

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Produção
Microbiológica de carotenóides
em escala industrial

Mario E. Fernández Urpí
Químico Industrial

Orientador:
Dr. Nestor Mascotti
Professor titular da Faculdade de
Engenharia e Ciências Exatas, Físicas
e Naturais - Universidade Nacional de Cuyo
Professor visitante da
Faculdade de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

1972

Dedicatória

Com toda estima e carinho

A meus pais

Em seus quarenta anos de casamento

Seu filho

E R R A T A

<u>Página</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia - se</u>
1	18 ^a	familia	Classe
2	18 ^a	family	Class
2a.	1 ^a	isonicotinol hydra- zine	isonicotinoil- hidrazine
11	10 ^a	familia	classe
16	23 ^a	hicroxílico	hidroxílico
27	9 ^a	mg/g.	mg/g célula seca
30	14 ^a	1926a	1962a
34	27 ^a	esquema 1	figura 11
35	1E ^a	Esquema 1	figura 11
38	9 ^a	swarthoult	Swarthout
43	11 ^a	viável	viáveis
44	8 ^a	<u>trípóra</u>	tríspora
45	31 ^a	incoviniente	inconveniente
48	4 ^a	caroteno seco	caroteno na matéria seca
48	7 ^a	uma vez que	além disso
48	10 ^a	corresponde	correspondendo

Í N D I C E

RESUMO	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO	3
DISTRIBUIÇÃO DE CAROTENÓIDES EM MICROORGANISMOS	7
I. Bactérias	7
II. Fungos e Leveduras	7
III. Algas	8
METODOLOGIA GERAL DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	15
PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENOS EM ESCALA	
INDUSTRIAL	20
I. Beta-caroteno	20
II. Licopeno	37
PRODUÇÃO MICROBIANA DE XANTOFILAS EM ESCALA	
INDUSTRIAL	40
I. Por <i>Dacrymycetaceae</i>	40
II. Por Algas	40
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
AGRADECIMENTOS	

R E S U M O

As indústrias de produtos alimentícios ao submeterem as matérias primas aos distintos processos de beneficiamento, transformação, e conservação, frequentemente produzem modificações da coloração das mesmas, razão porque torna-se necessário a utilização de corantes para sua reintegração. A ciência juntamente com a indústria, nas últimas décadas, têm se dedicado à tarefa de investigar diferentes caminhos para obtenção de tais substâncias, requerendo inocuidade a baixo custo.

A cromatografia, e em especial a cromatografia de absorção, a espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear (NMR), infra-vermelho e ultra-violeta, assim como o aprimoramento das técnicas analíticas de extração têm permitido grandes progressos neste campo durante os últimos anos.

Nesta investigação bibliográfica se discutem os caminhos seguidos pelos pesquisadores com o objetivo de buscar a produção de certos corantes naturais (carotenóides), através de fermentações com diferentes microrganismos, em especial - certos fungos da família phycomycetes, da ordem das Mucorales espécie Blakeslea trispora. Este microrganismo apresenta ambas as formas sexuais (+ e -), e que quando cultivadas em - culturas combinadas (+ e -) atinge rendimentos de 273mg/100 ml de meio de B-caroteno.

O meio básico é comum para o desenvolvimento da maioria dos fungos, compondo-se especialmente de uma fonte de carbono (carboidratos) e fonte de nitrogênio (uréia, caseína hidrolisada, extrato de levedura, etc.), são também essenciais certas substâncias estimulantes, como beta-ionona, isonicotinoil-idrazina, óleos vegetais, surfactantes, etc, e as condições exigem aeração, agitação, temperatura ideal de 28°C e pH 6,8.

Procuram-se, desse modo, as melhores condições para a produção dos pigmentos carotenóides em escala industrial, capazes de competir com os processos de síntese química dessas substâncias.

SUMMARY

In order to improve, transform and conserve food products, food processing methods frequently result in undesirable colour changes, thus necessitating the utilisation of food colouring additives.

In the last few decades, scientists, in conjunction with industry, have been investigating different ways of producing innocuous low cost colouring materials for this purpose.

In the last few years, chromatography, in particular absorption chromatography, mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance, and infra-red and ultra-violet spectroscopy, together with analytical extraction techniques, have produced considerable advances in this field.

This literature survey consists of a discussion of the various approaches by different researchers in the field, more specifically with respect to the production of the natural carotenoid pigments as a result of microbial fermentations by fungi of the family Phycomycetes, order Mucorales, species Blakeslea trispora. This microorganism exists in both male and female forms (+ and -), and when both are propagated together, produces up to 273mg of beta carotene per ml of medium.

The basic medium for the production of most fungi, consists of a carbon source (carbohydrate) and a nitrogen source (urea, hydrolyzed casein, yeast extract, etc.). Certain activating substances are also essential, such as beta-ionone,

isonicotinolhydrazine, vegetable oils and surfactants.

The ideal conditions consist of a temperature of 28°C and a pH of 6.8, together with constant aeration and agitation.

By searching for the best conditions for the production of these carotencid pigments on an industrial scale, it may be possible to compete with the chemical synthesis of these substances.

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista bromatológico, a qualidade de um produto alimentício, além de seu valor nutritivo, depende também das características sensoriais, como aroma, sabor, textura, cor e aparência. Esta última é de grande importância na aceitação do produto, porque predispõe favoravelmente o consumidor, estimulando o apetite e a digestão.

As indústrias de produtos alimentícios, ao submeterem as matérias-primas aos processos usuais de beneficiamento, transformação e conservação, com frequência subestimam o valor do "aspecto natural" do produto, razão por que necessário se faz reintegrar-lhe, durante ou após o processamento, algumas de suas características originais, devolvendo-lhe o aspecto agradável.

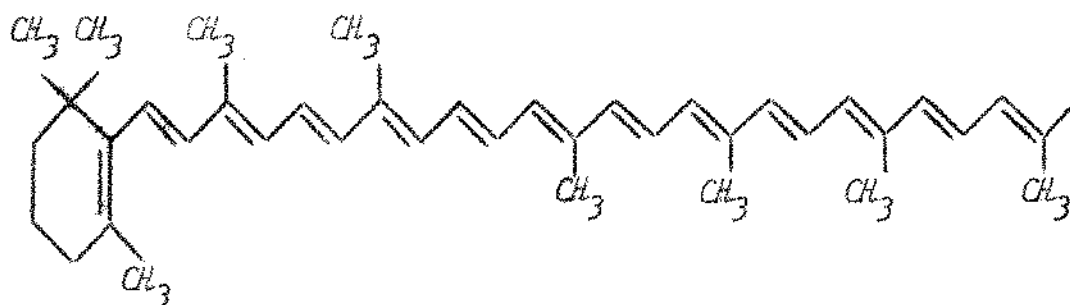
Para tal finalidade tem-se usado corantes artificiais e naturais entre os quais os carotenóides. Os primeiros são recusados, pois a maioria deles está proibida pela legislação atual, por motivo de proteção à saúde pública, porque tem-se comprovado, experimentalmente, sua nocividade.

Os carotenóides, pelo contrário, não só são inócuos ao consumidor, como, alguns deles, entre os quais o beta-caroteno, são fatores nutricionais como provitamina A. Trata-se de um grupo de pigmentos naturais largamente difundido nos tecidos animais e vegetais, solúveis em diferentes solventes orgânicos. Quimicamente, os carotenóides são políenos que possuem um sistema de duplas ligações carbono-carbono, na forma conjugada, responsáveis por uma faixa de colorações, variando da amarela ao vermelha. Em geral, são formados de oito resíduos de isopreno e, com poucas exceções, contêm 40 átomos de carbono na molécula.

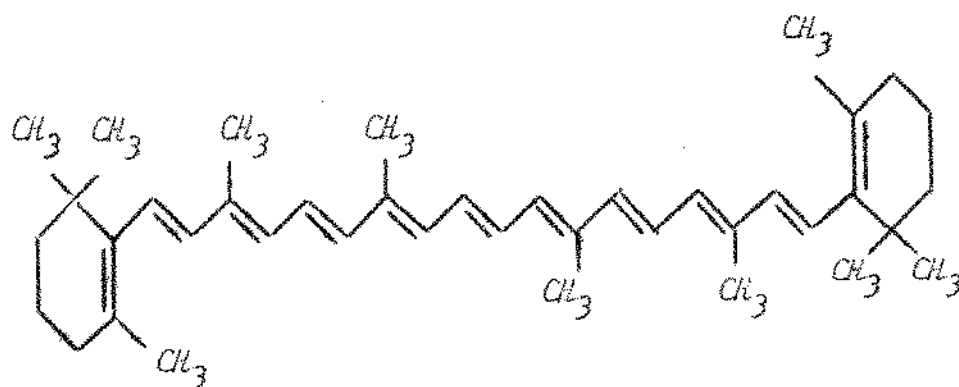
Subdividem-se em duas categorias (60):

- a) Hidrocarbonetos, comumente conhecidos como carotenos. Ver estrutura da Figura 1.

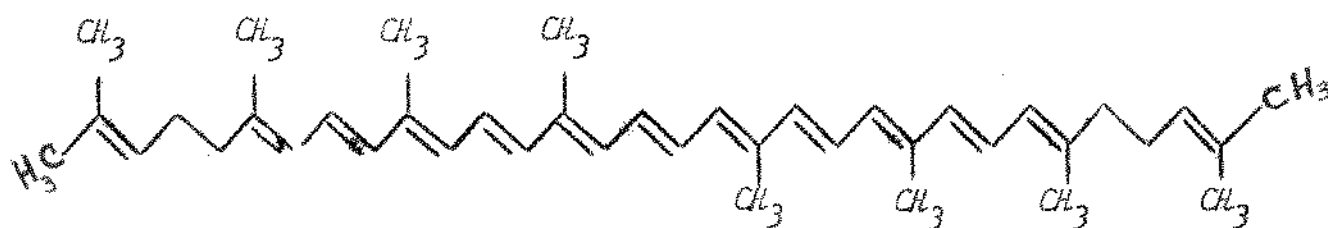
Figura 1. Estruturas de alguns carotenos principais.



TORULENO ($C_{40}H_{54}$)

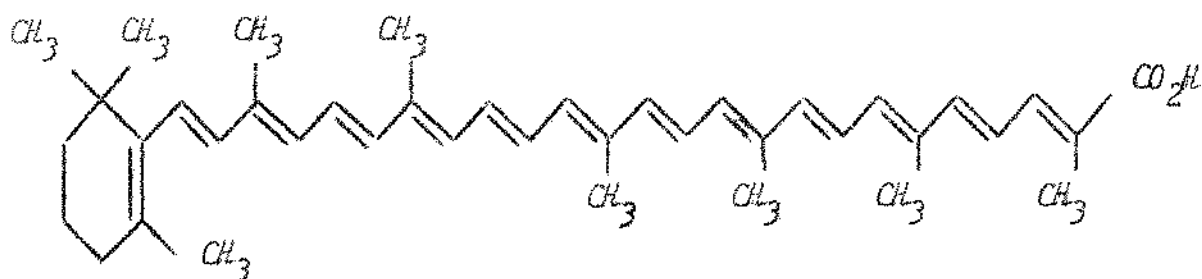


BETA CAROTENO ($C_{40}H_{56}$)

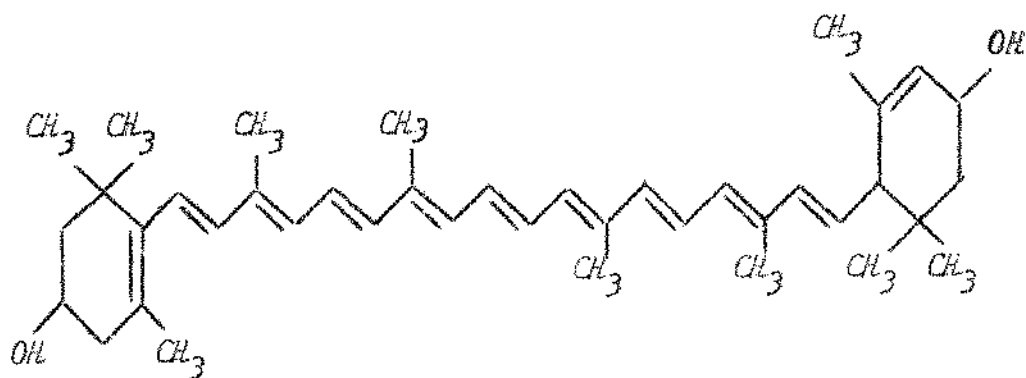


LICOPENO ($C_{40}H_{56}$)

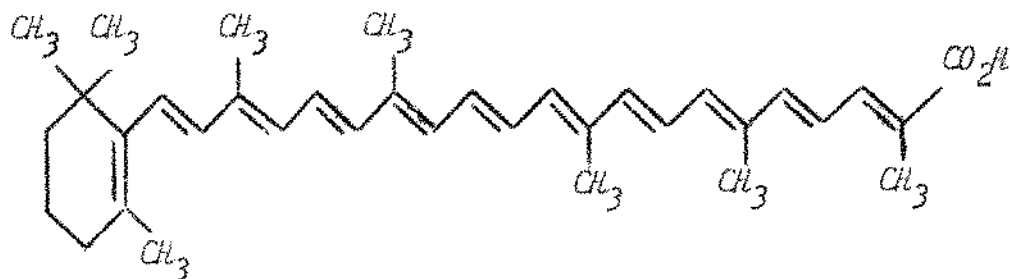
Figura 2. Estrutura de algumas xantofilas importantes.



