

APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO INDUSTRIAL DE ÓLEOS VEGETAIS PARA PRODUÇÃO DE RIBOFLAVINA POR *Candida guilliermondii* DM 644¹

Maria de Lourdes Andrade PESSOA^{2,*}, Samara Alvachian Cardoso ANDRADE³,

Alexandra Amorim SALGUEIRO³, Tânia Lúcia Montenegro STAMFORD²

RESUMO

A produção e consumo de alimentos industrializados têm aumentado a preocupação com suplementação e enriquecimento de alimentos com vitaminas e sais minerais, visando repor as possíveis perdas durante os processos de fabricação, principalmente das vitaminas hidrossolúveis, mais especificamente da vitamina B₂ ou riboflavina. Assim sendo, a proposta deste trabalho foi utilizar como componente principal do meio, para produção da riboflavina, um subproduto do refino de óleos vegetais e o microrganismo *Candida guilliermondii* DM 644. A produção da vitamina B₂ foi realizada por fermentação em batelada utilizando Erlenmeyer. As condições empregadas foram agitação orbital, ausência de luz, 30°C, e 24h de incubação. A otimização da produção de riboflavina foi realizada através de Delineamento Fatorial Fracionário, para avaliar os efeitos da concentração de matéria graxa, fonte de nitrogênio, pH, velocidade de agitação, fonte de fósforo e extrato de levedura e as possíveis interações. A concentração máxima de riboflavina foi 19,12µg/mL. Os fatores mais importantes para produção de riboflavina foram a concentração de matéria graxa e a fonte de nitrogênio, enquanto que a fonte de fósforo e o extrato de leveduras não estimularam sua biossíntese. A máxima produção foi obtida com matéria graxa a 10g/L, uréia a 2,5g/L e pH 5,0. A velocidade de agitação (200 e 400rpm) não interferiu no processo biotecnológico.

Palavras-chave: vitamina B₂; levedura; resíduo industrial de óleos vegetais.

SUMMARY

UTILIZATION INDUSTRIAL WASTE FROM VEGETAL OILS RIBOFLAVINE PRODUCTION BY *Candida guilliermondii* DM 644. The ever growing production and consumption of industrialized foods have increased the concern about supplementation and enrichment of food with vitamins and minerals, attempting the replenishment of the possible losses during their production processes, mainly the hydrosoluble vitamins, more specifically B₂ vitamin or riboflavin. A subproduct of vegetal oil refining and the microorganism *Candida guilliermondii* DM 644 were used as the main substrate. The vitamin B₂ was produced by the batch fermentation process using flasks with microorganism suspension, kept in orbital agitation, in the dark at 30°C for 24 hours. Optimization of the riboflavina production was carried out using a fractional factorial design, to evaluate the effects of oil substrate concentration, nitrogen source, pH, orbital agitation velocity, phosphate source, and yeast extract and the possible interactions. The maximum value of riboflavin concentration was 19.12µg/mL. The most important factors for riboflavin production were oil substrate concentration and nitrogen source, while phosphate source and yeast extract did not stimulate riboflavin production. The best conditions to produce riboflavin by *C. guilliermondii* DM 644 were: oil substrate 10g/L, urea 2.5g/L and pH 5.0. The orbital agitation velocity (200 and 400rpm) did not interfere in the biotechnological process.

Keywords: vitamin B₂; yeast; vegetable oil industrial waste.

1 – INTRODUÇÃO

A riboflavina ou vitamina B₂ faz parte do complexo B cujo consumo mundial é de aproximadamente 1.250 toneladas por ano. De acordo com a fonte de onde é extraída, ela poderá ter várias denominações como: lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina e uroflavina [12]. Suas principais fontes na alimentação são carne, ovo, pescado e leite, apresentando ainda grandes variações de concentração entre as hortaliças e leguminosas. Deve-se ressaltar ainda a riqueza dessa vitamina nas leveduras. Sua forma livre é um produto natural relativamente raro, ocorrendo em maiores concentrações na retina, urina, leite e fluido seminal de animais, como também em alguns órgãos vegetais [19].

