



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus pararoseus* UTILIZANDO MEIO
AGROINDUSTRIAL EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

CARINA MOLINS BORBA

Dr.^a JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

Dr.^a CAROLINE COSTA MORAES
Coorientadora

RIO GRANDE, RS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus pararoseus* UTILIZANDO MEIO
AGROINDUSTRIAL EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

CARINA MOLINS BORBA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Engenharia e Ciência de
Alimentos da FURG, como
requisito necessário para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Dr.^a JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

Dr.^a CAROLINE COSTA MORAES
Coorientadora

RIO GRANDE, RS
2015

B726p Borba, Carina Molins.
 Produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* utilizando meio agroindustrial em diferentes condições de cultivo / Carina Molins Borba. - 2015.
 78 f.

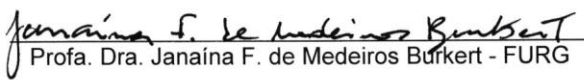
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2015.
 Orientadora: Dr^a. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert.
 Coorientadora: Dr^a. Caroline Costa Moraes.

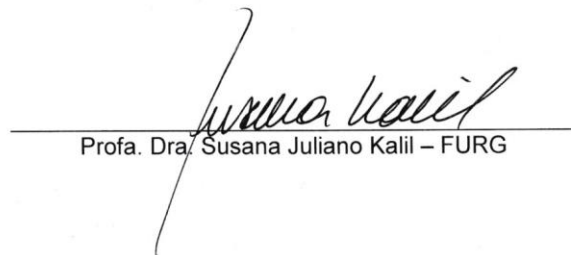
 1. Aeração 2. Agitação 3. Caroteno 4. pH 5. Temperatura I. Burkert, Janaina Fernandes de Medeiros II. Moraes, Caroline Costa II. Título.

CDU 664

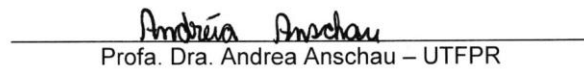
APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Carina Molins Borba e aprovada em 10 de abril de 2015,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:


Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert - FURG


Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG


Profa. Dra. Lucielen Oliveira dos Santos - FURG


Profa. Dra. Andrea Anschau - UTFPR

DEDICATÓRIA

Aos melhores presentes dados a mim pelos meus irmãos: meus sobrinhos Thiago e Sofia!

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, **Tania** e **Paulo** por todo o amor e dedicação, pelas diversas orações e palavras de incentivo. Aos meus irmãos **Fábio** e **Catiane**, cunhados **Milene** e **Leonardo** pela torcida incessável. Aos meus sobrinhos **Thiago** e **Sofia** por alegrarem meus dias.

A Prof.^a **Janaína Fernandes de Medeiros Burkert** por ter me recebido de braços abertos, pela atenção, compressão e apoio nos momentos difíceis e pelos valorosos ensinamentos repassados durante esses dois anos.

A Prof.^a **Caroline Costa Moraes**, obrigada pela coorientação, pelas palavras de incentivo e por ter aberto as portas do seu laboratório novamente para mim. Aproveito e estendo o agradecimento a Prof.^a **Ana Paula Manera** e ao técnico **Luciano Almeida** por terem me recebido como nos velhos tempos durante o período que estive realizando experimentos no LMTA na Unipampa.

Aos **professores** da PPGECA pelos ensinamentos.

Ao LEB e MIBI na figura dos professores **Jorge Costa** e **Michele Greque** pelo empréstimo de equipamentos.

Ao pessoal do Bioprocessos e Sensorial: **Dani**, **Vanessa**, **Renata**, **Bruno**, **Elisane**, **Michele Paludo** e pela convivência no laboratório, por terem me recebido como parte do grupo e terem me permitido ser o “piolho apegado” de vocês. Por todas as horas de conversa e cafezinhos que muitas vezes salvaram o meu dia. E também ao **Chico** pelo inestimável auxílio com o biorreator. A **Lili** pelo grande auxílio durante os primeiros testes.

As minhas queridas IC's **Carol Sá** e **Millene Tavares**, pela dedicação e responsabilidade com a execução das tarefas, pela risadas e pelas muitas análises de açúcares!

A minha flor **Carolina Ferrer**, que dividiu comigo as dificuldades e alegrias que encontramos na FURG, por todas as risadas e momentos de apoio. MUITO OBRIGADA! Aquele que se mostrou novamente muito mais que meu noivo, foi meu colega mais dedicado e meu melhor amigo, **Cleber Klasener**. Não existem palavras suficientes pra agradecer todo o teu incentivo, todas as vezes que com um abraço tu demonstraste todo o teu amor e pelas muitas ideias que ajudaram pra que essa dissertação se tornasse algo concreto. TE AMO!

A Capes pela bolsa.

A todos que de uma forma ou outra fizeram parte dessa etapa: muito obrigada!

EPÍGRAFE

*Eu pedi forças... Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi sabedoria... Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi prosperidade... Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar
Eu pedi coragem... Deus me deu perigos para superar.
Eu pedi amor... Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi favores... Deus me deu oportunidades.
Eu não recebi nada do que pedi... Mas recebi tudo de que precisava.*

(Autor desconhecido)

RESUMO

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, apresentando papel de destaque na fotossíntese e fotoproteção de sistemas vegetais e como precursores de vitamina A nos seres humanos. Além de funções nos sistemas biológicos, apresentam também grande importância para a indústria farmacêutica na elaboração de cosméticos e como aditivo alimentar na indústria de alimentos. A produção de carotenoides por micro-organismos, como a levedura *Sporidiobolus pararoseus*, vêm sendo estudada como forma alternativa para a produção desses corantes naturais, por permitirem, entre outras coisas, o melhor controle das condições de produção em menor tempo e utilização de substratos de baixo custo como fontes de carbono e nitrogênio. O rendimento desse processo sofre interferência de diversos parâmetros, entre eles a aeração e a agitação. O presente trabalho teve como objetivo a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados e biorreator de bancada em diferentes condições de cultivo, utilizando como substratos coprodutos agroindustriais. Primeiramente foi realizado o estudo da influência das variáveis temperatura (20 a 35°C), agitação (100 a 200 rpm) e pH inicial (4 a 8), na produção de carotenoides em frascos agitados, utilizando-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³. A produção máxima de carotenoides totais foi de 565,0 µg.L⁻¹ e biomassa de 13,6 g.L⁻¹ a 27,5 °C, 150 rpm, pH inicial 4,0 e meio composto por 40 g.L⁻¹ de melão e 6,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho (ensaio 13) em 240 h de cultivo. Posteriormente, foi realizado novo planejamento experimental (2²), para avaliação do efeito da diminuição da faixa de pH estudada (3 a 5) e da relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ (3:10 a 7:10). A maior produção de carotenoides foi obtida nas condições 27,5 °C, 150 rpm, pH inicial 4,0 e meio composto por 40 g.L⁻¹ de melão e 6,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho em 240 h (ensaio 5), validando assim o modelo obtido no planejamento 2³, com produção de carotenoides totais de 591,4 µg.L⁻¹. A relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ não foi estatisticamente significativa. Além da produção em frascos agitados, foi estudada a ampliação da escala de produção para biorreator de bancada, onde duas condições de agitação e aeração foram utilizadas: 158 rpm/1,2 vvm e 300 rpm/ 1,7 vvm. Nos cultivos em biorreator o comportamento para produção de biomassa, pH e consume de substrato foi bastante similar nas duas condições até 120h. Na condição de 158 rpm/ 1,2 vvm a máxima produção de carotenoides foi 1969,3 µg.L⁻¹ e 11,48 µg.L⁻¹.h⁻¹ para produtividade em carotenoide, na condição de 300 rpm/1,7 vvm foram obtidos 1042,1 µg.L⁻¹ e 5,93 µg.L⁻¹.h⁻¹ para carotenoides e produtividade em carotenoides, respectivamente. As respostas carotenoides totais, biomassa, conversão de substrato em produto, conversão de biomassa em produto e produtividade em carotenoides foram 47, 21, 35, 31 e 48% superiores para a condição de 158 rpm/1,2vvm do que para 300 rpm/1,7vvm. A produção de carotenoides obtida nos cultivos em biorreator 3,5 vezes superior ao valor obtido utilizando-se frascos agitados. Sendo assim, o presente trabalho demonstra a influência dos parâmetros temperatura, agitação, pH e aeração na produção de carotenoides totais pela levedura *S. pararoseus*, além de demonstrar que sua capacidade de produção pode ser aumentada através da utilização de diferentes taxas de aeração e agitação.

Palavras-chave: Aeração, agitação, β-caroteno, pH, temperatura.

ABSTRACT

Carotenoids are widely distributed in nature, featuring prominent role in photosynthesis and photoprotection of plant systems and as precursors of vitamin A in humans. In addition to functions in biological systems, it has also been important in the pharmaceutical industry in the preparation of cosmetics and as a food additive in the food industry. The production of carotenoids by micro-organisms such as yeast *Sporidiobolus pararoseus*, has been studied as an alternative way to produce these natural dyes, for allowing, among other things, better control of production conditions in less time and using low substrate cost as carbon and nitrogen sources. The efficiency of this process is interfered on several parameters, including the aeration and agitation. The present work had as objective the production of carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* in shake flasks and bioreactor in different conditions, using agroindustrial co-product as substrates. First was carried out the study of the influence of temperature (20 to 35°C), agitation (100 to 200 rpm), initial pH (4 to 8) in the production of carotenoids in shake flasks, using a 2³ experimental design. The production of carotenoids showed maximum value of 565.0 µg.L⁻¹ and biomass of 13.6 g.L⁻¹ to 27.5 °C condition, 150 rpm and initial pH 4.0 and medium composed of 40 g.L⁻¹ molasses and 6.5 g.L⁻¹ corn steep liquor (run 13) in 240 h. Posteriorly, was held a new experimental design (2²) to assess the effect of the increase of the studied pH range (3 to 5) and the relation V_{meio}:V_{reator} (3:10 to 7:10). The highest yield was obtained under the conditions 27.5°C , 150 rpm and an initial pH of 4.0 and medium composed of 40 g.L⁻¹ of molasses and 6.5g.L⁻¹ Corn steep liquor in 240 h (run 5) thus validating the model obtained in planning 2³ , with carotenoids yield response 591.4 µg.L⁻¹. An addition to production in shake flasks was also studied the scale up of production in bioreactor, where two conditions of agitation and aeration were used: 153 rpm/1.2 vvm and 300 rpm/1.7 vvm. In bioreactor cultivation behavior for production of biomass, pH and substrate consumption was very similar in both conditions up to 120 h. In the condition of 158 rpm / 1.2 vvm the maximum production of carotenoids was 1969.3 µg.L⁻¹ and 11.48 µg.L⁻¹.h⁻¹ for productivity in carotenoids, as to the condition of 300 rpm/1.7 vvm were obtained 1042.1 µg.L⁻¹ and 5.93 µg.L⁻¹.h⁻¹. The carotenoids responses, biomass and substrate conversion product, biomass conversion and product yield in carotenoids were 47, 21, 35 , 31 and 48% higher for the condition 158 /1.2 vvm than at 300 rpm/1.7vvm. Carotenoids production found in bioreactor cultivations was 3.5 times higher than the value obtained using the shake flasks. Thus the present study can demonstrate the influence of temperature parameters, agitation, pH, V_{meio}:V_{reator} and aeration for the production of carotenoids by the yeast *S. pararoseus*, as well as demonstrate that its production capacity can be increased by scale up.

Keywords: Aeration, agitation, β-carotene, pH, temperature.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais compostos de aroma originados a partir de carotenoides.	19
Tabela 2– Micro-organismos produtores de carotenoides	22
Tabela 3– Fontes de carbono estudadas para bioprodução de carotenoides	23
Tabela 4- Delineamento composto central rotacional 2^3 (valores codificados e reais) para avaliação do efeito das variáveis temperatura, agitação e pH.....	35
Tabela 5- Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{máx}$, Y_p/s , Y_x/s , Y_p/x , e P_c	43
Tabela 6- Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2^3	44
Tabela 7- Delineamento composto central 2^2 (valores codificados e reais) para avaliação do efeito das variáveis pH e relação $V_{meio}:V_{reator}$	49
Tabela 8- Parâmetros cinéticos dos cultivos em biorreator de bancada.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química de alguns carotenoides.....	14
Figura 2- Clivagem simétrica da molécula de β -caroteno	16
Figura 3- Clivagem assimétrica da molécula de β -caroteno	17
Figura 4- Acompanhamento de biomassa Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b)	36
Figura 5- Acompanhamento de carotenoides totais Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b).....	38
Figura 6- Acompanhamento de pH Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b).....	40
Figura 7- Acompanhamento de açúcares redutores totais Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b).	41
Figura 8- Curvas de contorno para produção de carotenoides totais: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b), pH X agitação (c).....	46
Figura 9- Curvas de contorno para produção de biomassa: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b), pH X agitação (c)	46
Figura 10- Curva de contorno para $\mu_{\text{máx}}$: pH X temperatura.....	47
Figura 11- Curva de contorno para $Y_{p/s}$: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b) e pH X agitação (c).....	47
Figura 12- Curva de contorno para P_c : agitação X temperatura (a), pH X T (b), pH X agitação (c)	48
Figura 13 - Acompanhamento Cinético da bioprodução de carotenoides (27,5°C, 150 rpm e pH inicial 4,0)	48
Figura 14- Acompanhamento de biomassa (a), pH (b).....	50
Figura 15- Acompanhamento de ART (a) e Carotenoides totais (b).....	51
Figura 16- Análise de efeitos para carotenoides totais	54
Figura 17- Análise de efeitos para biomassa e $Y_{p/x}$	54
Figura 18- Análise de efeitos para $Y_{p/s}$ e P_c	55
Figura 19- Análise de efeitos para $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{x/s}$ e P_x	55
Figura 20- Acompanhamento de biomassa (a), pH (b).....	57
Figura 21 - Acompanhamento de ART (a) e carotenoides totais (b).....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Carotenoides	14
3.2 Aplicações e propriedades dos carotenoides	15
3.2.1 Corante	15
3.2.2 Provitamina A	15
3.2.3 Antioxidante	17
3.2.4 Precursores de Aromas	19
3.3 Obtenção de carotenoides naturais.....	19
3.3.1 Obtenção de carotenoides por via biotecnológica.....	20
3.4 Fatores que afetam a bioprodução de carotenoides	22
3.4.1 Fonte de carbono.....	22
3.4.2 pH.....	23
3.4.3 Temperatura.....	24
3.4.3 Aeração e Agitação	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Manutenção e reativação da cultura microbiana.....	29
4.2 Coprodutos agroindustriais.....	29
4.3 Preparo do inóculo	29
4.4 Meio de cultivo	29
4.5 Pré-tratamento do meio	30
4.6 Estudo dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> em frascos agitados	30
4.7 Diminuição da faixa de pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$	30
4.8 Influência da agitação e aeração na produção de carotenoides por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> em biorreator	31

4.9 Métodos Analíticos	31
4.9.1 Acompanhamento de biomassa, pH e açúcares redutores totais	31
4.9.2 Rompimento celular e obtenção do extrato carotenogênico.....	31
4.9.3 Determinação de carotenoides totais.....	32
4.9.4 Parâmetros cinéticos.....	32
4.9.5 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Estudo dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> em frascos agitados.....	34
5.1.1 Avaliação do DCCR para as respostas estudadas	42
5.2 Diminuição da faixa de pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$	49
5.2.1 Avaliação dos efeitos das variáveis pH e relação entre volume de meio e volume de reator para as respostas estudadas.....	53
5.3 Avaliação da agitação e aeração na produção de carotenoides por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> em reator de bancada	56
6 CONCLUSÕES	60
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO 1: Caracterização da água de maceração de milho.....	71
ANEXO 2: Caracterização do melaço de cana-de-açúcar.	72
APÊNDICE 1: Curva padrão de biomassa.....	73
APÊNDICE 2: Curva padrão de glicose	73
APÊNDICE 3: Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para as respostas $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$	74
APÊNDICE 4: Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, $Y_{p/x}$, e P_c	75

1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides estão amplamente distribuídos na natureza, apresentando papel de destaque na fotossíntese e fotoproteção de sistemas vegetais e como precursores de vitamina A nos seres humanos. Além de funções nos sistemas biológicos, apresentam também grande importância para a indústria farmacêutica na elaboração de cosméticos e como aditivo alimentar na indústria de alimentos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os pigmentos naturais vêm tendo uma participação cada vez mais importante no mercado, devido às restrições maiores no uso de corantes sintéticos. Essas restrições são consequência da preocupação quanto ao aspecto de alterações orgânicas que possam ser causadas pela ingestão destas substâncias a longo prazo (CARVALHO, 2004; GHIGGI, 2007). A importância comercial dos carotenoides pode ser observada pelo crescimento de seu mercado, que em 2010 movimentava cerca de US\$ 1,2 bilhões, com estimativa de crescimento anual de 2,3%, podendo alcançar US\$ 1,4 bilhões até 2018 (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2011)

Carotenoides utilizados comercialmente são obtidos, em sua maioria, por rota sintética ou por extração a partir de plantas e algas. A produção de carotenoides por micro-organismos, como a levedura *Sporidiobolus pararoseus*, vêm sendo estudada como forma alternativa de obtenção desses corantes naturais, por possibilitarem melhor controle das condições de produção em menor tempo e utilização de substratos de baixo custo como fontes de carbono e nitrogênio (CASTELO BRANCO, 2010; VALDUGA, et al., 2009a).