TORULARODINA ($C_{40}H_{52}O_2$)



LUTEINA ($C_{40}H_{56}O_2$)



NEUROSPORAXANTINA ($C_{35}H_{46}O_2$)

b) Xantofilas, derivadas oxigenadas das anteriores. Ver estrutura da Figura 2.

Os carotenóides, geralmente, se encontram no estado natural em cenouras, tomates, gema de ovo, folhas verdes, flóres, penas de aves, insetos e microrganismos.

Atualmente, os carotenóides são produzidos em escala industrial por processos químicos e biológicos. As investigações desenvolvidas, especialmente nesse segundo grupo, são muito promissoras pelas perspectivas de produção em massa e a baixo custo.

O conhecimento da química dos carotenóides data de há muito tempo e tem-se difundido através de numerosas publicações. São publicadas revisões periódicas sobre o assunto. As primeiras foram elaboradas por Karrer e Jucker (1) e, recentemente, por Goodwin (2,3,4,5,6,7), Isler e colaboradores (8), Thichester e Nakayama (9). Por último, Nakayama (10), Kessel - tine (11), Lilly e colaboradores (12), Hanson (13), Hiet e colaboradores (14), e Liscov (15), descreveram o assunto particularizando áreas específicas, tais como a influência de certos fatores que estimulam a produção de carotenóides nos diferentes processos biológicos, variedades de microrganismos e outras que serão tratadas no presente trabalho.

DISTRIBUIÇÃO DOS CAROTENÓIDES EM MICRORGANISMOS

Os pigmentos carotenóides estão bastante difundidos nos microrganismos, podendo ser encontrados em espécies representantes de bactérias (Schizomycetes), leveduras (Blastomycetes), fungos (Eumycetes) e algas.

Apesar disto, no momento atual, somente certos tipos de microrganismos são capazes de sintetizar em quantidade suficiente para permitir sua produção em escala industrial.

I - Bactérias

Como se evidencia na Tabela I, os carotenóides se acham largamente difundidos na quase totalidade das bactérias. Todavia não se encontrou relação entre a taxonomia com a distribuição dos carotenóides em bactérias.

Os carotenóides produzidos pelas bactérias tendem a ser xantofílicos poli-hidroxilados, em lugar de carotenos. O beta-caroteno se encontra com pouca frequência, existindo informações que mencionam a presença de luteína, conforme indicado na Figura 2.

Entre as bactérias fotossintéticas (Rhodospiraceae e Thiorhodaceae), os pigmentos contidos são todos acíclicos e muitos deles metoxilados.

Entre as bactérias quimiassintéticas, o maior número e variedades de carotenóides se encontram nas famílias Micrococcaceae e Mycobacteriaceae, sendo a maioria xantofílica.

Das bactérias marinhas estudadas, encontrou-se que a maioria é cromogênica. Courington e Goodwin (16) em alguns estudos, encontraram que os carotenóides produzidos não diferiam muito daqueles investigados em outras bactérias, isto é, encontram-se predominantemente xantofílicos poli-hidroxilados e ausência de luteína.

II - Fungos e Leveduras

Na Tabela II encontra-se a distribuição conhecida dos pigmentos em fungos e leveduras.

Como se evidencia, muitos aeróbios dos fungos não são carotenogênicos e onde os carotenóides ocorrem, parece não existir significação taxonômica.

Os carotenóides fúngicos, frequentemente, são de natureza ácida, tais como os caracterizados na neurospoxantina, toruloxantina e rodotorulina.

Entre os Ficomycetes, a distribuição diferencial de pigmentos pode ocorrer entre as duas formas de uma dada espécie; nas Allomyces por exemplo, o masculino produz gama-caroteno enquanto que a forma feminina não o produz.

Revisões bibliográficas sobre a carotenogênese nesses tipos de fungos têm sido publicadas por Lilly e colaboradores (13) e por Hesseline (12). Uma revisão geral dos diferentes tipos de fungos foi divulgada por Goodwin (8).

Entre as leveduras, foi bem estabelecido o caráter carotenóide dos pigmentos da Rhodotorula; o beta e gama-caroteno, toruloxantina, e toruleno com predominância deste último, como se observa nas estruturas das figuras 1 e 2.

III - Algas

A distribuição de carotenóides em diversas classes de algas está resumida na Tabela III. Em todas elas, o beta-caroteno se apresenta como o principal caroteno, exceto nas Cryptophytas, em que predomina o alfa-caroteno. Os componentes xantofílicos são diferentes segundo o tipo de microrganismo analisado.

Nas Chlorophytas (algas verdes) se efetuaram muitos estudos em cultivos puros, relativos à sua composição e possíveis aplicações industriais.

Com algumas exceções, os carotenóides nas famílias de Xanthophyta, Rhodophyta e Euphrasphyta são semelhantes aos representados pelas Chlorophytes.

Heilmann (17), Haxo (18), Strain (19, 20), efetuaram revisões relativas à distribuição dos carotenóides em diferentes algas.

TABELA I

DISTRIBUIÇÃO DOS CAROTENÓIDES EM BACTÉRIAS

<u>Família</u>	<u>Carotenóide presente</u>
<i>Pseudomonadaceae</i>	Criptoxantina Zeaxantina
<i>Microrhodaceae</i>	Beta-caroteno Gamma-caroteno Licopeno Astaxantina Zeaxantina Sarcineno Sarcinoxantina Rubixantina Rodoxantina
<i>Actinomyetaceae</i>	Corralina
<i>Corynebacteriaceae</i>	Beta-caroteno Licopeno Criptoxantina Copriniloxantina Canthaxantina
<i>Richnomobacteriaceae</i>	Sarcineno Sarcinoxantina Alfa-bacteriopurpurina Alfa-bacterioruberina
<i>Mycobacteriaceae</i>	Alfa-caroteno Beta-caroteno Gamma-caroteno Licopeno Lycopreno Astaxantina Criptoxantina Luteína Zeaxantina

(continua)

(continuação)

Família

Athiorhodaceae

Carotenóide presente

Beta-caroteno

Licopeno

Licoxantina

Rodoviolacina

Didroxinetoxi-Licopeno

Didroxinetoxi - copanona

Espiriloxantina

Cloroxantina

2-Ductonodovibina

2-Euctoespiriloxantina

Neurosporeno

Hyphomicrobiaceae

Beta-caroteno

Licopeno

Anisronodovibina

Espiriloxantina

Rodovibina

Espiriloxantina-florodenatibina

Xantina

Chlorobacteriaceae

Gamma-caroteno

Delta-caroteno

Rubixantina

Mycoplasmataceae

Neurosporeno

Carotenol

Bacillaceae

Beta-caroteno

Gamma-caroteno

Delta-caroteno

Licopeno

Licoxantina

Rodoviolacina

Rodopurpurina

Flavonodeno

Beta-lacteriopurpurina

(continua)

(continuação)

<u>Família</u>	<u>Carotenóide presente</u>
	Espiriloxantina
	Oquenona
	Neurosporeno

Fonte: Sieglar (60). Microbial carotenogenesis. Adv. In. Appl. Microbiol. 7, 1 (1965)

TABELA II

DISTRIBUIÇÃO DOS CAROTENÓIDES EM FUNGOS E LEVEDURAS

<u>Família</u>	<u>Carotenóide presente</u>
Ascomycetes	Alfa-caroteno
	Beta-caroteno
	Gama-caroteno
	Licopeno
	Licoxantina
	Neurosporeno
	Rodopurpureno
	Rodoviolacina
Basidiomycetes	Alfa-caroteno
	Beta-caroteno
	Gama-caroteno
	Delta-caroteno
	Licopeno
	Toruleno
	Cantaxantina
	Criptoxantina
	Zeaxantina
Phycomycetes	Alfa-caroteno
	Beta-caroteno
	Gama-caroteno

(continua)

(Continuação)

<u>Família</u>	<u>Carotenóide presente</u>
Phycomycetes	Beta-caroteno
	Licopeno
	Neurosporenno
	Tonuleno
Deuteromycetes	Alfa-caroteno
	Beta-caroteno
	Gamma-caroteno
	Delta-caroteno
	Licopeno
	Neurosporenno
	Rodoxantina
	Rodotonulina
	Tonuleno
	Tonulinodina
	Neurosporennoxantina

Fonte: Siegel (66). Microbial carotenogenesis. Adv.
In. Appl. Microbiol., 7, 1 (1965).

TABELA III

DISTRIBUIÇÃO DOS CAROTENÓIDES EM ALGAS

<u>Divisão</u>	<u>Carotenóide presente</u>
Bacillariophyta	Beta-caroteno
	Fucooxantina
	Diatoxantina
	Diadinoxantina
Chlorophyta	Alfa-caroteno
	Beta-caroteno
	Gamma-caroteno
	Luteína
	Zeaxantina

(continua)

(continuação)

Famílias

Carotenóide presente

Chlorophyta

Violaxantina

Neoxantina

Astaxantina

Sifonoxantina

Chrysophyta

Alfa-caroteno

Beta-caroteno

Fucoxantina

Diatoxantina

Diadinoxantina

Cyanophyta

Beta-caroteno

Luteína

Zeaxantina

Mixoxantina

Mixoxantofila

Osciloxantina

Flavocina

Equinenona

Cryptophyta

Alfa-caroteno

Zeaxantina

Euglenophyta

Beta-caroteno

Gamma-caroteno

Luteína

Neoxantina

Astaxantina

Equinenona

Criptoxantina

Euglenonona

Riboflavinonona

Pyrrhophyta

Beta-caroteno

Diadinoxantina

Sulcatoxantina

Dinoxantina

(continua)

(continuação)

<u>Família</u>	<u>Carotenóides presentes</u>
<i>Phaeophyta</i>	<i>Beta-caroteno</i> <i>Luteína</i> <i>Violaxantina</i> <i>Fuco-xantina</i> <i>Diatoxantina</i>
<i>Rhodophyta</i>	<i>Alfa-caroteno</i> <i>Beta-caroteno</i> <i>Luteína</i> <i>Neoxantina</i> <i>Taraxantina</i>
<i>Xanthophyta</i>	<i>Beta-caroteno</i> <i>Luteína</i> <i>Violaxantina</i> <i>Neoxantina</i>

Fonte: (60) Ciegler . *Microbial carotenogenesis*.
Adv. In. Appl. Microbiol. 7, 1 (1965)

METODOLOGIA GERAL DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ^(a)

A escolha do método para a separação das carotenóides de suas fontes naturais, está primariamente condicionada aos seguintes aspectos:

- a) Natureza do material biológico;
- b) Facilidade para extração com solventes;
- c) Suas propriedades e quantidades relativas em que estão presentes.

1. Extração.

Geralmente se extraem carotenóides dos microrganismos mediante tratamento das células com solventes orgânicos, como por exemplo acetona, éter de petróleo, hexano, metanol anidro, etc. Este processo de extração pode ser acelerado por meio da agitação.

2. Separação.

A mistura das carotenóides assim extraída, é geralmente fracionada por cromatografia ou por extração com solventes imiscíveis, conforme esquematizado na figura 3.

2a. Vários tipos de cromatografia têm sido utilizados, como a cromatografia em papel, cromatografia em camada fina, cromatografia em fase gasosa e cromatografia de adsorção, dos quais o último é o mais utilizado em escala industrial. Strein e colaboradores (21), referiram-se à cromatografia por adsorção como indispensável na separação das carotenóides. Vários tipos de materiais adsorventes são utilizados, dependendo da polaridade dos carotenos a serem separados; assim, por exemplo, para carotenóides muito polares, utilizam-se sacarose, celulose e sílica de magnésio (22), enquanto que para as de polaridade intermediária, utiliza-se óxido de magnésio ou carbonato de cálcio. Para as de polaridade baixa, usa-se hidróxido de cálcio ou alumina ativada.

2b. Na extração por solventes imiscíveis, geralmente, são utili-

zadas misturas de etanol e acetona. Os fenômenos, de oxidação, isomerização e mudanças internas nas moléculas, produzidas por ácidos liberados durante o processo, são evitadas na extração, pela adição de substâncias antioxidantes como o quinol e os agentes neutralizantes como o carbonato de cálcio ou piridina (23).

Para casos em que a extração por solventes é lenta ou incompleta, recomenda-se (24) moer o material a ser extraído. Em certos microrganismos utiliza-se a adição de enzimas, como por exemplo, o lisozimo, que produz a ruptura da parede celular, facilitando a extração das carotenóides (25).

