostos por hidrolisados fosfóricos carregam em seu conteúdo o elemento essencial fósforo. Quanto maior a concentração de  $H_3PO_4$ , utilizada para hidrolisar o amido, medida através do pH, maior será a concentração de fósforo incorporada ao meio de cultivo.

O fósforo está relacionado a biossíntese de proteínas além dos ácidos nucléicos e ao crescimento. A biossíntese da coenzima mais importante, ATP, está condicionada à disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi). Concentrações elevadas deste elemento favorecem a formação de biomassa de *Xanthophyllomyces*, todavia comprometem a produção de astaxantina (FLORES-COTERA; MARTIN e SÁNCHEZ, 2001).

De acordo com VAZQUEZ et al.,(1997) *Xanthophyllomyces* pode utilizar uma variedade de fontes de carbono, incluindo mono e dissacarídeos. Segundo JOHNSON E LEWIS (1979), a glucose proporciona a maior taxa de crescimento nos cultivos de *Xanthophyllomyces*, embora a produção de astaxantina seja moderada. Por outro lado, dissacarídeos, como sacarose e maltose, produzem astaxantina em alto rendimento.

Não foi encontrado na literatura relato de cultivo de *Xanthophyllomyces* realizado com hidrolisado de amido, ou os oligomaltossacarídeos (oligossacarídeos com grau de polimerização  $\geq 3$  unidades de glucose). Os trabalhos onde foram necessárias hidrólises como pré-tratamento, foram conduzidos no sentido de se

produzir o máximo de rendimento da unidade monomérica do polissacarídeo. MEYER , PREEZ e KILIAN (1993) cultivaram *Xanthophyllomyces* usando xilose da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. PARAJO e CRUZ (1998) cultivaram *Xanthophyllomyces* em meio contendo glucose e celobiose a partir de hidrolisados enzimáticos de madeira.

O crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em meio sólido contendo HFAM pode ser observado na Figura 28.

FIGURA 28 CULTIVO DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO HIDROLISADO FOSFÓRICO DE AMIDO DE MANDIOCA COMO FONTE DE CARBONO, 96 HORAS DE CULTIVO.



#### 4.2.1 Efeito do HFAM no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous* suplementado com extrato de levedura.

Os hidrolisados fosfóricos do amido de mandioca como descritos no ítem 3.3.4, foram usados como fonte de carbono no cultivo de *Xanthophyllomyces*, na concentração 10%. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 29.

O hidrolisado obtido a 160°C/5atm e pH 2,0 apresentou teores de glucose maior que 50% e maltose de 22%, ou seja um DE correspondente a 68. No cultivo realizado com este hidrolisado foram obtidos biomassa correspondente de 556 mg/ 100 ml de meio e a maior produção de astaxantina de todos os cultivos, 344 µg de astaxantina/g de célula seca.

A utilização de hidrolisados de maior DE (maior teor relativo de glucose) não proporcionou, neste experimento, maior crescimento e rendimento de astaxantina aos cultivos. Comparando os cultivos preparados com os hidrolisados fosfóricos pH 2,0, 2,75 e 3,0 obtidos a 160°C, estes apresentavam DE 68, 18 e 10 respectivamente. A produção de biomassa do cultivo pH 2,0 foi de 556 mg/ 100 ml, enquanto nos cultivos com hidrolisados pH 2,75 e 3,0 a biomassa foi ligeiramente superior, 562 e 566 mg/ 100 ml de meio respectivamente. A produção de astaxantina também foi equivalente para os três cultivos, 344, 335 e 335 µg de astaxantina/g de célula seca respectivamente.

NAMPOOTHIRI e PANDEY (1999) analisando vários hidrolisados de mandioca com DE entre 14 e 90, também obtiveram melhores resultados na produção de ácido glutâmico pela bactéria *Brevibacterium* a partir de cultivos com hidrolisados com valor de DE intermediário, entre 45 e 50.

Considerando a Figura 30, pode-se verificar que o consumo de açúcares redutores no cultivo do hidrolisado pH 2,0, aproximadamente 2g%, foi bem superior aos dos cultivos de pH 2,75 e 3,0, onde foram consumidos em torno de 0,5g%. A explicação de rendimentos semelhantes de crescimento e produção de astaxantina e consumos de AR extremamente diferenciados deve-se, ao fato da capacidade de *Xanthophyllomyces* hidrolisar oligomaltossacarídeos. Ao mesmo tempo em que a levedura está consumindo açúcares redutores, também está produzindo os mesmos a partir de açúcares maiores (grau de polimerização 4, 5, 6,7 unidades de glucose e maiores).

Os resultados dos cultivos realizados com os hidrolisados fosfóricos em condições mais drásticas, temperatura de 176°C, Figura 29, demonstram que, quando as condições de hidrólise são muito severas ocorre formação de produtos

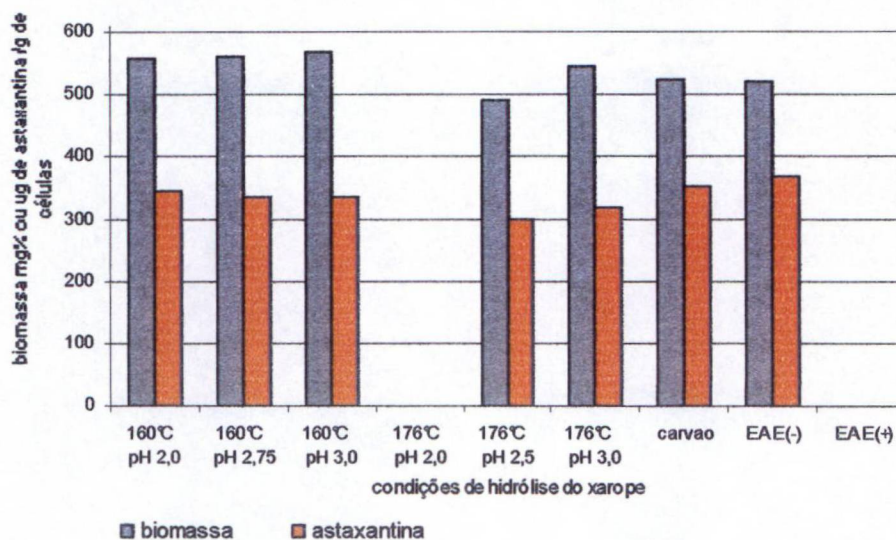
inibitórios para a levedura. Os cultivos realizados com o hidrolisado 176°C, pH 2,5 e 3,0, apresentaram crescimento celular de 489 e 544 mg/100ml de meio e produção de astaxantina de 525 e 519µg /g de célula seca. No cultivo com o hidrolisado obtido nas condições mais severas, de pH 2,0, houve total inibição e a levedura *Xanthophyllomyces* não se desenvolveu nestas condições de cultivo.

A concentração das substâncias inibidoras nestes cultivos com hidrolisados a pH 2,5 e 3,0, não foi tão elevada a ponto de provocar inibição total como no cultivo correspondente a hidrólise de pH 2,0, mas provocou uma inibição inicial do crescimento de *Xanthophyllomyces*, a seguir superada.

Os efeitos inibitório dos produtos de degradação da hidrólise podem ser observados nas Figuras 30 e 31, onde são mostradas as evoluções do crescimento de *Xanthophyllomyces* em função dos tempos de cultivo. Nos cultivos realizados com os HFAM a 160°C, pode-se observar que a fase lag teve duração de 24 horas e o período de fase exponencial ocorreu das 24 às 72 horas, enquanto que no cultivo realizado com o hidrolisado 176°C pH 3,0, a fase lag se prolongou até 48 horas e a fase log foi das 48 até às 96 horas. Já no cultivo a partir de hidrólise um pouco mais drástica, pH 2,5, 176°C, a fase lag se estendeu até 72 horas, e o cultivo ainda se apresentava em fase de crescimento quando foi interrompido às 144horas.

Quando o hidrolisado pH 2,0 e 176°C, apresentando efeito inibitório total, foi pré-tratado com carvão ativo ou pré-extraído com acetato de etila para retirada dos produtos de degradação e/ou responsáveis pela coloração, os cultivos passaram a apresentar crescimento e pigmentação. As produções de biomassa nestes cultivos tratados com carvão e com acetato de etila foram de respectivamente 525 e 519 mg de células secas/ 100ml. A produção de astaxantina foi 350µg /g de célula seca no hidrolisado tratado com carvão e 368µg /g de célula seca no hidrolisado tratado com acetato de etila, valores próximos dos demais cultivos obtido por hidrólises menos severas.

FIGURA 29 CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENÊSE DE *Xanthophyllomyces* CULTIVADO EM MEIOS CONTENDO HFAM PRODUZIDOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA.



Legenda:

carvão → hidrolisado obtido a pH 2,0 e 176°C/ 8atm, submetido ao pré-tratamento com carvão ativo.

EAE (-) → hidrolisado obtido a pH 2,0 e 176°C/ 8atm, submetido ao pré-tratamento com acetato de etila.

EAE (+) → hidrolisado obtido a pH 2,0 e 176°C/ 8 atm, e incorporado o material extraído no pré-tratamento com acetato de etila do hidrolisado EAE (-).

FIGURA 30 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) EM CULTIVO DE *Xanthophyllomyces* EM DIFERENTES HFAM OBTIDOS A 160°C/ 5atm

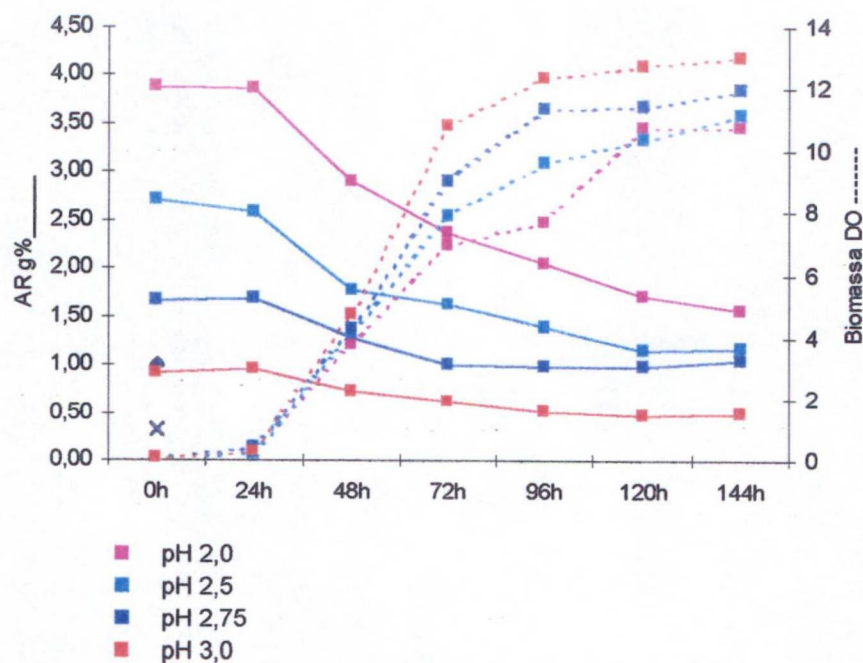
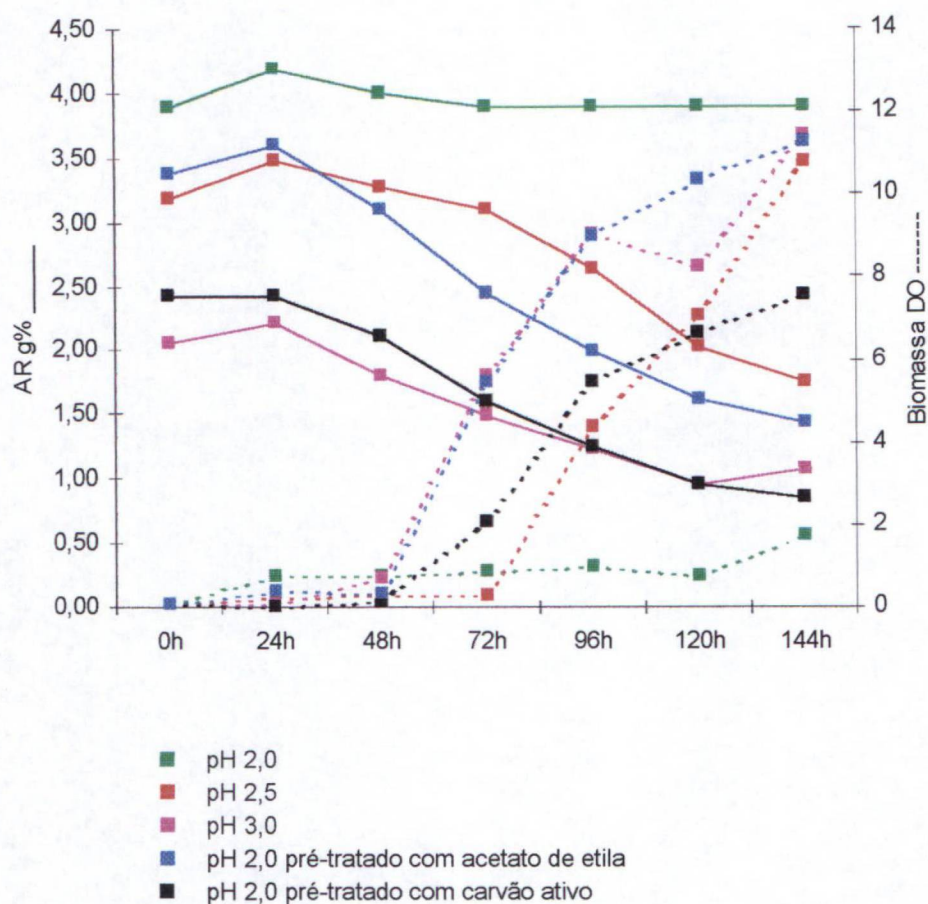


FIGURA 31 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) EM CULTIVO DE *Xanthophyllomyces* EM DIFERENTES HFAM OBTIDOS A 176°C/ 8atm



#### 4.2.2 Efeito do álcali utilizado na neutralização do hidrolisado de mandioca no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Com o objetivo de avaliar o efeito do álcali utilizado na neutralização do HFAM na produção celular e na astaxantinogênese da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, foram realizados experimentos empregando hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio, de modo a obter hidrolisados com pH 6,0 para posterior utilização em meios de cultivos.

Os resultados mostrados na Tabela 8 demonstram que os cultivos elaborados com os xaropes neutralizado com hidróxido de amônio, apresentaram maior rendimento de biomassa 770 mg de células/100 ml de meio (obtidos por gravimetria), enquanto os cultivos neutralizados com potássio, sódio e cálcio o

rendimento de biomassa foi de 720, 686 e 676 mg de células /100 ml respectivamente.

A neutralização do  $H_3PO_4$  com  $NH_4OH$  forma o fosfato de amônio monobásico ( $NH_4H_2PO_4$ ), e este sal, além de fornecer o fosfato ao meio, atua também como fonte de nitrogênio. O  $NH_4H_2PO_4$  é comumente utilizado nos cultivos de *Xanthophyllomyces* (JOHNSON; LEWIS; 1979) (YAMANE; et al., 1997).

A amônia também exerce uma ação estimuladora na astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces*. O rendimento do pigmento,  $355\mu g$  /g de célula seca, foi maior, acima de 10%, se comparado com a neutralização do hidrolisado com KOH e NaOH, 324, 320  $\mu g$  /g de célula seca respectivamente.

TABELA 8 - INFLUÊNCIA DO ÁLCALI NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*

álcali	biomassa mg%	ug astaxantina / g células	ug astaxantina /25 ml meio
$NH_4OH$	770	355	61
KOH	720	324	52
NaOH	686	320	49
$Ca(OH)_2$	676	357	54

A análise de variância dos dados de produção de astaxantina por cultivo (Tabela 9), demonstrou que existe diferença significativa (valor-P = 0,0107) entre os tratamentos, e a utilização do teste de TUKEY, revelou diferenças significativas, ao nível de 95%, no cultivo de *Xanthophyllomyces* com a utilização de  $NH_4OH$  se comparado aos demais íons.

TABELA 09. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA EFEITO DE ÍONS NA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA

caso de verificação	Soma dos quadrados	grau de liberdade	quadrado médio	teste-F	valor-p
tratamento	242,195	3	80,7317	16,12	0,0107
resíduo	20,027	4	5,00679		
total	262,222	7			

#### 4.2.3 Efeito da fonte de nitrogênio no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivada em HFAM

Classicamente, os meios de cultivos encontrados na literatura utilizam o extrato de levedura e a peptona como fonte de nitrogênio para o cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. O alto custo destas fontes de nitrogênio geralmente torna seu uso limitado em processos fermentativos industriais, sendo necessário a utilização de fontes alternativas de nitrogênio.

A uréia foi utilizada por FANG e CHENG (1993), mas segundo os autores não houve crescimento da levedura.

Experimentos realizados com hidrolisado fosfórico de mandioca acrescidos apenas de uréia também não apresentaram crescimento de *Xanthophyllomyces*. Os experimentos bem sucedidos obtidos com *Xanthophyllomyces* utilizando uréia como único suplemento nitrogenado (FONTANA, et al., 1996b), tanto em termos de biomassa, quanto de astaxantina se referem a caldo bruto (integral) de cana-de-açúcar e não à sacarose p.a..

BONFIM (1999) utilizou fontes alternativas de nitrogênio suplementadas ao caldo de cana para o cultivo de *Xanthophyllomyces*. Os melhores resultados foram obtidos com a farinha de soja e com a uréia. A milhocina e a farinha animal (aparas de couro moídas) como fonte de nitrogênio também proporcionaram resultados promissores.

Com o objetivo de desenvolver um método de cultura industrial de baixo custo, várias fontes de nitrogênio e misturas de aminoácidos foram testadas em nosso trabalho, inicialmente complementadas com extrato de levedura (EL), itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2 .

#### 4.2.3.1 Efeito da fonte de nitrogênio no Cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* com HFAM (obtido a 152°C/ 4atm, pH 2,0 e 10 minutos) suplementado com EL 0,05g%

Para avaliar fontes de nitrogênio, nos primeiros cultivos foram testadas misturas de aminoácidos, uréia, farinha de soja, manipueira desidratada por liofilização, todos complementados com uma quantidade pequena de extrato de levedura, 0,05g%, para garantir o fornecimento mínimo de nutrientes, como descrito no item 3.7.3.1 (experimento A). O HFAM utilizado nesse cultivo foi obtido a 152°C, pH 2,0 e 10 minutos, item 3.3.3.