Diversos estudos demonstram que a composição do meio empregado pode interferir na bioprodução desses pigmentos, além disso, outras condições externas do cultivo como temperatura, agitação e pH também levam a alterações como variedade e quantidade de carotenoides produzidos pelo micro-organismo (RIBEIRO, BARRETO, COELHO, 2011; SCHWARTZ, 2010).

A produção de carotenoides microbianos vem sendo realizada nos Laboratórios de Engenharia de Bioprocessos (ENGEBIO) e Análise Sensorial e Controle de Qualidade (LASCQ) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Diferentes linhagens de *Phaffia rhodozyma*, cepas de *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Sporidiobolus pararoseus* isoladas pelos laboratórios e a microalga *Haematococcus pluvialis* foram cultivadas em meios complexos e meios formulados com coprodutos agroindustriais, como água de maceração de milho, água de parboilização de arroz, melaço e glicerol residual

(FONSECA et al., 2011; MACHADO, 2013; OTERO, 2011; REIS, 2011; SILVA, 2009; SILVA, 2010;). Além dos trabalhos com enfoque na produção, já foram realizados estudos sobre a avaliação da capacidade antioxidante desses compostos (CIPOLATTI, 2012) e estudos relacionados às técnicas de ruptura celular (MICHELLON et al., 2012; LOPES, 2014).

Em vista do apresentado o presente trabalho tem como objetivo a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados e biorreator de bancada em diferentes condições de cultivo, utilizando como substratos coprodutos agroindustriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados e biorreator de bancada em diferentes condições de cultivo, utilizando como substratos coprodutos agroindustriais.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito das variáveis temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides em frascos agitados;
- Avaliar efeito da relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ na produção de carotenoides em frascos agitados;
- Determinar a interferência da aeração e agitação na produção de carotenoides em biorreator de bancada;
- Determinar os parâmetros cinéticos obtidos ao longo dos cultivos nas diferentes condições estudadas.

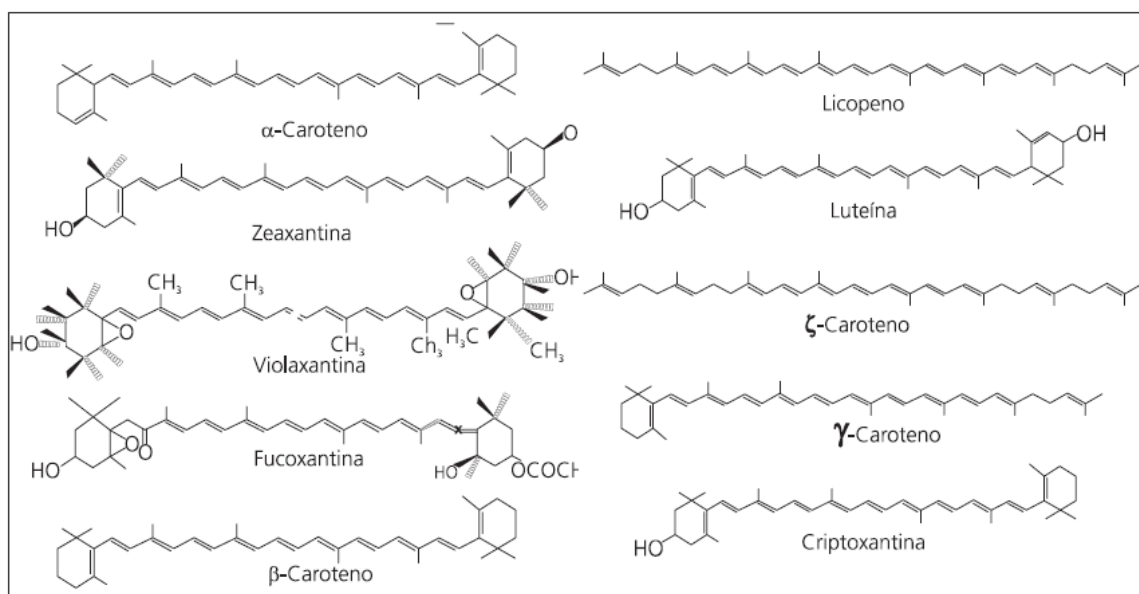
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais, lipofílicos, insolúveis em água e solúveis em solventes, como acetona, álcool e clorofórmio, amplamente distribuídos na natureza, de coloração amarela, laranja e vermelha, presente em vegetais e micro-organismos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Do ponto de vista químico, os carotenoides possuem estrutura básica formada por unidades de isopreno ligadas covalentemente, criando uma molécula simétrica com 40 carbonos. Muitos outros carotenoides podem derivar-se dessa estrutura primária, através de modificações químicas como a ciclização, hidrogenação, desidrogenação, encurtamento ou extensão de cadeia, isomerização ou combinação desses e de outros processos (AKSU; EREN, 2005, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As diferenças das estruturas químicas entre alguns carotenoides podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1- Estrutura química de alguns carotenoides



Fonte: Ambrósio; Campos; Faro (2006).

Estima-se a existência de 600 diferentes carotenoides na natureza, os quais são divididos em duas classes: aqueles compostos apenas por carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos) são chamados de carotenos, enquanto os hidrocarbonetos que apresentam moléculas de oxigênio como grupos funcionais recebem a denominação de xantofilas, sendo

essas sintetizadas a partir dos carotenos por meio de reações de hidroxilação e epoxidação (AMBRÓSIO; CAMPOS, FARO, 2006; BARBOSA, 2010; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

3.2 Aplicações e propriedades dos carotenoides

3.2.1 Corante

A cor é uma característica essencial dos alimentos e apesar de nem sempre ter relação direta com o valor nutricional, tem importância central na sua aceitabilidade por parte do consumidor. A coloração dos carotenoides é consequência da presença de pelo menos sete duplas ligações conjugadas que originam o grupo cromóforo, sendo que, quanto maior o número de ligações conjugadas mais amplo o espectro de cor apresentado (CARVALHO, 2004; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Na indústria de alimentos, esses pigmentos são empregados com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenagem, colorir os alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Um exemplo disso é o β -caroteno, carotenoide muito utilizado na indústria de alimentos, como corante solúvel em óleos e gorduras, para conferir coloração a margarinas, queijos e molhos para saladas (BARBOSA, 2010; CASTELO BRANCO, 2010).

Salmões, trutas e outros pescados devem sua coloração característica à presença de carotenoides como a astaxantina, absorvida pela ingestão de zooplâncton e crustáceos. Na produção em cativeiro, é necessário adicionar esse carotenoide a alimentação dos pescados, com o intuito de aumentar o valor do produto não apenas em aspectos econômicos, mas também nutricionais. A taxa de deposição dos carotenoides na musculatura de salmonídeos, por exemplo, é dependente de um conjunto de fatores, entre eles o tipo de pigmento presente na ração, densidade energética da ração, tamanho dos peixes, estado fisiológico, fatores ambientais, doenças e histórico genético (GHIGGI, 2007; PASSOS, 2007).

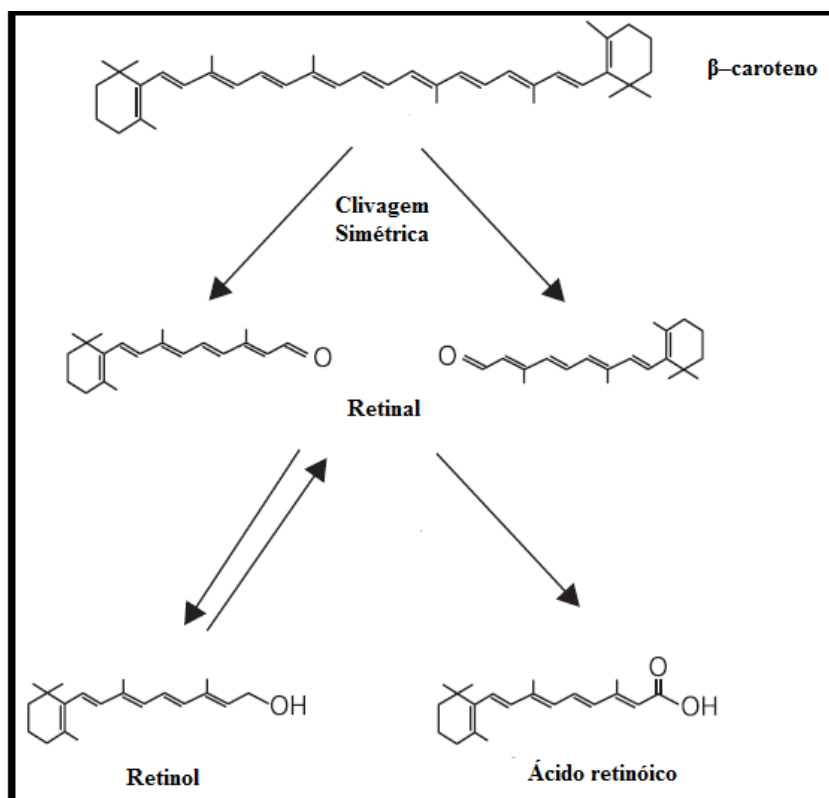
3.2.2 Provitamina A

Apesar de se destacarem por seu papel como pigmentos, os carotenoides apresentam outras importantes funções, como por exemplo, precursores de vitamina A. Seo, et al. (2005) destacaram a importância dos carotenoides como fonte dessa vitamina. A deficiência de vitamina A é uma causa comum de cegueira e mortalidade infantil, sendo considerado um problema de saúde pública no Sudeste da Ásia, África e partes das Américas do Sul e Central.

É importante ressaltar que, nem todos os carotenoides apresentam requisitos estruturais para conversão em vitamina A. Apenas carotenoides que possuam um anel β , sem grupos funcionais oxigenados, juntamente com uma cadeia de polieno contendo pelo menos 11 átomos de carbono apresentam atividade pró-vitâmica. Dos 10% de carotenoides precursores de vitamina A, o β -caroteno tem a maior atividade, uma vez que cada molécula produz duas moléculas de retinol (GARCÍA, et al., 2012; RIBEIRO, 2008).

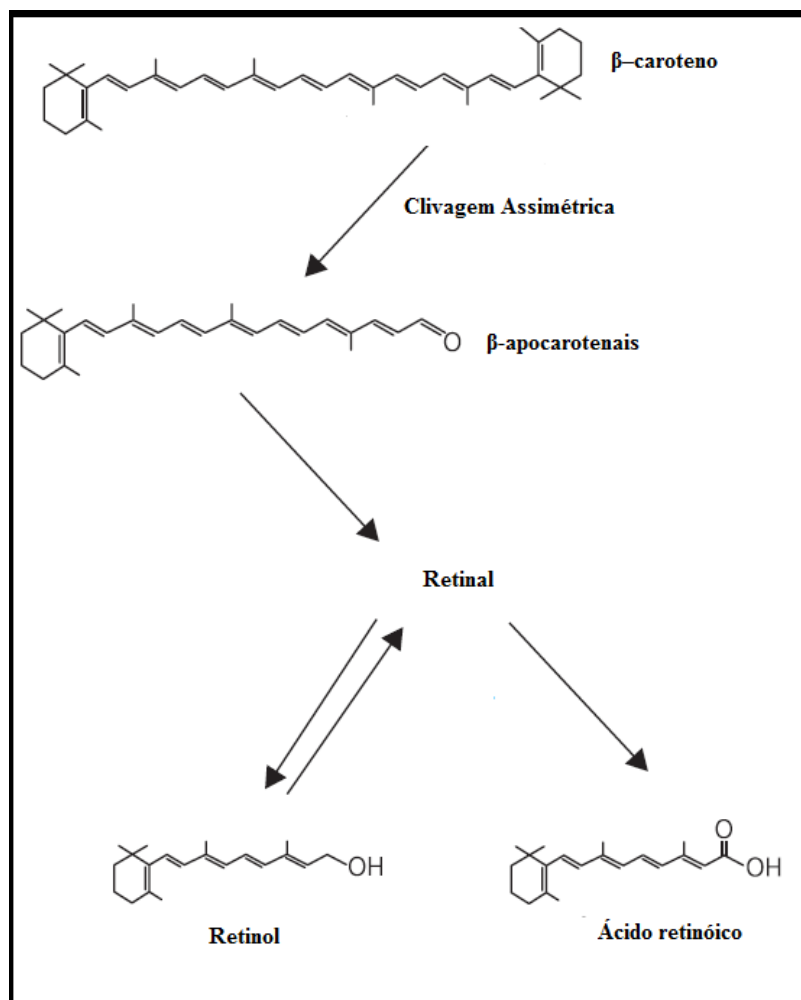
O processo de clivagem sofrido pelo β -caroteno para a produção de vitamina A ainda não está totalmente elucidado, acredita-se que esse processo pode ser realizado de duas formas. Na clivagem simétrica (Figura 2) o β -caroteno é quebrado na dupla ligação central (15-15') e o produto resultante é o retinal, que pode ser convertido de forma reversível a retinol (vitamina A) e irreversível a ácido retinóico. Já na clivagem assimétrica (Figura 3) são formados β -apocarotenais, que podem ser convertidos a retinal (AMBRÓSIO, CAMPOS, FARO, 2006; GARCÍA, et al., 2012).

Figura 2– Clivagem simétrica da molécula de β -caroteno



Fonte: Adaptado de Ambrósio; Campos; Faro (2006).

Figura 3– Clivagem assimétrica da molécula de β -caroteno



Fonte: Adaptado de Ambrósio; Campos; Faro (2006).