3. Identificação

As misturas de carotenóides extraídas e separadas parcialmente por técnicas de extração com solventes imiscíveis ou por cromatografia, são posteriormente identificadas em seus componentes por meio de métodos espectroscópicos tais como: ultravioleta, infra-vermelho, ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa.

A espectrometria por absorção de ultravioleta tem sido utilizada durante os últimos 50 anos na caracterização das carotenóides, uma vez que a mesma apresenta a vantagem de permitir reconhecimento de certos grupos importantes em suas moléculas. A técnica do infra-vermelho não tem tido muita utilidade na química das carotenóides devido, principalmente, ao fato destes compostos possuírem um sistema conjugado, produzindo bandas muito fracas e difíceis de detectar. Não obstante, com essa técnica, foi possível identificar certos grupos químicos importantes nas moléculas das carotenóides, tais como: hidroxi-lico, cetônico, acetilênico e alênico (26).

A ressonância nuclear magnética (NMR) dos prótons fornece dados importantes, permitindo não só uma melhor compreensão das estruturas das moléculas, como também a determinação de grupos funcionais e suas posições relativas dentro, das moléculas (27).

A utilização de tais métodos analíticos tem sido de grande valia no desenvolvimento da química das carotenóides, permitindo, desta maneira, triplicar o número de compostos conhecidos em apenas alguns anos.

Todas estes pigmentos, uma vez isolados e cristalizados, podem ser analisados, determinando-se seus pontos de fusão, grau de insaturação, rotação óptica, formação de derivados, etc.

Excelentes discussões a respeito foram publicadas por Goodwin (2), Strain (20, 28), Kanner e Jucker (1), Curl (29), Purcell (30) e Burt (31).

(a) O processo de isolamento deve ser produzido na obscuridade ou em presença de luz difusa, a temperaturas baixas (25°C a 0°C). Em atmosfera inerte (nitrogênio ou vácuo), com solventes puros, livres de peróxidos.

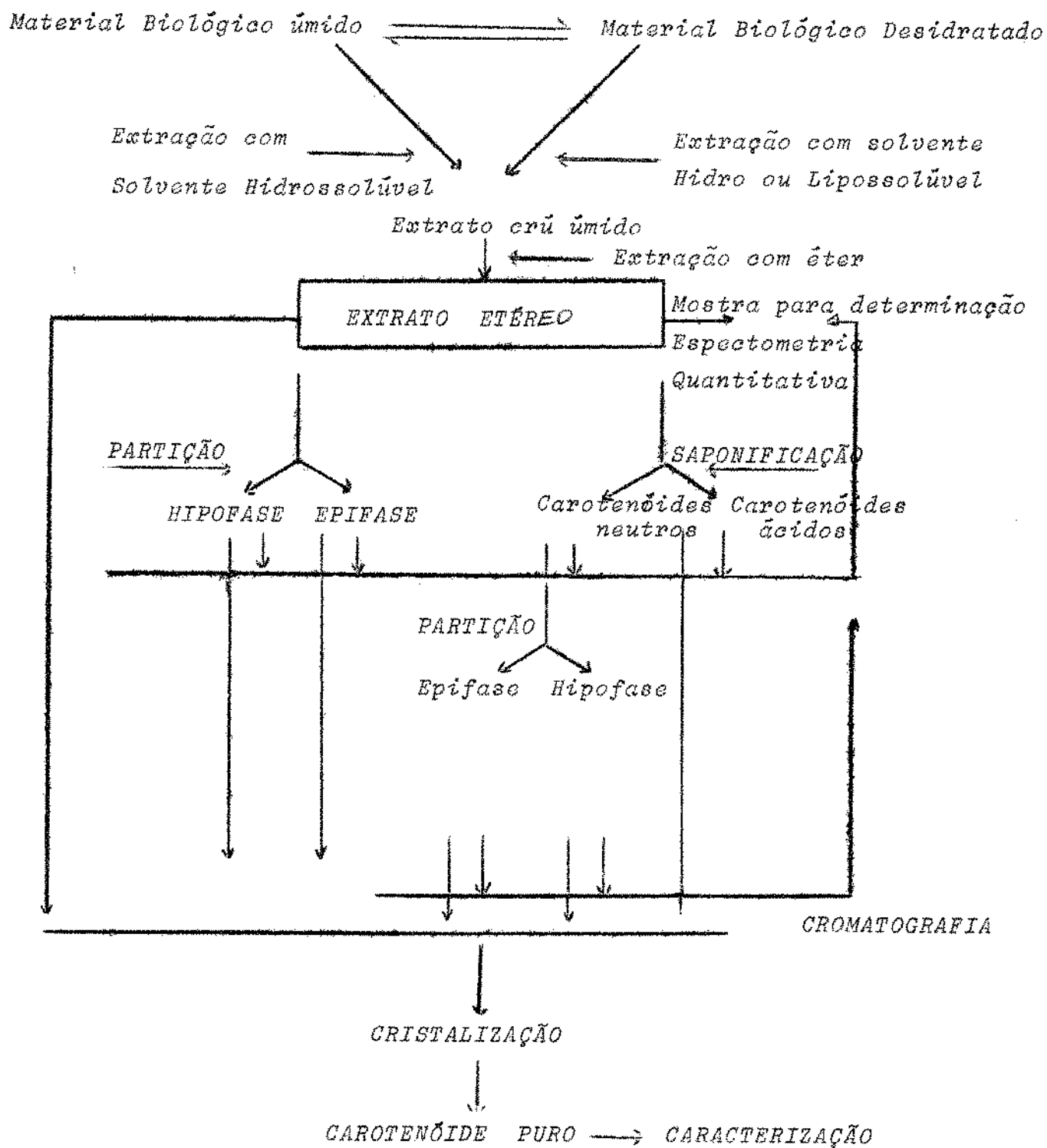
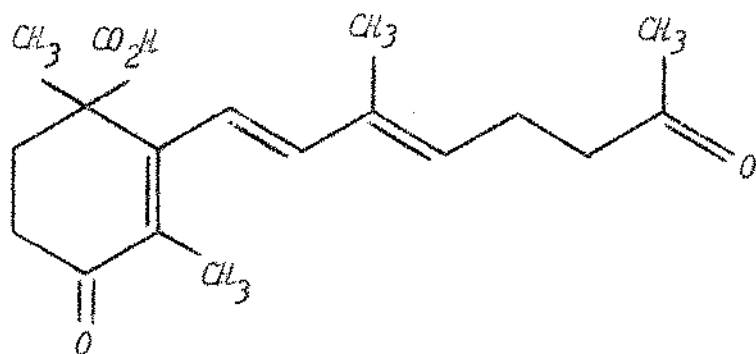
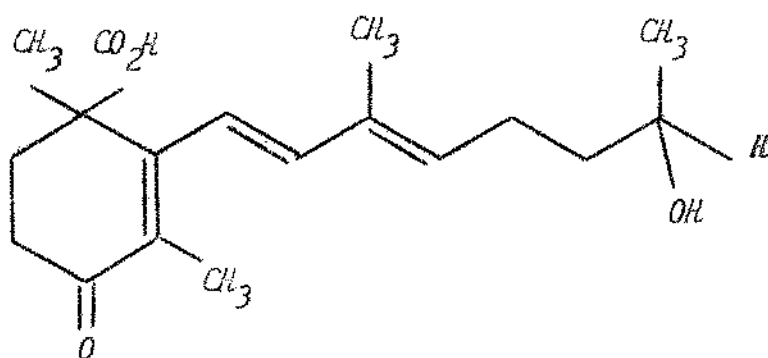


Figura 3. Esquema geral de separação e identificação dos carotenóides.

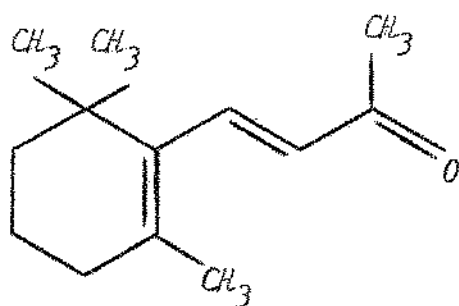
Figura 4. Estrutura dos ácidos trisporicos B e C, e da B-ionona.



ÁCIDO B-TRISPORICO



ÁCIDO C-TRISPORICO



B - JONONA

PRODUÇÃO MICROBIANA DE CAROTENOS EM ESCALA INDUSTRIAL

1. - Produção de beta-caroteno

O beta-caroteno pode ser obtido de diversas espécies de fungos, leveduras e algas. Não obstante, quando se deseja bons rendimentos, capazes de serem aplicados em escala industrial, o número de espécies aplicáveis se reduz a poucos microrganismos, a saber:

1. Rhodotorula sp.

Deufel e Clark (32), estudaram a produção de beta-caroteno em caldos sintéticos e não sintéticos por distintas espécies de Rhodotorula, como: R. flava, R. gracilis e R. pallida. Os rendimentos obtidos oscilaram entre 5,2 e 120,6 $\mu\text{g/g}$ de células secas. Peterson e colaboradores (33) encontraram resultados similares em um estudo quantitativo de um grande número de espécies, obtendo o maior rendimento com a R. aurantiaca (155 $\mu\text{g/g}$ de célula seca). Não obstante, Vuori e colaboradores (34), utilizando o tipo denominado R. Sarniei, em estudos posteriores, alcançaram rendimentos da ordem de 177 $\mu\text{g/g}$ de células secas.

Entretanto, presentemente, os rendimentos obtidos com espécies de Rhodotorula são baixos e sem significação industrial econômica.

2. Neurospora crassa

Durante as investigações realizadas com esse microrganismo em fermentações com agitação, iluminação, e adição de estimulantes, tais como detergentes selecionados, sais de amônio, etc., obteve-se um rendimento de 2,7 mg , por grama de células secas, depois de cinco dias e meio de fermentação. O resultado é, evidentemente, muito baixo, para uma aplicação industrial.

Maxo (35), Zalocher (36), Krzeminski e Du Bonbush (37) mencionam diversos métodos de produção por esse microrganismo, que não serão comentados neste trabalho por não oferecerem perspectivas industriais.

3. Penicillium sclerotium

Entre os representantes desta espécie, em geral, não se encontram carotenóides. Por outro lado, Nase e colaboradores (38) informaram que um membro da série (P. thomii) produziu 7 mg de carotenos totais por grama de célula seca, dos quais 65% era beta-caroteno.

Além da informação de que o rendimento é muito baixo, não tem sido publicado nenhum estudo adicional recente sobre a produção industrial com esta espécie.

4. Phycomycetes Blakesleerius

Goodwin e colaboradores (39) estudaram largamente a produção com representantes desse gênero de fungo no que se refere à influência de distintos nutrientes e condições do meio (pH, temperatura, etc.). Os rendimentos máximos obtidos alcançaram 4 mg de carotenos por grama de células secas em condições de cultivo estático, e estimulado por beta-ionona e iluminação contínua. Os rendimentos citados se conseguem depois de seis a oito dias de fermentação.

Alguns dados sobre esse assunto foram publicados por Hesseltine (11), principalmente. Ainda assim, os rendimentos obtidos não possuem significação econômica para uma aplicação industrial.

5. Choanephoraceae

Hesseltine (11) efetuou uma revisão geral sobre carotenóides produzidos por representantes da ordem Mucorales, com especial referência à família Choanephoraceae, particularizando especialmente a busca de fermentações capazes de produzir beta-caroteno em escala industrial. Foram estudados vários membros da família, sendo, grande parte da investigação, realizada no Laboratório de Investigação Regional do Norte (Northern Regional Research Laboratories), possuidor de uma vasta coleção de material biológico.

Alguns laboratórios industriais têm investigado extensivamente essas fermentações mas, seus dados, em geral, não são publicados.

Um fenômeno fundamental observado por Barnett e colaboradores (40) foi o seguinte:

o micélio originado pelo desenvolvimento, na forma conjugada dos dois sexos (+ e -) das culturas de Chonnephora cucurbitarum produziam, no meio líquido, 15-20 vezes mais beta-caroteno que o obtido quando os dois sexos são cultivados separadamente.

Hasseltine e Anderson (41), estenderam estas observações a outros membros da família que também apresentam as duas formas sexuadas: C. conjuncta e Blakeslea circinans. Em ambos os casos observou-se que o desenvolvimento em conjunto dos dois sexos produzia rendimentos mais altos do que o desenvolvimento em separado. Apesar disso, o rendimento continuou sendo baixo para sua exploração econômica. Anderson e colaboradores (42) usaram cultivos de Blakeslea trispora NRRL 2456 (+) e NRRL (-). Em tal caso observou-se um incremento ainda maior em relação ao desenvolvimento conjunto dos dois sexos, porém, com rendimentos até 13 mg/g de células secas. As fermentações foram realizadas em fermentadores com agitação, em meio de cultura sintético, adicionando-se substâncias estimulantes, como óleo vegetal, beta-ionona, e detergente não iônico, a um meio básico que continha milho, caseína, macerado de milho, fosfato monopotássico e tiamina. O caroteno recuperado foi submetido a análises, encontrando-se como componentes predominantes todos os trans-beta-caroteno. Ensaio biológico efetuado em ratos indicava que esse pigmento, dentro do micélio seco, é eficaz como precursor da vitamina A.