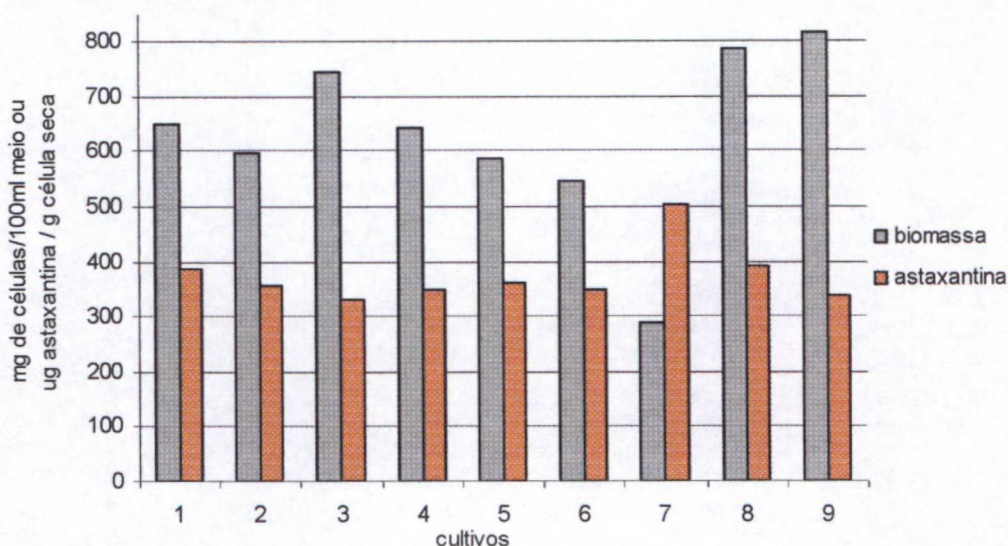
De acordo com os resultados demonstrados na Figura 32, o cultivo de melhor resultado, 390µg de astaxantina/g de célula seca e biomassa de 785mg de célula seca / 100 ml de meio, foi obtido com a mistura de aminoácidos ácido glutâmico + glicina + asparagina + alanina (total: 0,05%), acrescidos de extrato de levedura 0,05%. A escolha da mistura destes aminoácidos foi baseada nos estudos realizados por BONFIM (1999) sobre a parede celular da própria *Xanthophyllomyces dendrorhous*. De acordo com a autora, os quatro aminoácidos estão presentes em maior concentração na parede celular da levedura, em torno de 10% cada um. Por outro lado não houve crescimento de *Xanthophyllomyces* no experimento realizado em meio de cultivo contendo somente a mistura de aminoácidos e o hidrolisado sem suplementação do extrato de levedura.

Outra mistura de aminoácidos triptofano, cisteína e tirosina acrescidos de extrato de levedura, por sua vez apresentou 503µg de astaxantina/g de célula seca e o pior resultado para biomassa, 290 mg de célula seca / 100 ml de meio, menos da metade da maior parte dos cultivos.

Os cultivos suplementados separadamente com manipueira, peptona, caseína, uréia e soja apresentaram produções semelhantes de astaxantina, em média em torno de 350µg de astaxantina/g de célula seca e crescimento de biomassa em torno de 600 mg de células secas / 100 ml de meio de cultura.

Destacando-se neste grupo somente o cultivo com uréia, devido a produção de 743 mg de células / 100 ml de biomassa.

FIGURA 32 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (EL + COMPLEMENTO) NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGÊNESE DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADO EM HFAM (HIDRÓLISE pH2,0, 152°C/ 4atm)



Legenda:

Amostras de 1 a 8 acrescidas com extrato de levedura 0,05g%

1 → peptona 0,05g%

2 → manipueira liofilizada 0,05g%

3 → uréia 0,05g%

4 → farinha de soja 0,05g%

5 → caseína 0,05g%

6 → TSB 0,05g%

7 → triptofano + cisteína + tirosina (0,016 + 0,016 + 0,016g%)

8 → ácido glutâmico + glicina + asparagina + alanina ( 0,0125 + 0,0125 + 0,0125 + 0,125g%)

9 → extrato de levedura 0,1g% + complexo vitamínico Centrum 25µl

A manipueira apresentou resultados satisfatórios e com boa perspectiva de aplicação, devido ao fator econômico, uma vez que é um produto residual e indesejável (poluidor) do próprio processamento industrial de amido de mandioca. Incidentalmente, dos cinco aminoácidos presentes em maior concentração na parede celular de *Xanthophyllomyces* (BONFIM, 1999), quatro também são encontrados nas maiores concentrações na manipueira (CEREDA, 1994), ácido glutâmico, alanina, glicina e leucina. A manipueira, utilizada como fonte alternativa de nitrogênio foi liofilizada para possibilitar padronização de sua utilização e evitar

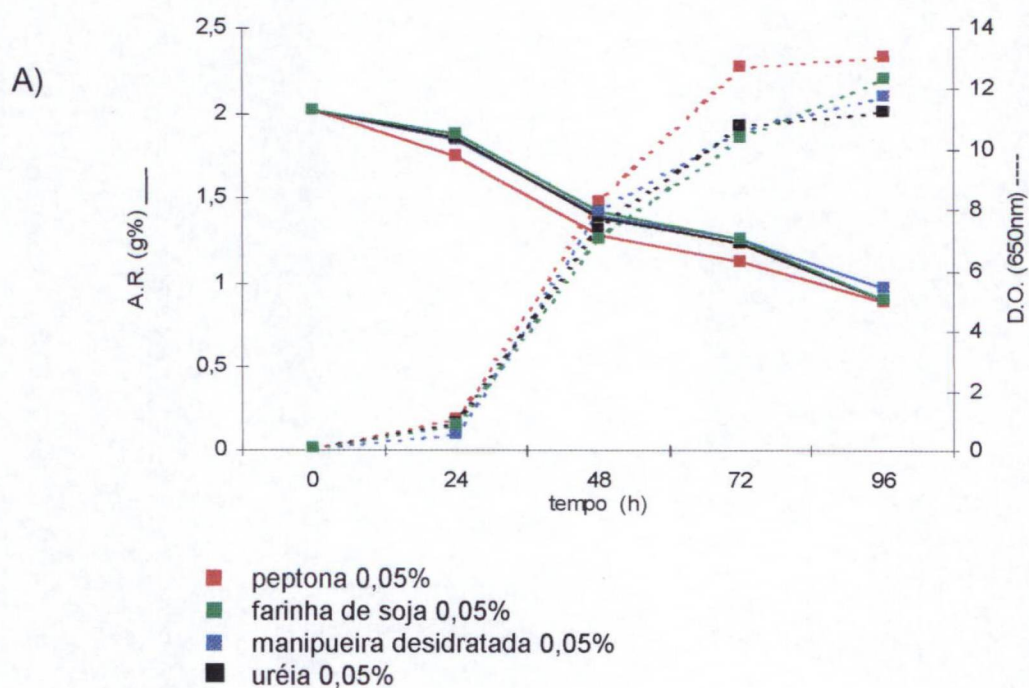
possíveis alterações em sua composição. Análises do conteúdo da manipueira liofilizada revelaram a presença de 12% de AR, 38% de AT e 44% de proteínas totais (item 3.10).

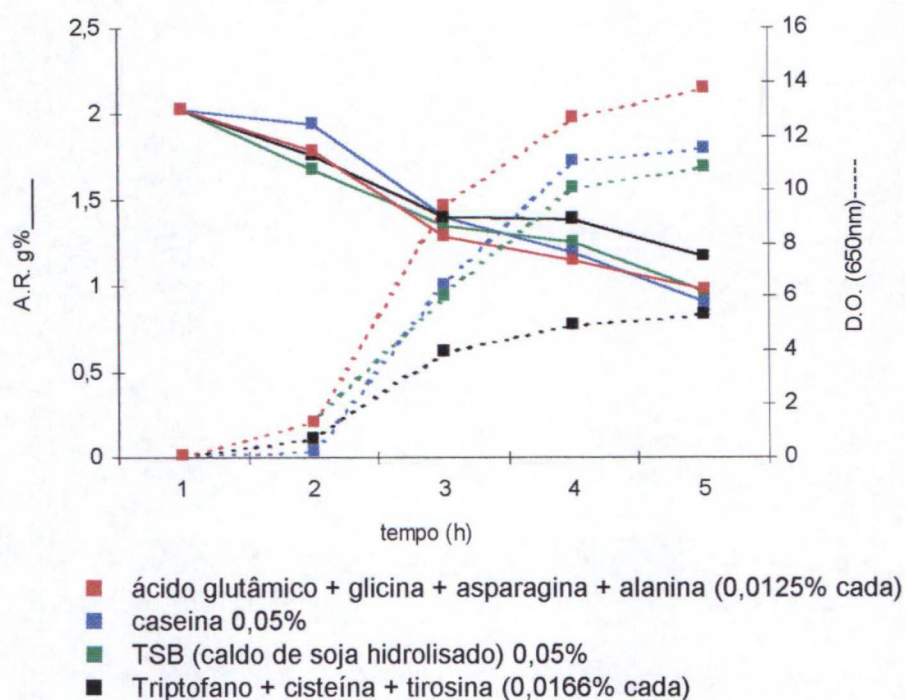
Os acompanhamentos do consumo de açúcares redutores e formação de biomassa dos cultivos estão representados na Figura 33

#### 4.2.3.2 Efeito da fonte de nitrogênio no cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em HFAM (obtido a 160°C/ 5 atm, pH 2,75 e 20 minutos) suplementado com EL 0,05g%

Esta segunda série de cultivos para avaliação do efeito de fontes alternativas de nitrogênio, conforme descrito no experimento B do item 3.7.3.1, foi realizada mantendo a suplementação com EL 0,05g%, com exceção do cultivo controle, realizado sem nenhuma suplementação de extrato de levedura e demais fontes de nitrogênio. Os resultados podem ser observados na Figura 34.

FIGURA 33 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CONSUMO DE AÇÚCAR REDUTOR (AR) E BIOMASSA DE *Xanthophyllomyces* CULTIVADA EM HFAM (pH2,0, 152°C e 10min) CULTIVOS ADICIONADOS DE EXTRATO DE LEVEDURA 0,05g%.





O cultivo controle apresentou a produção de biomassa de 76mg de células secas/100 ml de meio e a produção de astaxantina de 290 $\mu$ g de astaxantina/g de célula seca. De acordo com o gráfico A da figura 35, a formação de biomassa deste cultivo ocorreu no período das primeiras 24 horas. Neste período, a levedura *Xanthophyllomyces* utilizou a amônia oriunda da neutralização do hidrolisado fosfórico para produção da biomassa.

Quando o extrato de levedura foi adicionado ao hidrolisado fosfórico, numa concentração de 0,05 g% p/v, a produção de biomassa passou de 76 para 397 mg de células/100ml de meio e a produção de astaxantina passou de 290 para 377 $\mu$ g de astaxantina/g de célula seca.

A adição do complexo vitamínico Centrum<sup>®</sup> ao extrato de levedura não proporcionou nenhum benefício ao cultivo. A produção de biomassa permaneceu a mesma, em torno de 399mg de células/100ml de meio e a astaxantina teve um pequeno decréscimo para 360 $\mu$ g de astaxantina/g de célula seca. O extrato de levedura já deve ter suprido satisfatoriamente as necessidades de vitamina requeridas por *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

AN (2001) estudou o efeito de vários aminoácidos na produção de biomassa e carotenogênese de *Xanthophyllomyces* e constatou que os aminoácidos não afetaram a astaxantinogênese, alguns somente aumentaram a biomassa.

Nos cultivos suplementados com as misturas de aminoácidos ao extrato de levedura, os resultados demonstram que houve um pequeno aumento, entre 10 e 20% aproximadamente, na produção de astaxantina. A combinação de ácido glutâmico + glicina e a de asparagina + alanina produziu em torno de 440 µg de astaxantina/g de célula seca, enquanto que com a combinação de cisteína + tirosina e a de triptofano + metionina a produção de astaxantina foi de aproximadamente 410µg de astaxantina/g de célula seca.

O grande diferencial com relação ao efeito dos aminoácidos no cultivo de *Xanthophyllomyces* foi a produção de biomassa. Dois cultivos apresentaram aumento de biomassa. O cultivo com a mistura asparagina + alanina proporcionou uma biomassa de 710 mg de células secas/ 100 ml de meio, 80% de acréscimo em relação ao extrato de levedura, e o cultivo com ácido glutâmico + glicina, 629 mg de células secas /100 ml de meio.

Como já citado no experimento anterior, asparagina, alanina, ácido glutâmico e glicina são os aminoácidos que estão em maior concentração na parede celular de *Xanthophyllomyces*, segundo análises de BONFIM (1999). A utilização de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) aumenta a produção de biomassa, mas diminui a produção de astaxantina, segundo AN (2001). O uso de um aminoácido conector ao TCA (asparagina ou ácido glutâmico) combinado com outro aminoácido que contém grupo alifático simples ou hidrogênio (alanina ou glicina) pode ter sido responsável pelo aumento tanto de biomassa como de astaxantina na *Xanthophyllomyces*.

Nas combinações de triptofano + metionina, a produção de biomassa permaneceu a mesma, 400 mg de células secas/100ml de meio, enquanto a adição da mistura de cisteína + tirosina na complementação do extrato de levedura, provocou uma redução de quase 50% na biomassa, passando para 208 mg de células secas/100ml de meio. Esta combinação, de um aminoácido contendo um

grupo aromático (tirosina ou triptofano) com outro aminoácido sulfurado (cisteína ou metionina), apresentou pequeno aumento na astaxantina mas nada acrescentou e até reduziu a produção de biomassa.

O nitrogênio na forma de nitrato não é utilizado por Chytridiomycetes, Oomycetes e Basidiomycetes (GRIFFIN, 1994). Nos cultivos suplementados com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , os resultados mostram realmente que o nitrogênio em forma de nitrato não contribuiu para a produção de biomassa, situada em torno de 400mg de células /100 ml de meio. No entanto, tanto a adição do nitrato de amônio quanto a de potássio, elevaram a produção de astaxantina para 520 e 460 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca respectivamente. O efeito positivo do íon  $\text{NH}_4$  na astaxantinogênese já havia sido verificado no item 4.2.2.

A adição de uréia ao extrato de levedura apresentou resultado benéfico apenas para a biomassa, aumentando-a para 624 mg de células seca/100ml de meio. A produção de astaxantina permaneceu inalterada, 380 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

Nos cultivos contendo a manipueira nativa ou pré-proteolizada, adicionadas isoladamente ao extrato de levedura, a produção de biomassa aumentou para 681 e 698 mg de células secas/100 ml de meio respectivamente, e não houve alteração na produção de astaxantina. Os resultados demonstraram que o efeito da hidrólise da proteína de mandioca foi muito pouco significativo para o metabolismo de *Xanthophyllomyces*.

A utilização da farinha de soja mais caseína com o extrato de levedura nos cultivos de *Xanthophyllomyces*, resultou num aumento para 721 mg de células secas/100ml de meio, mas com um pequeno decréscimo na astaxantinogênese, 360  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

No cultivo realizado com citrato de sódio, houve um aumento da astaxantina, passando para 436 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca, porém, uma ligeira redução na biomassa para 361 mg de células secas/100ml de meio. Segundo FLORES-COTERA, MARTIN E SÁNCHEZ (2001), a utilização do citrato de sódio aumenta a produção de astaxantina na *Xanthophyllomyces* porque reduz a síntese proteica, e

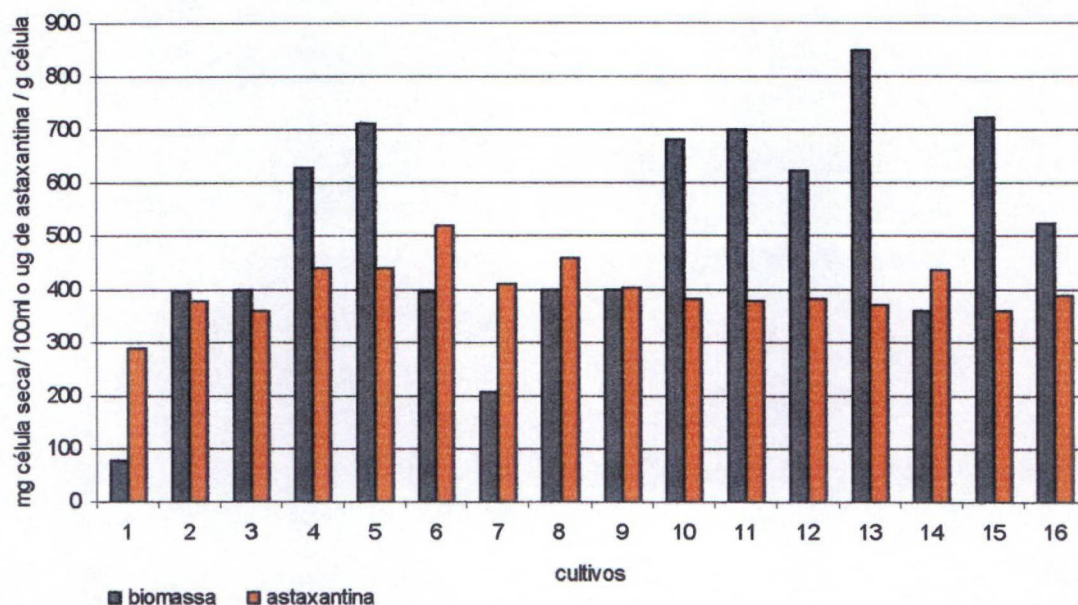
esta restrição pode ser um importante fator na síntese de carotenóides de *Xanthophyllomyces*.

O cultivo que apresentou a melhor produção de biomassa foi aquele onde foram adicionados ao extrato de levedura, a uréia e a manipueira. O crescimento celular foi de 847mg de células/100 ml de meio, enquanto a produção de astaxantina permaneceu praticamente inalterada. Como verificado em cultivos anteriores, nem a manipueira nem a uréia apresentaram efeito na astaxantinogênese da levedura. Este aumento observado no crescimento celular pode ser atribuído a maior concentração de nitrogênio encontrada neste cultivo, em relação aos demais (0,05 g% de uréia + 0,05g% de manipueira).