Essa vitamina é comercialmente produzida por síntese química e por fermentação microbiana, sendo esta última preferida, pois tem propiciado o desenvolvimento de novas tecnologias com diminuição de custos e alta

produtividade. Deve ser ressaltado que a riboflavina é a única vitamina que é rápida e totalmente sintetizada em altas concentrações por microrganismos.

Com o aumento do consumo de produtos alimentícios industrializados, aumenta a preocupação com a perda de nutrientes durante o processo de fabricação dos mesmos, principalmente no que diz respeito às perdas de vitaminas hidrossolúveis, essenciais ao bom funcionamento e desenvolvimento do organismo. A maior parte da riboflavina é usada em formulações farmacêuticas, enriquecimento de alimentos e suplementos alimentares para indústrias, de forma a minimizar essas perdas [8,14].

Considerando os resultados promissores obtidos utilizando resíduos industriais na composição de meios de cultivo para produção de riboflavina por microrganismo, o aproveitamento de uma matéria bruta de baixo custo (subproduto ou resíduo industrial) é uma alternativa viável na investigação da produção dessa vitamina.

O presente trabalho teve como objetivo a produção de riboflavina por processo biotecnológico cultivando *Candida guilliermondii* DM644 num subproduto de refinaria de óleos vegetais, considerando que há uma carência a nível nacional de produção dessa vitamina e que o mercado consumidor tende a se expandir. Por ou-

¹ Recebido para publicação em 23/07/2002. Aceito para publicação em 27/01/2003 (000901).

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Recife - PE, Brasil, newtonps@novaera.com.br

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química

* A quem a correspondência deve ser enviada.

tro lado, sua produção industrial pode ser economicamente viável pela utilização de um substrato de baixo custo.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material

2.1.1 – Microrganismo utilizado e manutenção

A linhagem de *Candida guilliermondii* DM644 foi procedente da Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

A cultura de *C. guilliermondii* foi mantida em tubos de ensaios com o meio de cultura descrito por OZBAS & KUTSAL [13], com a seguinte composição em gL⁻¹: 20 de glicose; 5 de peptona; 5 de extrato de levedura; 5 de extrato de malte; 0,2 de MgSO₄·7 H₂O; 0,2 de K₂HPO₄·H₂O deionizada q.s.p. 1000mL e ágar 2%, este meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min.

2.1.2 – Meio de fermentação e condições empregadas

O subproduto industrial denominado de “borra”, foi cedido pela SANBRA – Divisão da SANTISTA Alimentos S/A. Este subproduto, foi transferido de tanques industriais para depósitos de plásticos vedados, transportados para o laboratório em temperatura ambiente, onde foram armazenados em sacos plásticos com capacidade 200mL, congelados a -2°C e descongelados apenas nos dias da preparação do meio de cultivo ou da determinação da sua composição físico-química.

Para a produção de riboflavina foi utilizado um meio líquido contendo como fonte de carbono a “borra” em concentrações diferentes, ajustado com solução de HCl para diferentes valores de pH e esterilizado a 121°C por 20 minutos; como fonte de nitrogênio foi utilizada a uréia ou (NH₄)₂SO₄, na proporção de nitrogênio:carbono de 1:4, KH₂PO₄ e extrato de levedura nas concentrações de 0,20g/L e 0,01g/L respectivamente, e agitação orbital de 200 ou 400rpm por 24h, a temperatura de 30°C e no escuro, utilizando o processo de fermentação em batelada com frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 150mL do meio para produção, inoculado com suspensão de *C. guilliermondii*. Essas variações estão especificadas no Delineamento Experimental.

2.2 – Composição centesimal da “borra”

Foram realizadas análises de umidade, cinzas, matéria graxa e proteínas em três lotes diferentes da “borra”, armazenados sob congelamento, de acordo com a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ [7]; o teor de metais foi determinado por espectrometria de absorção atômica no Laboratório de Análises de Minerais da SUDENE.