Subsequentemente, Cieglar e colaboradores (43) empregaram os mesmos cultivos, porém, em condições diferentes: diversos cereais, produtos somente de soja ou em várias combinações, obtendo rendimentos que oscilavam entre 35-40 mg de caroteno por 100 ml do meio.

Prosseguindo este estudo, Cieglar e colaboradores (44), investigaram a influência de óleos vegetais, ácidos graxos, diversos detergentes e diversas ionônias sobre o rendimento. Os resultados foram os seguintes: óleos vegetais com alto conteúdo de ácidos oléicos e linolêicos têm maior efeito, especialmente como estimulante da produção de beta-caroteno.

Baixos rendimentos, entretanto, foram obtidos quando se substituíam no meio os detergentes não iônicos por detergentes catiónicos e aniônicos. A adição de beta-ionona estimula grandemente a síntese do beta-caroteno, como se observa pelos dados da Tabela V e da Figura 5.

TABELA V

Influência de beta-ionona na síntese de beta-caroteno

Beta ionona	Peso seco micélio	Caroteno do micélio seco	Caroteno prod.
mg/100 ml	g/100 ml	mg/g	mg/100 ml
0	6,14	1,6	10,1
0,0094	6,49	1,5	10,0
0,094	6,31	1,7	11,0
0,94	5,84	3,4	19,7
9,40	5,45	5,4	29,4
94,00	5,23	7,0	36,8
188,00	4,78	8,0	38,2

Fonte: Ciegler e colaboradores. *J. Agr. Food Chem.* 9, 447 (1962a).

Como que a beta-ionona é tóxica para o fungo, especialmente na etapa de sua multiplicação vegetativa, a adição ao micélio foi efetuada dois dias depois de sua inoculação, tempo suficiente para que se complete o desenvolvimento. A adição de alfa-ionona tem um efeito similar sem produzir mudança alguma nos pigmentos obtidos. Posteriormente, Zajic (45) informou que a carotenogênese pode ser estimulada também por alfa, beta, gama e delta-metiliononas. As investigações de Mackinnay e colaboradores (46) e Engel e colaboradores (47), assim como as informações dadas por Ciegler e colaboradores (44), e Saleh e Jager (48), indicam que a ação estimulante destes compostos é indireta e que, além disso, um fragmento da molécula se incorpora ao beta-caroteno. Reyes e colaboradores (49) postularam que a beta-ionona exerce uma ação estimulante sobre a atividade de enzimas preexistentes, dando a entender que a beta-ionona estimula a biossíntese de isoprenóides, atuando em forma catalítica e não mediante um mecanismo de indução enzimática.

Ciegler e colaboradores (44) em um estudo sobre o aumento da carotenogênese por *B. trispori*, a partir de lípidos, observaram que os aglomerados que eles formavam, não eram facilmente metabolizados pelos fungos.

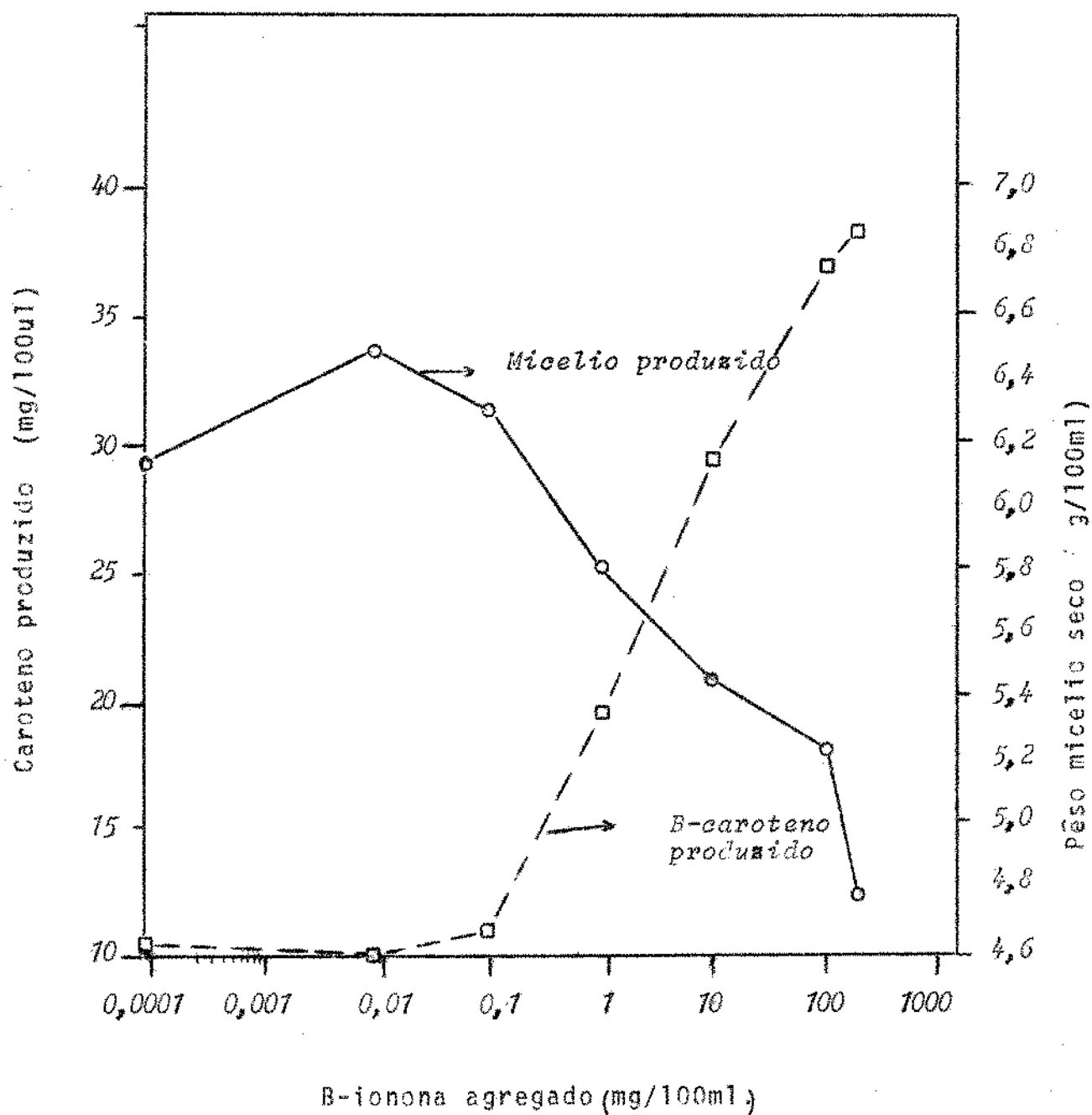


Figura 5: Influência da Beta-ionona na sínteses do Beta-caroteno

Em uma tentativa para evitar tal inconveniente e como meio para aumentar os rendimentos, foram feitos ensaios adicionando, ao meio, solventes orgânicos, tentando produzir desta maneira uma lixiviação de carotenos do micélio durante o desenvolvimento, assim como prevenir a formação daqueles agrupamentos. Ciegler e colaboradores (50), mediante adição de querosene conseguiu - nam aqueles propósitos; entretanto, não houve um aumento considerável no rendimento, devido à toxicidade do querosene adicionado. Quando repetiram o mesmo ensaio com o querosene desodorizado, o resultado foi uma duplicação dos rendimentos que chegaram até 100 mg/100 ml de líquido, conforme demonstrado na Figura 6. Não obstante, o efeito de lixiviação não se produziu, pois o caroteno encontrava-se no micélio. Hanson (13), Ciegler e colaboradores (50) postularam que o hidrocarboneto pode funcionar em parte como depósito dentro do micélio no qual dissolve o caroteno, facilitando o armazenamento de maiores quantidades de pigmentos. Outro fator que influiu desfavoravelmente no desenvolvimento desta fermentação, foi o custo relativamente alto dos estimulantes (beta-iononas), procurando-se, por essa razão, sua substituição por um equivalente de baixo custo. Ciegler e colaboradores (51, 52) comprovaram a possibilidade de substituir por subprodutos da indústria cítrica, como polpas de citrus, melão e óleos essenciais de frutas cítricas, que são de baixo custo. Zojic (45) encontrou também que uma variedade de óleos essenciais, especialmente os de estrutura terpênide, intensificavam a produção de carotenos.

A adição de 1% de melão de citrus, ao meio de fermentação que já continha 5% de farinha de gérmen de algodão, 2,5% de milho, 5% de óleo vegetal, 5% de querosene desodorizado e 0,2 % de tianina, produziu rendimentos que alcançaram até 107,9 mg/100 ml do meio, como se observa na Tabela e Figura 7.

Pozola e colaboradores (53), e Ciegler e colaboradores (54) encontraram que parte da atividade se deve essencialmente à presença de ácido cítrico e sacarose. Demonstraram, também, que a adição destas substâncias em conjunto produzia rendimentos superiores aos obtidos quando se usava cada uma delas em separado. Este feito levou a investigações posteriores, esperando por em evidência a interessante questão se tais substâncias estão ou não envolvidas na síntese dos carotenóides, que se produzem em altas concen

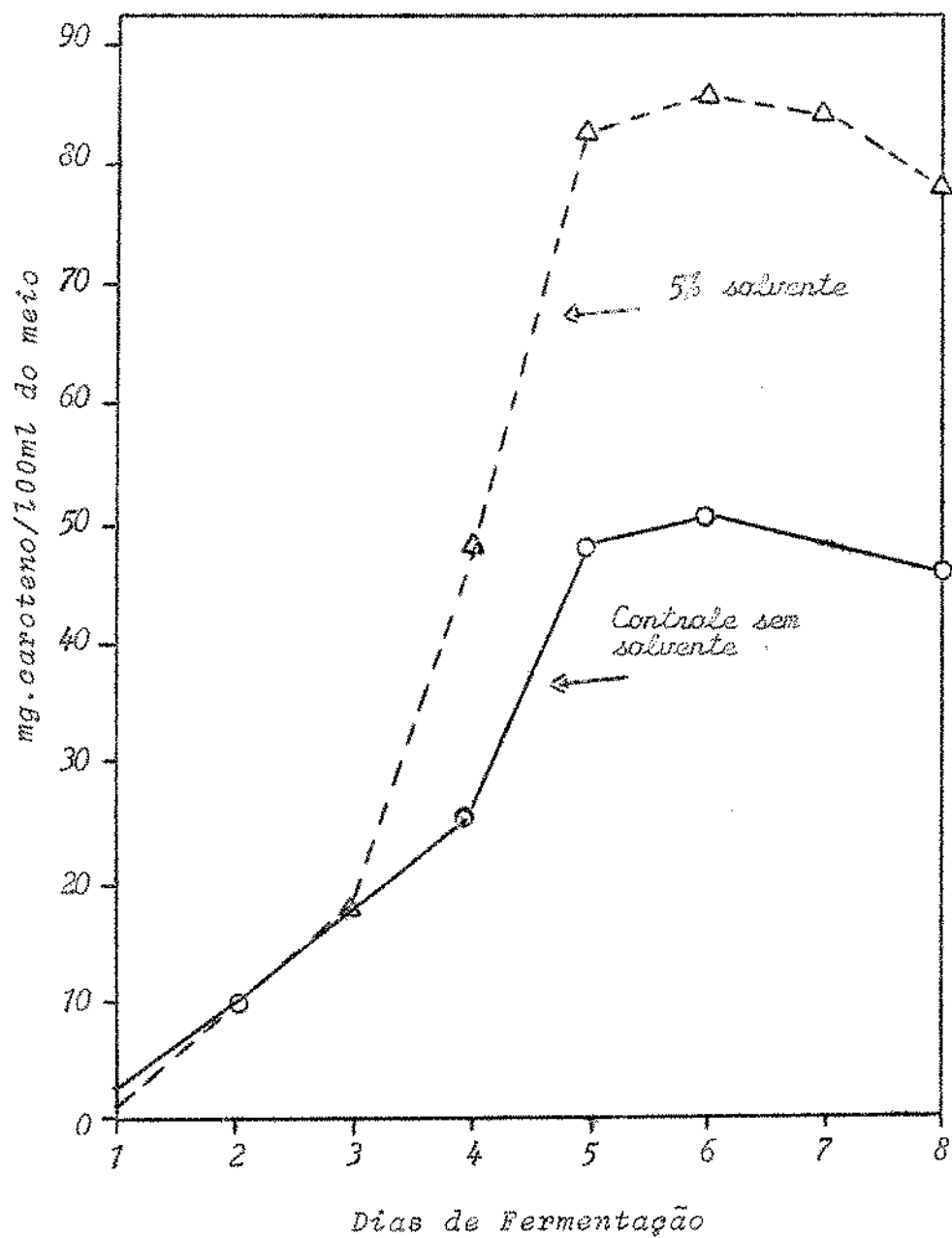


Figura 6. Efeito de querosene desodorizado na produção de carotenos

(13) Hanson, A. Microbial Technology 22. 1967.

trações. Ciegler e colaboradores (54) observaram também que a beta-ionona pode ser substituída pelo micélio de *B. trispora*, recuperado de uma fermentação prévia, com o que, em seis dias de fermentação, obtém-se até 142 mg de caroteno por 100 ml de meio.