De acordo com os gráficos de crescimento e do consumo de AR em função do tempo de cultivo, mostrados na Figura 35-A, observa-se que no cultivo suplementado com Centrum(3),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6) e  $\text{KNO}_3$  (8), a biomassa formada foi correspondente ao do cultivo complementado apenas com EL (2), já comprovados pelos dados da gravimetria. Verificando a concentração de açúcar redutor residual relativamente elevada para uma biomassa estabilizada, pode-se dizer que a limitação do crescimento ocorre, possivelmente pela supressão da fonte de nitrogênio no cultivo, no caso o EL.

No caso dos cultivos com as misturas de triptofano + metionina (9) e cisteína + tirosina (7), observa-se uma inibição do crescimento da levedura (Figura 35-B). No cultivo com o triptofano + metionina a inibição provocou um prolongamento da fase lag até às 48 horas e posterior recuperação do crescimento, porém no cultivo cisteína + tirosina não houve diferenciação das fases de crescimento, e sim um crescimento muito lento e gradual durante a fermentação.

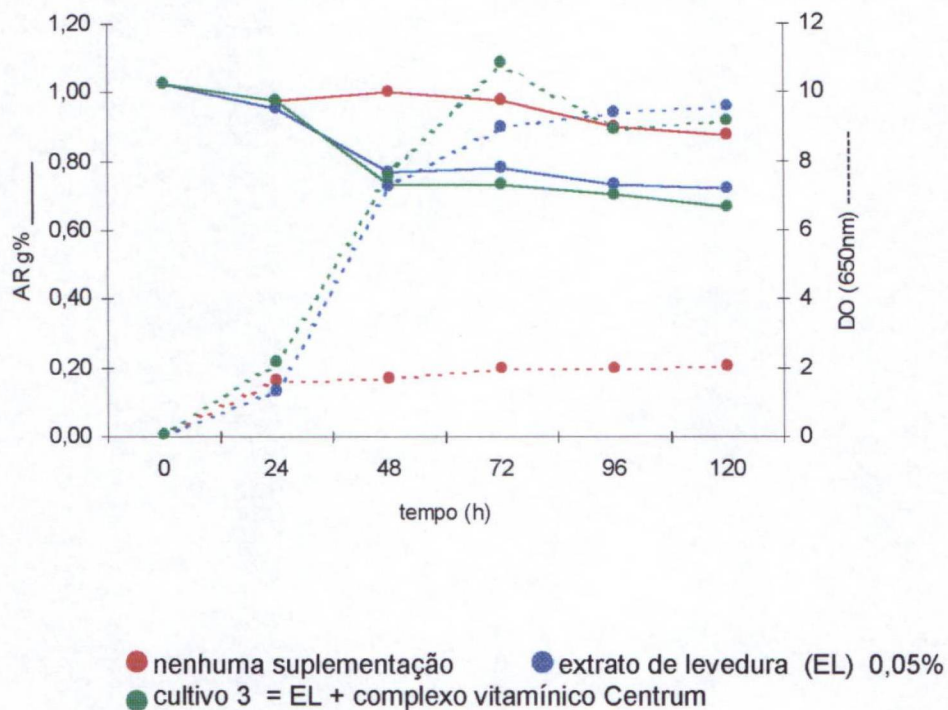
FIGURA 34 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (EXTRATO DE LEVEDURA + COMPLEMENTO) NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADO EM HFAM (HIDRÓLISE pH2,75, 160°C/ 5 atm E 20min)



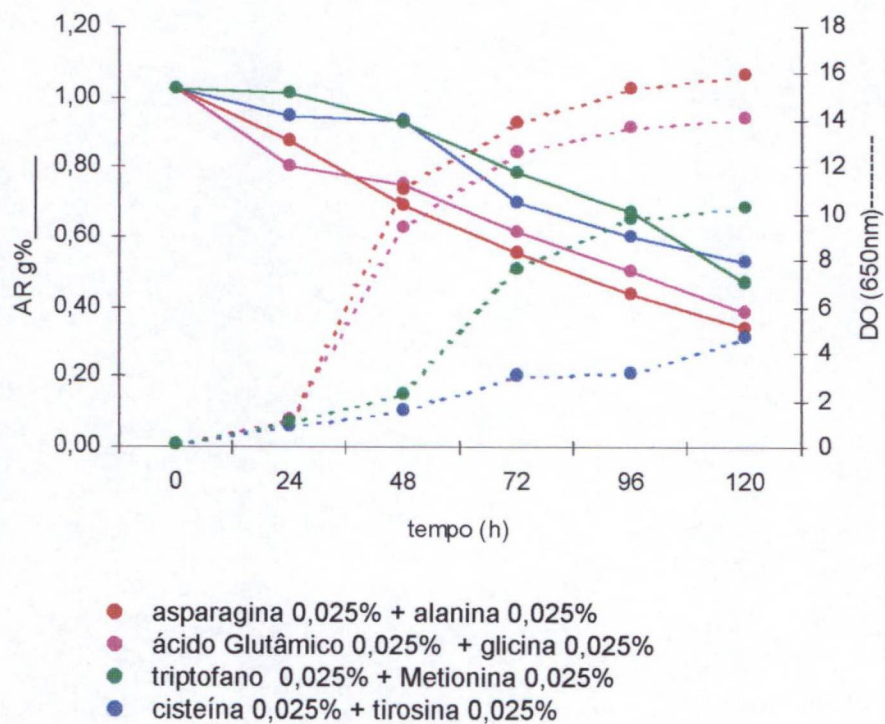
- 1 (-) nenhuma suplementação
- 2 extrato de levedura (EL) 0,05g%
- 3 EL 0,05g% + Centrum 25uL
- 4 EL 0,05g% + ácido glutâmico + glicina (0,025+0,025g%)
- 5 EL 0,05g% + asparagina + alanina (0,025 + 0,025g%)
- 6 EL 0,05g% + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>(0,05g%)
- 7 EL 0,05g% + Cisteína + Tirosina (0,025 + 0,025g%)
- 8 EL 0,05g% + KNO<sub>3</sub> (0,05g%)
- 9 EL 0,05g% + Triptofano + metionina (0,025 + 0,025g%)
- 10 EL 0,05g% + Manipueira liofilizada 0,1g%
- 11 EL 0,05g% + Manipueira liofilizada hidrolisada 0,1g%
- 12 EL 0,05g% + uréia 0,05g%
- 13 EL 0,05g% + uréia 0,05% + mandioca 0,05g%
- 14 EL 0,05g% + citrato de Na<sub>3</sub> 0,2g%
- 15 EL 0,05g% + soja 0,05% + caseína H<sup>+</sup> 0,05g%
- 16 EL 0,05g% + proteínas do leite (lactoglobulinas + lactoalbumina lácteas) 0,1g% + tampico 1mL

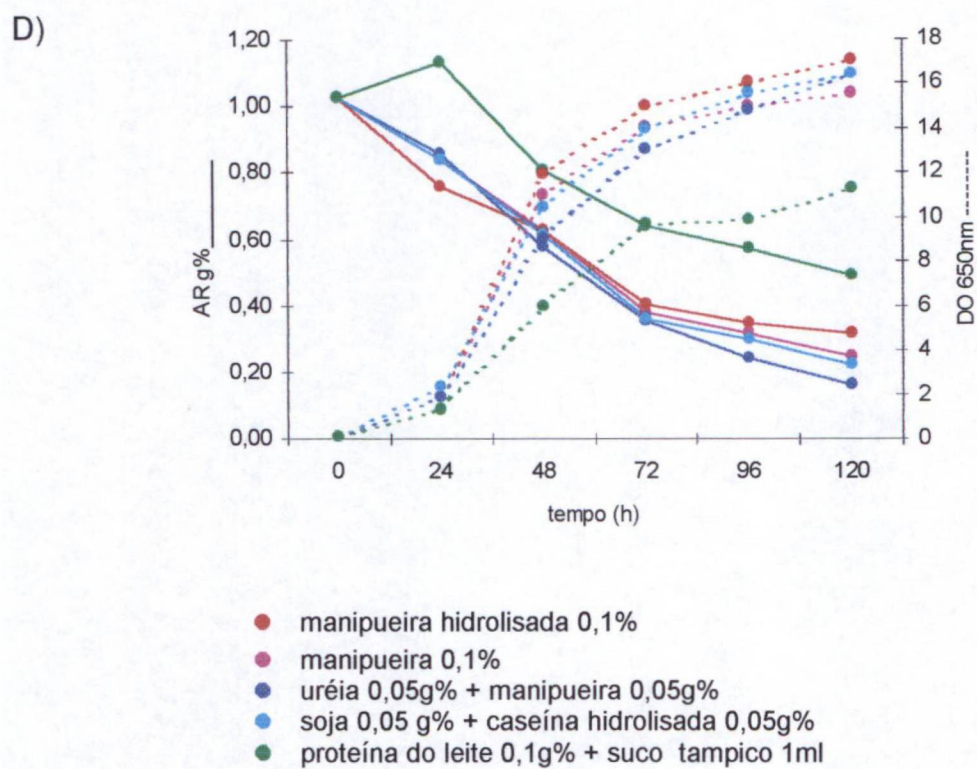
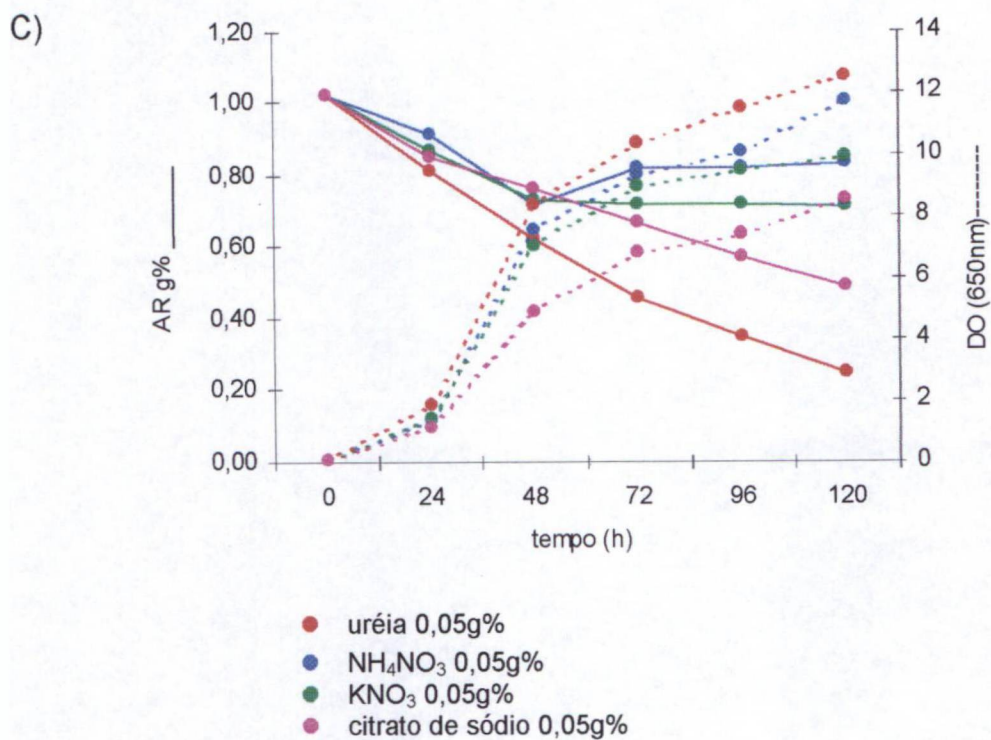
FIGURA 35 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO (EL + COMPLEMENTO) NO CRESCIMENTO E CONSUMO DE AR EM *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADO EM HFAM (HIDRÓLISE : pH2,75 , 160°C / 5 atm E 20 min)

A)



B)





#### 4.2.3.3 Efeito da manipueira e do $\text{NH}_4\text{NO}_3$ no cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em HFAM

A suplementação dos meios de cultivos com extrato de levedura, fornece além do nitrogênio, vitaminas e sais minerais. Nesta série de experimentos, como descritos no ítem 3.7.3.2, duas fontes de nitrogênio com grande perspectiva de uso para cultivo de *Xanthophyllomyces*, a manipueira e o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , em concentrações variadas foram comparadas com as variações correspondentes de extrato de levedura.

Combinações entre as três fontes de nitrogênio também foram feitas para avaliar o efeito associativo dos complementos na fermentação.

Os resultados após 120 horas de cultivo estão demonstrados na Figura 36. O cultivo controle foi feito utilizando 16g% do hidrolisado fosfórico. A única fonte de nitrogênio adicionada foi o  $\text{NH}_4\text{OH}$  1mM utilizado para neutralizar o xarope ácido. A produção de biomassa foi de 135mg de células secas/100 ml de meio e a produção de astaxantina foi de 232 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

Quando acrescentado EL nas concentrações de 0,1, 0,15 e 0,2g% nos cultivos, houve um aumento progressivo na produção de biomassa de 733, 910 e 1045mg de células secas/100 ml de meio, respectivamente. Um percentual de quase 50% de acréscimo de biomassa quando se dobrou a concentração de 0,1 para 0,2g% de extrato de levedura. No entanto, a astaxantinogênese não acompanhou o crescimento celular. A produção de astaxantina reduziu de 332, para 229 e 220 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula, correspondentes às concentrações crescentes de extrato de levedura. Assim, o aumento de 50% na biomassa foi anulado pela perda de 50% da produção da astaxantina.

PARAJÓ, SANTOS E VÁZQUEZ (1997) cultivando *Xanthophyllomyces* em hidrolisado de *Eucalyptus globulus*, contendo xilose e extrato de levedura 0,3g%, obtiveram biomassa de 1170 mg de células/ 100ml de meio de cultura e uma produção de astaxantina de 199 $\mu\text{g}$  /g de célula.

A manipueira, subproduto de custo nulo (dado o efeito poluente quando descartada) apresentou nos experimentos anteriores resultados positivos favorecendo o incremento de biomassa. A adição de 0,1, 0,15 e 0,20g% de manipueira ao hidrolisado fosfórico de mandioca para fermentação com *Xanthophyllomyces* também apresentou aumentos crescentes de biomassa, 459, 607 e 755mg de células secas/100ml de meio. Se deduzirmos a biomassa produzida pelo cultivo controle, 135mg de biomassa produzidas a partir da amônia da neutralização, das biomassas obtidas nos cultivos suplementados com manipueira, observamos que a cada 0,05g% de manipueira adicionada ao meio produz aproximadamente 160 mg de células secas/100 ml de meio. Com relação a astaxantina, a adição de 0,1 0,15 e 0,2 g% de manipueira, produziu 307, 380 e 360µg de astaxantina/g de célula seca.

Em experimento anterior, a adição de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ao cultivo contendo extrato de levedura, resultou apenas na elevação da produção de astaxantina por *Xanthophyllomyces*. O cultivo realizado sem utilização do extrato de levedura, suplementados apenas com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1g%, apresentou sensível aumento de biomassa, 147 mg de células/ 100ml de meio e aumento significativo de astaxantina, passando de 232 para 309µg de astaxantina/g de célula seca. Nos cultivos preparados com 0,15 e 0,2g% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o resultado mostrou um efeito inibitório tanto na biomassa, 114 e 102 mg de células/100 ml de meio respectivamente, como na produção de astaxantina, 155 e 120µg de astaxantina/g de célula seca respectivamente.

Algumas fontes de nitrogênio apresentaram sinergismo quando associadas. Cultivos combinando extrato de levedura 0,075g% e manipueira 0,075g% (total da fonte de nitrogênio = 0,15g% ) apresentaram biomassa de 805 mg% de células e astaxantina de 390µg /g de célula seca. Para efeitos comparativos dos resultados os valores obtidos são maiores do que a simples somatória ou valor teórico. Entende-se como valor teórico, o valor obtido da somatória das proporções dos respectivos resultados individuais, neste caso, os valores obtidos nos cultivos individuais com extrato de levedura e manipueira, encontrados na concentração de 0,15g% (50% da

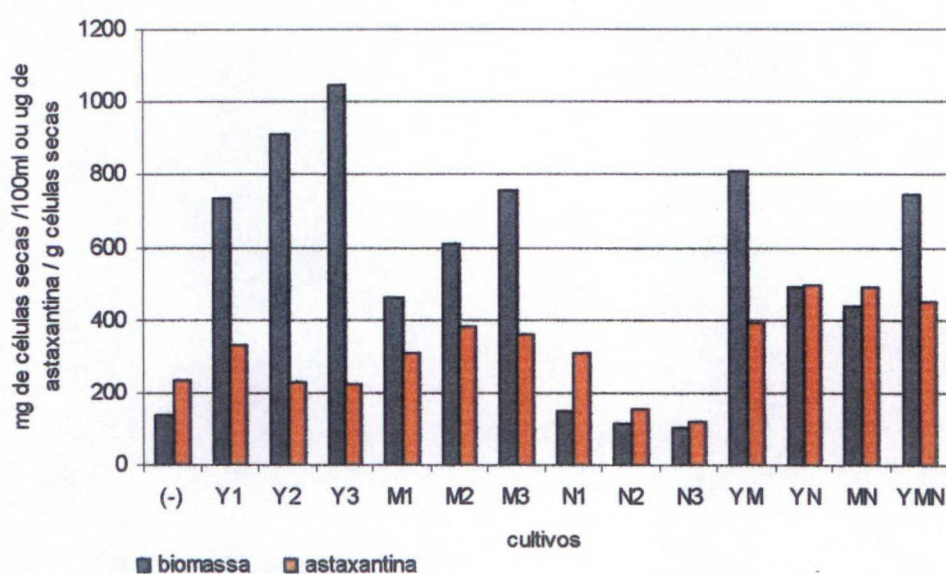
biomassa no cultivo com extrato de levedura 0,15g% + 50% da biomassa obtida com manipueira 0,15g% = 0,15g% → valor teórico da combinação).

a) manipueira teórico =  $910 \cdot (0,5) + 607 \cdot (0,5) = 785,5$  mg/100ml de meio

b) astaxantina teórico =  $229 \cdot (0,5) + 380 \cdot (0,5) = 304,5$  µg /g de célula seca.