3.2.3 Antioxidante

Segundo Damodaran; Parkin; Fennema (2010), o processo oxidativo ocorre pela retirada de elétrons de um átomo ou de um grupo de átomos. Simultaneamente, há uma reação de redução que ocasiona a adição de elétrons a um átomo ou a um grupo de átomos diferentes.

Antioxidantes são considerados benéficos para saúde humana por sua habilidade de agir contra espécies de oxigênio reativo. Os radicais livres, são tradicionalmente os maiores causadores de doenças relacionadas à idade e a doenças degenerativas. Esse fato leva a hipótese de que o maior consumo de antioxidantes pode reduzir o risco de doenças relacionadas à idade (FINLEY et al. 2001).

O mercado de ingredientes e suplementos antioxidantes vem crescendo. O aumento da demanda por antioxidantes e a tendência por substituir aditivos alimentares

synthetic por naturais, vem estimulando o desenvolvimento de processos biotecnológicos eficientes para a produção deste composto. Entre os antioxidantes produzidos por processos biotecnológicos, destacam-se os carotenoides (LIN, HAIN, YAN, 2014).

As propriedades antioxidantes, assim como sensibilidade à luz, temperatura e acidez são consequências da presença de insaturações na cadeia química desses pigmentos, sendo fornecidas pelos carotenoides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas, por exemplo, o licopeno é mais eficaz que o β -caroteno, pois o licopeno possui onze duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica, enquanto o β -caroteno possui nove duplas ligações conjugadas e cadeia cíclica nas extremidades (BARBOSA, 2010; MIRANDA, 2010).

Miranda (2010) avaliou o efeito da composição do meio de cultura (concentração de NaCl, pH e temperatura de cultivo na capacidade protetora de carotenoides extraídos da bactéria halófila *Halococcus morrhuae* (ATCC 17082) contra o oxigênio singlete. As reações foram realizadas utilizando etanol: acetato de etila (1:1) como solvente, solução de 1 g.L⁻¹ de dimetil antraceno (DMA) como actinômetro e solução de azul de metileno (13 μ M) como sensibilizador, sob agitação moderada, atmosfera de ar e temperatura controlada a 20 $\pm$ 1 °C. O estudo alcançou proteção máxima de 63,7% nas condições de pH 6,0, concentração de NaCl de 250 g.L⁻¹ e 40 °C.

Cipolatti (2012) avaliou a atividade antioxidante de extratos carotenogênicos de *Phaffia rhodozyma*, *Pichia fermentans*, *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* em meio YM (3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ extrato de malte, 5 g.L⁻¹ peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose), M1 (35,6 g.L⁻¹ de água de maceração de milho e 4,8 g.L⁻¹ de glicerol) e M2 (36,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho e 6,0 g.L⁻¹ de melaço). Os extratos foram obtidos após diferentes tempos de congelamento das células das leveduras e a atividade foi medida através da capacidade de interação com os radicais DPPH e ABTS e pelo poder de redução do ferro (FRAP). Os extratos de *S. pararoseus*, micro-organismo que foi utilizado no presente trabalho, em meio YM apresentaram aproximadamente 60% de inibição por μ g⁻¹ no métodos ABTS, enquanto que no método FRAP sua absorvância chegou a 0,7. Os extratos de *P. fermentans* em M2 apresentaram os valores mais promissores quanto a atividade antioxidante com valores de 129,6 e 239,1% inibição por μ g para DPPH e ABTS, respectivamente e valores superiores a 1,0 de absorvância pelo método FRAP.

3.2.4 Precursores de Aromas

Os carotenoides podem originar compostos de aroma, detectados em produtos folhosos (tabaco, chá e mate), em óleos essenciais, frutas (uva, maracujá, carambola, marmelo, maçã, nectarina, melão e tomate), vegetais, condimentos (açafrão e páprica) e em outras fontes, como vinho, rum, café, carvalho, mel e algas marinhas (UENOJO, MARÓSTICA, PASTORE, 2007).

Na Tabela 1 são apresentados alguns dos principais compostos de aroma originados de carotenoides e os produtos onde ocorrem.

Tabela 1- Principais compostos de aroma originados a partir de carotenoides.

Nome	Ocorrência
β -ionona	chá preto, framboesa, maracujá, cenoura, tabaco, damasco
α -ionona	groselha, chá preto, amora, cenoura, tabaco, banana, cereja, pêssego
β - damascona	rosa, chá preto, mamão, rum, tabaco
β - damascona	damasco, rosa, carambola, uva, kiwi, manga, tomate, vinho
4-oxo- β -ionona	chá preto, tabaco, flores,
diidroactinodiolida	chá preto, tomate, canela, tabaco
safranal	açafrão, chá preto, grapefruit, mate, páprica
β -ciclocitral	mate torrado, rum, chá, tomate, melão, páprica, pêra, damasco
teaspirano	chá preto, maracujá, tabaco

Fonte: Adaptado de Uenojo; Maróstica; Pastore (2007).

3.3 Obtenção de carotenoides naturais

Apesar dos corantes sintéticos apresentarem menor custo e maior estabilidade química, pesquisadores e consumidores principalmente da área de alimentos preocupam-se com sua natureza tóxica. Uma alternativa para sua substituição é a utilização de pigmentos naturais provenientes, por exemplo, de resíduos industriais. Barbosa (2010) obteve carotenoides a partir de bagaço do pedúnculo de caju por maceração enzimática. Em escala piloto as melhores condições de extração dos compostos carotenoides foram: 30°C, com adição de 500 ppm de complexo enzimático pectinolítico, 1 h de maceração, com proporção de 1:1 de bagaço:água e cinco extrações consecutivas obtendo aproximadamente 0,9 mg.L⁻¹

Também utilizando maceração enzimática, porém tendo como matéria prima película comestível de cajá, Vieira (2010) utilizando 150 μ L de complexo enzimático a 35°C e 3 h de maceração, obteve teor máximo β -criptoxantina de 19,40 mg.g⁻¹.

Chisté (2011), obteve de extrato de urucum, 5,2 mg de bixina.mL⁻¹ extraída com uma mistura de etanol e acetato de etila. Extratos etanólicos liofilizados de polpa de

piquiá resultaram em $0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ de carotenoides totais. A partir de resíduos do processamento de polpa de tomate, Chiu, et al. (2007) com a metodologia de extração com dióxido de carbono supercrítico obtiveram $525,3 \text{ } \mu\text{g}$ de licopeno. g^{-1} .

Outra opção como fonte de carotenoides naturais são os resíduos do processamento de camarão. Bertolo (2007) utilizou resíduo composto por cascas e cabeças de camarão-rosa, onde o rendimento de carotenoproteína foi de 9,9 % (50 °C e concentração de enzima e substrato de 0,3 %). A carotenoproteína foi submetida à purificação química, para obtenção de astaxantina, chegando a uma quantidade máxima de 197,41 ppm nas condições de 30 °C, na proporção de hexano/acetona de 25 % e com 2 h de extração. Com o mesmo tipo de resíduo, Mezzom et al. (2011) testaram diferentes pré-tratamentos e métodos de extração de carotenoides. A metodologia com maior eficiência na extração de carotenoides totais foi utilizando maceração com acetona, com valores de $253 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ de extrato.

Apesar dos estudos citados anteriormente serem promissores, a ampliação de escala da extração de carotenoides de resíduos industriais apresentam como desvantagem a sazonalidade que produtos como frutas e frutos do mar possuem, visto que são obtidos por safra e é neste ponto que a produção de carotenoides por via biotecnológica ganha destaque.

3.3.1 Obtenção de carotenoides por via biotecnológica

A obtenção de carotenoides por via biotecnológica pode ser realizada utilizando bactérias, microalgas e leveduras. Em bactérias fotossintéticas, por exemplo, a produção de carotenoides é consequência de sua função biológica na absorção de energia luminosa e na fotoproteção. Aproveitando-se dessa necessidade, Gu et al. (2008) produziram carotenoides utilizando a bactéria *Rhodobacter sphaeroides*, em meio composto por ácido cítrico, xarope de milho, NH_4Cl , MgSO_4 , Na_2HPO_4 , FeSO_4 e Na_2CO_3 a 28 °C, 200 lux de luminosidade e cultivo de 7 dias, com recuperação máxima de $6561 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ de carotenoide.

Úbeda (2008) estudou a produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila*. Em meio contendo sacarose como fonte de carbono, a concentração máxima de carotenoides foi de $2024,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, em ensaio com duração de 48 h, pH inicial 9,0, 24 °C e agitação de 100 rpm.

Algumas microalgas também podem ser fonte de carotenoides, um exemplo é a alga verde *Haematococcus pluvialis*, que apresenta alto teor de astaxantina. Yoo et al. (2012) realizaram a otimização do *design* do fotobiorreator para a produção de carotenoide por *H. pluvialis*, alcançando rendimento de $78,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de astaxantina. Utilizando a mesma

microalga, Reis et al. (2011) estudaram a obtenção de biomassa e carotenoides em 5 diferentes meios de cultivo: *Bold Basal Medium* (BBM), BBM e glicose, BBM e acetato de sódio, *Barbera Medium* (BAR) e *Blue-Green Medium* (BG-11). Os meios BBM e glicose ($2635,3 \mu\text{g.g}^{-1}$), BBM e acetato de sódio ($2623,0 \mu\text{g.g}^{-1}$) e BG-11 ($3026,6 \mu\text{g.g}^{-1}$) apresentaram maiores produções de carotenoides, não diferindo entre eles.

Li et al. (2012) estudaram a microalga *Eustigmatos cf. polyphem* (Eustigmatophyceae) como potencial fonte de β -caroteno, utilizando fotobiorreator de coluna com produção de até $470,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de carotenoide.

Além de bactérias e microalgas, leveduras também recebem destaque como fontes de carotenoides, entre as mais estudadas estão as do gênero *Rhodotorula* (OTERO, 2011), *Phaffia* (CIPOLATTI, 2012) e *Sporidiobolus* (MACHADO, 2013). Segundo Castelo Branco (2010) o acúmulo de pigmentos carotenoides na maioria das leveduras tem início no final da fase logarítmica e continuidade na fase estacionária de crescimento.

Otero (2011) isolou 3 leveduras silvestres com maior potencial para produção de carotenoides a partir de amostras ambientais, identificadas como *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, sendo que a primeira apresentou a maior quantidade de carotenoides produzidos ($123,6 \mu\text{g.g}^{-1}$) após 168 h de cultivo em meio YM (25°C e 180 rpm), tendo como carotenoide majoritário o β -caroteno.

Zeni (2009) também realizou o isolamento de micro-organismos visando a bioprodução de carotenoides e enzimas pectinolíticas, a partir de resíduos agroindustriais, frutas, amostras de solo, farinha de trigo e produtos processados em decomposição. Foram isolado 116 micro-organismos, dos quais 28 apresentaram coloração amarela ou rósea, sendo 6 leveduras, 20 bactérias e 2 fungos filamentosos. Entre as leveduras, as cepas W8 e K1 foram as que apresentaram os maiores conteúdos de carotenoides totais com média de produção de $818,56 \pm 36,61 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $729,72 \pm 40,66 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Na Tabela 2 são apresentados outros estudos sobre micro-organismos com capacidade de produção de carotenoides.

Tabela 2– Micro-organismos produtores de carotenoides

Micro-organismo	Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Referência
<i>Halococcus morrhuae</i> ATCC 17082	87,9	Miranda (2010)
<i>Halobacterium salinarium</i> ATCC 33171	44,5	Miranda (2010)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	6270,0	Denery et al. (2004)
<i>Dunaliella salina</i>	50,3	Denery et al. (2004)
<i>Chlorella minutissima</i>	2,5	Redaelli (2012)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	0,8	Sánchez et al. (2005)
<i>Rhodotorula graminis</i> DBVPG 7021	803,2	Buzini et al. (2005)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	628,8	Silva (2009)
<i>Rhodotorula rubra</i> GED8	503,5	Simova; Frengova; Beshkova (2004)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	238,0	Tatsch (2008)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1520,0	Maldonade; Rodriguez-Amaya; Scamparini (2012)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	3550,0	Aksu; Eren (2007)
<i>Rhodotorula minuta</i>	33,0	Maldonade; Rodriguez-Amaya; Scamparini (2008)

3.4 Fatores que afetam a bioprodução de carotenoides

É possível observar grande variabilidade na concentração de carotenoides obtidos entre os diferentes trabalhos apresentados no item anterior. Essa variação é consequência de fatores que vão além da utilização de micro-organismos distintos, portanto sequencialmente são apresentados outros fatores que podem afetar a bioprodução de carotenoides.

3.4.1 Fonte de carbono

Um dos fatores que mais recebe destaque nos trabalhos sobre produção de carotenoides por via biotecnológica é a fonte de carbono, não apenas por sua influência no desenvolvimento do micro-organismo e na síntese de carotenoides, mas também por interferir diretamente nos custos de produção. Glicose e sacarose são as fontes de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides e selecionar fontes alternativas de carbono que elevem produtividade do processo e reduzam custos é de grande interesse para a área (AKSU, EREN, 2005; SCWARTZ, 2010).

Aksu e Eren (2007) empregaram glicose, melaço e lactose proveniente do soro de queijo, como fontes de carbono para produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*. A maior concentração (125 mg.L^{-1}) foi obtida com 20 g.L^{-1} de melaço, enquanto que a maior

produção baseada na máxima concentração celular ($35,5 \text{ mg.g}^{-1}$) foi obtida quando $13,2 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose de soro de leite foi adicionada ao meio.

Silva (2009) realizou cultivo de 3 cepas de *Phaffia rhodozyma* em diferentes meios de cultura empregando água de parboilização de arroz como substrato. Utilizando glicose e sacarose como fontes de carbono, selecionou entre as 3 cepas de *P. rhodozyma* a NRRL Y-17268 como principal produtora de astaxantina ($2,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando sacarose), nessa mesma condição através de um espectro de varredura foi possível observar a presença de β -caroteno e equinona. A maximização da produção ($5,4 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) ocorreu utilizando meio composto por $16,25 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de malte, $8,75 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona, 15 g.L^{-1} de sacarose e $87,5 \text{ g.L}^{-1}$ de água de parboilização do arroz.

Água de maceração de milho, melaço e glicerol foram empregadas por Cipolatti (2012) na produção de carotenoides pelas leveduras *R. mucilaginosa*, *S. pararoseus*, *P. fermentans* e *P. rhodozyma* NRRL Y-17268. Os três coprodutos foram utilizados em dois meios de cultivo diferentes, o M1 (água de maceração de milho e glicerol) e o meio M2 (água de maceração de milho e melaço) foram realizados ainda cultivos utilizando meio YM. A levedura *Sporidiobolus pararoseus* foi a que se destacou nos cultivos em meios alternativos obtendo $643,5$ e $830,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ nos meios M1 e M2, respectivamente, sendo majoritária a presença do β -caroteno nesses extratos. Nos cultivos utilizando YM, foram obtidos $1068,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa*, também tendo como carotenoide majoritário o β -caroteno.

Na Tabela 3 são apresentadas outras possíveis fontes alternativas de carbono estudadas para bioprodução de carotenoides.