2.3 – Padronização do inóculo

Foi preparada uma densa suspensão de células a partir de culturas de *C. guilliermondii*. Os pré-inóculos

foram preparados em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 15mL do meio líquido (“borra”), para produção de riboflavina, incubados por 12h sob agitação orbital de 200 ou 400rpm, à temperatura de 30°C na ausência de luz. Foi utilizado 10% do inóculo.

2.4 – Produção de riboflavina

Os experimentos para otimização da produção de riboflavina foram realizados utilizando frascos de Erlenmeyer de 500mL de capacidade, contendo 150mL do meio líquido (“borra”), cujas condições foram investigadas de acordo com o planejamento experimental, sendo constantes os inóculos. Para a extração e quantificação da riboflavina foram coletadas alíquotas em triplicata de 5,0mL.

2.5 – Delineamento experimental

Para otimização das condições de produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* foram utilizados dois planejamentos fatoriais fracionários 2⁴⁻¹ [2]. As variáveis independentes para o primeiro planejamento fatorial fracionário foram: 1 – concentração da “borra”; 2 – fonte de nitrogênio; 3 – pH; 4 – agitação orbital. Para o segundo planejamento fatorial fracionário foram: concentração da “borra”; pH; KH₂PO₄; extrato de levedura. A resposta de interesse para os dois planejamentos foi à produção de riboflavina por *C. guilliermondii*. Os níveis decodificados de cada variável são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Cada planejamento consistiu de 8 ensaios, cujas condições (níveis codificados) são apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 1. Níveis decodificados das variáveis do primeiro planejamento fatorial.

Níveis codificados	Níveis decodificados			Agitação orbital (rpm)
	Concentração da “borra” (g/L)	Fonte de nitrogênio	pH	
-1	5	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0	200
1	10	Uréia	7,0	400

TABELA 2. Níveis decodificados das variáveis do segundo planejamento fatorial.

Níveis codificados	Níveis decodificados			
	Concentração da “borra” (g/L)	pH	KH ₂ PO ₄ (g/L)	Extrato de levedura (g/L)
-1	7,5	3,0	ausência	ausência
1	10	5,0	0,20	0,01

TABELA 3. Níveis codificados das variáveis para os ensaios do primeiro planejamento fatorial.

Ensaio	Concentração da “borra”	Fonte de Nitrogênio	pH	Agitação orbital
1	1-	1-	1-	1-
2	1+	1-	1-	1+
3	1-	1+	1-	1+
4	1+	1+	1-	1-
5	1-	1-	1+	1+
6	1+	1-	1+	1-
7	1-	1+	1+	1-
8	1+	1+	1+	1+

TABELA 4. Níveis codificados das variáveis para os ensaios do segundo planejamento fatorial.

Ensaio	Concentração da "borra"	pH	KH ₂ PO ₄	Extrato de levedura
1	1-	1-	1-	1-
2	1+	1-	1-	1+
3	1-	1+	1-	1+
4	1+	+	1-	1-
5	1-	1-	1+	1+
6	1+	1-	1+	1-
7	1-	1+	1+	1-
8	1+	1+	1+	1+

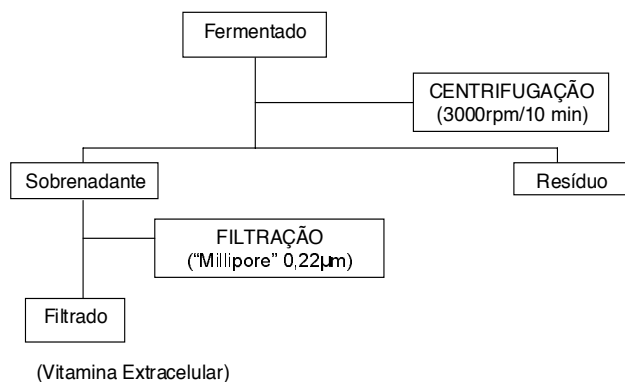
Para quatro fatores a serem investigados num planejamento experimental, o número de experimentos a serem realizados no planejamento fatorial completo é 16 (dezesesseis). Considerando uma meia fração desse planejamento, teremos o planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ sendo necessário apenas 8 (oito) experimentos. O primeiro planejamento fatorial foi realizado em triplicata e o segundo em duplicata.