TABELA VI

Influência do melão de citrus na produção de beta-caroteno

Melão citrus	Micélio seco	Caroteno prod.	Caroteno prod.
%	g/100 ml	mg/g	mg/100 ml
0	6,93	9,7	67,2
0,1	5,79	14,3	82,6
0,3	5,91	16,2	95,8
0,5	5,94	16,3	99,9
1,0	6,27	17,2	107,9
3,0	6,48	17,5	113,3(+)
5,0	7,62	13,8	105,0

(+) No quadro original encontra-se 103,3.

Fonte: (50) Ciegler e colaboradores. J. Agr. Food Chem. 9, 447 (1962a).

Ninet e colaboradores (14), efetuaram uma série de experimentos tratando de encontrar substâncias sintéticas capazes de substituir as iononas e certos terpenóides naturais, tais como os que aparecem na Tabela VII.

Pelos dados da Tabela VII deduz-se que o 2,2,6-trimetil-ciclohexanol e 2,2,6-trimetil-ciclohexanona, embora não aumentem significativamente a produção de carotenóides, o fazem em relação ao beta-caroteno. Por outro lado, o 2,2,6-trimetil-1-acetil-ciclohexeno produziu um incremento nos dois sentidos. Evidenciou-se que, adicionando-se ao meio certos antioxidantes, como a dimetilformamida, estimula-se a carotenogênese, com aumento dos rendimentos da ordem de 1,275 mg de beta-caroteno por litro. Usaram-se concentrações de 2 a 4 g desta substância por litro. Tais resultados levaram à

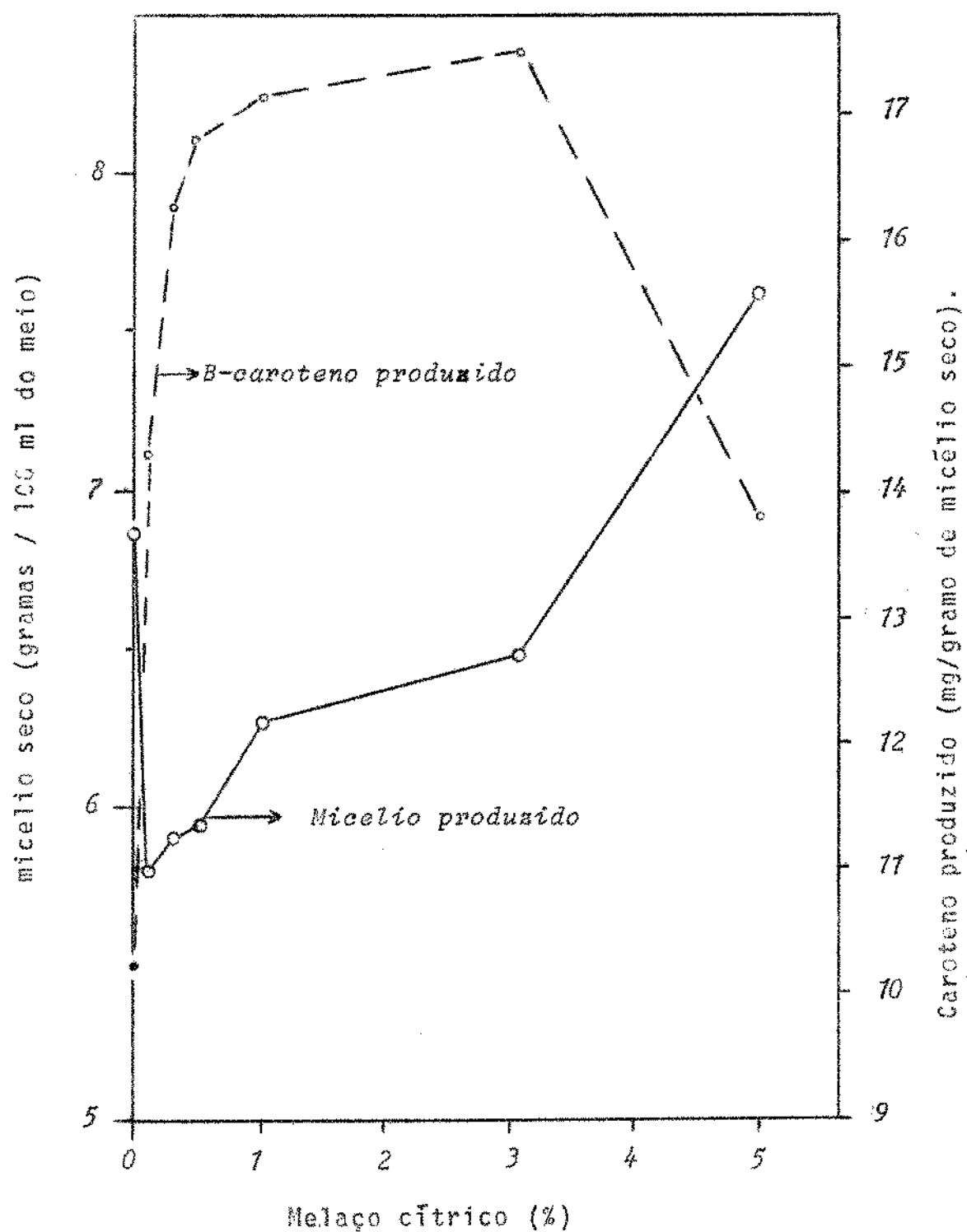


Figura 7: Influência do melaço de citrus na produção do B-caroteno

suposição de que esses compostos modificavam a permeabilidade seletiva da membrana celular em relação a certos produtos essenciais. Ninet e colaboradores (14), conduziram experimentos utilizando amidos simples, notando que a propionamida, a acetamida e a butilamida produziam uma estimulação sobre a carotenogênese, como mostram a Tabela VIII e a Figura 8.

T A B E L A VII

Efeito dos derivados do Ciclohexano^(a)

Composto	Concentração	Efeito relativo sobre produção de beta-caroteno
	g/2	%
2-2-6 trimetilciclohexanona	1	117
Ciclohexanona	1	79
2 metilciclohexanona	1	63
3 metilciclohexanona	1	97
4 metilciclohexanona	1	74
2-2-6 trimetilciclohexanona oxima	1	76
2-2-6 trimetilciclohexanona cetazina	1,5	115
2-2-6 trimetilciclohexanona semicacilona	1,2	125
2-2-6 trimetilciclohexanona	1	112
2-2-6 trimetil 1-ciano ciclohexanona	0,2	114
2-2-6 trimetil 1-acetil ciclohexanona	1	140
ionona	1	164

(a) Meio sem beta-ionona.

Fonte: (14) Ninet e colaboradores. *Biotech. and Bioeng.* 11, 1195 (1962a).

TABELA VIII

Efeito de amidas alifáticas na produção de beta-caroteno^(a)

Substância adicionada	Concentração	Efeito relativo prod. beta-caroteno
	g/l	%
Formamida	0,5	96
Acetamida	2	115
Propionamida	2	108
Butilamida	2	114
Dimetilformamida	2	122
N,N-dimetilacetamida	2	105
N-fenilacetamida	2	73

(a) Meio com beta-ionona.

Fonte: (14) Ninet e colaboradores. *Biotech and Bioeng.* 11, 1195 (1962a).

As investigações foram estendidas utilizando-se diferentes amidas e observou-se que, em condições similares às realizadas com as outras substâncias, a succinamida, em particular, produziu uma grande ativação da carotenogênese (50 a 60 vezes maior). Do mesmo modo, foram efetuados ensaios com derivados da mesma, sem encontrar nenhuma que superasse os resultados conseguidos pela adição de succinamida, conforme resultados da Tabela IX e Figura 9.

TABELA IX

Efeito da Succinamida na produção de beta-caroteno^(a)

Concentração	Produção beta-caroteno
g/l	mg/l
0	1.070
2	1.415
3	1.535
4	1.640

(a) Meio com beta-ionona.

Fonte: (14) Ninet e colaboradores.

Biotech and Bioeng. 11, 1195 (1962a)

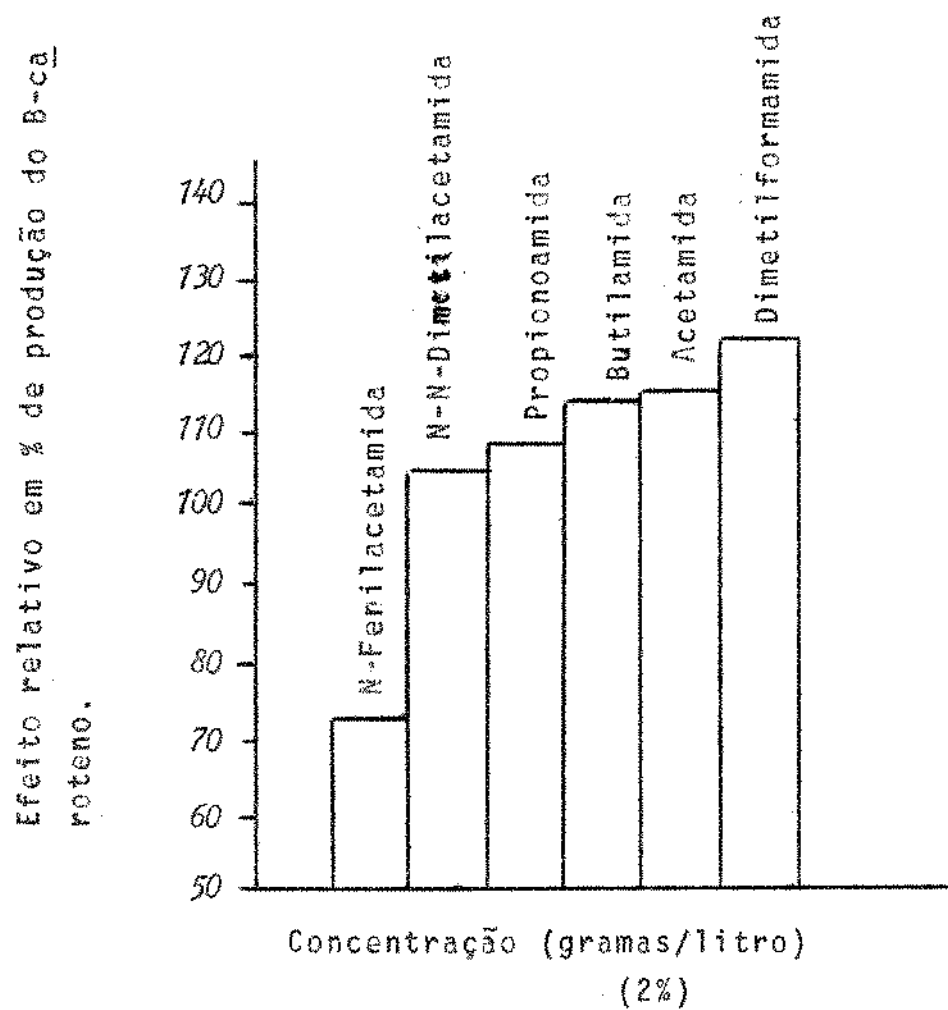


Figura 8: Efeito de alguns amidos alifáticos na produção de B-caroteno.