Tabela 3– Fontes de carbono estudadas para bioprodução de carotenoides

Fonte de Carbono	Micro-organismo	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
Extrato de Tomate	<i>R. glutinis</i>	3645,1	Chandi et al. (2010)
Rabanete fermentado	<i>R. glutinis</i>	92,0	Malisorn; Suntornsuk (2009)
Glicerol	<i>S.pararoseus</i>	16,5	Manowattana et al. (2012)
Glicerol	<i>R. glutinis</i>	135,2	Saenge et al. (2011)
Suco de Caju	<i>R.glutinis</i>	607,4	Oliveira (2010)
Farinha de feijão	<i>R. glutinis</i>	3,5	Tinoi; Rakariyatham; Deming (2005)

3.4.2 pH

O aumento de pH apresentou efeito sobre a produção de carotenoides, sendo que quando mantido pH na faixa de 7, Aksu; Eren (2005) encontraram as maiores concentrações

de carotenoides ($69,8 \text{ mg.L}^{-1}$) com *Rhodotorula mucilaginosa*. Em outro trabalho dos mesmos autores, o micro-organismo estudado foi a *Rhodotorula glutinis*, e o pH ótimo encontrado foi 6, com teor de carotenoides totais de $63,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (AKSU; EREN, 2007).

Ghiggi (2007) relatou que o pH inicial do meio de cultivo afetou as produtividades médias de astaxantina obtidas em cultivo de *Haematococcus pluvialis*. As produtividades médias obtidas nos meios sob pH 5, 6, 7, 8 e 9 foram respectivamente 0,035, 0,040, 0,043, 0,034 e $0,034 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ sendo assim, a faixa de pH 6-7 foi melhor do ponto de vista de produtividade média. O pH inicial do meio teve também influência sobre a indução de stress no cultivo da microalga, sendo que os meios com pH 8 e 9 foram os primeiros a apresentar produção de astaxantina com rápida degradação da clorofila. Possivelmente este resultado se deva aos meios em pH 8 e 9 terem entrado em fase de declínio antes dos demais, mostrando-se como um fator de stress importante para produção de cistos com astaxantina.

De forma contrária, Úbeda (2008) descreveu que a análise dos efeitos referentes ao pH inicial da fermentação, na faixa entre 5 a 9, mostraram que esta variável não foi estatisticamente significativa no processo de produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila*, sendo fixado em 9 na continuidade.

O incremento do pH inicial do meio de 4 para 6 no trabalho de Silva (2010), não apresentou efeito significativo para concentração de biomassa. Porém, na produção de astaxantina específica, o efeito foi positivo ($p < 0,1$), aumentando em média a produção específica em $27,8 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$. Na produção volumétrica, foi verificado um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) e negativo, diminuindo em média $0,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ na bioprodução do carotenoide. Como o pH teve efeito positivo para astaxantina específica e negativo para a volumétrica, decidiu-se fixar o pH em 5,0. É destacado no trabalho que outros estudos observaram o pH 5,0 sendo o mais adequado para ambos os casos: crescimento celular e produção de astaxantina para esta levedura.

No trabalho de Cabral et al. (2011) a passagem do pH de 4 para 8 levou a uma redução na produção de carotenoides por *Sporidiobolus parvovirens* em cultivo submerso. Os autores então, fixaram o valor de pH em 4.

3.4.3 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes para o desenvolvimento de organismos, visto que a mesma acarreta mudanças nas vias biossintéticas, incluindo a biossíntese de carotenoides (BHOSALE, 2004).

Na levedura *Rhodotorula glutinis*, a proporção de β -caroteno foi maior à 5 °C, enquanto que mais toruleno foi produzido quando a levedura foi cultivada à 25 °C. Os autores relataram que o γ -caroteno atua como o ponto de ramificação da síntese dos carotenoides. A reação de desidrogenação e subsequente descarboxilação que leva a produção do toruleno depende de enzimas que são menos ativas a temperaturas mais baixas, quando comparada a temperatura de ação da β -caroteno sintase (SIMPSON; NAKAYAMA; CHICHESTER, 1964).

O aumento de 25 °C para 30 °C levou as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis* aumentarem o teor de carotenoides totais de 57,0 e 57,3 mg.L⁻¹ para 69,8 e 63,4 mg.L⁻¹ respectivamente. Porém quando a temperatura ultrapassou 30 °C ambas apresentaram decréscimo na produção de carotenoides (AKSU; EREN, 2005, 2007).

Miranda (2010) utilizando bactérias halófilas, obteve concentrações de carotenoides entre 2,0 e 7,9 g.L⁻¹, sendo os maiores valores obtidos de 30 a 40 °C e os menores valores de 46 a 50 °C.

Zhang; Zhang; Tan (2014) utilizando *Rhodotorula glutinis* avaliaram o efeito de duas diferentes temperaturas de cultivo (24 °C e 30°C) sobre a produção de carotenoides e lipídios. Os resultados indicaram que a máxima biomassa (17,9 g.L⁻¹) foi obtida a 30 °C em 30 h de cultivo, enquanto que a 24 °C a concentração máxima alcançada foi de 15,8 g.L⁻¹. A concentração de carotenoides foi de 1,2 mg.L⁻¹ para 30°C e 0,9 mg.L⁻¹ para 24°C. Segundo os autores em condições normais, temperaturas superiores a 44 °C e inferiores a 18 °C inibem severamente a taxa de crescimento, produção de biomassa e a utilização de nutrientes.

3.4.3 Aeração e Agitação

A carotenogênese é um processo aeróbio, sendo o oxigênio um fator essencial para a assimilação de substrato, crescimento celular e síntese de carotenoides, que é intensificada por um determinado nível de estresse oxidativo (CASTELO BRANCO, 2010; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009).

Somente fornecer altas concentrações de nutrientes e a manutenção de temperaturas ideais ao longo do processo, sem a preocupação com a capacidade de oxigenação do sistema interferem na obtenção de elevadas concentrações de produto. Para que oxigênio seja difundido com maior facilidade até as células o processo de agitação é indispensável, favorecendo assim o transporte convectivo desse oxigênio (SCHMIDELL, 2001).

O aumento da aeração de 0 para 2,4 vvm, aumentou a concentração de carotenoides totais produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* de 69,8 para 112,8 mg.L⁻¹ e para *Rhodotorula glutinis* os valores aumentaram de 63,4 para 105,8 mg.L⁻¹. A taxa de transferência de oxigênio é predominantemente influenciada pelas condições de agitação ou pela intensidade de agitação dos frascos (AKSU; EREN, 2005, 2007).

Castelo Branco (2010) relatou que as maiores concentrações de biomassa (13,2 g.L⁻¹) de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 foram obtidas quando utilizada um relação Vmeio:Vreator de 1:10. Quando a relação foi diminuída para 1:5 e 1:3,3 houve uma redução da formação de biomassa e do consumo da fonte de carbono. Segundo o autor o resultado observado se deve, provavelmente, à exigência do micro-organismo em relação à taxa de transferência de oxigênio necessária para alcançar um bom desempenho no crescimento e na produção de β -caroteno.

Masseto et al. (2001) utilizaram biorreator de 4 L para estudar o efeito combinado da velocidade de agitação (200 a 600 rpm), taxa de aeração (1 a 2 vvm) e concentração de água de maceração de milho (1,6 a 4,6%) na produção de carotenoides por *Flavobacterium* sp. Os níveis mais altos desses dois parâmetros, 600 rpm e 2 vvm, juntamente com 4,6% de água de maceração de milho apresentaram os melhores valores de produção de carotenoides totais (11,4 mg.L⁻¹).

Utilizando *Xanthophyllomyces dendrorhous* foram estudados um fermentador em escala laboratorial de 50 L (volume útil de 35 L) com aeração entre 0,5 a 1,2 vvm e agitação de 300 a 500 rpm e outro de larga escala com 10 m³ com taxa de aeração de 0,3 a 0,5 vvm e agitação de 200 a 400 rpm, permitindo assim observar as consequências da ampliação de escala na obtenção de astaxantina. No primeiro fermentador foi obtida uma concentração máxima de biomassa de 21,3 g.L⁻¹ em 132 h, enquanto a concentração de astaxantina chegou ao máximo de 58,7 mg.L⁻¹ em 156 h, com fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) de 0,5 mg.g⁻¹. Para o fermentador de larga escala a máxima concentração de astaxantina foi de 52,3 mg.L⁻¹ em 156 h, valor 11% inferior ao fermentador de 50 L, alcançando um $Y_{p/s}$ de 0,48 mg.g⁻¹ e a concentração de biomassa foi 3,5% (20,5 g.L⁻¹) inferior em comparação a escala laboratorial (ZHENG, et al. 2006).

Tatsch (2008) estudou a produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em biorreator de 2 L (1 L de volume útil). A maior concentração de carotenoides totais (883 μ g.L⁻¹) foi observada no ensaio com agitação de 600 rpm, aeração de 2,5 vvm, pH 5,0, temperatura de 25 °C, 60 g.L⁻¹ de glicose, 15 g.L⁻¹ de extrato de malte e 7 g.L⁻¹ de peptona. Provavelmente este resultado se deve ao estresse aplicado às células que

apesar de reduzir o crescimento acarretou elevado acúmulo de carotenoides intracelularmente.

Em reator de 6 L (volume útil de 4 L), utilizando uma cepa de *Pichia pastoris* modificada geneticamente, a 30°C, pH 5, agitação entre 500-900 rpm com aeração de 4,5 L.min⁻¹ foram estudados dois meios, YPD e MMD (ácido fosfórico, CaSO₄, K₂SO₄, SO₄.7H₂O, KOH, traços de sais metálicos suplementado com glicose). Em YPD a cepa modificada produziu 93,2 g.L⁻¹ de biomassa em 37 h, com produção de licopeno de 51,7 mg.L⁻¹. Para o meio MMD a produção de biomassa foi inferior, 75,3 g.L⁻¹ em 39,5 h, porém, a produção de licopeno foi superior em comparação ao meio anterior, 73,9 g.L⁻¹. No mesmo trabalho havia sido testada anteriormente a produção em frascos agitados, onde o meio YPD apresentou melhores resultados para a produção com aproximadamente 16 mg.L⁻¹ de licopeno, enquanto que para o meio MMD a produção foi de 10 mg.L⁻¹. Os autores relacionaram essa discrepância com as diferenças na concentração de oxigênio e no pH de cultura (BHATAYA, et al. 2009).

Agitação e aeração são responsáveis pela melhoria na homogeneidade do meio de cultura e consequente aumento da disponibilidade de nutrientes e oxigênio com maiores produção de carotenoides. Schwartz (2010) estudou a otimização da produção de carotenoides por *S. salmonicolor*, em biorreator de 1 L de volume útil, sendo monitorados os parâmetros temperatura, agitação e aeração. A maior produção de carotenoides totais (3425,9 g.L⁻¹) foi encontrada nos ensaios correspondentes aos pontos centrais do planejamento experimental com 80 g.L⁻¹ de glicose e 1,5 vvm sendo que a agitação foi fixada em 180 rpm.

Utilizando reator coluna de bolhas com volume total de 1,4 L (volume útil de 0,7 L), foi estudada a interferência de diferentes taxas de aeração no desenvolvimento e produção de carotenoides em *Blakeslea tripora*. Em todas as aerações estudadas (3, 4 e 5 vvm) foi observado que a produção de carotenoides ocorreu em duas etapas, a primeira entre o início da fermentação até aproximadamente o 4º dia, na fase de crescimento e a segunda etapa entre o 4º e 8º dia na fase estacionária do desenvolvimento do micro-organismo. Quando utilizados 4 vvm, no 8º dia obteve-se a maior concentração de carotenoides (55,0 ± 2,5 mg.g⁻¹), sendo que aeração de 3 e 5 vvm levou a redução na concentração do pigmento (28,5 mg.g⁻¹ para 3 vvm e 30 mg.g⁻¹ para 5 vvm). Quando analisado o perfil de carotenoides no 8º dia, é relatado pelos autores que a faixa de aeração interfere no tipo e quantidade de carotenoides majoritários. Para aerações de 3 e 4 vvm o β-caroteno foi o carotenoide majoritário representando, respectivamente 89,5 e 91,7% dos carotenoides totais, seguido

pelo γ -caroteno (9,6% para 3 vvm e 7,5% para 4 vvm) e o licopeno em quantidades inferiores a 1% em ambas aerações. Porém quando elevou-se a aeração para 5 vvm o γ -caroteno tornou-se o carotenoide majoritário (44,7%), seguido pelo β -caroteno (44,7%) apresentando ainda elevação na produção de licopeno, que chegou a representar 11,6% dos carotenoides totais (NANO; ROUKAS; PAPADAKIS, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção e reativação da cultura microbiana

A levedura carotenogênica *Sporidiobolus pararoseus* isolada de amostras ambientais por Otero (2011) foi mantida em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura (YM) composto por 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e adicionados de 0,2 g.L⁻¹ de KNO₃ a 4°C (PARAJÓ et al., 1998).

Para a reativação, foram realizados repiques a partir das culturas estoques contendo o mesmo meio e incubados por 48 h a 25°C. Aos tubos de reativação foram adicionados 1 mL de água peptonada (0,1%) para ressuspensão da biomassa, posteriormente adicionada em 9 mL de caldo composto por 40 g.L⁻¹ de melaço e 6,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho, pré-tratado com ácido sulfúrico segundo Machado, Burkert (2015), sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente.

4.2 Coprodutos agroindustriais

A água de maceração de milho utilizada no presente trabalho foi doada pela Corn Products de Balsa Nova – PR e o melaço adquirido da empresa Melaços Brasileiros de Saltinho - SP. A água de maceração de milho foi previamente caracterizada (Anexo 1) por Cipolatti (2012) e a caracterização do melaço foi enviada pela empresa fornecedora (Anexo 2).

4.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos agitados de 250 mL contendo 90 mL do meio composto por melaço e água de maceração de milho, descrito no item 4.1, adicionado de 10 mL de cultivo oriundo da reativação, sendo incubados a 180 rpm, 25°C por 48 h, ou tempo necessário para concentração celular atingir 1x10⁷ células.mL⁻¹, contadas através de câmara de Neubauer.

4.4 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado foi otimizado previamente por Machado; Burkert (2015), sendo composto por melaço de cana de açúcar (40 g.L⁻¹) e água de maceração de milho (6,5 g.L⁻¹), pré-tratado com ácido sulfúrico 1 N.

4.5 Pré-tratamento do meio

Os substratos melaço e água de maceração de milho foram acidificados até pH 3,0 pela adição de ácido sulfúrico 1 N, permanecendo em repouso por 24 h a temperatura ambiente. Após esse período, foram centrifugados a 3439 x g por 10 minutos e o pH ajustado conforme delineamento experimental apresentado no item 4.6, antes do processo de esterilização, com auxílio de solução de NaOH 2 N ou solução de ácido sulfúrico 1N (MACHADO; BURKERT, 2015).

4.6 Estudo dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados

Para avaliar os efeitos das variáveis temperatura (20 a 35 °C), agitação (100 a 200 rpm) e pH inicial (4 a 8) sobre a produção de carotenoides por *S. pararoseus*, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 , apresentado na Tabela 4.

Os cultivos foram realizados em *Erlenmeyers* de 500 mL com 250 mL de meio composto por 40 g.L⁻¹ de melaço e 6,5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho, durante 240 h sendo realizado acompanhamento de biomassa (g.L⁻¹), pH, açúcares redutores totais – ART (g.L⁻¹) e carotenoides totais (µg.L⁻¹). A partir desses dados foram calculados os fatores de conversão e produtividade conforme descrito no item 4.9.4.

4.7 Diminuição da faixa de pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$

Para a diminuição da faixa de pH (3 a 5) e para a avaliação da interferência da relação entre o volume de meio e o volume total do reator, usando frascos agitados do tipo *Erlenmeyer*, foi realizado um Delineamento Composto Central 2^2 (Tabela 7).