FIGURA 36 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE

DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* (hidrolisado pH2,75, 160°C / 5ATM E 20min)



- (-) Hidrolisado 16%
- Y1 EL 0,1%
- Y2 EL 0,15%
- Y3 EL 0,2%
- M1 Manipueira 0,1%
- M2 Manipueira 0,15%
- M3 Manipueira 0,2%
- N1  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%
- N2  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,15%
- N3  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,2%
- YM EL 0,075g% + manipueira 0,075g%
- YN EL 0,075g% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,075g%
- MN manipueira 0,075g% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,075g%
- YMN EL 0,05g% + manipueira 0,05g% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g%

Os resultados do cultivo suplementado com 0,075g% de EL + 0,075g% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , demonstram uma produção razoável de biomassa, 489 mg%, e um aumento na produção de astaxantina 496 $\mu\text{g}$  de /g de célula seca.

Nos cultivos suplementados com 0,075g% de manipueira + 0,075g% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  os resultados demonstram uma produção de biomassa de 440 mg% e um aumento na produção de astaxantina, 488 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

A combinação das três fontes de nitrogênio, EL 0,05g% + manipueira 0,05g% +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g% resultou em cultivos com a produção de biomassa de 747 mg% e 448  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

Analisando os cultivos com as fontes de nitrogênio combinadas podemos verificar que a associação das diferentes fontes aumentou significativamente a produção de astaxantina e que a utilização do nitrato de amônio em concentrações abaixo de 0,1g%, na presença de manipueira ou EL, contribuiu significativamente na astaxantinogênese e, de alguma forma também, para a formação de biomassa .

#### 4.2.4 Otimização das fontes de nitrogênio (manipueira e nitrato de amônia) e taxa de inoculação na produção de biomassa e astaxantina para o cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em hidrolisado fosfórico de amido de mandioca

Alguns trabalhos na literatura citam a utilização de ferramentas estatísticas na modelagem e otimização de meios de cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (FLORÊNCIO et al.,1998), (VÁSQUEZ; MARTIN, 1998) (RAMÍREZ; GUTIERREZ ; GSCHAEDLER, 2001).

Com o objetivo de estabelecer as melhores concentrações de manipueira,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e taxa de inoculação para produção de biomassa e astaxantina da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em meios contendo HFAM 16g% foi desenvolvido um planejamento experimental do tipo Box-Behnken composto de 3 fatores e 12 níveis e mais 3 pontos centrais. O valor mínimo(-1), médio(0) e máximo(+1) para

cada fator foi respectivamente, 0,15g%, 0,25g% e 0,35g% para a manipueira, 0,02g%, 0,04g% e 0,06g% para  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e taxa de inóculo correspondente a 0,1, 0,2, e 0,3 para  $A_{650\text{nm}}$ .

A matriz contendo os fatores e resultados do planejamento experimental utilizado para otimização da concentração de manipueira, nitrato de amônio e biomassa estão dispostos na Figura 37 e na Tabela 10.

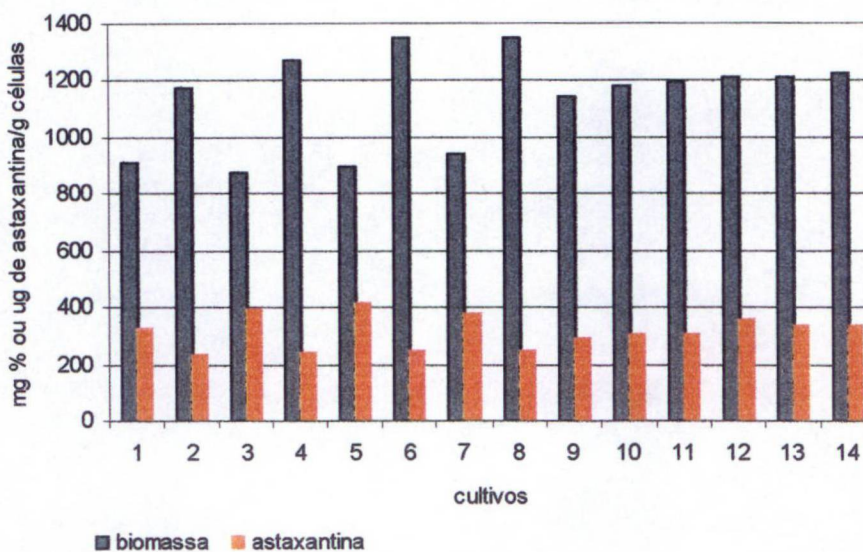
Os resultados mostrados na Tabela 10 demonstram que a taxa de inoculação não apresentou efeito significativo na produção de biomassa e astaxantina. Comparando-se os cultivos 6 e 8, ambos apresentavam concentração de 0,35g% de manipueira e 0,04g% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , diferindo apenas na taxa de inoculação de 0,1 e 0,3 ( $A_{650\text{nm}}$ ), respectivamente. A produção de biomassa (1350 mg/100ml de meio) e astaxantina (245  $\mu\text{g}$  /g de célula seca) foi praticamente igual para ambos os cultivos.

De acordo com os gráficos de contorno mostrados na Figura 38, as melhores concentrações de manipueira e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  para produção de biomassa são de aproximadamente 0,35g% e 0,04g% respectivamente, enquanto que para a produção de astaxantina são de 0,25g% e 0,05g% respectivamente.

O perfil cromatográfico dos pigmentos carotenóides produzidos pela *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Figura 39-A, cores naturais) evidencia que o pigmento predominante nos cultivos é a astaxantina. A cantaxantina, uma xantofila menos oxigenada que a astaxantina, também encontrada na pigmentação da carne do salmão, é outro pigmento presente, em concentrações bem menores. Outros carotenóides como o  $\beta$ -caroteno e o apo-carotenóide não estão presentes em quantidades suficientes que permitam a determinação cromatográfica.

A cromatografia B mostra a revelação com vapor de iodo, usado para evidenciar os compostos que apresentam insaturações e a cromatografia C, revelada com o p-anisaldeído, mostra todos os componentes lipídicos, inclusive contaminantes do processo de extração da astaxantina tais como TAGS (triacilglicerois) (Figura 39).

FIGURA 37 - EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES OTIMIZADAS DAS FONTES DE NITROGÊNIO E DA TAXA DE INOCULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADOS EM HFAM

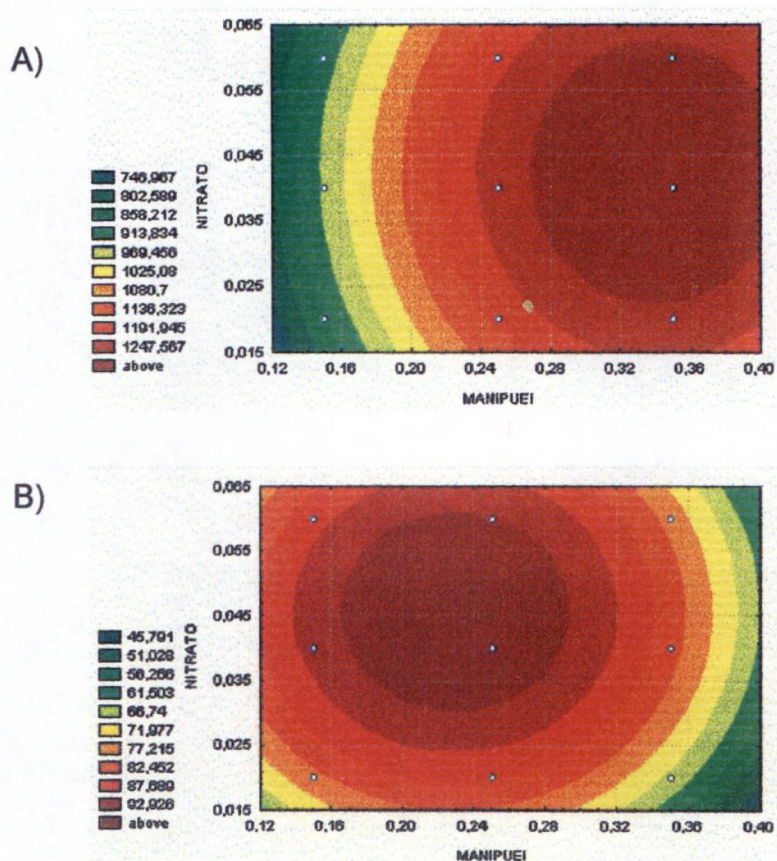


Legenda dos cultivos na tabela 10 a seguir

TABELA 10 - MATRIZ DA OTIMIZAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO E INÓCULO NO CULTIVO DA *X. dendrorhous* EM HFAM

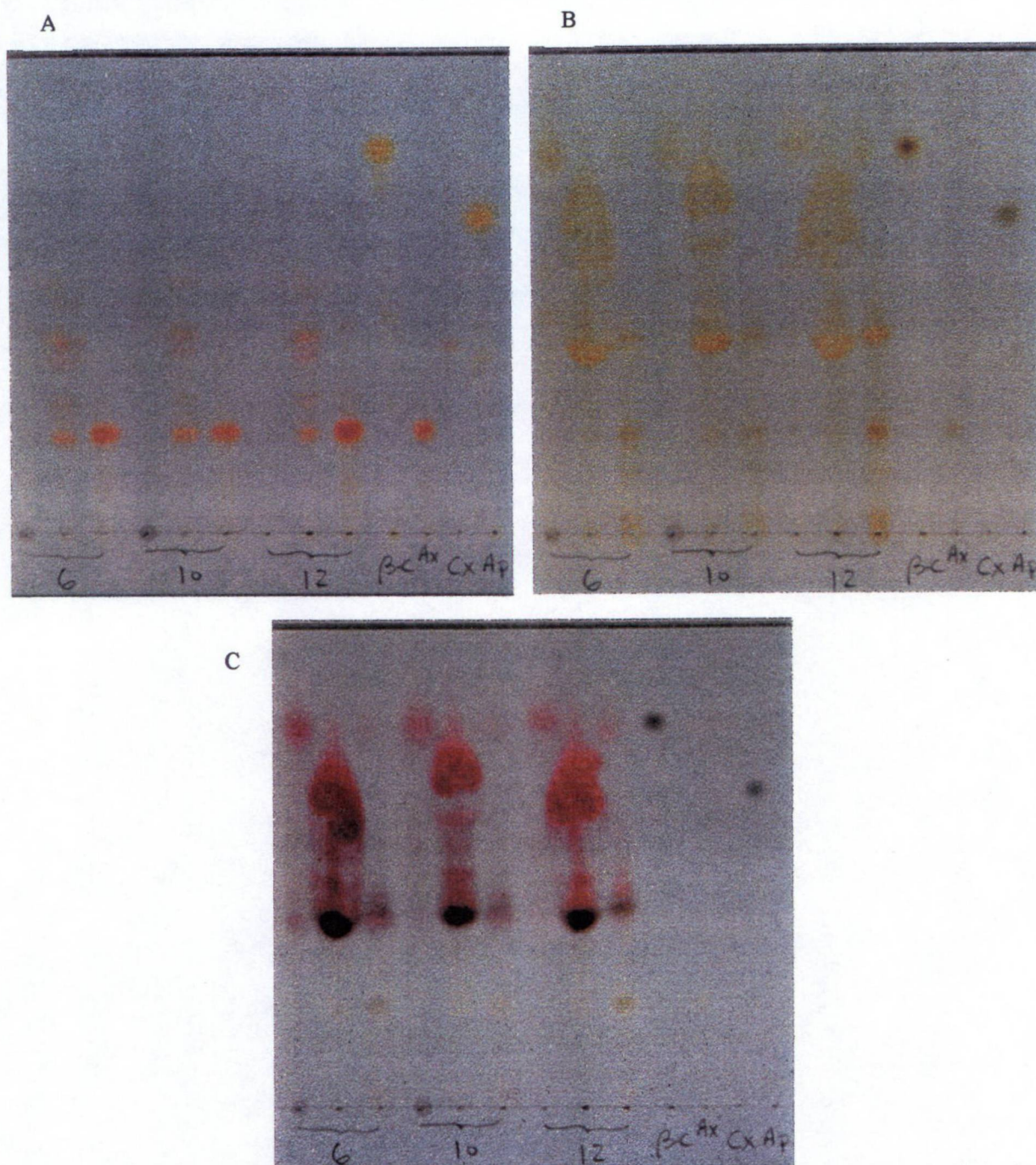
cultivos	1	2	3	biomassa mg%	astaxantina ug/g célula
	manipueira g%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> g%	inóculo DO		
1	0,15	0,02	0,2	912	330
2	0,35	0,02	0,2	1176	236
3	0,15	0,06	0,2	873	410
4	0,35	0,06	0,2	1268	241
5	0,15	0,04	0,1	897	436
6	0,35	0,04	0,1	1350	245
7	0,15	0,04	0,3	943	392
8	0,35	0,04	0,3	1348	246
9	0,25	0,02	0,1	1145	289
10	0,25	0,06	0,1	1183	304
11	0,25	0,02	0,3	1196	309
12	0,25	0,06	0,3	1210	355
13	0,25	0,04	0,2	1207	333
14	0,25	0,04	0,2	1225	333
15	0,25	0,04	0,2	1215	334

FIGURA 38 - GRÁFICO DE CONTOURO PARA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA E BIOMASSA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADOS EM HFAM EM FUNÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO



- A) Efeito das concentrações de manipueira e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  na produção de Biomassa (mg de células secas/100ml de meio)
- B) Efeito das concentrações de manipueira e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  na produção de Astaxantina ( $\mu\text{g}$  de astaxantina/25 ml de meio)

FIGURA 39 - CCD DA EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES DE 3 CULTIVOS DE *X. dendrorhous* OBTIDOS COM HFAM E SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E  $\text{NH}_4\text{NO}_3$



CCD dos cultivos 6, 10 e 12 da tabela 9. Cada cultivo passou por pré-tratamento em coluna de sílica. Após misturado com um pouco de sílica e evaporado o solvente de extração, as amostras dos cultivos foram eluídas com os seguintes solventes, representados pelos 3 pontos de aplicações de cada cultivo: 1º) 60% hexano e 40% clorofórmio, aplicação do lado esquerdo 2º) 40% hexano e 60% clorofórmio aplicação central e o 3º) acetona 100%, aplicação da direita.

Padrões:  $\beta$ -c =  $\beta$ -caroteno; Ax = astaxantina; Cx = cantaxantina e Ap = apocarotenóide.  
 Revelação : A) ao natural, B) vapor de iodo e C) anisaldeído

#### 4.2.5 Otimização da relação HFAM / manipueira (C:N) para produção de biomassa e astaxantinogênese em cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

É sabida a influência da relação C:N no metabolismo de microrganismos (DAWES; SUTHERLAND, 1992). Com o objetivo de estabelecer a melhor relação HFAM / manipueira para produção celular e de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi realizado neste experimento um planejamento fatorial completo do tipo  $3^2$  (2-0) com 9 cultivos. Os meios de fermentações foram realizados utilizando HFAM (item 3.3.6) na concentração mínima (-1), média (0) e máxima (+1) correspondentes a 8, 12 e 16g%. A concentração mínima, média e máxima de manipueira utilizada foi de 0,15, 0,25 e 0,35g%. Todos os cultivos foram suplementados com 0,05g% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Conforme demonstram os resultados da tabela 11, cultivos realizados com a concentração de manipueira de 0,15g%, tiveram limitação do crescimento celular devido à falta de nitrogênio. O acréscimo da concentração de hidrolisado não produziu proporcionalmente a biomassa correspondente. As biomassas dos cultivos nesta concentração de manipueira e concentrações correspondentes de 8, 12 e 16% de hidrolisados, produziram respectivamente 716, 725 e 797 mg de células secas/100ml de meio e 453, 473 e 458 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca.

Cultivos realizados com a concentração de 0,25g% de manipueira apresentaram os melhores resultados. As biomassas dos cultivos nesta concentração de manipueira e concentrações correspondentes de 8, 12 e 16% de hidrolisados produziram respectivamente 885, 1093 e 1220 mg de células secas/100ml de meio e 427, 395 e 357 $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca. A redução da astaxantina (16,4%) é compensada pelo ótimo incremento da produção de biomassa (26,65%).

Concentrações de 0,35g% de manipueira não produziram ganhos de biomassa e provocaram redução de astaxantina. As biomassas produzidas foram de 957, 112 e 1148 mg de células secas/100ml de meio e 389, 348 e 268  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca respectivamente.

TABELA 11 - MATRIZ DA OTIMIZAÇÃO DA RELAÇÃO MANIPUEIRA E HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*

cultivo	Manipueira g%	hidrolisado % v/v	biomassa mg/100ml	astaxantina ug/g célula
1	0,15	8	716	453
2	0,15	12	725	473
3	0,15	16	797	458
4	0,25	8	885	427
5	0,25	12	1093	395
6	0,25	16	1220	357
7	0,35	8	957	389
8	0,35	12	1120	348
9	0,35	16	1148	268

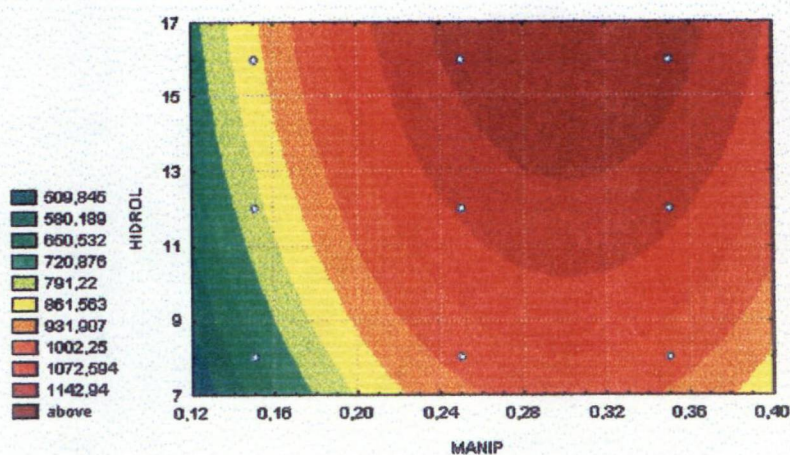
De acordo com os gráficos de contorno Figura 40, as concentrações mais apropriadas para a produção de biomassa são de 0,3g% de manipueira e 14% (v/v) de hidrolisado, mas, para a astaxantinogênese, as concentrações 0,25g% de manipueira e 12% (v/v) de hidrolisado são as mais favoráveis.

#### 4.2.6 Efeito do pH no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivado em HFAM suplementado com EL ou manipueira.