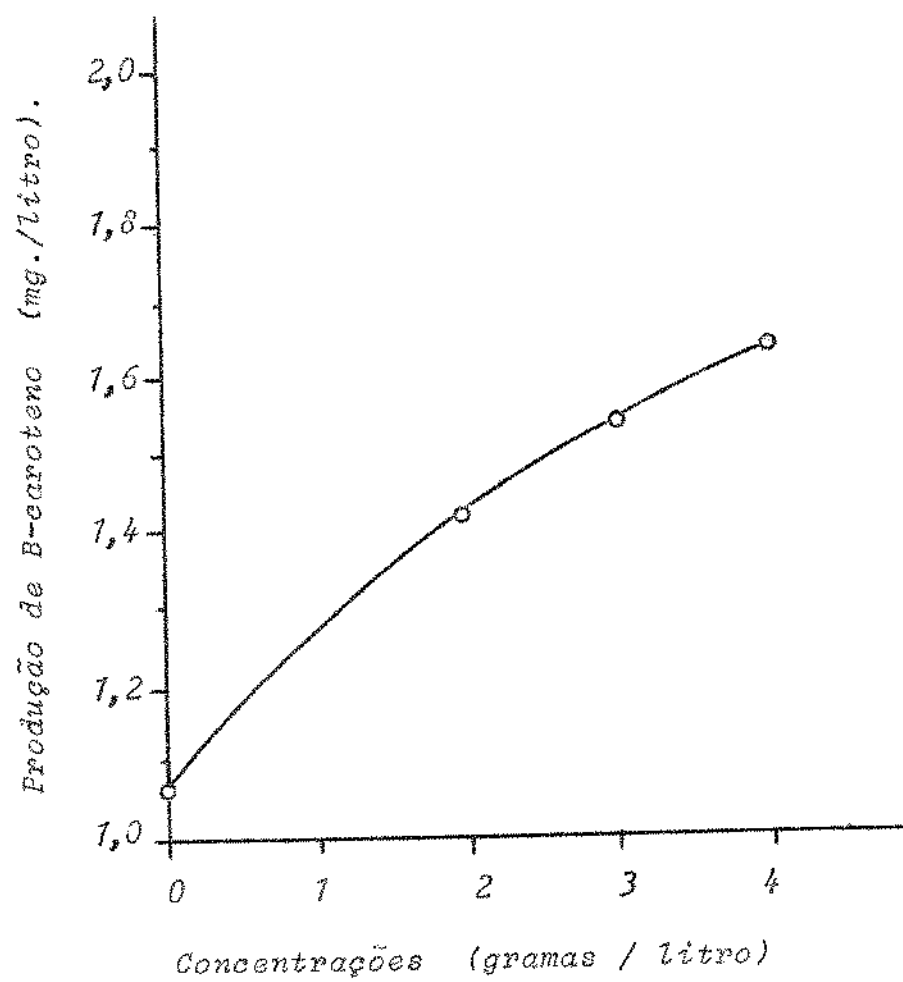


Fig. 9. Efeito da succinamida na produção do B-caroteno

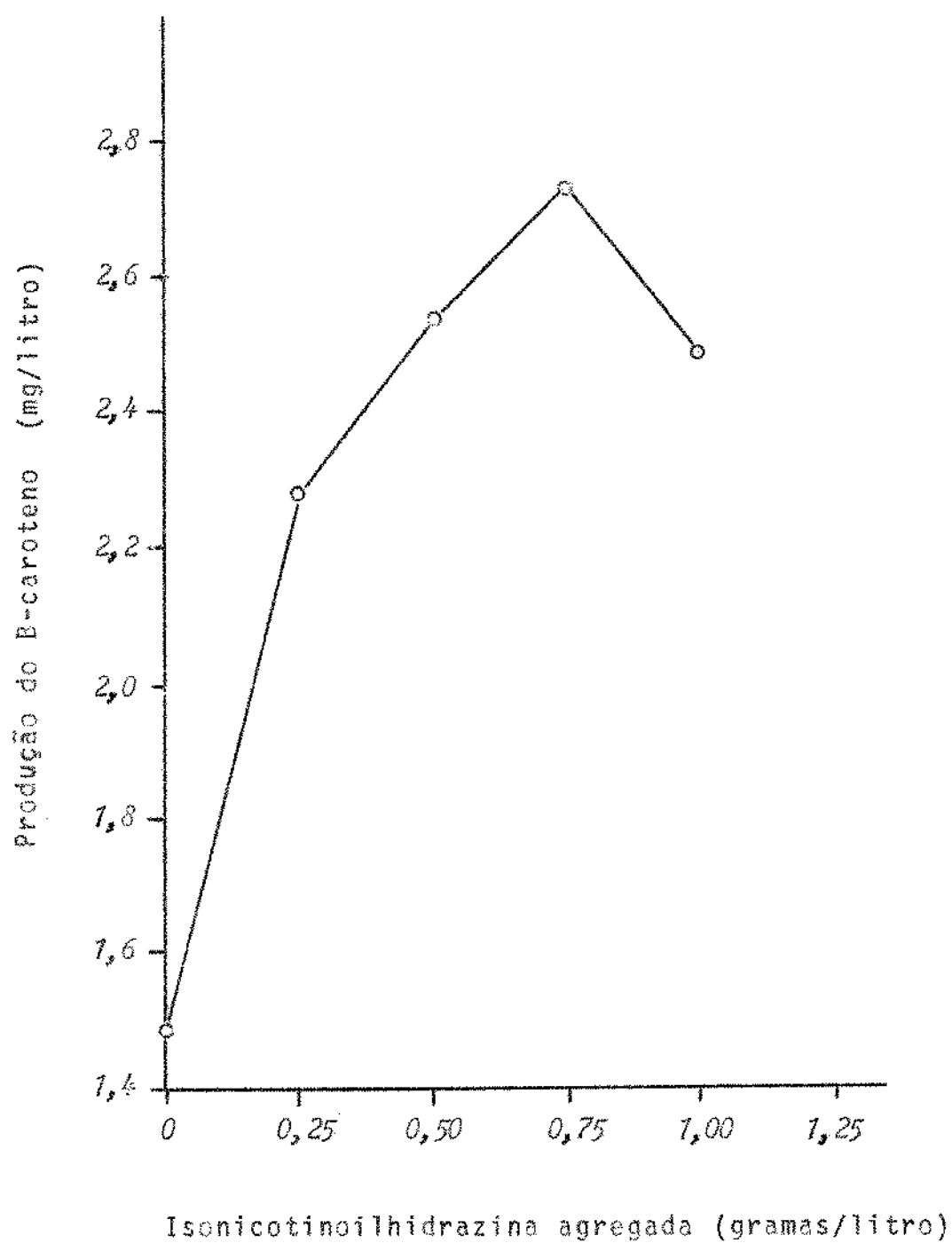


Figura 10: Efeito da isonicotinoilhidrazina na produção do B-caroteno.

Foram realizados ensaios com outras substâncias tais como as hidrazidas alifáticas e aromáticas, e com diferentes ácidos heterocíclicos. Destas últimas substâncias, algumas melhoram a produção de beta-caroteno, porém, nenhuma é superior à Isonicotinailhidrazina, que produz concentrações de até 2.730 mg de beta-caroteno por litro. Tabela X, Figura 10.

TABELA X

Efeito da Isonicotinailhidrazina na produção de beta-caroteno^(a)

Concentração	Produção
g/l	beta-caroteno mg/l
0	1,485
0,25	2,280
0,5	2,540
0,75	2,730
1,0	2,495

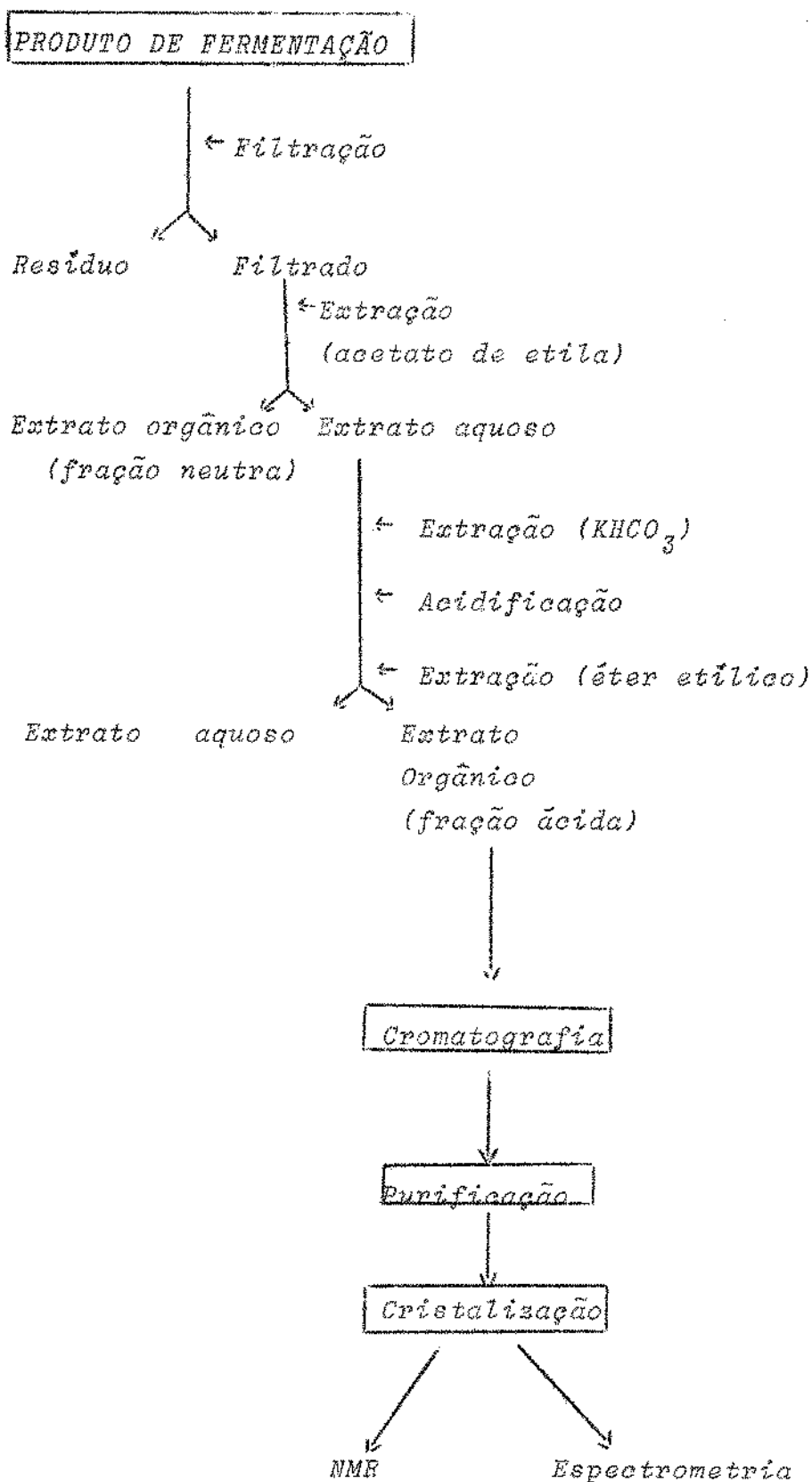
(a) Feito com beta-ionona.

Fonte: (14) Kinet e colaboradores.

Biotech and Bioeng. 11, 1195 (1962a).

Estudos posteriores levados a efeito por Van Den Ende (55), nas quais se investigava a interrelação da sexualidade da B. trispora com respeito à síntese de carotenos, mostraram que, quando se adicionavam quantidades equivalentes de hormônio (indutores de gametas) em cultivos inoculados com a Blakeslea trispora⁽⁻⁾, obtinham-se quantidades de carotenóides similares aos produzidos em cultivos combinados com as duas formas sexuais do fungo em questão. Isso levou-o a admitir que a ativação da síntese é resultado da ação hormonal. Estes hormônios foram isolados e purificados, conforme esquema 4. Mediante análises de amostras puras, ficou evidente que eram idênticos aos ácidos trispóricos B e C, cujas estruturas são apresentadas na Figura 4.

Observou-se também que, quando ambos os sexos de B. trispora foram cultivados em um único recipiente, separados por uma membrana filtran



Esquema 4. Separação e identificação dos Ácidos Trisporicos B e C.

te que não permitiu a conjugação genética, mas permitiu o intercâmbio de produtos solúveis, não se inibiu a formação de hormônios sexuais, pois se obtiver produção similar de carotenóides é resultante do cultivo dos dois tipos combinados. Desta forma foi provado que não é necessário o contacto físico entre ambos para induzir a atividade sexual. Estes hormônios também se formam em cultivos combinados de B. trispora (+) com Zigotrychus molleri (uma espécie homotética), porém não se formam quando se mistura este último com a B. trispora (-), o que confirma que estes hormônios são produzidos pelas linhagens masculinas de B. trispora.

Clepler e colaboradores (56), desenvolveram fermentações em plantas-pilotos de 20 litros de capacidade. O período de fermentação se reduziu a 72 horas (três dias), em contraste com os seis dias que eram necessários utilizando-se recipientes com agitação. Isto foi atribuído à maior eficiência prática de aeração que se pode alcançar em tanques, em relação a operações com agitação. Uma análise de gastos indica que o custo é de 31,35 dólares por quilograma de caroteno contido nos sólidos secos provenientes do processo fermentativo. Tal estimativa baseou-se numa produção anual de 5.000 toneladas de sólidos livres de umidade (76.200 kg de caroteno) em ciclos de 24 horas por dia e 300 dias por ano. Nas Tabelas XI e XII resumem-se os dados da produção microbiológica de beta-caroteno, de onde se deduz que esses processos podem competir com a obtenção do beta-caroteno por síntese química.

TABELA XI

Inversão de capital estimado para a indústria de beta-caroteno

Itens	Valor US\$
Terreno e melhoramentos	22,500
Construção - 342.000 pés cúbicos	227,500
Equipamento	606,000
Instalações de equipamento	212,000
Inst. elétricas, tubulações, etc.	286,000
A transportar	1.353,000

<u>De transporte</u>	7.353.000
Construção e outros gastos	<u>386.000</u>
Capital total investido	US\$ 7.740.000

Fonte: (56) Ciegler e colaboradores. *Biotechnol. Bioeng.* 5, 109 (1963d).