Os cultivos foram realizados em *Erlenmeyers* de 500 mL com volume de meio e pH definidos conforme a Tabela 7, com agitação de 150 rpm, 27,5°C durante 240 h sendo acompanhado biomassa (g.L⁻¹), pH, açúcares redutores totais – ART (g.L⁻¹) e carotenoides (µg.L⁻¹). A partir desses dados foram calculados os fatores de conversão e produtividade conforme descrito no item 4.9.4.

4.8 Influência da agitação e aeração na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em biorreator

Os ensaios de produção foram realizados em biorreator da marca Biostat de 2 L (volume útil de 1,5 L) a 25 °C e pH inicial de 6,0, com monitoramento de pH e temperatura durante 168 h, com acompanhamento de biomassa (g.L^{-1}), pH, açúcares redutores totais – ART (g.L^{-1}) e carotenoides ($\mu\text{g.L}^{-1}$). A partir desses dados foram calculados os fatores de conversão e produtividade conforme descrito no item 4.9.4. As condições estudadas foram 158 rpm/1,2 vvm e 158 rpm/1,2 vvm.

4.9 Métodos Analíticos

4.9.1 Acompanhamento de biomassa, pH e açúcares redutores totais

Para acompanhamento do processo foram retiradas amostras a cada 24 h de produção para análise de biomassa, pH e açúcares redutores totais. As amostras foram submetidas a centrifugação (1745xg) por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para leitura de pH e análise açúcares e a biomassa foi lavada com água destilada e novamente centrifugada pra posterior análise de concentração celular.

A concentração de biomassa ao longo do processo foi estimada por leitura de absorbância a 620 nm, através de curva padrão de biomassa (CHOI e PARK, 2003).

O pH foi determinado através da leitura da amostra em potenciômetro (AOAC, 2000) e para acompanhamento de açúcares redutores totais (ART) foi utilizado o método do Ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), com curva padrão de glicose e prévia hidrólise ácida das amostras (MALDONADE, CARVALHO, FERREIRA, 2013).

4.9.2 Rompimento celular e obtenção do extrato carotenogênico

Para a determinação da concentração de carotenoides, a biomassa foi seca por 48 h a 35°C (FONSECA et al., 2011), posteriormente macerada com gral e pistilo e padronizada em peneira com mesh 115. As amostras foram congeladas por 48 h a -18 °C (CIPOLATTI, 2012).

O processo de rompimento celular se deu por técnica química aplicando-se dimetil sulfoxido (DMSO), seguindo a metodologia de Michelin et al. (2012). Em tubos contendo 0,05 g de biomassa foram adicionado 2 mL de DMSO a 55 °C e homogeneizadas por 1 min em vórtex, em intervalos de tempo de 15 min, até completar 1 h de contato (FONSECA et al., 2011).

Após a ruptura foram adicionados 6 mL de acetona, a fim de promover a extração dos carotenoides. A amostra foi centrifugada a 1745xg por 10 min. A fase solvente separada e o procedimento de ruptura repetido até o branqueamento total das células. Aos sobrenadantes, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (m.v⁻¹) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases a fase apolar foi filtrada com sulfato de sódio (Na₂SO₄), dando origem aos extratos carotenogênicos (MICHELON, et al., 2012).

4.9.3 Determinação de carotenoides totais

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) através do valor médio da máxima absorbância a 448 nm, utilizando a Equação 1, e sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (CIPOLATTI, 2012), β-caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de 2592, de acordo com Davies (1976).

$$CT = \frac{A*V*10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%}*100*m_{amostra}} \quad (1)$$

Onde: CT = concentração específica de carotenoides totais (µg.g⁻¹); A = absorvância; V = volume (mL); m_{amostra} = massa celular seca (g); A_{1cm}^{1%} = absortividade específica.

Os valores de carotenoides totais específicos foram convertidos a valores de carotenoides totais volumétricos (µg.L⁻¹) utilizando-se a concentração de biomassa (g.L⁻¹).

4.9.4 Parâmetros cinéticos

Para obtenção dos parâmetros cinéticos foram utilizados os dados obtidos nas metodologias analíticas, tendo sido calculados segundo HISS (2001).

A velocidade específica máxima de crescimento - µ_{máx} (h⁻¹) foi calculada com auxílio do Software Grapher 8, através da regressão linear da fase exponencial, através da equação 2.

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

Os fatores de conversão de substrato em produto - Y_{p/s} (µg.g⁻¹), substrato em biomassa - Y_{x/s} (g.g⁻¹) e biomassa em produto - Y_{p/x} (µg.g⁻¹) foram calculados através das equações 3, 4 e 5, respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{P_m - P_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

$$Y_{p/x} = \frac{P_m - P_0}{X_m - X_0} \quad (5)$$

Onde: X_m = concentração de biomassa máxima (g.L^{-1}); X_0 = concentração de biomassa inicial (g.L^{-1}); P_m = concentração máxima de carotenoides ($\mu\text{g.L}^{-1}$); P_0 = concentração inicial de carotenoides ($\mu\text{g.L}^{-1}$); S = concentração inicial de ART (g.L^{-1}); S_0 = concentração final de ART (g.L^{-1}).

Para a avaliação do desempenho do processo fermentativo, foram calculadas as produtividades em carotenoides - P_c ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e biomassa - P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), através das equações 6 e 7, respectivamente

$$P_c = \frac{P_m - P_0}{t_f} \quad (6)$$

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (7)$$

Onde: X_m = concentração de biomassa máxima (g.L^{-1}); X_0 = concentração de biomassa inicial (g.L^{-1}); P_m = concentração máxima de carotenoides ($\mu\text{g.L}^{-1}$); P_0 = concentração inicial de carotenoides ($\mu\text{g.L}^{-1}$); t_f = tempo de fermentação onde foi obtido o valor máximo de biomassa ou produto (h).

4.9.5 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Software Statística V 8.0 (Startsoft).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em frascos agitados

Na Tabela 4 está apresentado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³ com valores codificados (valores reais), assim como as respostas carotenoides totais, biomassa, velocidade específica máxima de crescimento, $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, $Y_{p/x}$, produtividade em biomassa (P_x) e produtividade em carotenoides (P_c).

A produção de carotenoides totais variou entre 89,5 (ensaio 6) a 565 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 13), para biomassa de 2,6 (ensaio 6) a 13,6 g.L^{-1} (ensaio 13), para $\mu_{\text{máx}}$ de 0,001 (ensaio 10) a 0,039 h^{-1} (ensaios 3, 9 e 7), para $Y_{p/s}$ de 0 (ensaio 10) a 10,87 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (ensaio 13), para $Y_{x/s}$ de 0,04 (ensaio 6) a 0,44 g.g^{-1} (ensaio 10), para $Y_{p/x}$ de 0 (ensaio 10) a 87,9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (ensaio 16), para P_x de 0,01 (ensaios 2, 6 e 14) a 0,07 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (ensaio 13), para P_c de 0 (ensaio 10) a 3,04 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (ensaio 16). A faixa de temperatura ideal para as leveduras em geral se encontra entre 25°C e 30°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008). É possível observar que os menores valores de algumas das respostas estudadas foram obtidos nos ensaios onde a temperatura foi mantida acima de 30°C (ensaios 2, 4, 6, 8, e 10), como observado na Figura 4. Na Tabela 5 estão apresentados os parâmetros cinéticos para a máxima produção de carotenoides, encontrada no ensaio 13 com 240 h de cultivo.

Segundo Frengova; Beshkova (2009), o efeito da temperatura depende da espécie do micro-organismo e muitas vezes manifesta-se nas variações de quantidade de carotenoides sintetizados. Um exemplo disso é o estudo de El-Banna; El-Razek; El-Mahdy (2012) onde foi demonstrado que a variação de temperatura de 15 a 35°C no cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis* levou a alteração na porcentagem de β -caroteno e toruleno produzidos. Quando a temperatura foi elevada até 30°C, o β -caroteno foi o carotenoide majoritário produzido pela levedura, representado até 60% da produção. Porém quando essa temperatura chegou a 35°C essa proporção sofreu inversão e o toruleno passou a representar 61% da produção total de carotenoides.

Tabela 4- Delineamento composto central rotacional 2^3 (valores codificados e reais) para avaliação do efeito das variáveis temperatura, agitação e pH

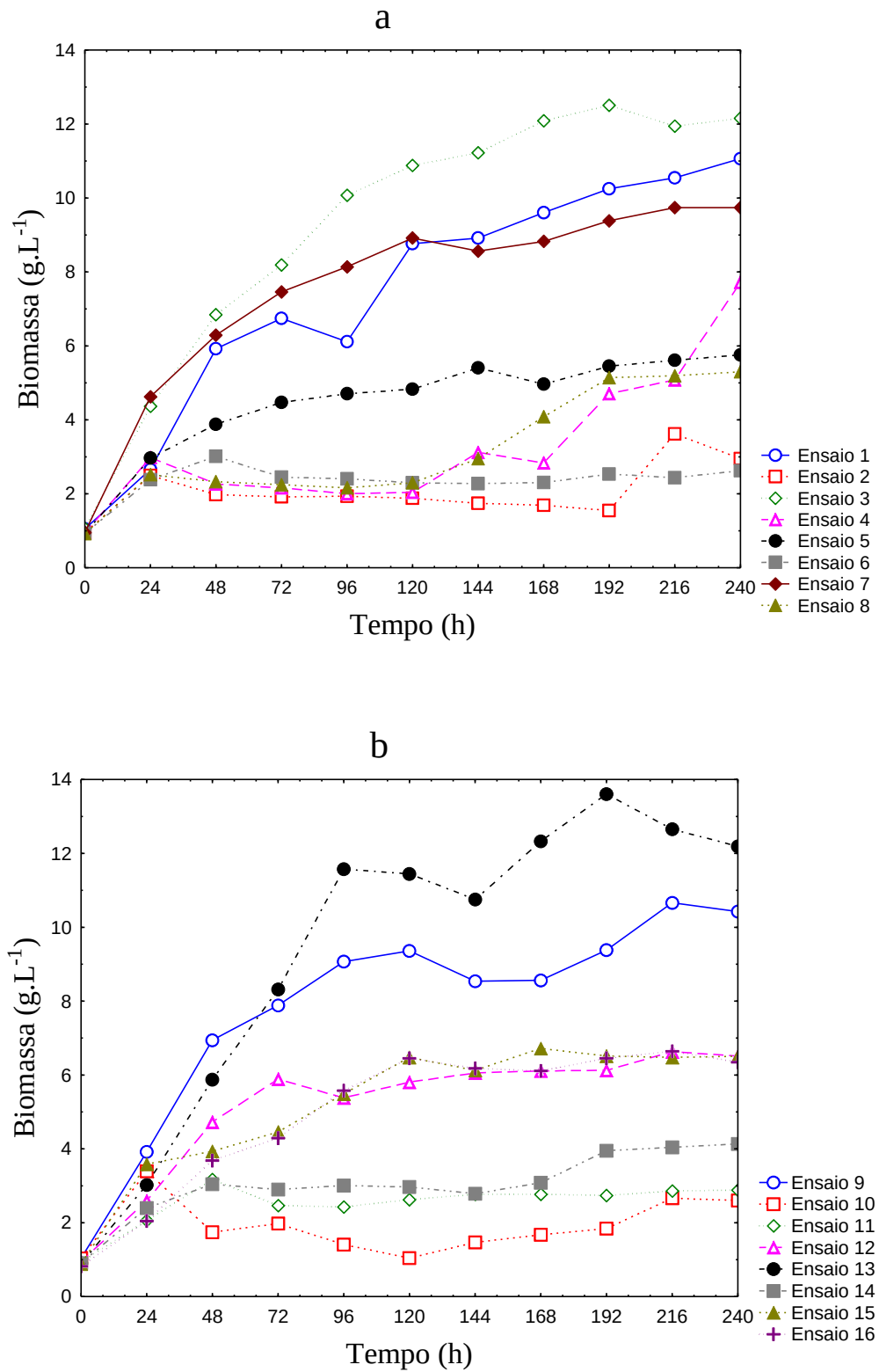
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1	-1,00 (23)	-1,00 (120)	-1,00 (5,2)	323,8 (192 h)	11,1(240 h)	0,036	6,52 (192 h)	0,20 (240 h)	28,3	0,04	1,47
2	1,00 (32)	-1,00 (120)	-1,00 (5,2)	164,5 (216 h)	3,6 (216 h)	0,002	2,86 (216 h)	0,07 (216 h)	42,9	0,01	0,52
3	-1,00 (23)	1,00 (180)	-1,00 (5,2)	412,4 (168 h)	12,5 (192 h)	0,039	7,76 (168 h)	0,22 (192 h)	33,6	0,06	2,28
4	1,00 (32)	1,00 (180)	-1,00 (5,2)	172,2 (240 h)	7,7 (240 h)	0,009	3,03 (240 h)	0,14 (240 h)	17,0	0,03	0,48
5	-1,00 (23)	-1,00 (120)	1,00 (7,2)	184,7 (120 h)	5,8 (240 h)	0,030	5,19 (120 h)	0,11 (240 h)	28,5	0,02	1,16
6	1,00 (32)	-1,00 (120)	1,00 (7,2)	89,5 (240 h)	2,6 (240 h)	0,024	1,56 (240 h)	0,04 (240 h)	40,8	0,01	0,29
7	-1,00 (23)	1,00 (180)	1,00 (7,2)	395,7 (144 h)	9,7 (216 h)	0,039	7,25 (144 h)	0,23 (216 h)	28,7	0,04	1,73
8	1,00 (32)	1,00 (180)	1,00 (7,2)	222,0 (216 h)	5,3 (240 h)	0,010	4,58 (216 h)	0,10 (240 h)	44,7	0,02	0,91
9	-1,68 (20)	0,00 (150)	0,00 (6)	287,4 (168 h)	10,7 (216 h)	0,039	4,91 4 (168 h)	0,27 (216 h)	17,0	0,04	0,98
10	1,68 (35)	0,00 (150)	0,00 (6)	136,8 (24 h)	3,4 (24 h)	0,001	0,00 (24 h)	0,44 (24 h)	0,0	0,10	0,00
11	0,00 (27,5)	-1,68 (100)	0,00 (6)	132,6 (48 h)	3,2 (48 h)	0,025	1,54 (48 h)	0,07(48 h)	22,3	0,05	1,07
12	0,00 (27,5)	1,68 (200)	0,00 (6)	232,2 (192 h)	6,6 (216 h)	0,025	4,56 (192 h)	0,19 (216 h)	22,9	0,03	0,67
13	0,00 (27,5)	0,00 (150)	-1,68 (4)	565,0 (240 h)	13,6 (192 h)	0,025	10,87 (240 h)	0,26 (192 h)	43,0	0,07	2,27
14	0,00 (27,5)	0,00 (150)	1,68 (8)	203,3 (144 h)	4,1 (240 h)	0,025	6,10 (144 h)	0,07 (240 h)	57,7	0,01	1,28
15	0,00 (27,5)	0,00 (150)	0,00 (6)	502,7 (168 h)	6,7 (168 h)	0,030	9,52 (168 h)	0,11 (168 h)	83,7	0,03	2,89
16	0,00 (27,5)	0,00 (150)	0,00 (6)	520 (168 h)	6,6 (216 h)	0,030	10,20 (168 h)	0,12 (216 h)	87,9	0,03	3,04

X₁: Temperatura (°C); X₂: Agitação (rpm); X₃: pH inicial; R₁: Carotenoides totais (µg.L⁻¹); R₂: Biomassa (g.L⁻¹); R₃: µ_{máx} (h⁻¹); R₄: Y_{p/s} (µg.g⁻¹); R₅: Y_{x/s} (g.g⁻¹); R₆: Y_{p/x}(µg.g⁻¹); R₇: P_x (g.L⁻¹.h⁻¹); R₈: P_c (µg.L⁻¹.h⁻¹).