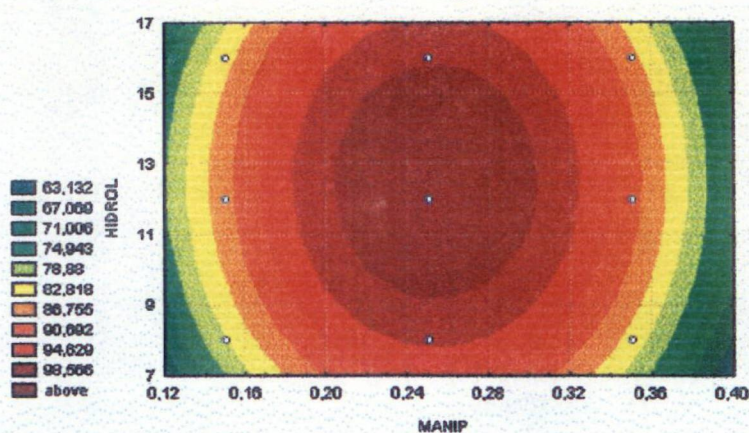
O efeito do pH no crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi estudado por vários autores. Quando são comparados os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de microrganismos, o principal problema é a mudança do pH durante o cultivo (MEYERS , PREEZ, 1994). Geralmente isto pode ser controlado com a utilização de soluções tampão. JOHNSON e LEWIS (1979) determinaram que o pH ótimo foi o 4,5, onde foram conseguidos máximo rendimento celular, maior velocidade de crescimento e de produção de astaxantina. O uso de tampão ftalato ou fosfato inibiram levemente estes parâmetros.

FIGURA 40 - GRÁFICO DE CONTORNO PARA PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA E BIOMASSA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO MANIPUEIRA E HFAM

A) biomassa (mg de células secas/100ml de meio)



B) astaxantina (ug de astaxantina / 25ml de meio)



BONFIM (1999), cultivando *Xanthophyllomyces* em caldo de cana, obteve biomassa constante na faixa de pH de 3,0 a 6,0. No entanto, a produção de astaxantina foi maior para os pH 3,0, 3,5 e 6,0.

A determinação do efeito do pH no crescimento e/ou na produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces* foi realizada num meio constituído de

HFAM 7% v/v suplementado com manipueira 0,25g% e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g% p/v e separadamente ajustado para de pH 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 e comparativamente foram feitos os mesmos cultivos substituindo as fontes de nitrogênio pelo EL 0,1g%.(item 3.7.5).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 41, o pH 6,0 foi o melhor para crescimento celular e produção de astaxantina, tanto nos cultivos suplementados com manipueira e nitrato de amônia, produções de biomassa de 791mg de células/100ml de meio e astaxantina de 445 $\mu\text{g}$  /g de célula seca, como nos cultivos suplementados com EL, biomassa de 674mg de células/100ml de meio e astaxantina de 399 $\mu\text{g}$  /g de célula seca.

Os resultados do crescimento celular e produção de astaxantina nos demais cultivos suplementados com manipueira e nitrato de amônia foram respectivamente pH 5,0 (729mg /100ml de meio e 441 $\mu\text{g}$  /g de célula seca), pH 4,0 (707mg /100ml de meio e 428 $\mu\text{g}$  /g de célula seca) e pH 3,0 (310mg /100ml de meio e 495 $\mu\text{g}$  /g de célula seca)

Nos cultivos suplementados com EL as produções de biomassa e astaxantina foram respectivamente, pH 5,0 (648mg /100ml de meio e 400 $\mu\text{g}$  /g de célula seca), pH 4,0 (661mg /100ml de meio e 382 $\mu\text{g}$  /g de célula seca) e pH 3,0 (581mg /100ml de meio e 356 $\mu\text{g}$  /g de célula seca).

A Figura 42 mostra a variação do pH ao decorrer do tempo de cultivo. Comparando as suplementações de nitrogênio, pode-se observar que no cultivo suplementado com a manipueira e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , o pH decresceu mais rapidamente em função do tempo de cultivo do que o cultivo com EL. A amônia normalmente é utilizada pelos microrganismos na forma de  $\text{NH}_3$  liberando  $\text{H}^+$ . Quando o suplemento de nitrogênio está sob forma de sal de amônia, o cátion é absorvido muito mais rapidamente do que o ânion, e ocorre um rápido aumento de acidez (GRIFFIN, 1994). A queda acentuada de pH não influenciou a produção de astaxantina, mas pode ter sido responsável pela grande diferença da produção de biomassa nestes cultivos.

FIGURA 41 - EFEITO DO pH NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENÊSE DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADA EM HFAM SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA (EL) OU MANIPUEIRA (M)

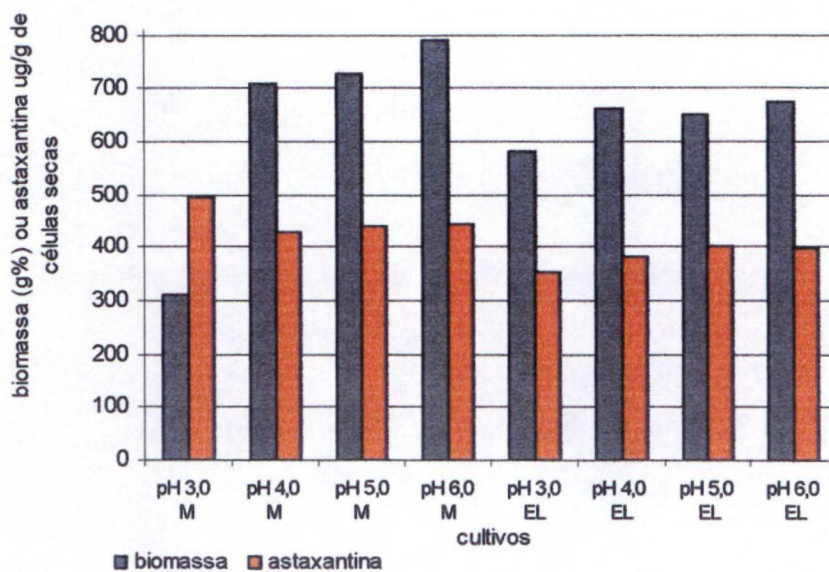
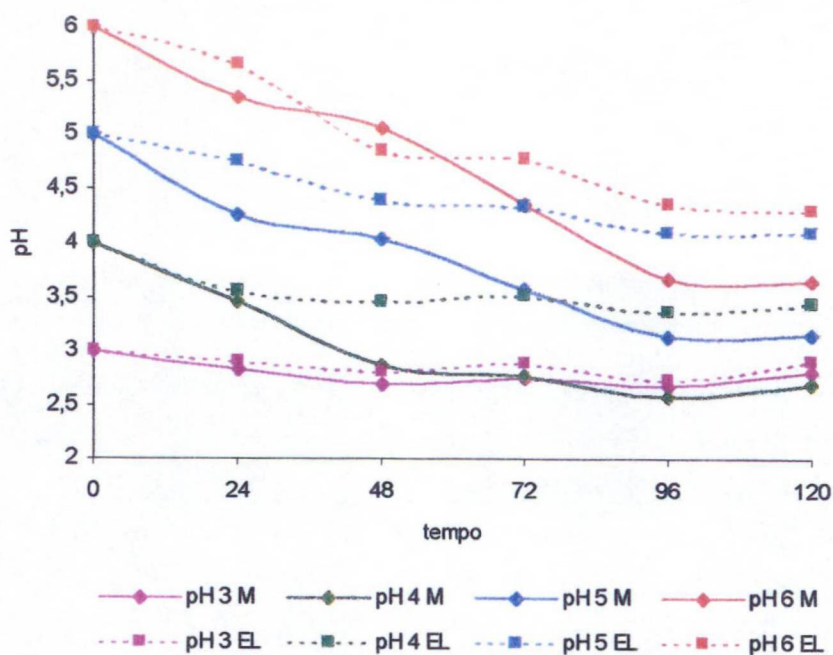


FIGURA 42 - EVOLUÇÃO DO pH EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS CULTIVOS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* SUPLEMENTADO COM MANIPUEIRA E  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (M) OU EXTRATO DE LEVEDURA (EL)



#### 4.2.7 Efeito do HMF no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivado em HFAM

O HMF (5-hidroximetilfurfural) é um produto formado da desidratação de hexoses durante a hidrólise ácida. Segundo SANCHEZ e BAUTISTA (1988) o HMF pode afetar o metabolismo de vários microrganismos. Para TAHERZADEH, GUSTAFSSON e NIKLASSON (2000), o HMF é um dos mais importantes inibidores de leveduras em fermentações com xaropes obtidos de hidrólise ácida. SANCHEZ e BAUTISTA (1988) observaram inibição de 60% do crescimento celular de *Candida guilliermondii* quando 0,2% de HMF foi adicionado ao meio de cultivo.

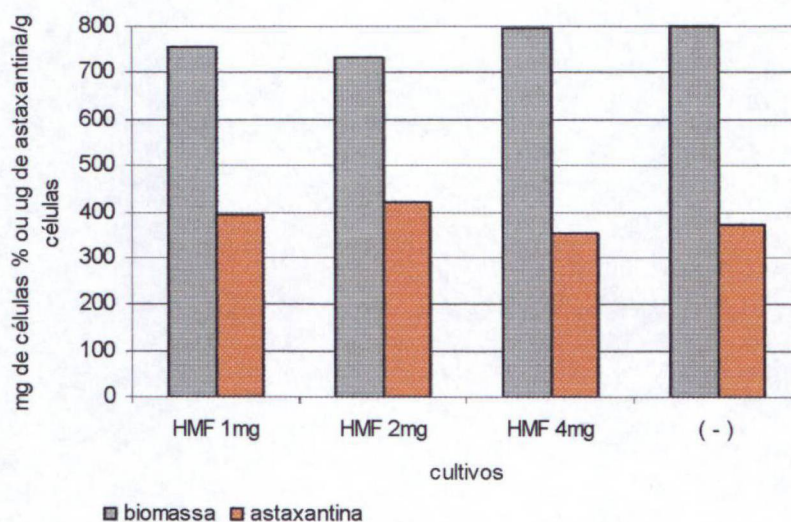
O efeito do HMF (2g/l) em *Saccharomyces cerevisiae* consiste num prolongamento da fase lag proporcional à concentração deste aldeído no meio de fermentação. Este efeito inibitório do HMF tem sido atribuído devido à sua ação sobre enzimas chaves que atuam na glicólise, como as triose-fosfato-desidrogenase e a álcool-desidrogenase, SANCHEZ e BAUTISTA (1988).

TAHERZADEH, GUSTAFSSON e NIKLASSON (2000) descreveram que a adição de HMF(4g/l) reduziu em 32% a taxa de evolução de CO<sub>2</sub> e afetou a taxa de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae*. PALMQVIST e HAHN-HARGEDAL (2000) demonstraram que o HMF pode ser metabolizado por *S. cerevisiae*. O principal produto da conversão é o HMFAL (5-hidroximetilfurfuril álcool), como também, o HMFCA (5-hidroximetil furano ácido carboxílico).

Para estudar o efeito do HMF no crescimento e astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, foram feitos cultivos contendo HFAM (item 3.3.6) a 7,5g% suplementados com manipueira 0,25g% e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,05g%. Em diferentes cultivos de 25 ml foram adicionados 1, 2 e 4mg de HMF e dois cultivos sem adição de HMF foram feitos para controle.

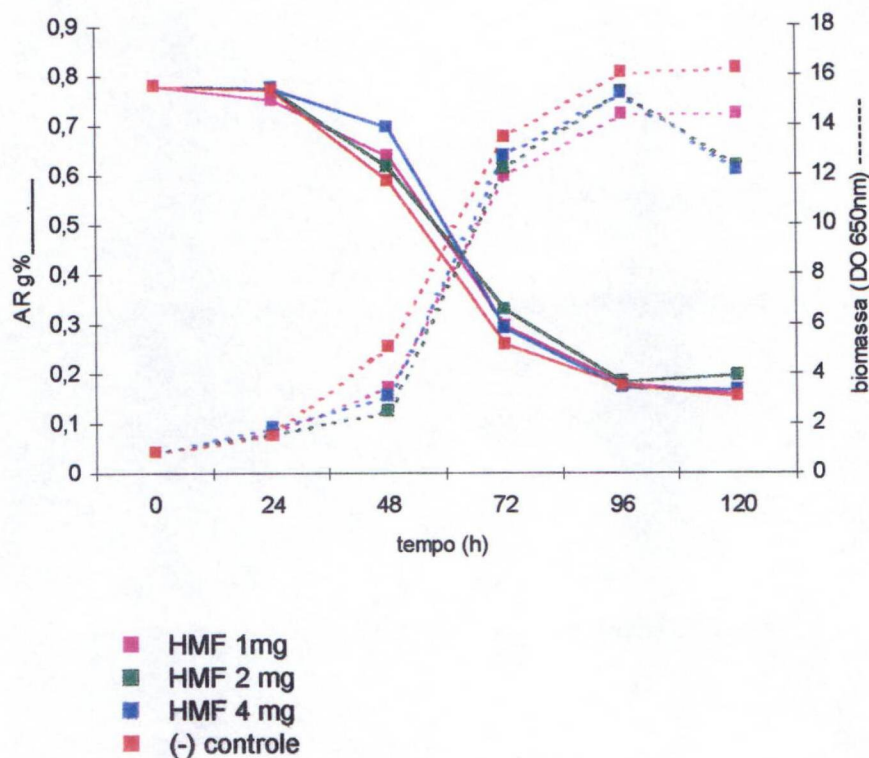
Os resultados apresentados na Figura 43, demonstram que as concentrações de HMF adicionada aos cultivos não afetou de forma significativa o crescimento celular e a astaxantinogênese da levedura. Os cultivos contendo 1, 2, e 4 mg de HMF apresentaram biomassa de 756, 733 e 794 mg de células/100 ml de meio, enquanto que a média dos controles foi de 801 mg de células/100 ml de meio. A produção de astaxantina nos cultivos contendo 1, 2, e 4 mg de HMF foi de respectivamente 392, 418 e 354  $\mu\text{g}$  /g de célula seca e 373  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de célula seca, resultado obtido da média dos controles.

FIGURA 43 - EFEITO DO HMF NO CRESCIMENTO E ASTAXANTINOGENESE DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* CULTIVADO EM HFAM



Observando a Figura 44, que mostra a relação do consumo de açúcar redutor e o crescimento, pode ser observado um pequeno atraso no crescimento nos hidrolisados no período de 24 a 48 horas, nos cultivos onde foi acrescentado o HMF. O consumo de AR neste período para estes cultivos, também foi menor do que nos controles. A partir do tempo de 48 horas, *Xanthophyllomyces* deve ter metabolizado o HMF e houve então a compensação do crescimento celular pelo aumento da velocidade de crescimento e, conseqüentemente maior consumo de açúcares.

FIGURA 44 - EFEITO DO HMF NO CONSUMO DE AR E NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NOS CULTIVOS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*



Um cultivo que apresente 4 mg de HMF em 25 ml de meio, ou seja concentração de HMF de 0,16mg/ml de meio, corresponde aproximadamente ao HMF encontrado num cultivo feito com hidrolisado fosfórico obtido em pH 1,8 a 160°C por 5 min, diluído a 12%. A diferença é que no referido hidrolisado, além do HMF, também há a presença de outros produtos de degradação, inclusive originados do próprio HMF, como os ácidos fórmico e levulínico e/ou compostos tipo Maillard.

De acordo com dados mostrados no gráfico da Figura 26, item 4.1.2.3.1, a concentração de ácido fórmico é duas vezes maior do que a de HMF, nesta condição de hidrólise, e numa hidrólise nas mesmas condições com ácido clorídrico, as concentrações de ácido fórmico são cinco vezes maiores.

O ácido fórmico pode ser mais inibitório do que o ácido acético e o ácido levulínico em concentrações equimolares. Devido ao pequeno tamanho da molécula, o ácido fórmico tem sua difusão através da membrana celular facilitada, resultando na diminuição do pH intracelular. Para compensar a queda do pH, prótons devem ser bombeados para fora da célula, atividade que requer gastos de ATP, energia

que é desviada da produção de biomassa. Se a concentração de ácido fórmico for alta, a energia reservada pela célula é depauperada, resultando em acidificação do citoplasma e morte da célula (LARSSON et al., 1999).

#### 4.2.8 Variação do crescimento e produção de astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em função do tempo de cultivo.

Segundo JOHNSON e LEWIS (1979), a produção de astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous* ocorre principalmente durante a fase de crescimento exponencial, mas continua sendo produzida lentamente durante a fase estacionária, mesmo na exaustão da glucose. JOHNSON e AN (1991) mencionam que a astaxantina continua a ser sintetizada na fase estacionária do crescimento, e que *Xanthophyllomyces* excreta um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo um álcool, ácido acético ou intermediário do ciclo do ácido cítrico, que é posteriormente assimilado e estimula a carotenogênese. Em contraste, a produção de carotenóides em *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula rubra* ocorre durante a fase estacionária do crescimento. Em fungos cultivados em culturas superficiais, a carotenogênese não ocorre antes da fase estacionária do crescimento e a formação de carotenóides é estimulada pelo excesso de carboidratos e pela limitação de nitrogênio (ACHEAMPONG; MARTIN, 1995). Estes autores observaram em seus estudos que a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* é diferente dos outros fungos carotenogênicos e que a formação dos carotenóides acontece durante todo o período de crescimento e continua durante a fase estacionária do crescimento.

Para verificar a variação do crescimento e da produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em função do tempo de cultivo, foram realizados experimentos empregando o hidrolisado fosfórico de mandioca (item 3.3.6) diluído a 8% (v/v) suplementado com manipueira 0,25g% e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g% . Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 45 e 46.