2.6 – Determinação de pH

O pH das amostras coletadas foi medido através de potenciometria ao longo da fermentação para produção de riboflavina.

2.7 – Determinação de riboflavina

A extração dessa vitamina foi realizada segundo o método descrito por GOODWIN & PENDLINGTON [6], modificado, de acordo com a *Figura 1*.

**FIGURA 1.** Esquema de extração de riboflavina extracelular.

Aliquotas do cultivo de *C. guilliermondii* DM 644 foram coletadas assepticamente e armazenadas no escuro até serem centrifugadas a 3000rpm por 10min para separação da massa celular do sobrenadante. Após centrifugação, foi realizada filtração em membrana "Millipore" de 0,22µm, visando retirar o excesso de matéria-graxa. No filtrado livre de células e matéria graxa foi determinado o conteúdo de riboflavina extracelular, cobrindo sempre as amostras com papel laminado para evitar a degradação dessa vitamina pela luz.

Para quantificação da riboflavina foi utilizado o método direto segundo a técnica descrita por GOODWIN & PENDLINGTON [6] e SABRY, EL-REFAI & GAMATI [17].

A partir do filtrado de cada amostra convenientemente manipulada, foi determinado o conteúdo de vitamina extracelular pela leitura de absorbância a 445nm e por intermédio de uma regressão linear do padrão de riboflavina nas concentrações de 0,1 a 50µg/mL.

As leituras de absorbância foram feitas contra um branco constituído pelo meio de cultura para a produção de riboflavina filtrado também por membrana "millipore" de 0,22µm.

2.8 – Métodos estatísticos

As respostas obtidas para todos os ensaios foram avaliadas quanto aos efeitos principais e as interações entre os fatores, conforme a metodologia descrita por BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS [2], obtidas através do programa *Statistica* versão 6.0.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição físico-química da "borra" está representada na *Tabela 5*.

TABELA 5. Composição centesimal da "borra".

Componentes	%*
Umidade	9,82
Matéria graxa	46,46
Carboidratos**	34,91
Proteínas	0,55
Cinzas	8,26

* Peso úmido

** Calculados por diferença

A levedura utilizou esse subproduto como fonte de carbono devido ao seu elevado percentual de carboidratos e matéria graxa (46%). Resultados promissores têm sido obtidos na produção dessa vitamina pela mesma levedura, utilizando como fontes de carbono fração da refinação de óleos [16]; óleo de babaçu [12].

A concentração de metais do subproduto industrial encontra-se na *Tabela 6*.

TABELA 6. Concentração de metais na "borra"

Metal	%*
Ferro (em Fe ³⁺)	ND
Cobalto (Co ²⁺)	ND
Sódio (em Na ⁺)	2,7000
Cálcio (em Ca ²⁺)	0,1900
Magnésio (em Mg ²⁺)	0,0800
Potássio (em K ⁺)	0,0630
Cobre (em Cu ²⁺)	0,0050
Manganês (em Mn ²⁺)	0,0011
Zinco (em Zn ²⁺)	0,0041

* Peso úmido

ND = não detectável

A ausência de íon Fe^{3+} na “borra” pode ser determinante no aproveitamento desse subproduto industrial para produção de riboflavina. Vários trabalhos já foram publicados ressaltando o efeito negativo desse íon na produção dessa vitamina [4,5,21].

Por outro lado, SABRY & GHOZLAN [18], observaram que a produção de riboflavina não foi influenciada pelos metais presentes no melaço quando cultivaram *Aspergillus terreus* na presença de resíduo da fabricação de milho como fonte de nitrogênio.

A presença dos íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} em concentrações mínimas, no subproduto industrial utilizado nesse trabalho, tende a contribuir positivamente no metabolismo do microrganismo devido a esses íons constituírem-se em cofatores de inúmeras enzimas [1].

YAMANE, OOSHIMA & KATO [21], evidenciaram o efeito positivo do íon Zn^{2+} na produção de riboflavina por *Arthrobacter* na presença dos íons K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} .