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos calculados em função da produção máxima de carotenoides totais obtidos no ensaio 13 (240 h)

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
13	0,00 (27,5)	0,00 (150)	-1,68 (4)	565,0	12,2	0,025	10,87	0,23	48,3	0,05	2,27

X₁: Temperatura (°C); X₂: Agitação (rpm); X₃: pH inicial; R₁: Carotenoides totais (µg.L⁻¹); R₂: Biomassa (g.L⁻¹); R₃: µ_{máx} (h⁻¹); R₄: Y_{p/s} (µg.g⁻¹); R₅: Y_{x/s} (g.g⁻¹); R₆: Y_{p/x}(µg.g⁻¹); R₇: P_x (g.L⁻¹.h⁻¹); R₈: P_c (µg.L⁻¹.h⁻¹).

Figura 4- Acompanhamento de biomassa Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b)

O perfil de carotenoides de oito leveduras isoladas do ecossistema brasileiro, incluindo uma cepa de *Sporobolomyces*, foi avaliado após o cultivo de 5 dias em caldo YM a 25°C e agitação de 200 rpm. Foram identificados ao total nove carotenoides: fitoflueno, β -caroteno, β -zeacaroteno, γ -caroteno, neurosporeno, hidroxitoruleno, toruleno, echinenone, torilarrodina. Desses nove carotenoides, dois apresentaram-se como majoritários em todas as leveduras estudadas, o β -caroteno e o toruleno, sendo as relações entre os dois carotenoides variáveis conforme o micro-organismo (MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2008).

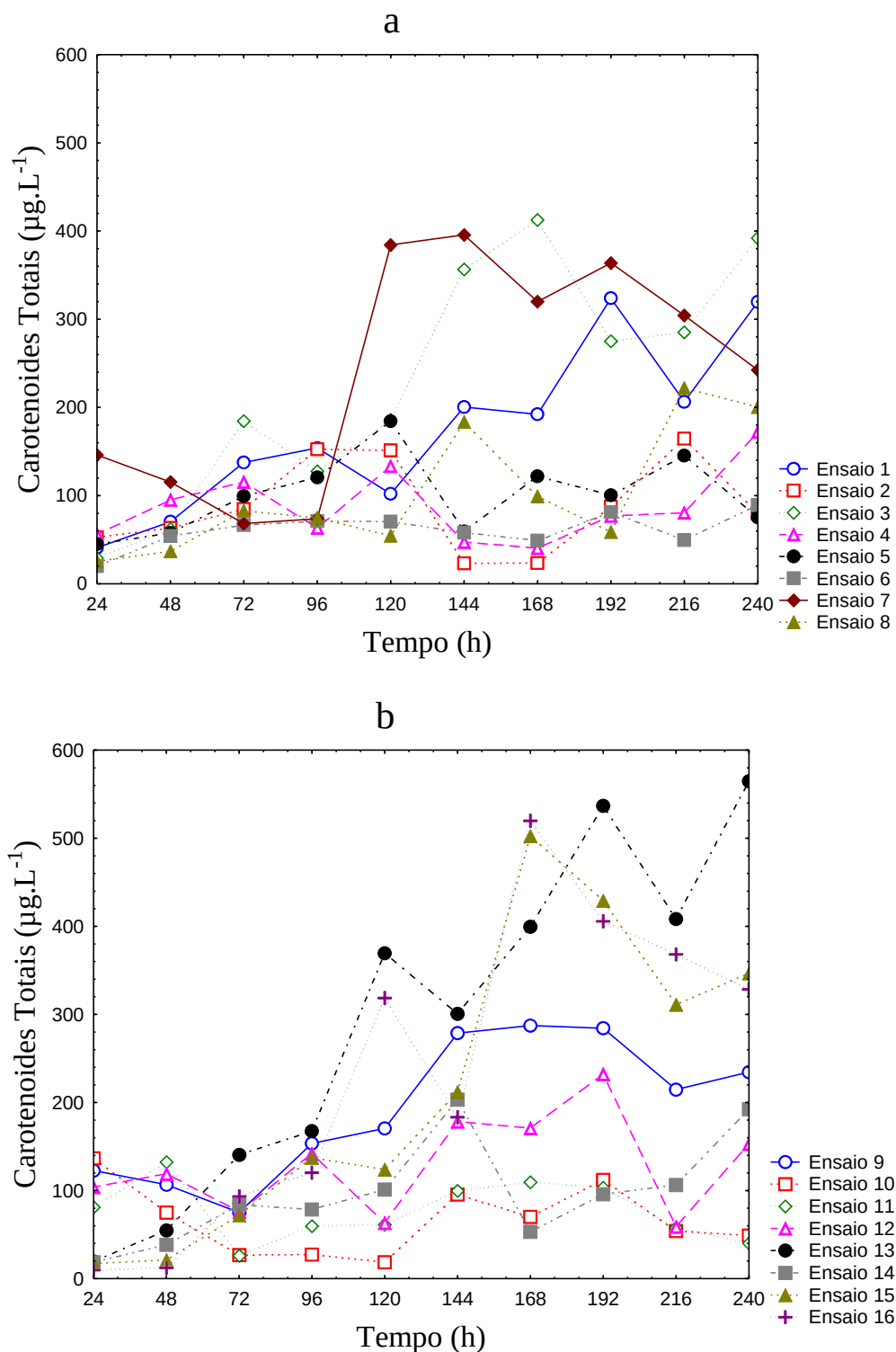
No presente trabalho a estimativa dos carotenoides totais foi realizada através da leitura espectrofotométrica, levando-se em consideração a absorvidade específica do carotenoide majoritário da levedura estudada que é o β -caroteno, conforme observado por Otero (2011). As menores produções encontradas nas temperaturas mais elevadas, assim como as quedas de concentração observadas durante o acompanhamento cinético da produção, principalmente entre 72 e 120 h (Figura 5) podem ter sido decorrentes da alteração no carotenoide majoritário.

Os maiores valores de carotenoides totais ($565 \mu\text{g.L}^{-1}$), biomassa ($13,6 \text{ g.L}^{-1}$) e conversão de substrato em produto ($Y_{p/s} = 10,87 \mu\text{g.g}^{-1}$) e produtividade em carotenoides foram obtidos no ensaio 13 (Tabela 4), onde as condições de temperatura e agitação foram mantidas em 27,5°C, 150 rpm (ponto central) e o pH = 4 (nível -1,68).

O acompanhamento do pH durante todos os ensaios (Figura 6) demonstrou que independente do pH inicial do meio de cultivo estar em faixa ácida ou alcalina, a maioria dos cultivos ao término do processo apresentou pH entre 7 e 8,2, com exceção dos ensaios 1 e 10 onde os pH finais ficaram na faixa de 5,5 a 6,5.

Essa maior produção de carotenoides em pH ácido já havia sido observado por Valduga, et al. (2008), que em cultivo (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0) de *S. salmonicolor* em meio compostos por 10 g.L^{-1} de melaço, 5 g.L^{-1} de água de maceração de milho e 5 g.L^{-1} de Prodex Lac[®], pré-tratado com ácido sulfúrico, alcançou uma produção de $541,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Cabral, et al. (2011), também utilizando *S. pararoseus*, em meio composto por 60 g.L^{-1} de glicose, 15 g.L^{-1} de extrato de malte, 15 g.L^{-1} de peptona, 180 rpm, 25°C e pH inicial 4,0 alcançaram produção de $856 \mu\text{g.L}^{-1}$ de carotenoides totais e $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Esse valor superior ao encontrado no presente trabalho, para carotenoides totais e inferior para biomassa pode ser ocasionado pela formulação mais complexa do meio em comparação ao meio agroindustrial utilizado neste trabalho (melaço e água de maceração de milho), assim como pela diferença do tipo de açúcar presente em maior concentração no meio.

Figura 5- Acompanhamento de carotenoides totais Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b)

A interferência causada pelo tipo de açúcar no meio de cultivo foi verificada por Aksu; Eren (2005), ao cultivarem *R. mucilaginosa* com 15 g.L^{-1} de glicose e observaram que a carotenogênese apresentou-se fortemente relacionada ao desenvolvimento celular.

Para a mesma concentração de sacarose a produção de carotenoides esteve parcialmente associada ao crescimento. Ao utilizar $13,2 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose foi possível perceber que o desenvolvimento celular e a produção de pigmento não apresentou associação.

Na maioria dos ensaios foi observado que entre 0 e 48 h ocorreram quedas de pH com posterior aumento até valores alcalinos. Esse comportamento já havia sido observado por Machado; Burkert (2015) utilizando a mesma cepa de *S. pararoseus* e com o mesmo meio agroindustrial nas condições de 180 rpm, 25°C, pH inicial 6,0, obtendo $555,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, onde nas primeiras 12 h o pH apresentou um decréscimo, com posterior aumento até 72 h (pH 7 e 8). Essas mudanças no pH ocorrem provavelmente em consequência do desenvolvimento celular e a liberação de compostos como ácido acético, álcool ou intermediários do ciclo do ácido cítrico durante a fase de adaptação, causando a redução do pH. A partir de 72 h, a levedura provavelmente inicia a reassimilação desses intermediários passando a estimular a carotenogênese, levando a elevação do pH, que mantém-se praticamente constante no final do processo (VALDUGA et al., 2009).

Durante o cultivo de *Escherichia coli* modificada geneticamente para produção de carotenoides, Nguyen, et al. (2012), observaram que em pH 8,0 o meio de cultura apresentou uma coloração alaranjada mais escura e intensa do que em pH neutro. Quando realizado um espectro de varredura dos extratos obtidos de células cultivadas nas duas condições, foram encontrados 3 picos de absorção para cada um dos extratos 430, 454 e 480 nm no cultivo em pH neutro, caracterizando a presença de β -caroteno e picos de absorção em 454, 472 e 504 nos extratos proveniente de cultivo em pH levemente alcalino, sendo que os dois últimos picos característicos da presença de licopeno. Para a confirmação dessas observações foram realizadas análises em HPLC, que indicaram a produção de licopeno ao invés do β -caroteno quando o cultivo foi realizado em pH levemente alcalino, enquanto que o cultivo em pH neutro resultou apenas em β -caroteno.

Nos ensaios 1 (96-120 h), 3, 4 e 12 (72-96 h), 8 (72-120 h), 9 (48-72h) e 14 (144-192 h) ocorrem quedas acentuadas na concentração de carotenoides totais, sempre acompanhada de uma leve alcalinidade no meio (com pH entre 7 e 8). Desses sete ensaios apenas dois (ensaios 4 e 8) tinham temperatura de cultivo acima de 30°C. Isso provavelmente ocorreu devido à interferência da temperatura sobre o metabolismo da levedura levando a desenvolvimento celular e carotenogênese menores.

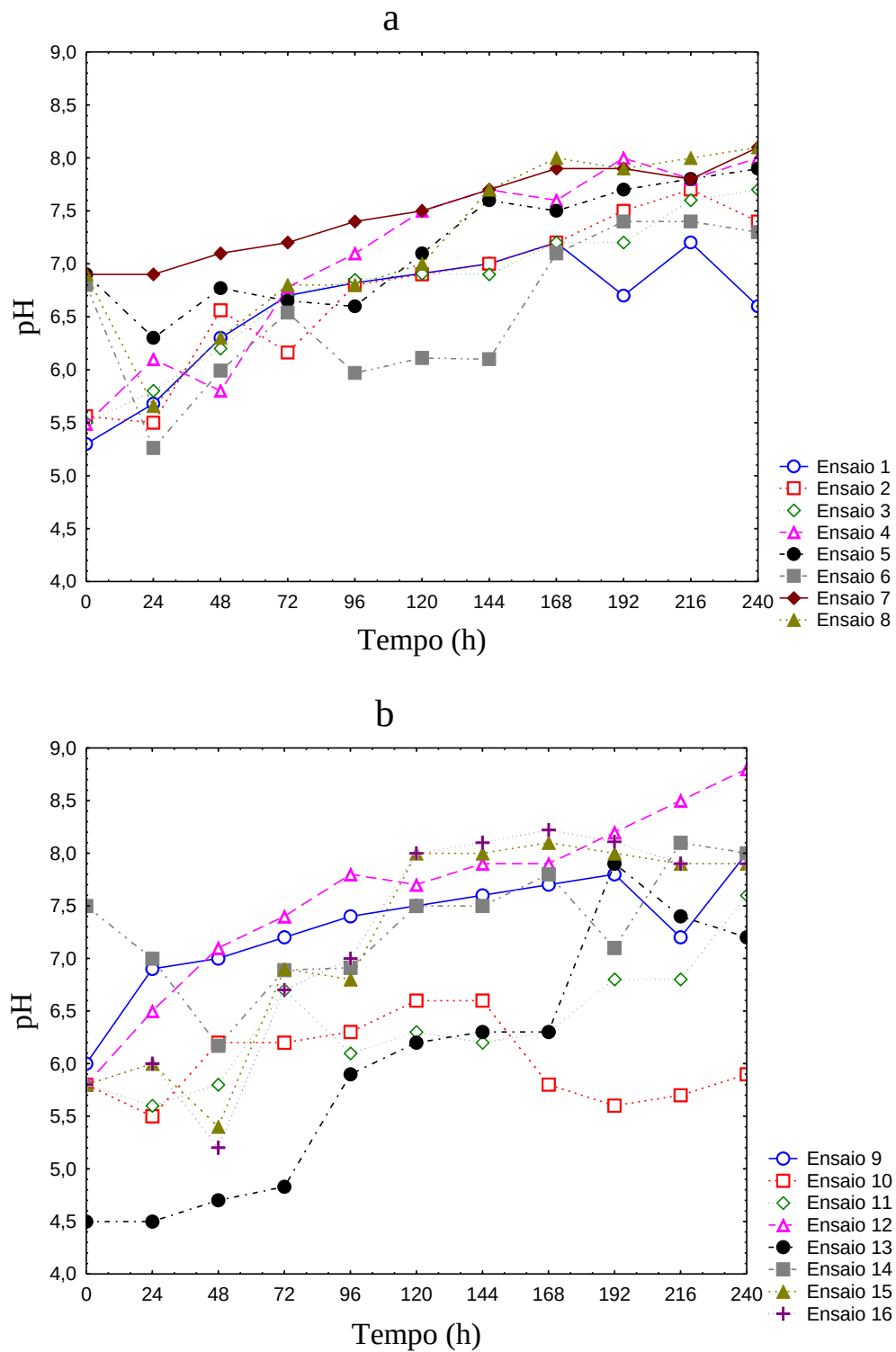
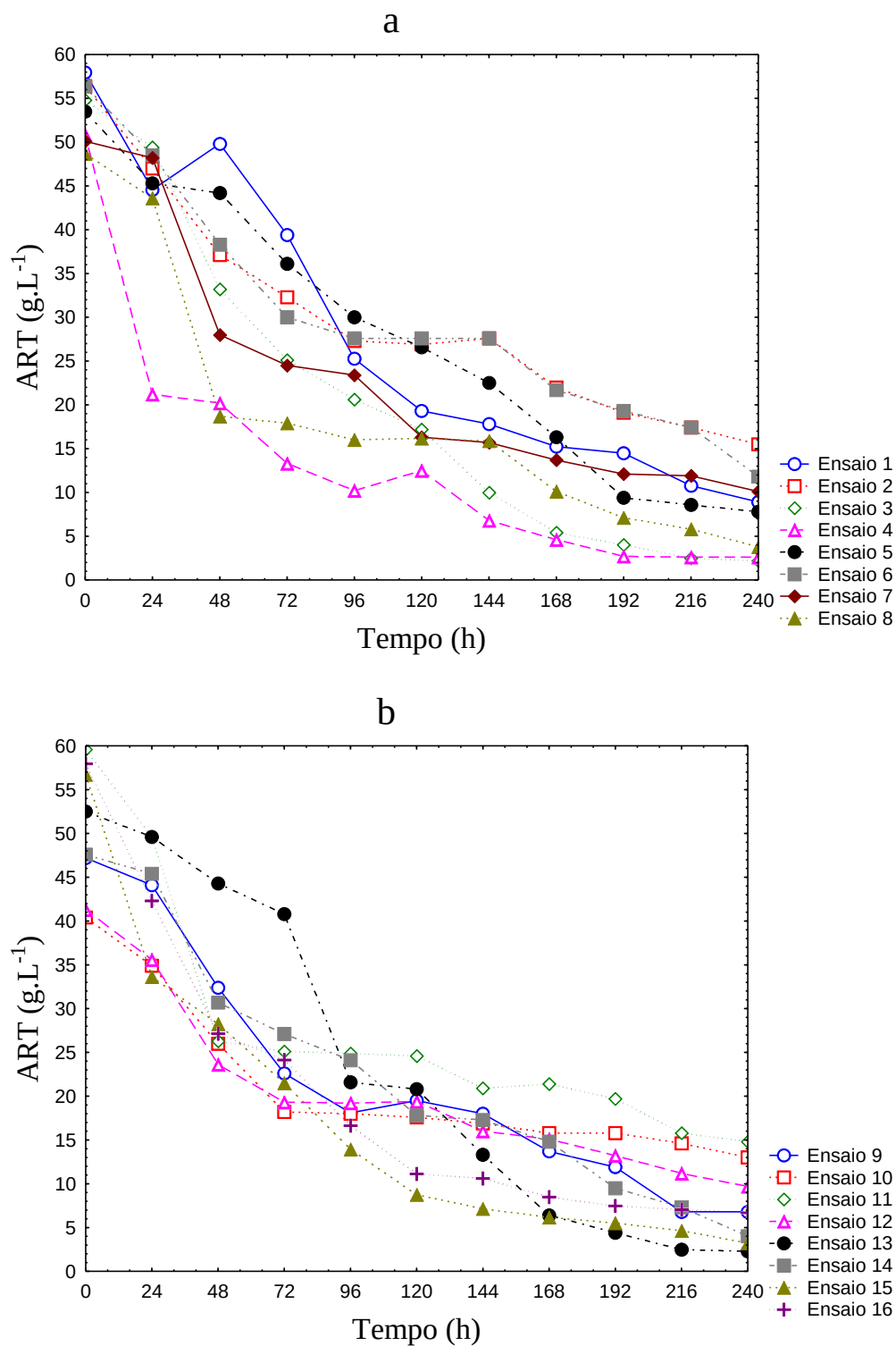
Figura 6- Acompanhamento de pH Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b)