FIGURA 45 - VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ASTAXANTINA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO HFAM SUPLEMENTADO COM MANIPUEIRA 0,25g% E  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g%

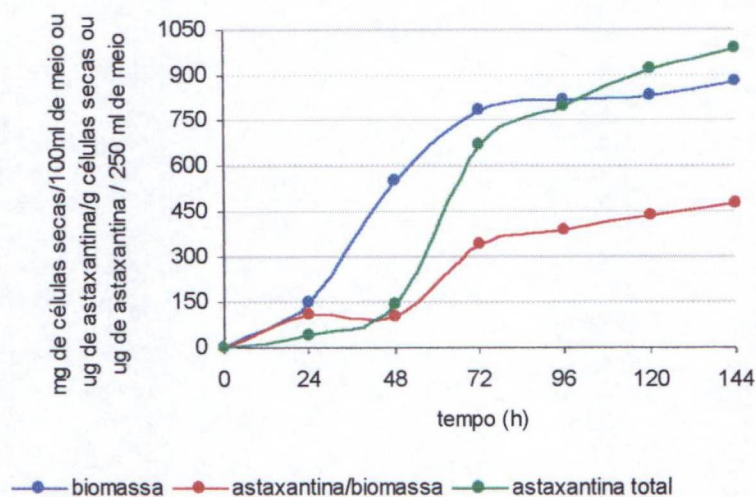
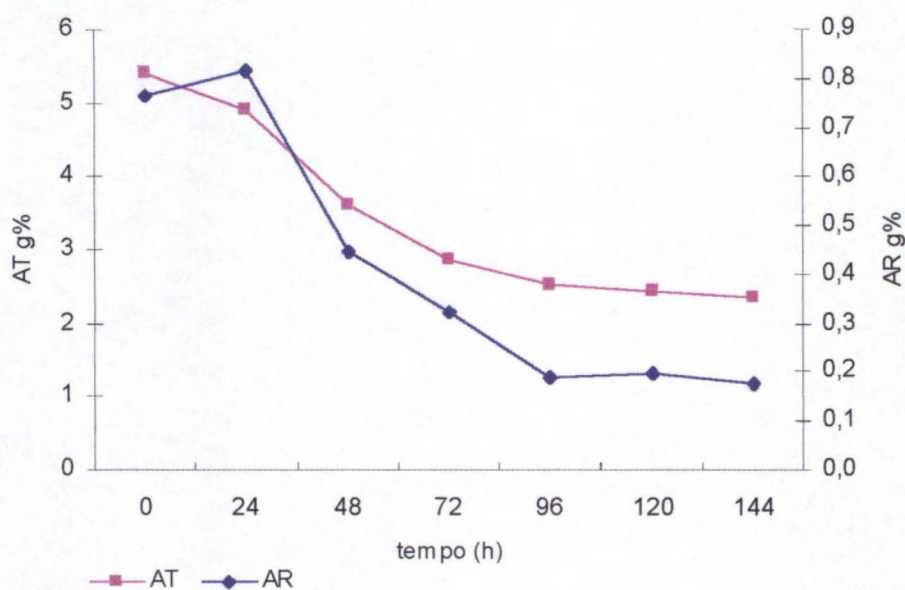


FIGURA 46 - CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS (AT) E AÇÚCARES REDUTORES (AR) DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO NO HFAM



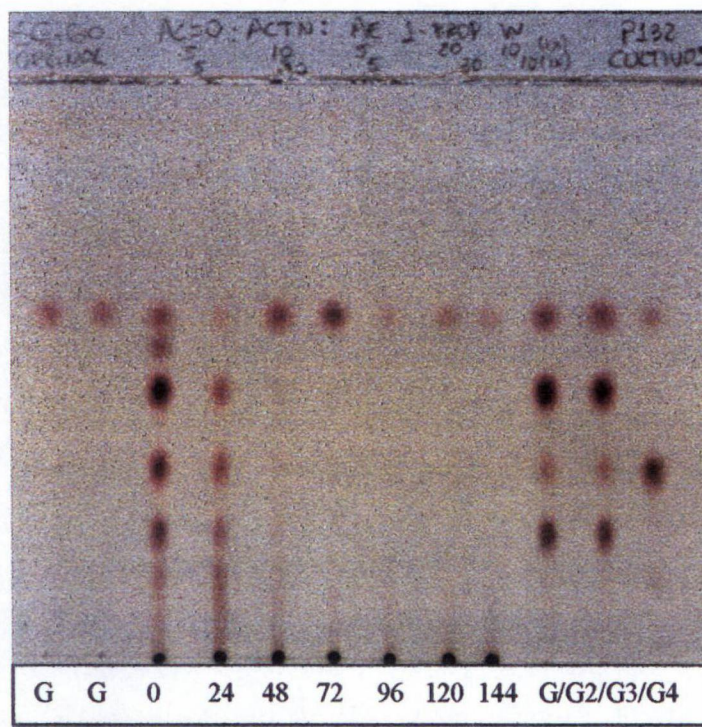
Os resultados dos cultivos mostram que a variação do crescimento e da produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em função do tempo ocorreu de maneira semelhante àquela descrita por ACHEAMPONG e MARTIN (1995).

A análise da evolução do crescimento celular da levedura *Xanthophyllomyces* em função do tempo no HFAM deve estar associada necessariamente ao perfil de açúcares disponibilizados durante o processo de fermentação, uma vez que HFAM utilizado nestas fermentações apresentava DE inicial em torno de 18 (Tabela 6, p.77), o que significa baixo percentual de açúcares redutores e concentrações maiores de maltoligossacarídeos.

Observando o gráfico da Figura 45, verifica-se que a fase de crescimento exponencial estendeu-se até 72 horas de cultivo. A partir deste período, o cultivo não entrou na fase estacionária, mas provavelmente numa fase muito lenta de crescimento, quando pode ser observado também pequeno consumo de açúcares totais (Figura 46). Este comportamento da levedura *Xanthophyllomyces* pode ser explicado pela análise da CCD dos perfis de açúcares em cada tempo (Figura 47), e na respectiva densitometria (Figura 48) e do perfil do consumo de cada açúcar em função do tempo de cultivo (Figuras 49).

Praticamente todas os oligossacarídeos com grau de polimerização até 5 unidades de glucose foram consumidos até 72 horas de fermentação, permanecendo no meio de cultura apenas os açúcares maiores e a glucose residual, produto da hidrólise dos mesmos oligossacarídeos. Neste período, a concentração de açúcares totais baixou de 5,4g% para 2,86g% e o crescimento da levedura *Xanthophyllomyces* relativo ao período foi de 783 mg de células secas/100 ml de meio. No período a partir de 72 horas até o final da fermentação a levedura passou a metabolizar de forma mais lentamente os açúcares maiores existentes no meio. A concentração de AT no período passou de 2,86 g% em 72 horas para 2,52 g%, 2,44 g% e 2,37g%, correspondentes aos tempos de 96, 120 e 144 horas respectivamente. A evolução do crescimento de *Xanthophyllomyces* no período foi de 783mg (72h), 818mg (96h), 835mg (120h) e 869mg de células secas/100 ml de meio ao término do cultivo, as 144h.

FIGURA 47 - CCD DO PERFIL DO CONSUMO DE AÇÚCARES EM FUNÇÃO DO TEMPO DO CULTIVO DE levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM HFAM



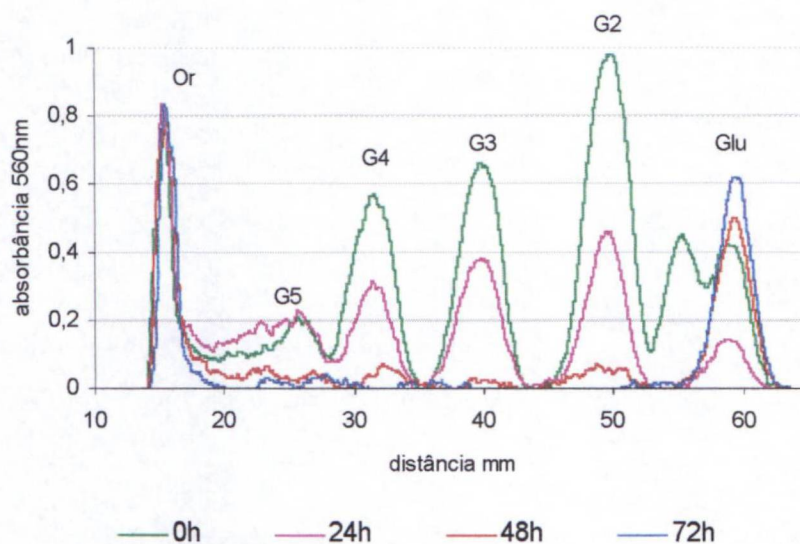
CCD em cromatoplaça de sílica-gel SG-60. Legenda: G (glucose), 0 a 144 (tempo de cultivo em horas), G2(maltose), G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose). Solvente de corrida : primeira corrida, mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:10:5:20:10) e a segunda corrida com a mistura de acetona / acetonitrila / acetato de etila / 1-propanol / água (5:30:5:30:10). Aplicação das amostras 1 $\mu$ l. Revelação com orcinol.

A concentração de AR no início da fermentação era de 0,77g%, passando para 0,18g% quando o cultivo foi interrompido, representando um consumo aparente de 0,59g%. Este consumo não pode ser considerado absoluto porque ao mesmo tempo em que *Xanthophyllomyces dendrorhous* consumiu, também produziu os ARs a partir da conversão dos oligossacarídeos maiores.

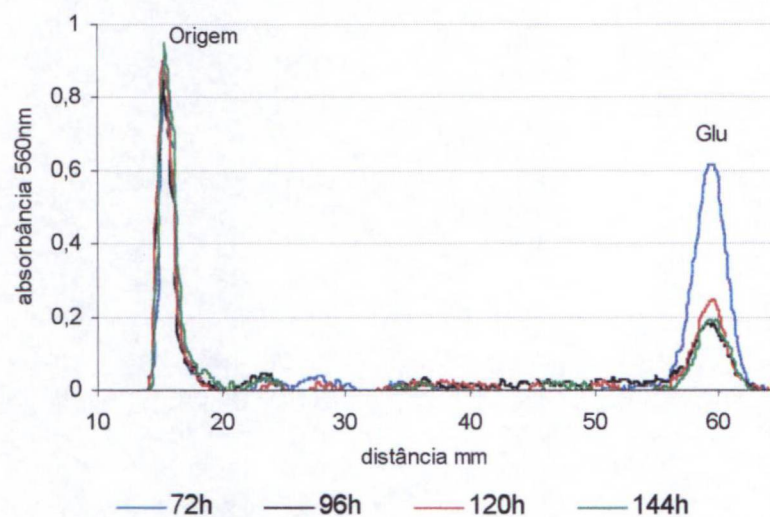
Este experimento comprova a habilidade de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, em utilizar hidrolisados de amido que apresentam grau de polimerização maior do que três unidades de glucose. Esta atividade metabólica é possível devido a capacidade da levedura *Xanthophyllomyces* produzir enzimas amilolíticas, amilase, glucoamilases e/ou  $\alpha$ -glicosidase, conforme o perfil de consumo e formação de cada açúcar em função do tempo, Figura 49.

FIGURA 48 - DENSITOMETRIA DO PERFIL DE CONSUMO DOS AÇÚCARES EM FUNÇÃO DO TEMPO DO CULTIVO DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM HFAM

A)



B)



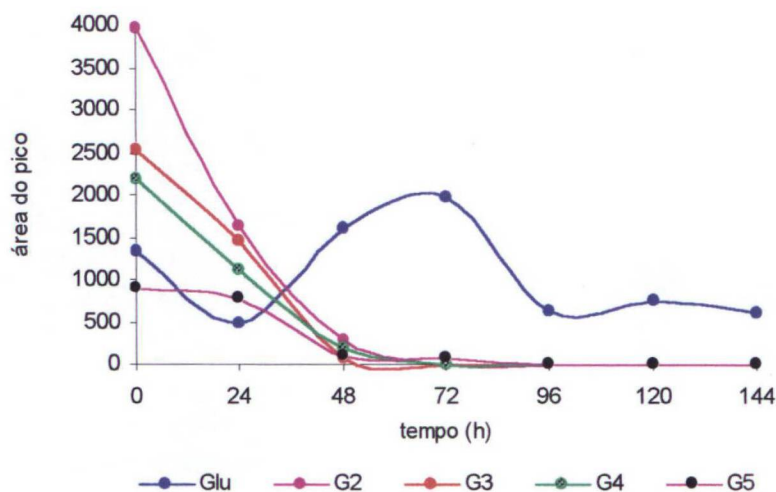
Legenda:

G (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose), G5 (maltopentaose) e Or (origem).

Gráfico A) cultivos correspondentes aos tempos de 0 a 72 horas

Gráfico B) cultivos correspondentes aos tempos de 72 a 144 horas

FIGURA 49 - PERFIL DO CONSUMO DE CADA AÇÚCAR DO HFAM EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DE *Xanthophyllomyces*



A produção da astaxantina, também foi maior no período até 72 horas (64% do total). Nas primeiras 24 horas a produção de astaxantina foi de  $107,8\mu\text{g/g}$  de células secas. No período entre 24 e 48 horas, a produção de astaxantina foi um pouco menor do que o crescimento celular passando para  $99\mu\text{g/g}$  de células secas. Esta diferença entre a velocidade de crescimento e de produção de astaxantina nesta fase pode estar relacionado ao acetil-CoA. Conforme JOHNSON e AN (1991), a astaxantina é produzida a partir da via do mevalonato. Por sua vez, o ácido mevalônico é formado a partir da acetil-CoA. Como no período de 24 a 48 horas foi o período de maior crescimento, maior parte do acetil-CoA deve ter sido priorizado para a formação de biomassa, justificando a queda da produção da astaxantina.

Já no período entre 48 e 72 horas foi quando ocorreu a maior produção de astaxantina, 50% do total, passando de 99 para  $341\mu\text{g/g}$  de células secas, a velocidade de crescimento foi bem menos intensa. A partir 72 horas a produção de astaxantina continuou, mas em taxas decrescentes, 15, 12 e 8%, correspondentes a  $391\mu\text{g/g}$  de células secas (96h),  $439\mu\text{g/g}$  de células secas (120h) e  $456\mu\text{g/g}$  de células secas (144h).

Cultivos de *Xanthophyllomyces* utilizando apenas mono e/ou dissacarídeos, como a fermentação conduzida por BONFIM (1999) em caldo de cana, produziram pigmentação até 96 horas. JOHNSON e LEWIS (1979) determinaram que o tempo máximo de cultivo de *Xanthophyllomyces* em glucose era de 128 horas, e VÁSQUEZ et al. (1997) realizaram suas culturas durante 168 horas em meio contendo hidrolisado de turfa.

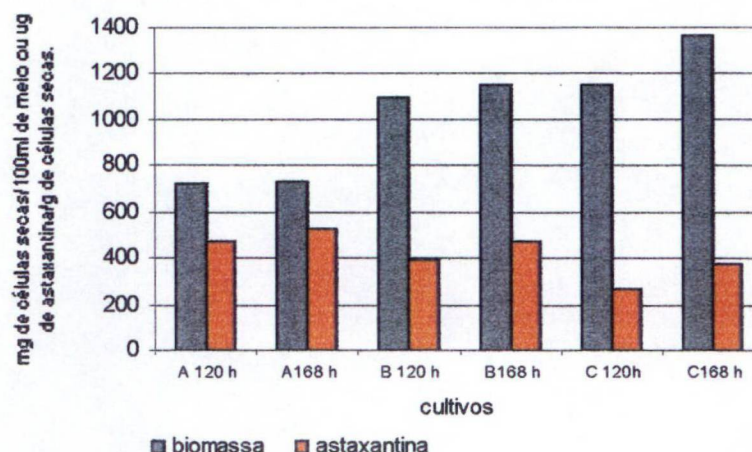
A comparação dos tempos de fermentação de 120 e 168 horas foi feita em cultivos empregando manipueira e HFAM, nas concentrações respectivas de 0,15g% e 8% (cultivo A), 0,25g% e 12% (cultivo B) e 0,35g% e 16% (cultivo C). Os resultados representados na Figura 50 mostraram que o efeito do tempo de fermentação na produção de biomassa e astaxantinogênese é maior quanto maior for a concentração dos nutrientes no meio.

No cultivo mais pobre em nutrientes, o prolongamento do tempo de cultivo de 120 a 168 horas não proporcionou crescimento celular de *Xanthophyllomyces*, a biomassa permaneceu no patamar de 730 mg de células secas/100ml de meio. Não houve crescimento porque o cultivo apresentava-se na fase estacionária, determinada pela exaustão da fonte de nitrogênio. No entanto, a ampliação do tempo proporcionou pequeno incremento de 5% de massa celular no cultivo B (aumentou de 1093 para 1148 mg de células/100 ml de meio) e 19% no cultivo C (de 1148 para 1366 mg de células/100 ml de meio).

O resultado mais significativo com relação ao efeito do tempo de fermentação foi verificado na astaxantinogênese. No cultivo A o incremento de astaxantina foi de 11% (de 473 para 524 $\mu$ g/g de células secas), no cultivo B o aumento foi de 20% (de 395 para 473 $\mu$ g/g de células secas) e extremamente representativo no cultivo C, apresentando elevação de 38% (passando de 268 para 371 $\mu$ g/g de células secas).

Os resultados do cultivo A conferem com os estudos de JOHNSON e LEWIS (1979) de que, mesmo na fase estacionária, *Xanthophyllomyces dendrorhous* produz astaxantina.

FIGURA 50 - COMPARAÇÃO DO TEMPO DE 120 E 168 h NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA EM CULTIVOS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM MEIOS CONTENDO HFAM



A = 0,15g% de manipueira e 8% de hidrolisado fosfórico de mandioca  
 B = 0,25g% de manipueira e 12 % de hidrolisado fosfórico de mandioca  
 C = 0,35g% de manipueira e 16 % de hidrolisado fosfórico de mandioca

O aumento de 19% na massa celular e 38% na astaxantina observados no cultivo C (o de maior concentração de manipueira e hidrolisado) demonstra que tanto a fonte de carbono como a de nitrogênio residuais nas 120 horas de cultivo eram suficientes para manutenção da intensa atividade metabólica da levedura. Neste período excedente de 48 horas, *Xanthophyllomyces dendrorhous* produziu 64% da astaxantina deste cultivo.

#### 4.2.9 Efeito do aumento das condições de oxigenação na produção de biomassa e astaxantina em *Xanthophyllomyces dendrorhous*

O efeito da aeração na produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi inicialmente estudado por JOHNSON e LEWIS (1979). Segundo os autores a produção de massa celular e astaxantina são independentes da taxa de oxigênio dissolvida no meio, exceto para os casos com aeração muito reduzida, menor que  $30\text{mmol O}_2\text{ l}^{-1}\text{ h}^{-1}$ .