Pode-se observar na Tabela 7 que a melhor produtividade média de riboflavina foi de 18,22 $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{dia}$, obtida quando a fonte de nitrogênio e carbono estão em seus níveis superiores. Comparando os dois ensaios (4 e 8), podemos observar que apresentam os mesmos níveis da fonte de carbono e nitrogênio, só diferem pelo nível do pH e da agitação orbital. O ensaio correspondendo ao nível superior destes fatores independentes teve uma queda da produtividade média da riboflavina. Essa diferença entre eles foi muito pequena, menor que 16%. Conseqüentemente, as faixas de pH e de agitação do cultivo de *C. guilliermondii* não devem interferir na produção de riboflavina, discordando dos achados de BAILEY & OLLIS [1], que nos cultivos submersos de microrganismos, observaram que a agitação influenciou diretamente a aeração por aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura, oferecendo uma maior superfície de contato entre o gás e as células e facilitando a transferência de massa nos processos aeróbios.

TABELA 7. Produtividade de riboflavina por *C. guilliermondii* DM 644 em três séries de experimentos para o primeiro planejamento fatorial fracionário.

Ensaio	Fatores				Produtividade ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{dia}$)			Média
	A	B	C	D	1ª série	2ª série	3ª série	
1	-	-	-	-	ND	1,72	ND	0,57
2	+	-	-	+	10,85	ND	1,53	4,13
3	-	+	-	+	ND	7,91	10,97	6,29
4	+	+	-	-	1,03	44,42	9,20	18,22
5	-	-	+	+	ND	ND	0,91	0,30
6	+	-	+	-	ND	ND	6,54	2,18
7	-	+	+	-	16,81	ND	ND	5,60
8	+	+	+	+	0,39	41,96	3,78	15,38

ND – não detectado; A-concentração da “borra”(g/L); B-fonte de nitrogênio; C-pH inicial; D-agitação orbital(rpm).

A importância da concentração da “borra” pode ser vista na Tabela 7. Quanto maior a concentração de ma-

téria graxa no meio de cultivo de *C. guilliermondii*, maior a produção de riboflavina, resultados estes concordantes aos encontrados por KALINGAN & KRISHNAN [9], quando investigaram o efeito da concentração de melaço como fonte de carbono na produção de riboflavina por *E. ashbyii*, detectando o aumento gradativo da vitamina à medida que aumentava a concentração do melaço na faixa de 3 a 5%. Logo, a concentração inicial da matéria graxa foi novamente investigada no segundo planejamento fatorial.

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que os efeitos concentração da “borra” e fonte de nitrogênio são os mais importantes, embora não tenham exercido influência significativa nas respostas, dentro das faixas estudadas. Quanto ao fator pH, (Tabela 8), embora não significativo, houve uma pequena tendência da produção dessa vitamina ser estimulada em pH ácido (Tabela 7). Estes resultados são confirmados por KOLONNE, SEVIOUR & MCDUGALL [10] no cultivo de *E. ashbyii* na presença de glicose e em pH ao redor de 4,5-5,5, enquanto nenhuma produção de riboflavina foi detectada a pH 3,5 e 8,5. Portanto, foi investigado no segundo planejamento fatorial os valores de pH 3,0 e 5,0.

TABELA 8. Efeitos principais e de interação para o primeiro planejamento fatorial fracionário.

Fatores e Interações	Efeitos Principais	Efeitos de Interação
A	6,8	-
B	9,6	-
C	-1,4	-
D	-0,1	-
AB=CD	-	4,1
AC=BD	-	-1,0
AD=BC	-	-0,3
ABC=D	-	-0,1

A – concentração da “borra”(g/L); B – fonte de nitrogênio; C – pH; D – agitação orbital (rpm).