Figura 7- Acompanhamento de açúcares redutores totais Ensaio 1 a 8 (a) e Ensaio 9 a 16 (b).



Na Figura 7 está apresentado o acompanhamento do consumo de substrato, avaliado como concentração de açúcares redutores totais. O consumo do substrato durante

os cultivos variou de 68 (ensaio 10) a 96% (ensaio 3). Os ensaios onde o consumo de substrato foi maior ocorreram com 180 rpm (nível +1) e 200 rpm (nível +1,68). O menor consumo de substrato em agitações inferiores a 150 rpm ocasionou os três menores valores de $Y_{p/s}$ (1,54; 1,56; 2,86 $\mu\text{g.g}^{-1}$) e $Y_{x/s}$ (0,07; 0,04; 0,07 g.g^{-1}) nos ensaios 11, 6 e 2, com exceção do ensaio 10, que apesar da agitação ter sido de 150 rpm apresentou $Y_{p/s}$ próximo a zero, provavelmente pela temperatura se encontrar em 35°C (nível +1,68).

Em agitações de 100 a 150 rpm a *Rhodotorula glutinis* apresentou menor crescimento celular, provavelmente pela diminuição de nutrientes disponíveis na superfície das células, enquanto que altas taxas de agitação (superiores a 250 rpm) causaram a ruptura celular da levedura (TINOI, et al., 2005).

5.1.1 Avaliação do DCCR para as respostas estudadas

Considerando as variáveis temperatura (°C), agitação (rpm) e pH foi realizada a verificação dos modelos de segunda ordem analisando as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{\text{máx}}$, conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e produtividade em carotenoides (P_c).

Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, erro padrão e limites de confiança apresentados no Apêndice 3. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA) estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Na Tabela 6 para as respostas carotenoides totais e conversão de substrato em produto percebe-se que os coeficientes temperatura linear (L) e quadrático (Q), agitação (L e Q) e pH (L) do modelo foram significativos ($p < 0,1$). Na resposta biomassa os coeficientes temperatura e agitação (L) e pH (L e Q) do modelos foram significativos ($p < 0,1$). Na velocidade específica máxima apenas o coeficiente temperatura (L e Q) foi significativo, juntamente com sua interação com o pH ($p < 0,1$).

Para conversão de substrato em biomassa apenas o coeficiente quadrático da temperatura foi significativo ($p < 0,1$). Para produtividade em carotenoides foram significativos os coeficientes da temperatura (L e Q), da agitação (Q) e pH (Q). Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 7.

Tabela 6- Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância (p) para as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{\text{p/s}}$, e P_c

Carotenoides Totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					Biomassa (g.L^{-1})				
	CR	EP	t(6)	p		CR	EP	t(6)	p
Média*	511,16	50,80	10,06	<0,01	Média*	6,61	0,90	7,34	p<0,01
X₁(L)*	-67,53	39,02	-3,46	0,01	X₁(L)*	-2,36	0,69	-6,81	p<0,01
X₁(Q)*	-105,59	47,42	-4,45	p<0,01	X₁(Q)	0,22	0,84	0,52	0,62
X₂(L)*	44,51	39,02	2,28	0,06	X₂(L)*	1,30	0,69	3,77	p<0,01
X₂(Q)*	-116,09	47,42	-4,90	p<0,01	X₂(Q)	-0,54	0,84	-1,29	0,24
X₃(L)*	-57,80	39,02	-2,96	0,02	X₃(L)*	-2,01	0,69	-5,81	p<0,01
X₃(Q)	-44,63	47,42	-1,88	0,11	X₃(Q)*	0,85	0,84	2,04	0,09
X₁X₂	-19,92	50,96	-0,78	0,46	X₁X₂	0,19	0,90	0,41	0,69
X₁X₃	16,32	50,96	0,64	0,54	X₁X₃	0,59	0,90	1,30	0,24
X₂X₃	30,90	50,96	0,21	0,27	X₂X₃	0,14	0,90	0,30	0,77

$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})					$Y_{\text{p/s}}$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$)				
	CR	EP	t(6)	p		CR	EP	t(6)	p
Média*	0,0299	<0,01	9,79	p<0,01	Média*	9,81	0,76	12,89	p<0,01
X₁(L)*	-0,0119	<0,01	-10,17	p<0,01	X₁(L)*	-1,68	0,58	-5,75	p<0,01
X₁(Q)*	-0,0034	<0,01	-2,37	0,05	X₁(Q)*	-2,50	0,71	-7,06	p<0,01
X₂(L)	0,0004	<0,01	0,31	0,76	X₂(L)*	0,84	0,58	2,90	0,03
X₂(Q)	-0,0016	<0,01	-1,12	0,30	X₂(Q)*	-2,29	0,71	-6,46	p<0,01
X₃(L)	0,0012	<0,01	1,06	0,33	X₃(L)*	-0,70	0,58	-2,41	0,05
X₃(Q)	-0,0016	<0,01	-1,12	0,30	X₃(Q)	-0,37	0,71	-1,04	0,34
X₁X₂	-0,0024	<0,01	-1,55	0,17	X₁X₂	-0,01	0,76	-0,04	0,97
X₁X₃	0,0036	<0,01	2,36	0,05	X₁X₃	0,26	0,76	0,68	0,52
X₂X₃	-0,0019	<0,01	-1,22	0,27	X₂X₃	0,45	0,76	1,20	0,27

P_c ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)				
	CR	EP	t(6)	p
Média*	2,945	0,29	10,04	p<0,01
X₁(L)*	-0,447	0,22	-3,97	p<0,01
X₁(Q)*	-0,834	0,27	-6,09	p<0,01
X₂(L)	0,09	0,22	0,84	0,43
X₂(Q)*	-0,07	0,27	-5,11	p<0,01
X₃(L)	-0,170	0,22	-1,51	0,18
X₃(Q)*	-0,377	0,27	-2,75	0,03
X₁X₂	-0,099	0,29	-0,67	0,52
X₁X₃	0,132	0,29	0,90	0,40
X₂X₃	0,052	0,29	0,35	0,73

*(p < 0,1); X₁: temperatura; X₂: agitação; X₃: pH

Os coeficientes de determinação (R^2) de 0,82; 0,90; 0,90; 0,93 e 0,87 foram calculados na ANOVA (Tabela 7), respectivamente, para carotenoides totais, biomassa, velocidade específica máxima, conversão de substrato em produto e produtividade em carotenoides, com isso pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão $F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$ foi de 3,6 (carotenoides totais), 10 (biomassa), 13,4 ($\mu_{\text{máx}}$), 10,8 ($Y_{\text{p/s}}$), 6,4 (P_c).

Tabela 7- Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2³

Carotenoides Totais						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	R²
Regressão	282612,9	5	56522,6	9	3,6	0,82
Resíduo	62522,2	10	6252,2			
Total	345135,1	15				
Biomassa						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	R²
Regressão	165,5	4	41,4	25,3	10	0,90
Resíduo	17,97	11	1,6			
Total	183,5	15				
μ_{máx}						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	R²
Regressão	0,0021	3	0,00071	35	13,4	0,90
Resíduo	0,0002	12	0,00002			
Total	0,0024	15				
Y_{p/s}						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	R²
Regressão	142,8	5	28,5	27,2	10,8	0,93
Resíduo	10,5	10	1,0			
Total	153,2	15				
P_c						
Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	R²
Regressão	10,6	4	1,6	16,2	6,4	0,85
Resíduo	1,8	11	0,2			
Total	12,4	15				

Carotenoides Totais: F_{tab} = 2,52; Biomassa: F_{tab} = 2,54; μ_{máx}: F_{tab} = 2,61; Y_{p/s}: F_{tab} = 2,52; P_c: F_{tab} = 2,54

A partir da análise dos coeficientes de regressão foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento as respostas em funções das variáveis carotenoides totais - CT (Equação 8), biomassa (Equação 9), μ_{máx} (Equação 10), Y_{p/s} (Equação 11) e P_c (Equação 12).

$$\text{CT } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 441,1 - 67,5*T - 86,8*T^2 - 44,5*A - 97,3*A^2 - 57,8*\text{pH} - 44,6*\text{pH}^2 \quad (8)$$

$$\text{Biomassa } (\text{g.L}^{-1}) = 6,3 - 2,3*T + 1,30*A - 2,0*\text{pH} + 0,9 \text{ pH}^2 \quad (9)$$

$$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1}) = 0,03 - 0,012*T - 0,002*T^2 + 0,004*T*\text{pH} \quad (10)$$

$$Y_{\text{p/s}} (\mu\text{g.L}^{-1}) = 9,2 - 1,7*T - 2,3*T^2 + 0,8*A - 2,1*A^2 - 0,7*\text{pH} \quad (11)$$

$$P_c (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 2,9 - 0,4*T - 0,8*T^2 - 0,7*A^2 - 0,4* \text{pH}^2 \quad (12)$$

Nas Figuras 8, 9, 10, 11 e 12, estão apresentadas as curvas de contorno geradas a partir dos modelos acima. Observando Figura 8a, b e c percebe-se que para produção máxima de carotenoides totais a agitação deve ser mantida entre 144 e 170 rpm, combinado com a temperatura entre 24 e 27,5°C e pH entre 4 e 4,2.

Para a máxima produção de biomassa (Figura 9), a agitação deve ser mantida entre 192 e 200 rpm, a uma temperatura de 20 a 21 °C e pH inicial de 4 a 4,3. Para a velocidade específica máxima o pH deve ser mantido na faixa de 4 a 4,4 e a temperatura de 20 a 21 °C, como mostra a Figura 10.

Para uma maximização da conversão de substrato em produto (Figura 11) a agitação deve ser mantida entre 140 e 171 rpm, a temperatura entre 23,5 e 28,5°C e o pH entre 4 e 4,8. Para a maximização da produtividade em carotenoides (Figura 12) a agitação deve ser mantida entre 132 a 168 rpm, temperaturas de 25 a 27,5°C e pH de 5,4 a 6,6.

Como o objetivo principal deste trabalho é a maximização da produção de carotenoides totais, as faixas selecionadas são de 144 a 170 rpm, temperatura de 24 a 27,5 °C e pH de 4 a 4,2.

Como forma de validar a condição do modelo foi realizada a produção de carotenoides totais a 27,5°C, 150 rpm e pH inicial 4,0 (Figura 13). Nesse ensaio foram obtidos 591,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, aproximadamente 43% a mais do que o previsto pelo modelo representado pela equação 8.

A avaliação dos coeficientes de regressão e assim o desenvolvimento de modelos para as variáveis respostas fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{\text{p/x}}$) e produtividade em biomassa (P_x) na faixa estudada não foi estatisticamente significativa ($p > 0,1$). Sendo que seus efeitos estão apresentados no Apêndice 3.