Para MARTIN et al.,(1993) testando velocidades de rotação de 150, 200, 250, 300 e 350rpm, os parâmetros de crescimento alcançaram valores máximos a 200 rpm.

Paralelamente ao experimento anterior sobre o efeito do tempo na produção de biomassa e astaxantina de *Xanthophyllomyces* no período de 0 a 144 horas (item 4.2.8) foram feitos experimentos com o objetivo de verificar a influência das condições de aeração no crescimento celular e astaxantinogênese, como descritos no item 3.7.8. Foram realizados cultivos em duplicata, exatamente com as mesmas condições do meio de fermentação, exceto a substituição do Erlenmeyer de 125ml por 250ml de capacidade. O volume de 25ml por cultivo e a velocidade de rotação de 200 rpm permaneceram inalteradas, ou seja, a relação ar : meio foi elevada de 5:1 para 10:1, conforme Figuras 51e 52.

Os resultados apresentados na figura 51, demonstram que o aumento das condições de aeração proporcionado pela utilização de frascos maiores, foi responsável pelo incremento da massa celular, passando de 835 para 879 mg/100ml de meio, aumento aproximadamente de 5%.

O efeito da aeração foi mais significativo na astaxantinogênese. A troca do volume dos frascos possibilitou uma elevação de 439 para 478 $\mu$ g de astaxantina/g de célula seca, aumento de quase 15%, considerando também o aumento de biomassa na ordem de 5%.

FIGURA 51 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EM HFAM EM FUNÇÃO DAS TAXAS DE AERAÇÃO 5:1 E 10:1 (AR:MEIO)

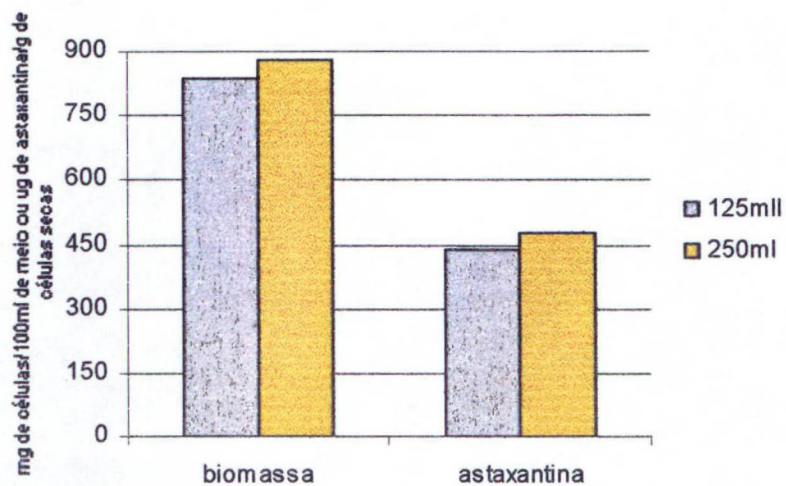


FIGURA 52 - CULTURA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* (25ml) EM FRASCOS DE 125ml e 250ml



#### 4.2.10 Comparação da produtividade dos cultivos de *Xanthophyllomyces dendrorhous* com diferentes HFAM suplementados com manipueira e $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Cultivos de *Xanthophyllomyces* utilizando HFAM, obtidos de diferentes condições de hidrólise (Tabela 12), foram realizados com o objetivo de avaliar a influência do hidrolisado, suplementado com manipueira 0,25g% e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05g%, na produção de biomassa e astaxantinogênese pela *Xanthophyllomyces*. Os resultados estão demonstrados na Figura 53 e na Tabela 13.

O cultivo que apresentou melhor resultado de crescimento foi aquele feito com o hidrolisado obtido da hidrólise fosfórica na condição de pH 1,75, produção de biomassa de 948 (mg/100ml de meio) contra 903 e 835 (mg/100ml de meio) respectivamente para os cultivos com HFAM pH 1,5 e 2,75. Estas biomassas são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (valor-p = 0,026), ao nível de 95% de confiança.

A expectativa de maior crescimento celular seria no cultivo com hidrolisado pH 1,5, uma vez que este hidrolisado apresentava maior concentração de açúcares fermentescíveis, DE 56 contra 50 encontrada no hidrolisado pH 1,75. O perfil favorável da composição de açúcares no hidrolisado pH 1,5 foi limitado pela maior concentração de produtos inibitórios oriundos da degradação, devido a hidrólise ser mais drástica, e/ou pela concentração excessiva de fósforo. De acordo com o trabalho de FLORES-COTERA, MARTIN e SÁNCHEZ (2001) a partir de 0,65mM de fosfato, a produção de biomassa decresce à medida que a concentração de fosfato do meio aumenta.

Verificando a Tabela 12, pode-se observar as concentrações de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  aplicadas a cada hidrolisado. No caso do hidrolisado pH 1,5 a concentração final de ácido foi correspondente a 9,4mM. Considerando a utilização de 8% deste hidrolisado para formulação do meio, a quantidade de fosfato no meio de cultura, proveniente do ácido fosfórico da hidrólise, foi de aproximadamente 0,75mM. Nesta concentração, acima do valor de referência encontrado por FLORES-COTERA,

MARTIN e SÁNCHEZ (2001), como sendo o limite máximo da concentração de fósforo para efeitos positivos na produção de biomassa, ainda deve ser considerado o fosfato existente na manipueira incorporado no cultivo.

A produção de astaxantina também foi superior, 477 $\mu$ g /g de célula seca, no cultivo feito com o HFAM pH1,75. Nos cultivos dos hidrolisados pH 2,75 e 1,5, a produção de astaxantina correspondente foi 439 e 417 $\mu$ g /g de célula seca.

A superioridade da produção de astaxantina no cultivo feito com o hidrolisado pH 1,75 pode estar relacionada ao perfil de açúcares do hidrolisado. A concentração dos oligomaltossacarídeos que apresentam grau de polimerização entre 2 e 6 unidades de glucose neste hidrolisado foi de 19,78 g%. Nos hidrolisados pH 1,5 esta concentração foi de 13,59g%, e no pH 2,75, foi de 15,05 g%. A astaxantinogênese em meio contendo maltose é maior do que naquele contendo a glucose (JOHNSON; LEWIS; 1979) e os oligomaltossacarídeos também apresentam efeitos estimuladores na astaxantinogênese de *Xanthophyllomyces dendrorhous*

TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS DOS HFAM UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS COMPARATIVOS DE FERMENTAÇÃO

Hidrolisado	condições de hidrólise			DE	Glucose g%	Maltose g%	G2 a G6 g%
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> mM	min.	°C				
pH 1,5	9,4	15	152	56	17,4	5,5	13,59
1,75	3,5	15	152	50	13,0	8,2	19,78
2,75	0,45	20	160	18	3,5	3,5	15,05

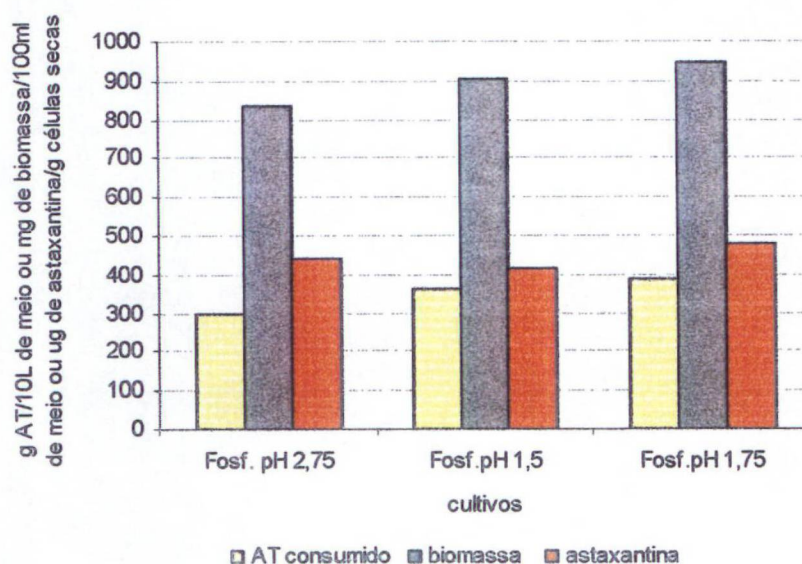
-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mM indica a concentração de ácido fosfórico presente no hidrolisado.

-G2 a G6 g% indica a somatória de todos os maltoligossacarídeos com grau de polimerização entre 2 e 6 unidades de glucose expresso em g%

A produtividade de biomassa e a produção de astaxantina foi maior no cultivo realizado com o hidrolisado pH 2,75. Este cultivo apresentou uma produção de biomassa de 278 mg/g de açúcar consumido, contra 250 no pH1,5, e 243 mg/g de açúcar consumido no pH1,75. A produtividade astaxantina no cultivo pH 2,75 foi de

146 $\mu$ g /g de açúcar consumido, enquanto que nos cultivos do pH 1,5 e pH 1,75 estes valores foram 116 e 122 $\mu$ g /g de açúcar consumido respectivamente. Estes dados de produtividade de biomassa e astaxantina em função do consumo de açúcar comprovam o efeito benéfico dos oligomaltossacarídeos existentes nos HFAM, sobre os cultivos de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

FIGURA 53 - CONSUMO DE AÇÚCAR TOTAIS (AT), PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ASTAXANTINA EM CULTIVOS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* OBTIDOS EM DIFERENTES HFAM SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>



Fosf. pH 2,75 = cultivo feito com hidrolisado obtido da hidrólise fosfórica realizada no pH 2,75  
 Fosf. pH 1,5 = cultivo feito com hidrolisado obtido da hidrólise fosfórica realizada no pH 1,5  
 Fosf. pH 1,75 = cultivo feito com hidrolisado obtido da hidrólise fosfórica realizada no pH 1,75

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS CULTIVOS COM DIFERENTES HFAM SUPLEMENTADOS COM MANIPUEIRA E NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

HFAM	DE	biomassa mg%	ug astaxantina /g célula seca	ug astaxantina / 25ml de meio	AR inicial g%	Consumo AT g%	biomassa/ consumo AT	Astaxantina/ consumo AT
pH 1,5	56	903	417	94	2,9	3,6	250	116
pH 1,75	50	948	477	113	2,5	3,9	243	122
pH 2,75	18	835	439	92	0,8	3,0	278	146

#### 4.3 UTILIZAÇÃO DO HFAM PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO (AL) PELAS BACTÉRIAS *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*

O hidrolisado fosfórico do amido de mandioca foi utilizado com a finalidade de testar novas aplicações biotecnológicas: a produção do ácido láctico pelas bactérias *Lactobacillus plantarum* (*Lp*) e *Pediococcus pentosaceus* (*Pp*) (item 3.11).

O amido é um substrato comum para produção de AL. De acordo com HOFVENDHAL e HANH-HAGERDAL (2000) o amido precisa ser previamente hidrolisado à glucose e maltose para que possa ser fermentado pelas bactérias lácticas.

A Figura 54 mostra o resultado da produção do AL pelas bactérias *Lp* e *Pp*, obtidos nos cultivos onde foi feita a substituição da glucose do meio MRS pelos HFAM. Os dois hidrolisados utilizados, pH 1,5 tempo de 5 minutos e pH 2,0 tempo de 15 minutos, apresentavam praticamente o mesma DE, 40 (conforme tabela 05), todavia houve um diferencial com relação ao perfil de açúcares nos hidrolisados. As concentrações de glucose, maltose e maltotriose verificados no hidrolisado pH 1,5 eram de 13, 4 e 3 g%, respectivamente, enquanto no hidrolisado pH 2,0 os respectivos açúcares apresentavam 8, 7 e 6 g%. A presença de açúcares maiores como maltohexaose só era detectada no hidrolisado pH 2,0, concentração em torno de 6 g%.

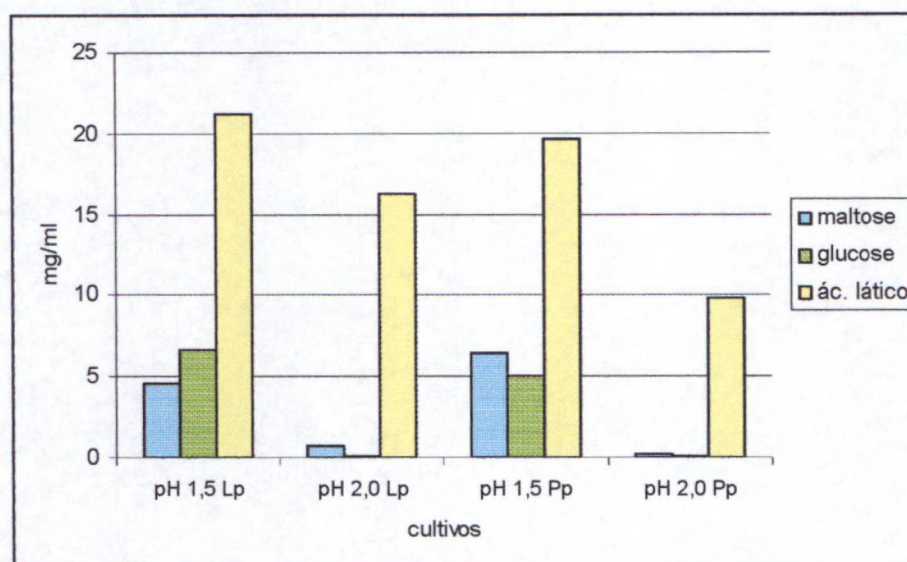
O hidrolisado que apresentou o melhor resultado como fonte de carbono na produção de AL, para ambos os microrganismos, foi aquele obtido pela hidrólise com a maior concentração de ácido, pH 1,5, devido à sua concentração superior de açúcares fermentescíveis. No caso do *Lp* a produção de AL neste hidrolisado foi de 21g/l e no *Pp* 20g/l. Este resultado foi superior a produção de 15g/l de ácido láctico obtido por SHAMALA E SREEKANTIAH, citado por HOFVENDAHL e HANH-HAGERDAL (2000) em cultivos da bactéria *Lp* em hidrolisado solúvel de amido e hidrolisado de mandioca.

A produção de AL obtida a partir da hidrólise fosfórica pH 2,0 apresentou valores inferiores, 16g/l para o *Lp* e de 10g/l para o *Pp* respectivamente.

A Figura 55 mostra a análise por CLAE da produção de AL. É possível também, verificar o perfil de açúcares remanescentes do processo fermentativo. Pode-se observar nos cultivos realizados com o hidrolisado obtido no pH 2,0 a existência do pico extremamente expressivo dos oligossacarídeos no tempo de corrida de 6 minutos. A determinação das elevadas concentrações de oligos associado às quantidades insignificantes de glucose e maltose sugerem a limitação da produção de AL pela exaustão dos açúcares fermentescíveis e pouca, ou falta, de habilidade por parte das bactérias *Lp* e *Pp* de metabolizar os oligossacarídeos para produzir LA.

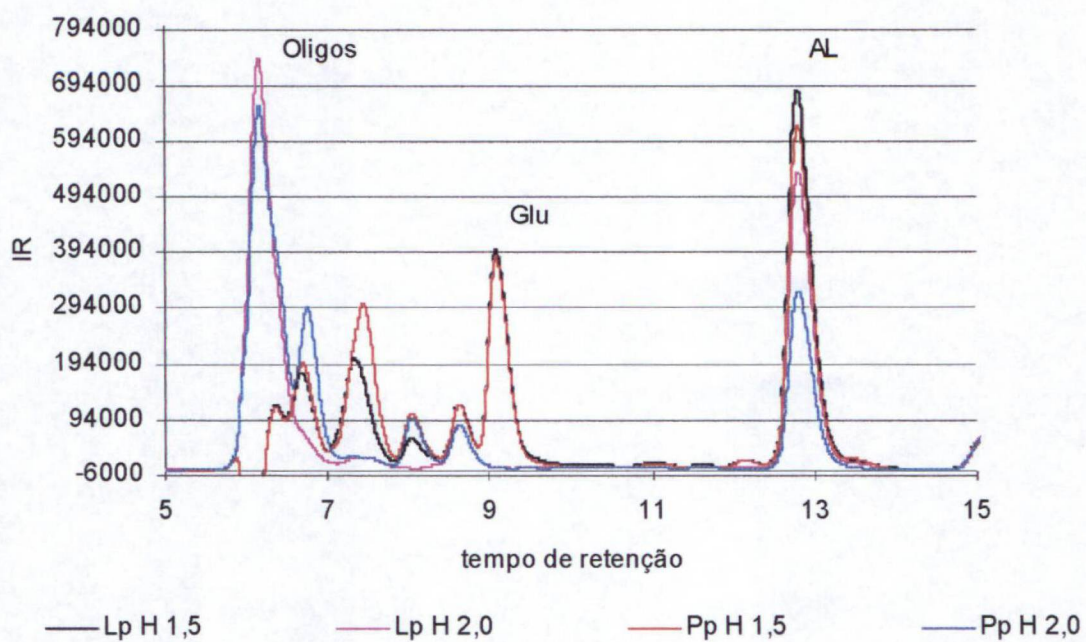
A utilização de HFAM mostrou-se promissor para produção de AL por ambas as bactérias, *Lp* e *Pp*, principalmente considerando a aplicação de hidrolisados com elevado valor de DE.

FIGURA 54 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO (AL) PELAS BACTÉRIAS *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* EM HFAM



pH 1,5 Lp = cultivo de Lp em hidrolisado fosfórico de mandioca obtido no pH 1,5 por 5 minutos  
 pH 2,0 Lp = cultivo de Lp em hidrolisado fosfórico de mandioca obtido no pH 2,0 por 15 minutos  
 pH 1,5 Pp = cultivo de Pp em hidrolisado fosfórico de mandioca obtido no pH 1,5 por 5 minutos  
 pH 2,0 Pp = cultivo de Pp em hidrolisado fosfórico de mandioca obtido no pH 2,0 por 15 minutos

FIGURA 55 - CLAE DOS CULTIVOS DE *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* EM HFAM PARA PRODUÇÃO DE AL.



AL = ácido láctico

Glu = glucose

Oligos = maltoligossacarídeos com grau de polimerização  $\geq 4$  unidades de glucose

## 5. CONCLUSÕES

1. Considerando a alta produtividade (>25 t/ha), o custo enquanto matéria-prima e a ocorrência de uma forma mais concentrada de amido e menor acompanhamento de componentes proteicos e lipídicos, a mandioca foi selecionada, na forma de fécula, como alternativa ao (amido de) milho para fins de hidrólise ácida mineral.