Para o fator agitação, os resultados obtidos demonstraram que a variação de 200 para 400rpm não foi significativa (Tabela 8). Logo, no segundo planejamento fatorial, foi usado 400rpm, conseguindo-se assim uma melhor dispersão do substrato em toda a extensão do cultivo. Segundo OZBAL & KUTSAL [14], e YAMANE *et al.* [22], que trabalharam com o cultivo de *A. gosypii* e *Arthrobacter* sp. , os melhores resultados para a produção de riboflavina foram obtidos sob agitação de 300rpm e 600rpm, respectivamente.

Analisando os efeitos de interação entre dois fatores na Tabela 8, foi observada a não significância ao nível de 5% de todos eles. Entretanto, houve uma importante interação entre a matéria graxa e fonte de nitrogênio, podendo-se afirmar que uma variação do fator fonte de carbono é dependente da fonte de nitrogênio e esses dois fatores não devem ser analisados separadamente. Apesar do efeito de interação entre os fatores pH e agitação ter apresentado o valor 4,1, pode-se observar que seus efeitos principais foram baixos.

Os resultados apresentados na *Figura 2* mostram que, com relação ao sal de amônio, a produtividade média de riboflavina aumentou oito vezes (de 0,4 para 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dia), e, na presença de uréia, aumentou de 5,9 para 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dia, ou seja 3 vezes. Pode-se também observar que a fonte de nitrogênio orgânica estimula a produção de riboflavina dez vezes mais que o sal de amônio quando a concentração de “borra” é 5g/L. Comportamento metabólico diferente é evidenciado quando essa fonte de carbono é de 10g/L. Possivelmente há inibição por excesso de substrato. Os resultados acima discordam dos achados por LEVINE *et al.* [11], que constataram aumento na produção de riboflavina por *C. flarerii* na presença de sulfato de amônio, enquanto a uréia causou efeito inverso no metabolismo celular dessa levedura. Diante destes resultados, foi utilizada na segunda etapa do planejamento experimental a fonte de nitrogênio orgânica (uréia), sempre mantendo-se a taxa: fonte de nitrogênio: fonte de carbono igual a 1:4.

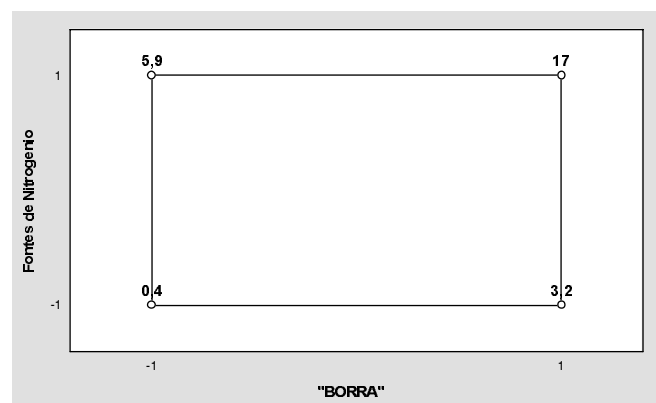


FIGURA 2. Interpretação dos resultados de produtividade média do primeiro planejamento fatorial fracionário.

O melhor resultado médio de riboflavina produzido por *C. guilliermondii* foi obtido com pH 5,0; concentração da “borra” 10,0g/L; uréia 2,5g/L, resultando em 19,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.dia (*Tabela 9*).

Ao calcular a resposta dos ensaios no segundo planejamento fatorial, observa-se na *Tabela 10* que a variável independente pH foi a única a exercer influência significativa sobre a produção de riboflavina.

A elevação da concentração da “borra” acarretou um aumento da produtividade, que foi mais acentuada em pH 5,0 (0,21 para 10,77) (*Figura 3*).

Com relação ao fósforo, ficou evidenciado que ele não estimulou a produção (*Tabelas 9 e 10*), reforçando o que foi dito por SCHLEGEL [20], que possivelmente a mesma velocidade de agitação e conseqüentemente a mesma condição de aeração utilizada na investigação dos dois níveis do fator independente fósforo justificam os resultados obtidos, considerando que para maior concentração de fósforo no meio é necessário uma maior concentração de oxigênio para que ocorra liberação de ATP por fosforilação oxidativa.