TABELA XII

Custo de produção estimado para obtenção de beta-caroteno^(a)

Itens	kg de caroteno US\$
Matéria-prima	19,86
Utilidades	3,33
Mão-de-obra e supervisão	2,22
Manutenção	1,04
Gastos fixos	2,72
Interesse sobre o capital em movimento	0,16
Gastos gerais da indústria	1,63
Fatores variados de abastecimento	0,39
Preço de custo estimado	<u>31,35</u>

(a) Capacidade anual 5.000 t de sólidos com 76.200 g de beta-caroteno.

Fonte: (56) Ciegler e outros. *Biotechnol. Bioeng.* 5, 109 (1963d).

II. Produção de Licopeno

Embora esse caroteno se encontre em muitos microrganismos, somente um método de obtenção por fermentação aparece na literatura. Swarthout (57) usou cultivos combinados de B. tripartita NRRL 9216 (+) e NRRL 9159 (-) e a

NRRL 2456 (+) e NRRL 2457 (-), empregados anteriormente para a produção de beta-caroteno e de licopeno como subproduto. (Figura 1).

Ninet e colaboradores (14) encontraram que em fermentações com *B. trispora* NRRL 2456 (+) e NRRL 2457 (-) com adição de substâncias sintéticas ativadoras como imidazol, piridina e piperidina, inibe-se, total ou parcialmente, a formação de beta-caroteno, havendo, por outro lado, produção de grande quantidade de licopeno, atingindo até 703 mg/100 ml de meio. Essa interessante descoberta tornou possível a carotenogênese seletiva.

Os volumes que Swanthoult (57) utilizou no processo por ele seguido, variaram entre 100 ml até 130 litros, com rendimentos de 3 a 15 mg por 100 ml. Observou-se, além disso, que os cultivos (+) e (-), isoladamente, produziam menores quantidades de pigmentos. Na Tabela XIII estão resumidas as condições de trabalho e os resultados obtidos com fermentações conduzidas em três volumes diferentes. A magnitude da síntese desse pigmento parece estar em função inversa à do valor de pH. Observou-se que, ao se adicionar o micélio resultante da fermentação contendo o licopeno, aos alimentos balanceados de aves, produzia-se uma mudança de coloração da pele e na gema do ovo, fenômeno que, em geral, é observado com a ingestão de xantofilas específicas.

TABELA XIII

Produção de Licopeno em culturas combinadas de Blakeslea trisporaCondições de
fermentação

Fermentação

	A		B		C	
Volume:	100 ml		10 litros		130 litros	
Meio:	"Fish stick liquor"		"Fish stick liquor"		"Fish stick liquor"	
		1,4%		1,4%		1,4%
	K_2HPO_4	0,35%	K_2HPO_4	0,35%	K_2HPO_4	0,35%
	Acetato de calcio	2,5%	Ácido oleico	1,5%	Glicose	4,4%
			Na_2CO_3	2,2%	Na_2CO_3	2,2%
pH inicial	7,2		6,6		6,6	
pH final	8,37		6,6 (ou mais)		6,6 (ou mais)	
Agitação (rpm)...	228		-		-	
Aeração	-		0,4 v/v/min.		0,5-1 v/v/min.	
Temperatura	28°C		27°C		27°C	
Duração do processo	4 dias		6 dias		4 dias	
Tamanho do inóculo	0,5% v/v/cada linhagem		0,5% v/v/cada linhagem		1,0% v/v/cada linhagem	
Rendimento	8,65mg/100ml		15,02mg/100ml		8,78mg/100ml	

Fonte: Swarthout (57). In "Microbial Carotenogenesis". Adv. in Appl.
Microbiol. 7, 1 (1965).

PRODUÇÃO MICROBIANA DE XANTÓFIAS

Embora estes pigmentos se encontrem em diferentes bactérias, leveduras, fungos e algas, conhecem-se poucos microrganismos que produzem xantófilas de interesse comercial tais como luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, além disso os dados da literatura relativos à produção de xantófilas são muito escassos. Quando se trata de produção industrial, os resultados frequentemente são não revelados por interesse econômico. Os dados publicados referem-se às possibilidades apenas potencial. Em neste sentido a maior quantidade de informação refere-se à produção de xantófilas por *Dacrymycetaceae* e por Algas.

a) Por *Dacrymycetaceae*

Patenteou-se⁽⁺⁾ um processo para produção de beta-caroteno e xantófilas não identificadas, produzidas por vários fungos que pertencem à família *Dacrymycetaceae*, como *D. deliquescens*, *D. spathulicaria*, *D. nuda* e outras, variando os meios e as condições usadas com cada microrganismo. A iluminação durante a fermentação é comum em todos os casos, com luz de onda entre 3200 a 7600 Å² a fim de se obter um rendimento máximo de pigmentos. Comprovou-se que não é necessário uma irradiação contínua para se obter bons rendimentos, porém, depende do comprimento de onda utilizado. Em geral, os resultados foram baixos, oscilando entre 0,4 mg a 3,9 mg de xantófilas por grama de sólido recuperado.

b) Por Algas

Alguns processos têm sido desenvolvidos, utilizando-se diferentes tipos de algas, como a *Sporodococcum excentricum*, obtendo-se rendimentos de até 733 mg de xantófilas por libra, necessitando-se de fontes inorgânicas de sais de amônio e nitratos (Kathrein (58)), e Thiericault (59).

Kathrein (58) fez um estudo utilizando um grande número de algas verdes (*Chlorophytas*), obtendo altos rendimentos com a alga mencionada, em um meio composto de 3% de dextrase, 1,5% de infusão de milho e o pH ajustado a 6,8. Depois da esterilização adicionou-se 0,4% de uréia. Os frascos contendo os meios de cultivo foram inoculados e incubados durante nove dias à temperatura de 28°C, em recipientes com agitação.

(+) Farrow e Tabenkin. U. S. Patent 2.974.044 (1961).

O meio foi suplementado com 3% de dextrose e 1% de macerado de milho nos dias 3, 4, 5, 6 e 7, e com 4% de uréia nos dias 5 e 7, obtendo-se rendimentos que alcançaram 294 mg de xantofila por litro de líquido.

Thericult (59) conseguiu maior produção destes pigmentos, utilizando um novo tipo de alga, a *Chlorella pyrenoidosa*, desenvolvida em recipientes de fermentação com agitação e iluminação. Seus rendimentos foram de 650 mg. de xantofila por litro, com um meio contendo 30g de glicose, 5 mg. de uréia, 2,5g de fosfato monopotássico, 5 g de sulfato de magnésio, 0,5 g. de EDTA, 114,2 mg. de ácido fólico, 63,5 mg de cloreto de cálcio, 49,8 mg. de sulfato de ferro, 88,2 mg de sulfato de zinco, 14,4 mg de cloreto manganoso (II), 7,1 mg de malibidato de sódio, 15,7 mg de sulfato de cobre, 4,9 mg de cobre. O meio com pH 6,1. Após a inoculação, o meio foi continuamente alimentado por uma solução, consistindo de 606g de glicose, 0,14 g de fosfato monopotássico, e 75g de uréia por litro, que foi adicionada 66 horas depois de iniciar-se o processo, diariamente, durante todo o período de fermentação que durou 776 horas.

Quando a fermentação foi produzida sem iluminação, a produção de xantofilas foi mais baixa, pois a conversão de carboidratos em células foi mais eficiente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A importância da produção de pigmentos carotenóides por via fermentativa é tanto de ordem acadêmica (pesquisa) como tecnológica. Por um lado constitui um apaixonante campo para elucidação do mecanismo de sua gênese na natureza; por outro lado, constitui um processo viável para atender à demanda de corantes bromatologicamente adequados para serem incorporados aos alimentos do homem e dos animais.

O interesse da demanda concentra-se no crescente consumo de alimentos condensados (processados), como também na necessidade de suplementar os alimentos de diferentes animais, que produzem alimentos para o homem (exemplo: ovo de galinha).

Em todo caso, a importância desses compostos se deve ao fato de se tratar não só de pigmentos naturais, como em alguns casos, constitui um fator nutricional (beta-caroteno), por exemplo, que fornece a vitamina A.

Um fator que facilitará o desenvolvimento deste campo da ciência e da tecnologia é o desenvolvimento paralelo dos novos métodos de diferenciação e identificação dos pigmentos. Tal afirmativa fundamenta-se na consideração de que, com a introdução da espectroscopia é possível por em evidência novos pigmentos, com respeito aos anteriormente conhecidos, evidente que com o desenvolvimento destes novos métodos de análise instrumental, foi possível uma orientação mais segura do programa de pesquisa como um melhor controle da produção para fins industriais.

No que se refere aos microrganismos empregados para processos industriais, embora os pigmentos carotenóides estejam amplamente difundidos em bactérias, leveduras, fungos e algas, até agora só foi possível a utilização prática de um número muito reduzido de representantes. Tal limitação baseia-se em razões fundamentais como: tipos de pigmentos produzidos (fator de qualidade) e no rendimento que se é possível obter (fator de quantidade).

Em consequência, os únicos aplicados atualmente são Chlorella pyrenoidosa e Blakeslea trispora.

Apesar disto, deve-se destacar obviamente que este

nao da microbiologia industrial é de desenvolvimento recente e esta em plena evoluçao. Disso é de se presumir que, num futuro não muito distante, o homem poderá dispor de uma gama numerosa de microrganismos, com que produz um amplo espectro de pigmentos por via fermentativa, segundo sistemas cada vez mais simples e de maior rendimento. Sem dúvida para isto há de contribuir, os esclarecimentos que se vão acumulando sobre o metabolismo celular, os mecanismos internos de açao enzimática, etc.

Pelo que se sabe sobre os pigmentos, a produçao industrial por métodos microbiológicos refere-se atualmente ao licopeno, ao beta-caroteno e às xantofilas. Em cada caso, o que se objetivou nas investigações foi incrementar o rendimento até valores economicamente viáveis.

Para isso foi necessário encerrar o problema sobre as seguintes linhas.

1a) Encontrar um meio de cultivo básico capaz de prover ao microrganismo um bom desenvolvimento, ainda que a síntese dos pigmentos não fosse significativa.

2a) Investigar estimulantes das sínteses que, ao serem adicionados ao meio, aumentassem a produçao dos pigmentos.

3a) Determinar as condições operacionais adequadas para os microrganismos, no meio básico e estimulantes em relação à iluminação, pH, K₁, etc., Os esforços conjugaram-se em torno de otimização do rendimento em pigmentos, velocidade de produçao, constância e sistematização de produçao, etc.

Em resumo, o que até agora se conhece sobre o tema em questão e relacionado aos pigmentos antes mencionados, é o seguinte:

Beta-caroteno

Microrganismos: Historicamente e em primeira instância, ensaiaram-se espécies de *Spirulinas*, (*Rhodotorula*, *Neurospora crassa*, etc.) e fungos (*Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Duteromycetes*), porém os rendimentos obtidos, escassamente chegaram, em alguns casos, a 150 mg por grama de célula seca.

Estes ensaios, contudo, têm o inquestionável valor de ter servido

como campo de experimentação para elucidar o mecanismo e os fatores de estimulação da carotenogênese.

Posteriormente, foi experimentado um grupo de fungos que multiplicam-se sexualmente, apresentando uma possibilidade adicional de melhorar os rendimentos, atuando precisamente, não sobre o meio básico, mas sobre a forma como se conduz o fenômeno sexual.

Por último, e já referido, o único microrganismo de uso geral para a produção de beta-caroteno, é a Blakeslea trispora, com a qual se conseguiu 2.730 mg/l de meio. Trata-se de um Phycomycetes (fungo não septado) que se multiplica sexualmente (conjugação heterotálica isogâmica), de modo que é possível manter em separada linhagens masculinas e femininas, que se multiplicam asexualmente; em tal caso, produzem uma certa quantidade de caroteno. Quando as duas formas são cultivadas juntas, determinam a formação do zigoto, com a prole resultante deste fenômeno dando um incremento substancial de tais pigmentos.

Meio de cultivo. Está constituído de um meio básico adicionado de distintos estimulantes.

O meio básico é muito simples e comum ao desenvolvimento da maioria dos fungos: fontes de carbono (açúcares), milho, caseína hidrolizada, macedo de milho, fosfatos e outros sais minerais. Os estimulantes estudados foram vários e de distintas origens. Deve-se destacar que a bibliografia não especifica o critério de seleção adotado pelos autores, nem faz uma análise prévia do problema na relação estimulante-estimulado. Parece-nos que estes trabalhos foram realizados ao acaso com base em provas prévias e em alguns casos, os resultados foram deduzidos depois. A gama de produtos ensaiados e suas propriedades dá lugar a que se deduz, também, que a estimulação não tem um único mecanismo, mas sim, o resultado da ação combinada de várias causas: a) mobilização da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática; b) orientação da síntese (indução e repressão enzimática); c) dispersão do meio para aumentar a superfície específica, etc. Assim, por exemplo, o beta-ionona atuaria indiretamente, estimulando a atividade de enzimas do ciclo da carotenogênese para um aumento da síntese. Atuaria sobre os enzimas existentes (catálise) e não provocando a síntese de novos en-

zircos ou acion quantidade das já existentes (indução enzimática). Além disso, sendo a beta-ionona na etapa da sua multiplicação vegetativa típica para o fungo, a adição se efetua após esta etapa, o que acontece 48 horas depois de iniciado o processo fermentativo.