2. O ácido fosfórico, diluído e termopressurizado, foi testado com sucesso como ácido alternativo ao ácido clorídrico para depolimerização da pasta concentrada (40g%) de amido de mandioca até glucose e maltoligossacarídeos, e este hidrolisado fosfórico demonstrou ser uma excelente fonte de carbono utilizado em meio de cultivo para o crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e bioprodução de astaxantina. A neutralização do catalisador com o hidróxido de amônio, gerando fosfato de amônio, proporcionou condições adequadas para o crescimento e produção de astaxantina na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, assim os três requisitos nutritivos básicos de fermentação foram satisfeitos, ou seja, fontes de C, N e P, sendo desnecessária a dessalificação que é exigida pela hidrólise clorídrica.

3. Dentre as fontes de nitrogênio testadas, a combinação da manipueira e o nitrato de amônio foi a mais promissora. A manipueira devido ao seu custo reduzido ou nulo, por ser um subproduto poluidor da etapa de feculagem, propiciou o crescimento celular, e o nitrato de amônio por sua vez, estimulou a astaxantinogênese.

O cultivo da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em hidrolisados fosfóricos que apresentou melhor resultado, crescimento de 948 mg/100ml de meio, e produção de astaxantina de 477 $\mu$ g de astaxantina / g de células secas, foi feito utilizando um xarope obtido nas condições de hidrólise de pH efetivo de 1,75, tempo de 15 minutos a 152°C (4 atm), suplementado com 0,25g% de manipueira e 0,05g% de nitrato de amônio.

de 15 minutos a 152°C (4 atm), suplementado com 0,25g% de manipueira e 0,05g% de nitrato de cálcio.

4. Cultivos utilizando hidrolisados mais enriquecidos em maltoligossacarídeos, comprovaram a habilidade da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em metabolizar oligossacarídeos com grau de polimerização a partir de três unidades monoméricas, no caso, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexose e oligossacarídeos superiores.

5. A temperatura, o tempo e o pH afetaram o rendimento da hidrólise fosfórica de amido de mandioca, bem como a formação de produtos da desidratação e degradação da glucose. A temperatura foi o fator que apresentou a maior ação degradativa correspondente à co-geração de hidroximetilfurfural. Esse produto da degradação, por sua vez, inibiu o crescimento de *Xanthophyllomyces*. Apenas os hidrolisados obtidos na temperatura mais elevada de 180°C, pH 2,0, por 15 minutos, utilizados nos meios de cultivos, inibiram totalmente o crescimento da levedura.

6. A utilização dos hidrolisados fosfóricos em outros modelos biotecnológicos mostrou ser também promissor. A produção de ácido láctico pelas bactérias *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* cultivados nestes hidrolisados, alcançou até 21g/l de produto.

7. Esta tecnologia inovadora de fosforólise de amido está protegida como propriedade intelectual pelo pedido PI 0002001-0, protocolado no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial em favor do orientador (J. D. Fontana) e respectiva publicação na Revista de Propriedade Industrial nº 1617, de 02 de janeiro de 2002 e página 132.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, T. A. ;KRISHNASWAMY, C.; RAMAKRISHNA, S. V. Effect of hydrolysis Conditions of cassava on the Oligosaccharide Profile and alcohol fermentation. **Starch**, Weinheim, v.39, n.7, p 237-240, 1987.

ACHEAMPONG, E. A.; MARTIN, A. M. Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, v. 35, p. 147-155, 1995.

ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Produção de etanol. In: \_\_\_\_\_ . **Tecnologia das fermentações**. São Paulo : Editora da Universidade de São Paulo, 1975, v. 1, p. 50-51.

AN, G.-H. Improved growth of red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in presence of tricarboxylic acid intermediates. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 23, p. 1005-1009, 2001

ANDREWES, A. G.; PHAFF, H.J.; STARR, M.P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigment fermenting yeast. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, p. 1009-1011, 1976.

AQUATEC INCORPORATION. **Astaxanthin research summaries**. Disponível em: <<http://www.astaxanthin.org>>acesso em : 15 nov. 2001.

ARBUCKLE, A. W, et al. Physicochemical Studies on Starches The fractionation of oat and wheat starches. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.80, n.13, p. 2626-2629, 1958.

AZHAR, A.; HAMDY, M., K. Alcohol Fermentation of Sweet Potato. I. Acid hydrolysis and factors involved. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, vol. 23, p. 879-886, 1981.

AZOULAY, E., et al. Fermentation methods for protein enrichment of cassava and corn with *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 41-47, 1980.

BLANCHARD, P. H. **Technology of Corn Wet Milling and Associated Processes**. Amsterdam: Elsevier, 1992 . 535p.

BEMILLER, J.,N.; ROBERTS, H.J. Acid Hydrolysis and other lytic reaction of starch In: WHISTLER, R. L. et al. **Starch: Chemistry and Technology**. Fundamental Aspects., New York: Academic Press, 1965.

BON, J. A.; LEATHERS, T. D.; JAYASWAL, R. K. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 19, n. 2, p. 109-112, 1997.

BONFIM,T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**.

Curitiba, 1999, 158 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BREITENBACH, J.; MISAWA, N.; KAJIWARA, S.; SANDMANN, G. Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 140, p. 241-246, 1996.

CABELLO, M.; LEONEL, M. Produção de ácido cítrico a partir da manipueira. In: CEREDA, M. P. **Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Ed. Paulicéia, 1994. p. 109-118.

CABELLO, C. Utilização de enzimas na produção de hidrolisados a partir de fécula de mandioca. In: *Cassava Biotechnology – IV International Scientific Meeting – Cassava Biotechnology Network*, 2000, Salvador. **Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2000. p. 497-505.

CALO, P.; GONZALES, T. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiologia Sem**, Madrid, v. 11, p. 386 – 388, 1995.

CANNIATTI-BRAZACA, S.G; CANOILAS, L. M.; SALGADO, J.M.; OLIVEIRA, A. J. O. Produção de proteína microbiana a partir da mandioca e/ou resíduos de seu processamento In: CEREDA, M. P. **Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Ed. Paulicéia, 1994. p. 119-132.

CEREDA, M.P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. **Resíduos da Industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Ed. Paulicéia, 1994. p. 11-50.

COLOMBO, A. J.; SCHNEIDERMAN, B.; BARUFFALDI, R.; NACCO, R. Hidrólise ácida da mandioca. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. v. 13, p79-90, 1975.

Corn Refiners Association, Inc . **Critical Data Tables**. Washington, 3. ed., p-7, 1969.

COWIE, J.M.G, et al. Physicochemical Studies on Starches .Vol.5. The effect of acid on potato starch Granules. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.80, n.15, p. 2658-2665, 1958.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press, 1976. v. 2, p.39-165.

DAWES I.W; SUTHERLAND, I.W. **Microbial Physiology**. Oxford: Blackwell, 1992. 287p.

DEAN, K.L. Carotenoids market. **Industrial Bioprocessing**. New York, v. 14, n. 5, p. 4-5, 1997.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.23, p. 30-35, 1960.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse as a model for cattle feeding. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 57-58, p. 171-182, 1996.

DIKE, A. O.; LETTNER, F.; ZOLLITSCH, W. The supplementation of layers feed with the yeast - *Phaffia rhodozyma* – as pigment carrier. **Archiv für Geflügelkunde**, Kingston, v.5, p. 205-209, 1992.

DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMITON, J.K.; REBERES, P.A. SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FANG, T. J; CHENG, Y. –S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, n. 6, p. 466-469, 1993.

FAO. **FAOSTAT – Database collections** . Disponível em: < <http://apps.fao.org>> acesso em: 02 dez 2001.

FLORÊNCIO, J.A.; SOCCOL, C.R.; FURLANETTO, L.F.; BONFIM, T.M.B.; KRIEGER, N.; BARON, M.; FONTANA, J.D. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. **Bioprocess Engineering**, Berlim, v.19, p. 161-164, 1998.

FLORÊNCIO J.A.; EIRAS-STOFELLA D.R; SOCCOL C.R.; RAIMBAULT M.; GUYOT J.P.; FONTANA J.D. *Lactobacillus plantarum* amylase acting on crude starch granules - Native isoforms and activity changes after limited proteolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.84, n.6, p.721-730, 2000.

FLORES-COTERA, L.B.; MARTÍN, R.; SÁNCHEZ, S. Citrate, a possible precursor of astaxantina in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. **Applied Microbiology Biotechnology**, Totowa, v .55, p. 341-347, 2001.

FONTANA, J.D.; CORREA, J. B. C.; DUARTE, J.H.; BARBOSA, A. M.; BLUMEL, M. Aqueous phosphoric acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane and sorghum bagasses. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, Tokyo, v.14, p 175-186, 1984.

FONTANA, J.D; RAMOS, L.P.; DESCHAMPS, F.C. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhance ruminal digestion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 51-52, p. 105-116, 1995.

FONTANA J.D; CZECZUGA B.; BONFIM T.M.B.; CHOCIAI M.B.; OLIVEIRA B.H.; GUIMARAES M.F.; BARON M. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of

raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v.58, n.2, p. 121-125, 1996.

FONTANA, J.D.; GUIMARÃES, M.F.; MARTINS, N.T.; FONTANA, C.A.; BARON, M. Culture of astaxanthinogenic yeast *Phaffia rhodozyma* in low cost media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 57-58, p. 413-422, 1996b.

FONTANA, J. D.; PASSOS, M.; BARON, M.; RAMOS, L. P. Cassava starch maltodextrinization/monomerization through termopressurized aqueous phosphoric acid hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa v. 91-93, p. 469-478, 2001.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. Carotenoides. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.13, p.40-45, 2000.

FONTANA J.D., CHOCIAI M.B., BARON M., GUIMARAES M.F., MARASCHIN M., ULHOA C., FLORENCIO J.A., BONFIM T.M.B. Astaxanthinogenesis in the yeast *Phaffia rhodozyma* - Optimization of low-cost culture media and yeast cell-wall lysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.63, n.5, p. 305-314, 1997.

FONTANA, J. D. Carotenogenic Microorganisms In: Spencer, F.T. : **Food microbiology protocols in Methods in Biotechnology** v. 14. Humana Press, Totowa, 2001, p. 259-271

FRENCH, D. Organization of starch granules. In: WHISTLER, R. L. BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E, F. **Starch: Chemistry and Technology**. Orlando: Academic Press, p. 183-242, 1984.

GOLDGERG, I. The SCP product. In: \_\_\_\_\_. **Single cell protein**. Berlin : Springer-Verlag, 1985. p. 129-152.

GOLUBEV, W.I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, Sussex, v. 11, p. 101-110, 1995.

GRAYSON, M. **Concise Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: John Wiley e Sons, 1985. 1318p.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York. Willey-Liss, 1994. p.130-193.

GUILBOT, G.; MERCIER, C. Starch. In: ASPINALL, G., O. **The Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1985. v.3, p. 209-282.

HAARD, G. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma* on molasses. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 10, n. 9, p. 609 – 614, 1988.

HAULY, M. C. O.; BECK, R.; FONTANA, J. D. Fructose and fructose anhydrides from *Dahlia* inulin **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 34-35, p. 292-308, 1992.

HEBEDA, R.E. Carbohydrate-Based Sweeteners. In: NAGODAWITHANA, T.,W.; REED,G. **Biotechnology** : Enzymes, Biomass and Feed. Weinheim : VHC, 1995, vol. 9, p737-765.

HOFVENDAHL, K; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 26, p. 87-107, 2000.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 34, p. 2417-2421, 1977.

JOHNSON, E. A.; VILLA T.G.; LEWIS M.J. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.35, p. 1155-1159, 1978.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, Regarding, v. 115, p. 173-183, 1979.

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

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 11, n. 4, p. 297 – 326, 1991.

KERR, R.W. **Chemistry and Industry of Starch**. 2.ed. London: Academic Press, 1950.

KIM, K.; HAMDY, K. Acid Hydrolysis of Sweet Potato for Ethanol Production. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 28,p. 316-320, 1985.

KUSTER, B. F. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focusing on its Manufacture. **Starch/Stärke**, Weinheim, v.42, p. 314-321, 1990.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACHCHI, G.; NILVEBRANT, N. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, London ,v.24, p 151-159, 1999.

LATSCHA,T.F. **Carotenoids**. Hoffman- La Roche, 1990, 110p.

LEBOURG, C.; CEREDA, F.D.; CHUZEL,G. Balanço de massa em uma feccularia de mandioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 9., 1996, **ANAIS ...** São Pedro: Editora Cerat, p.58-65.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo : Sarvier, 1995. 781p.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Viabilidade do uso da manipueira como substrato de processo biológico. I: caracterização do substrato armazenado a temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.15, n.1/2, p. 7-14, 1996.

LIGNELL, A. **Method for increasing the production of/in breeding and production animals in poultry industry**, United States Patent n. 5744502, 1998.

LORENZ, K.; JOHNSON, J.A. Starch hydrolysis under high temperatures and pressures. **Starch Hydrolysis**, Minnesota, v. 49, p.617-628, 1972.

MANSON, W. R. **100 Year of Food Starch Technology**. Site da National Starch e Chemical. Disponível em: < <http://www.foodstarch.com/news> > Acesso em: 06 maio 2001.

MARTINS, S., et al. Yields of Yeast Growth on Starch. **European Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 4, p. 29-35, 1977.

MARTIN, A. M.; ACHEAMPONG, E.; PATEL, T. R.; CHORNET, E. Study of growth parameters for *Phaffia rhodozyma* cultivated in peat hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Washington, DC, v. 37, p. 235 – 241, 1992.

MARTIN, A. M.; ACHEAMPONG, E.; PATEL, T. R. Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as a substrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 58, p. 223 – 230, 1993.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C; KILIAN, S. G. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, p. 514-520, 1993.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 178-183, 1994.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 26, n.2., p. 286-291, 1976.

MILLER, R.E. et al. 2-hydroxyacetyl furan from sugars. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.74, n20, p. 5236-5237, 1952

NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentation and recovery of L-glutamic acid from cassava starch hydrolysate by ion-exchange resin column. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n.3, p. 1-12, 1999

NEWTH, F.H. The formation of furan compounds from hexoses. **Advanced in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 6, p. 83-106, 1951.

NIGAM, P; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, p. 770-778, 1995.

OKAGBUE, R., N.; LEWIS., M. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma* : a potential tool to facilitate extration of astaxanthin. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v.6, n.4, p. 247-250, 1984.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ M. Co-production of carotenoides and xylitol by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 19, n. 2, p. 139-141, 1997.

PARAJÓ,J.C; CRUZ, J.M. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. **Food Chemistry**, Exter, v.63, n.4, p. 479-484, 1998.

RAMÍREZ, J.; GUTIERREZ, H.; GSCHAEDLER , A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology . **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 259-268, 2001.

REYDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 18, n. 6, p. 649 – 654, 1996.

ROBINSEN ,D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza : Acriba, 1991.p.55-83.

SALES, A. M. Aproveitamento da biomassa de mandioca fermentada na alimentação animal. **Coletâneas do Itai**, Campinas, v. 13, p 59-79, 1983.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v.10, p. 315-318, 1988.

SANTOS, J. Fungal protein produced on cassava for grounting rats and pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 56, p. 264-270, 1983.

SCHIEDT,K.; LIAANEN-JENSEN, S. Isolation and Analysis. In : BRITTON, G.; LIAANSE-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids..** Berlin : Birkhäuser Verlag, 1995. v. 1A, p. 81-108.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protects *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 14, p. 502-507, 1995.

SEAB – SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Principais culturas – comparativo de áreas e produção – Paraná/Brasil – Safra 2001**. Disponível em: < <http://www.pr.gov.br/seab/deral/cprbr.xls>> acesso em: 16 novembro 2001.

SHAMALA, T.R.; SREEKANTIAH, K.R. Fermentation of starch hydrolysates by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.3, p. 175-178, 1988

SIGURGISLADOTTIR, S. Effect of feeding natural tocopherol and astaxanthin on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillet quality. **Food Research International**, Kidlington, v.24, p.23-32, 1994.

SREENATH, H. K.; MOLDES A.,B.; KOEGEL, R.G.; STRAUB, R.J. Lactic production from agriculture residues. **Biotechnology Letters**. Middlesex. vol. 23, p. 179-184, 2001.

STOREBAKKEN, T.; NO, H.K. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, p. 209-229, 1992.

SWANSON, M. A. et al. Studies on the structure of Polysaccharides. Vol I. Acid Hydrolysis of Starch-Like Polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry** , Bethesda, v. 172, p 797-804, 1948.

TAHER, A. M.; CATES, D.M. A espectrophotometric investigation of the yellow color that accompanies the formation of furan derivatives in degraded-sugar solutions. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.34, p 249-261, 1974.

TAHERZADEH, M. L.; GUSTAFSSON, L; NIKLASSON, L. Physiological effect of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Totowa, v.53, p 701-708, 2000.

TEGGE,G.;RICHTER G. Studies on the filtration on starch raw hydrolysates. **Starch/Starke**, Weinheim, v.32, p.381-385 ,1980.

THOMAZ, T.D.; ELLWOOD, D.C.; LONGYEAR, M.C. Changes from homo- to heterolatic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, p. 109-117, 1979.

TORRISSEN, O. J.; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlim, v. 11, p. 225-230, 1995.

VÁZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJÓ, J.,C. Effect of the carbon source on the carotenoid profile of *Phaffia rhodozyma* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 263-268, 1997.

VÁZQUEZ, M.; MARTIN, A, M. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 57, n. 3, p. 315 – 320, 1998.

WHISTLER, R. L. et al. **Starch: Chemistry and Technology**. New York: Academic Press, 1965. v 1.

WINDHOLTZ, M. **The Merck Index**. Rahway: Merck e Co., Inc., 1983.

YAMANE, Y.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAZIKONO, T. NISHIO, N. Influence of 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**, Washington, v. 63, p. 4471-4478, 1997.

YOSHIZUMI et al. **Geneology and Science of Sweeteners**. Tokyo: Korin Publisher, 1986, p24-25.

ZOBEL, H. F. Starch: Sources, production, and properties. In: SCHENCK,F.W.; HEBEDA, R. E. **Starch Hydrolysis Products**. New York : VCH Publ., 1992. p.23-44.