TABELA 9. Produtividade de riboflavina por *C. guilliermondii* DM 644 em três séries de experimentos para o segundo planejamento fatorial fracionário.

Ensaio	E	F	G	H	1ª série	2ª série	Média
1	-	-	-	-	ND	0,09	0,04
2	+	-	-	+	0,91	0,99	0,95
3	-	+	-	+	5,77	6,56	6,16
4	+	+	-	-	30,48	7,76	19,12
5	-	-	+	+	ND	0,98	0,49
6	+	-	+	-	ND	ND	ND
7	-	+	+	-	0,67	ND	0,34
8	+	+	+	+	14,00	3,45	8,92

ND: não detectado; E-matéria graxa (g/L); F:pH; G: KH_2PO_4 (g/L); H: Extrato de levedura(g/L).

TABELA 10. Efeitos principais e de interação para o segundo planejamento fatorial fracionário.

Fatores e Interações	Efeitos Principais	Efeitos de Interação
E	5,44	-
F	8,21*	-
G	-4,18	-
H	-0,79	-
EF=GH	-	5,23
EG=FH	-	-1,49
EH=FG	-	-3,93
EFG=H	-	-0,79

*Efeito significativo; E: matéria graxa (g/L); F: pH; G- KH_2PO_4 (g/L); H: Extrato de levedura (g/L)

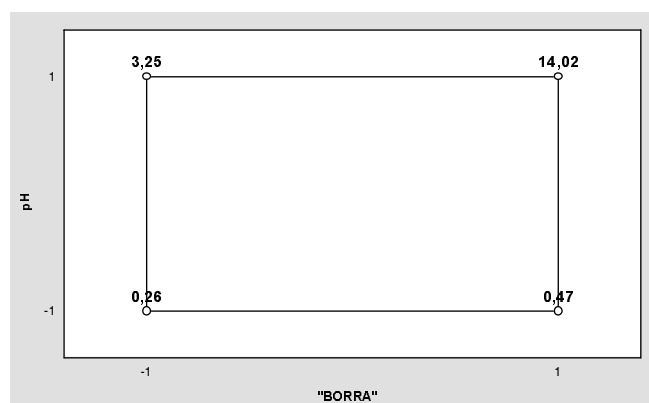


FIGURA 3. Interpretação dos resultados de produtividade do segundo planejamento fatorial fracionário.

Com relação ao extrato de levedura (*Tabela 10*), fica evidenciado que a presença de vitaminas do complexo B, presentes no extrato, poderiam atuar como precursores da riboflavina ou mesmo, como fator de crescimento para *C. guilliermondii*, porém não influenciaram a produção de riboflavina nas condições de trabalho, o que pode ser explicado por BLACKWELL, SINGLETON & TOBIN [3], que afirmaram que possivelmente os cultivos de *C. guilliermondii* não são estimulados pelo extrato de levedura devido a efeitos antagônicos entre os metais presentes na “borra” e os componentes dessa variável investigada. Em contraste, o extrato de levedura é metabolizado por microrganismos não apenas como fonte

de nitrogênio, mas também como fonte de carbono, vitaminas, aminoácidos e sais minerais [15].

4 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir as seguintes conclusões:

- No primeiro planejamento fatorial fracionário, a produção de riboflavina foi influenciada pelas variáveis independentes (fonte de carbono e nitrogênio) e suas interações, embora não tenha dado diferença significativa;
- Para a produção de riboflavina, as condições ótimas de cultivo foram: matéria graxa 10g/L, uréia 2,5g/L e pH 5,0, não interferindo a velocidade de agitação (200 e 400rpm);
- O extrato de levedura e fonte de fósforo (KH₂PO₄) não estimularam a produção de riboflavina;
- A produção de riboflavina foi significativa com pH 5,0, tido maior produtividade com a concentração da “borra” 10g/L;
- A produtividade máxima de riboflavina obtida no planejamento fatorial 1 e 2 situou-se entre 18 – 20µg/mL.dia.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. Singapore: McGraw-Hill, 2a ed, 984p, 1986.
- [2] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de experimentos, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 299p, 1995.
- [3] BLACKWELL, K. J.; SINGLETON, I. & TOBIN, J. M. Metal cation uptake by yeast: a review. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 43, p. 579-584, 1995.
- [4] ENARI, T. M.; KAUPPINEN, V. Interaction of cobalt and iron in the riboflavin production of *Candida guilliermondii*. **Acta Chemica Scandinavia**, v. 15, n. 7, p. 1513-1516, 1961.
- [5] GHOZLAN, H. A. Utilization of beet molasses for riboflavin production by *Mycobacterium phlei*. **J. Basic. Microbiol.**, v. 34, n. 3, p. 157-162, 1994.
- [6] GOODWIN, T. W.; PENDLINGTON, S. Studies on the Biosynthesis of Riboflavin nitrogen metabolism and flavinogeneses in *Eremothecium ashbyii*. **Biochemistry Journal**, v. 57, p. 631-641, 1954.
- [7] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Químicos e Físicos para análise de Alimentos. In: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, v. 1. São Paulo: Autor, 3ª ed., 1985.
- [8] KALINGAN, A. E.; KRISHNAN, M. R. V. Application of agro-industrial by-products for riboflavin production by *Eremothecium ashbyii* NRRL 1363. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 226-230, 1997a.
- [9] KALINGAN, A. E.; KRISHNAN, M. R. V. Agro industrial by-products as flavinogenic stimulators for riboflavin production. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 87-91, 1997b.
- [10] KOLONNE, S.; SEVIOUR, R.J. & McDOUGALL, B.M. Effect of pH on exocellular riboflavin production by *Eremothecium ashbyii*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 1, p. 79-84, 1995.
- [11] LEVINE, H.; OYAAS, J. E.; WASSERMAN, L.; HOOPERHEIDE, J. C. & STERN, R. M. Riboflavin production by *Candida* Yeast. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1661-1668, 1949.
- [12] NEVES, M. L. C. Produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* (Cast.) Lang e Guerra utilizando óleos de girassol, soja e babaçu. Recife, 1994. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- [13] OZBAL, T. & KUTSAL, T. Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 8, p. 593-597, 1986.
- [14] OZBAL, T.; KUTSAL, T. Effects of agitation and aeration rates on riboflavin fermentations by *Ashbya gossypii*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 97-105, 1991.
- [15] ROSE, A. H. Responses to the chemical environment; in: The Yeast, v. 2; eds. A. H. Rose & J.S. Harrison; Academic Press, London, p. 5- 40, 1987.
- [16] SABRY, S.A.; EL-REFAI, A. H.; GAMATI, S.Y. Utilization of oil fraction (solar) for riboflavin production by *Candida guilliermondii* as influenced by some culture conditions. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 9, p. 615- 618, 1988.
- [17] SABRY, S. A.; EL-REFAI, A. H.; GAMATI, S. Y. Production of riboflavin (Vitamin B₂) by hydrocarbon-utilizing yeasts. **Microbiologia Sem.**, v. 5, p. 45- 52, 1989.
- [18] SABRY, S. A.; GHOZLAN, H. A. Effect of some nutrients on riboflavin by *Aspergillus terreus*. **Rev. Lat.-Amer. Microbiol.** v. 36, p. 27-32, 1994.
- [19] SCHLEE, D.; STRAUGE, G. Physiology and biochemistry of riboflavin formation. **Die Pharmazie**, v. 39, p. 805-811, 1984.
- [20] SCHLEGEL, H.G. Basic mechanism and energy conversion; in: General Microbiology; Reino Unido: Cambridge University Press, 7ª edição, p. 234-289, 1993.
- [21] YAMANE, Y.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Overproduction of riboflavin by an *Arthrobacter* sp. Mutant resistant to 5-fluorouracil. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 877-880, 1993.
- [22] YAMANE, Y.; NAKAMURA, Y.; OKAMOTO, H.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Overproduction of riboflavin by an *Arthrobacter* sp. Mutant resistant to 5-fluorouracil – Effects of pH and dissolved oxygen concentration on production of riboflavin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, p. 317-322, 1995.