Devido o custo das iononas, tentou-se, com êxito, alguns substitutos mais econômicos:

- Polpa de citrus.
- Melaço de citrus.
- Óleos essenciais de citrus de estrutura terpenóide.

Em cada caso, atua por um produto ativo contido na fração hidrossolúvel, especialmente, ácido cítrico e sacarose em ação conjunta.

Reutilização do micélio: o resultado de uma fermentação prévia convenientemente atualizada, substitui com sucesso a demanda de beta-ionona.

2,2,6-trimetil ciclohexanal e o 2,2,6-trimetilciclohexanona, provocam o aumento parcial de beta-caroteno, porém não aumentam o rendimento de carotenos totais. O 2,2,6-trimetil- β -acetilciclohexano provoca o aumento de ambos.

Amidas - Aumentam o rendimento de beta-caroteno e sua ação se explica como uma modificação da permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, no sentido que favorece o ingresso às células, de produtos essenciais, precursores de pigmentos, que nas células normais têm sua passagem limitada.

Ímidas - Seu efeito e mecanismo de ação são semelhantes aos das amidas.

Hidrazidas Alifáticas e Aromáticas, Ácidos Heterocíclicos, Isonicotinil Hidrazina. Todas deram um incremento de rendimento, especialmente esta última (2730 mg/l).

Lípides - Não são solúveis no meio nem são metabolizadas facilmente, apesar disto são normalmente adicionadas ao meio. A literatura não esclarece por que razão, nem em que sentido exercem ação favorável, que indubitavelmente têm, e para evitar o inconveniente de sua insolubilidade, e a dispersão micelial que as caracterizam, são adicionadas conjuntamente com

hidrocarbonetos (querosene, óleo de petróleo, etc.) que desloca a aglomeração lipídica formada.

Hormônios sexuais

Sem dúvida, a descoberta mais importante, no que se refere ao incremento do rendimento de beta-caroteno, é a que se vincula com fenômenos sexuais de que caracterizam os fungos participantes, e sua relação com o rendimento. O apaixonante problema foi esclarecido desde que se colocou em evidência, que, para o aumento aludido não é estritamente indispensável o fenômeno sexual propriamente dito (conjugação dos gametas masculino e feminino). Desta forma, o que realmente atua são os hormônios sexuais masculinos induzidos das sementes pela presença do gameta feminino da mesma espécie ou de espécie diferente.

Produção de licopeno

Trata-se de um pigmento que se obtém como subproduto na produção de beta-caroteno. A relação resultante entre ambos, é por sua vez, uma consequência de quantidade e qualidade de estimulantes empregados de modo que, se em lugar de beta-ionona que atua fortemente em favor do beta-caroteno se empregam indolazóis, piridina, obtém-se efeito altamente favorável à produção do licopeno. Os meios básicos, microrganismos e condições físico-químicas pH, temperatura, etc., são iguais para a produção tanto do beta-caroteno como para a do licopeno.

Produção de Xantofilas

Qualquer que seja o aspecto que se considere, sua produção até o momento não ultrapassou o âmbito de especulações a nível de laboratório. Em todos os casos, os microrganismos empregados são os mesmos que para os pigmentos anteriormente considerados: algas, bactérias e fungos sexuais.

Como processo tecnológico e em relação a instalações necessárias, a produção de pigmentos é igual a qualquer outro sistema fermentativo moderno. A Bioengenharia fornece os critérios para o desenho do equipamento e outros fatores relacionados com o uso e controles exigidos pelas mesmas.

De fato, para o desenvolvimento industrial é necessário uma planta

de fermentação fornecida por tanques de aço inoxidável, com todos os acessórios para esterilização, agitação, fornecimento de ar (alto K_L), controle de temperatura, controle e registro de pH, sistema asséptico para adição de antiespumante, inoculação, retirada de amostra, inspeção, coligação durante a fermentação, etc.

Neste sentido, cabe assinalar que encontram maiores facilidades para sua realização os processos que empregam microrganismos não fotossintéticos (quimiossintéticos). Para o caso de fotossintéticos (emprego de algas, por exemplo), se bem executados em escala industrial, tem maiores dificuldades no "scaling-up". Além disso, não há razão tecnológica que impeça dotar uma cuba, qualquer que seja seu tamanho ou forma, dos implementos necessários para o fornecimento da iluminação na quantidade e qualidade desejadas (comprimento de onda, densidade, quantidade de energia por unidade de volume, etc.) porém, isso implica em aquisição de equipamentos e instrumentos adicionais que elevam o custo da exploração.

A adoção do sistema será evidentemente uma consequência da análise de conveniência. Em outras palavras, trabalha-se com microrganismos fotossintéticos somente quando se trata do único meio possível ou quando ele representa um rendimento mais elevado. Portanto, quando microrganismos fotossintéticos e quimiossintéticos produzem pigmentos em quantidades equivalentes, a opção é pelo segundo, devido ao seu menor custo.

Adicionalmente, em relação à adoção de sistemas contínuos vs sistemas descontínuos, a tendência moderna é preferir-se o primeiro. É verdade que a maior parte dos ensaios e experiências se circunscrevem aos sistemas descontínuos; entretanto, isso é somente uma questão de método. Em resumo, o conhecimento de um processo implica em coletar numerosas informações que depois são utilizadas para aliculdo de sistema contínuo.

Os processos descontínuos atuais que não representam a transferência direta para a indústria, da experiência obtida em laboratório, evoluíram, em todas aquelas situações possíveis, para processos contínuos em razão de suas claras vantagens tecnológicas e econômicas e, fundamentalmente, porque somente o processo contínuo permite realizar a produção de pigmentos em condições ideais e rendimentos satisfatórios.

Finalmente, com base na literatura consultada, confirmou-se que a produção de pigmentos (pelo menos beta-caroteno) por via fermentativa, pode competir favoravelmente com sua produção por síntese puramente química. Com efeito, um custo de produção de 37,35 dólares por kg de caroteno seco, comparado com o seu preço comercial, superior a 100 dólares por kg, torna tentadora a instalação desta indústria, todavia neste esclarecer que é muito provável que tenha uma aplicação específica, uma vez que essa indústria demandará uma grande inversão de capital inicial. Tal estimativa baseia-se no custo de uma planta capaz de produzir 5.000 ton. de sólidos secos por ano, corresponde a 76200 Kg por ano de caroteno e que equivale às características de uma "grande indústria"

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KARRER, P., JUCKER, E. *Carotenoids*. Elsevier, Amsterdam, 1950.
2. GOODWIN, T. In "modern Methods of Plant Analysis" Vol III 272. 1955b.
3. _____. In "Comparative Biochemistry of Photoneactive Systems". M.B. Allen, Ed., P.L. Academic Press, New York, 1960.
4. _____. "Carotenoids-Their Comparative Chemistry". Chem. Publ. Co., New York, 1954.
5. _____. *Ann. Rev. Biochem.* 24, 497, 1955a.
6. _____. *Advan. Enzymol.* 21, 295, 1959.
7. _____. *Botan. Rev.* 18, 291, 1952.a
8. CHICHESTER, C., NAKAYAMA, T. In "Biogenesis of Natural Compounds". P. Bernfeld, Ed., Pag. 475, Macmillan, New York, 1963.
9. ISLER, O., RUEGG, R., SCHUAEL, P. In "Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Colouring Matters and Related Field" p. 40, 1962.
10. NAKAIAMA, T. In "Physiology and Biochemistry of Algae". p. 409, 1962.
11. HESELTINE, C. U.S. Agr. Tech. Bull. 1245, 1960.

12. LILLY, V., BARNETT, H., KRAUSE, R. West Va. Univ. Expt. Sta.
Bull, 44LT, 1960
13. HANSON, A. Microbiol. , Technology. Reinhold Publishing Corp
ration , 222, 1967.
14. NINET, L., RENAULT, J., TISSIER, R. Biotech. and Bioeng. 11, 1195,
1962.
15. LYAAEN, S., Experientia , 26, 697, 1970.
16. COURINGTON, D., GOODWIN, T. I. Bacteriol. 70, 697, 1955.
17. HEILBRON I. Chem. Eng. News. 24, 1035, 1946.
18. HAXO, F., FORK, D. Nature. 184, 1051, 1959.
19. STRAIN, H. Manual of Phychology. Chronica Botanica, Waltham
Massachusetts, P. 243, 1951.
20. _____. Chlonoplast Pigments and Chromatographic Analysis. Penn.
State Univ. Press. Univ. Park, Pennsyvalnia, 1958.
21. STRAIN, H., SHERMA, J., GRANDORFO, M. Anal. Biochem. 24, 54,
1968.
22. _____. Anal. Chem. 33, 1733, 1961.
23. _____. J. Am. Chem. Soc. 63, 3448, 1941.
24. STARR, P., SARPESTEIN , S. Arch. Biochem. Biophys. 43, 157, 1953.

25. NORGARD, S., AASEN, J., LIAAEN-JENSEN. *Acta Che. Scand.* 24 ,
2183, 1970.
26. ISLER, O. *Carotenoids*. P. 61, 1971
27. JACKMANN, L., WEEDON, B. *J. Chem. Soc. Parte III*, 2870, 1960.
28. STRAIN, H. *Chromatographic Absorption Analysis*. Interscience,
New York, 1945.
29. CURL, A. J. *Agr. Food. Chem.* 1 , 456, 1953.
30. PURCELL, A. *Anal. Chem.* 30, 1949, 1958.
31. BUNT, J. *Nature*, 203, 1261, 1963.
32. DEUFEL, R., CLARK, F. *Bacteriol. Proc.* P. 13, 1958.
33. PETERSON, W., EVANS, W., LECCE, E., BELL, T. J. *Bacteriol.* 75, 586,
1958.
34. VUORI A., SAVOLAINEN, J., GYLLENBERG, H. *Microbiol Biochemis*
try 72, 108026p 1970.
35. HAXO, F. *Biochem.* 20, 400, 1949.
36. ZALOKAR, M. *Arch. Biochem. Biophys.* 50, 71, 1954.
37. KRZEMINSKI, L., QUACKENBUCH, F. *Arch. Biochem. Biophys.*
88, 64, 1960.
38. MASE, Y., RABOURN, W. QUACKENBUCH, F. *Arch. Biochem. Biophys.*
68, 150, 1957.

39. GOODWIN, T., JAMIKORN, M. J. *Protozoal.* 1, 216, 1954.
40. BARNETT, H., LILLY, V., KRAUSE, R. *Science.* 123, 2214, 1956.
41. HESSELTINE, C., ANDERSON, R. *Mycologia.* 49, 449, 1957.
42. ANDERSON, R., ARNOLD, M., NELSON, R., CIEGLER, A. *Agr. Food. Chem.*
6, 543, 1958.
43. CIEGLER, A., ARNOLD, M., ANDERSON, R. *Appl. Microbiol.*, 7, 94,
1959a.
44. CIEGLER, A., ARNOLD, M., ANDERSON, R., *App. Microbiol.*, 7, 98, 1959b.
45. ZAJIC, J. *Adv. in Appl. Microbiol.* 7, 20, 1965.
46. MACKINNEY, G., NAKAYAMA, T., CHICHESTER, C. *J. Am. Chem. Soc.*
75, 236, 1953.
47. ENGEL, B., WURSH, J., ZIMMERMAN, M. *Helv. Chim. Acta.* 36, 1771, 1953.
48. SEBEK, O., YAGER, H. *Abstr. 148th Meeting Am. Chem. Soc. P. 9Q* 1964
49. REYES, P., CHICHESTER, C., NAKAYAMA, T., *Biochem. Biophys. Acta.* Su
mitted, 1963.
50. CIEGLER, A., NELSON, G., HALL, H., *J. Agr. Food. Chem.*, 9, 1962.
51. _____. *Appl. Microbiol.*, 11, 128, 1963a.
52. _____. *Nature* 198, 1305, 1963b.

53. PAZOLA, Z., CIEGLER, A., HALL, H., *Bacteriol. Proc.*, P. 12, 1964.
54. CIEGLER, A., PAZOLA, Z., HALL, H., *Appl. Microbiol.*, 12, 150
1964.
55. ENDE, H. J., *Bacteriol.*, 96, 1298, 1968.
56. CIEGLER, A., LAGODA, A., SOHNS, V., HALL, H. *Bioeng.*, 5, 109, 1963.
57. SWARTHOULT, E. *Adv. in Appl. Microbiol.*, 7, 16, 1965.
58. KATHREIN, H. U.S. Patent. 3.108.402, 1963.
59. THERIAULT, R. *Abstr. 148th Am-Chem. Soc.*, P. 1 Q, 1964.
60. CIEGLER, A. *Adv. in Appl. Microbiol.*, 7, 1, 1965.

Este volume foi datilografado e impresso na
FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Rua Dr. Pelágio Lobo nº 63 - Tels. 96886 e 87822
CAMPINAS - SP