Figura 8- Curvas de contorno para produção de carotenoides totais: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b), pH X agitação (c)

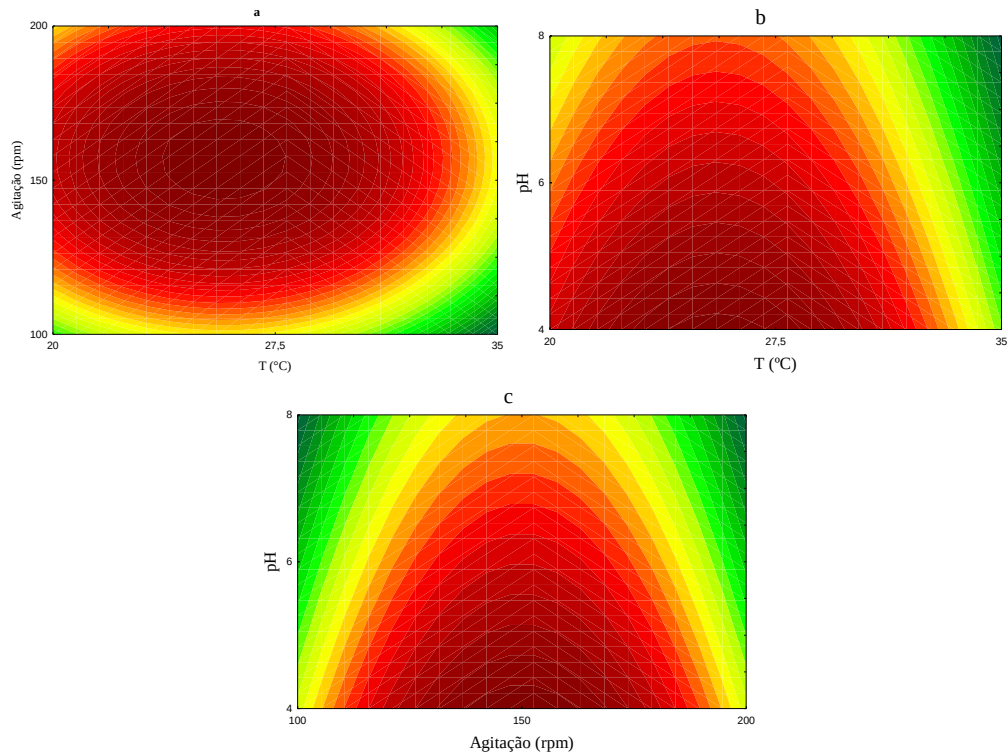


Figura 9- Curvas de contorno para produção de biomassa: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b), pH X agitação (c)

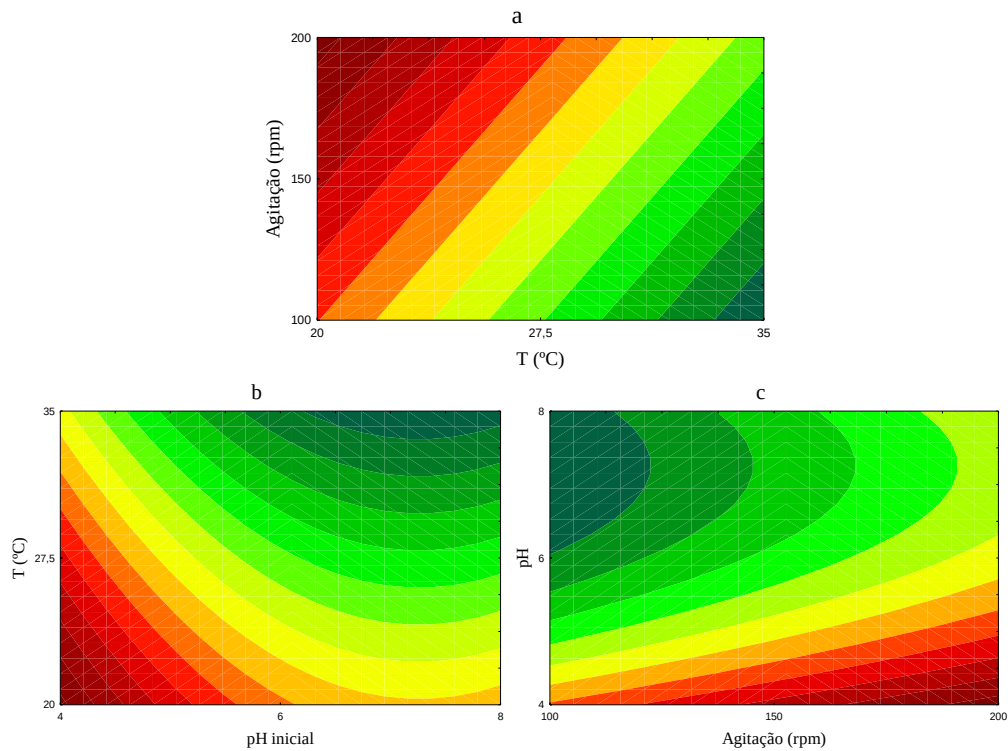


Figura 10- Curva de contorno para $\mu_{\text{máx}}$: pH X temperatura

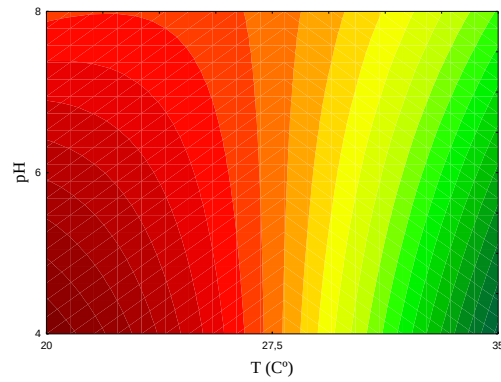


Figura 11- Curva de contorno para $Y_{p/s}$: agitação X temperatura (a), pH X temperatura (b) e pH X agitação (c)

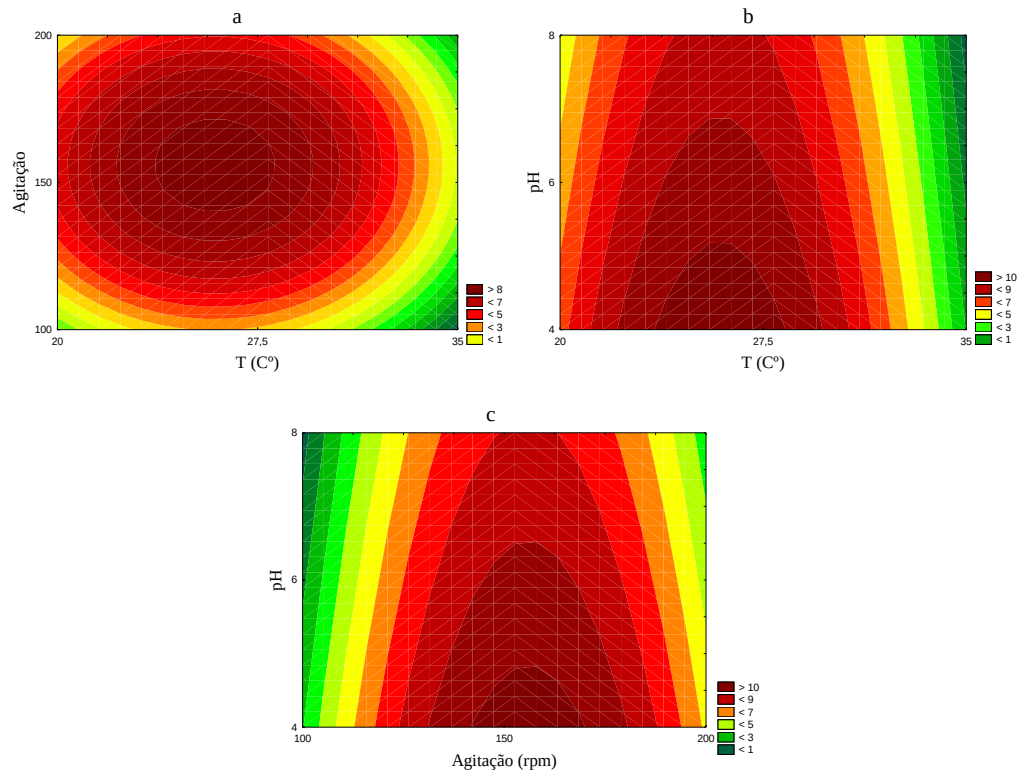


Figura 12- Curva de contorno para Pc: agitação X temperatura (a), pH X T (b), pH X agitação (c)

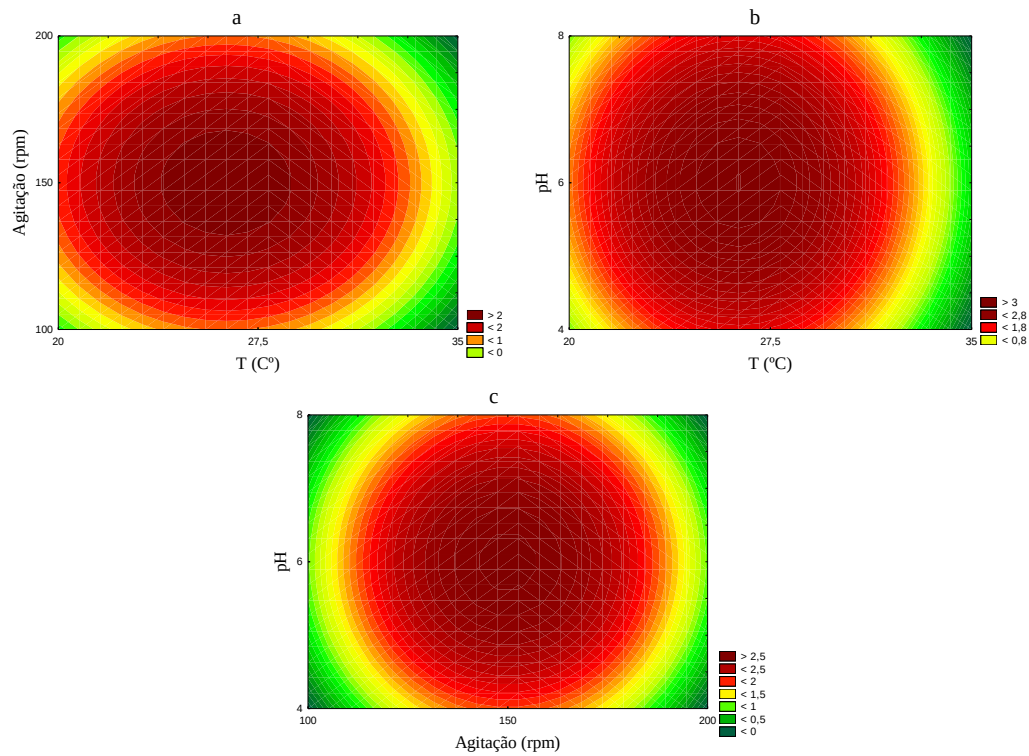
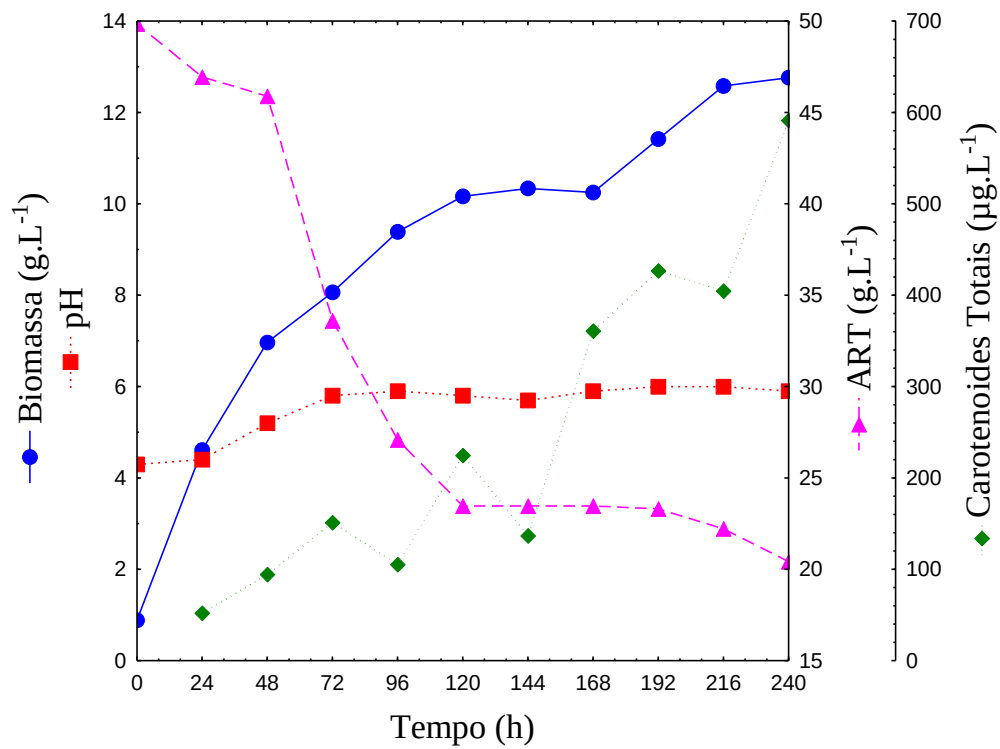


Figura 13 - Acompanhamento Cinético da bioprodução de carotenoides (27,5°C, 150 rpm e pH inicial 4,0)



5.2 Diminuição da faixa de pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$

Na tabela 7 está apresentado o delineamento composto central 2^2 valores codificados (valores reais), das variáveis independentes pH (3 a 5) e relação entre volume de meio e o volume do reator, utilizando frascos do tipo *Erlenmeyer*, assim como as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{\text{p/s}}$, $Y_{\text{x/s}}$, $Y_{\text{p/x}}$, P_{x} e P_{c} .

Esse segundo planejamento teve como objetivo avaliar a diminuição da faixa de pH estudado, como indicava a superfície de resposta apresentada nas Figuras 8(b) e (c). Além disso, desejava-se saber se o aumento ou diminuição do volume do meio utilizado poderia interferir nas respostas.

Os valores da resposta carotenoides totais variaram entre 204,7 (ensaio 2) a 591,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 5), biomassa de 4,6 (ensaio 4) a 13,6 g.L^{-1} (ensaio 1), $\mu_{\text{máx}}$ de 0,021 (ensaio 2) a 0,042 h^{-1} (ensaios 1 e 5), $Y_{\text{p/s}}$ de 1,05 (ensaio 1) a 18,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ensaio 5), $Y_{\text{x/s}}$ de 0,08 (ensaio 4) a 0,40 g.g^{-1} (ensaio 5), $Y_{\text{p/x}}$ de 21,2 (ensaio 2) a 46,9 g.g^{-1} (ensaio 4), P_{x} de 0,02 (ensaio 4) a 0,07 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (ensaio 1), P_{c} de 0,66 (ensaio 2) a 2,50 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (ensaio 1).

Tabela 8- Delineamento composto central 2^2 (valores codificados e reais) para avaliação do efeito das variáveis pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$

E	X ₁	X ₂	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1	-1,00 (3)	-1,00 (3:10)	463,9 (168h)	13,6 (192h)	0,042	1,05 (168h)	0,28 (192h)	33,4	0,07	2,50
2	1,00 (5)	-1,00 (3:10)	204,7 (240h)	8,5 (240h)	0,021	3,33 (240 h)	0,16 (240 h)	21,2	0,03	0,66
3	-1,00 (3)	1,00 (7:10)	468,4 (240h)	12,2 (240h)	0,025	8,12 (240 h)	0,23 (240 h)	35,3	0,05	1,66
4	1,00 (5)	1,00 (7:10)	265,8 (120h)	4,6 (168h)	0,028	3,67 (120 h)	0,08 (168 h)	46,9	0,02	1,41
5	0 (4)	0 (1:2)	591,4 (240h)	12,8 (240h)	0,042	18,35 (240 h)	0,40 (240 h)	45,3	0,05	2,25

X1: pH; X2: $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$; R1: Carotenoides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$); R2: Biomassa (g.L^{-1}); R3: $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}); R4: $Y_{\text{p/s}}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$); R5: $Y_{\text{x/s}}$ (g.g^{-1}); R6: $Y_{\text{p/x}}$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$); R7: P_{x} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); R8: P_{c} ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Aproximadamente 90% das menores respostas avaliadas foram encontradas nas condições dos ensaios 2 ou 4, ambos com pH 5,0 (nível +1). A maioria das variáveis relacionadas a biomassa (concentração de biomassa, $Y_{\text{x/s}}$ e P_{x}) apresentaram seus menores valores no ensaio 4, onde além do pH 5 a relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ estava no nível +1 (350 mL de meio em reator de 500 mL). Esse maior volume de meio, provavelmente levou a maior

difículdade na dissolução do oxigênio no meio diminuindo a taxa de transferência de oxigênio (TTO). Para as variáveis relacionadas à carotenogênese (carotenoides totais, $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$), os valores mais elevados foram encontrados no ensaio 5, onde o pH e a relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ foram pH 4 e 1:2 (ponto central), respectivamente. Condição está já confirmada anteriormente no DCCR.

Figura 14- Acompanhamento de biomassa (a), pH (b)

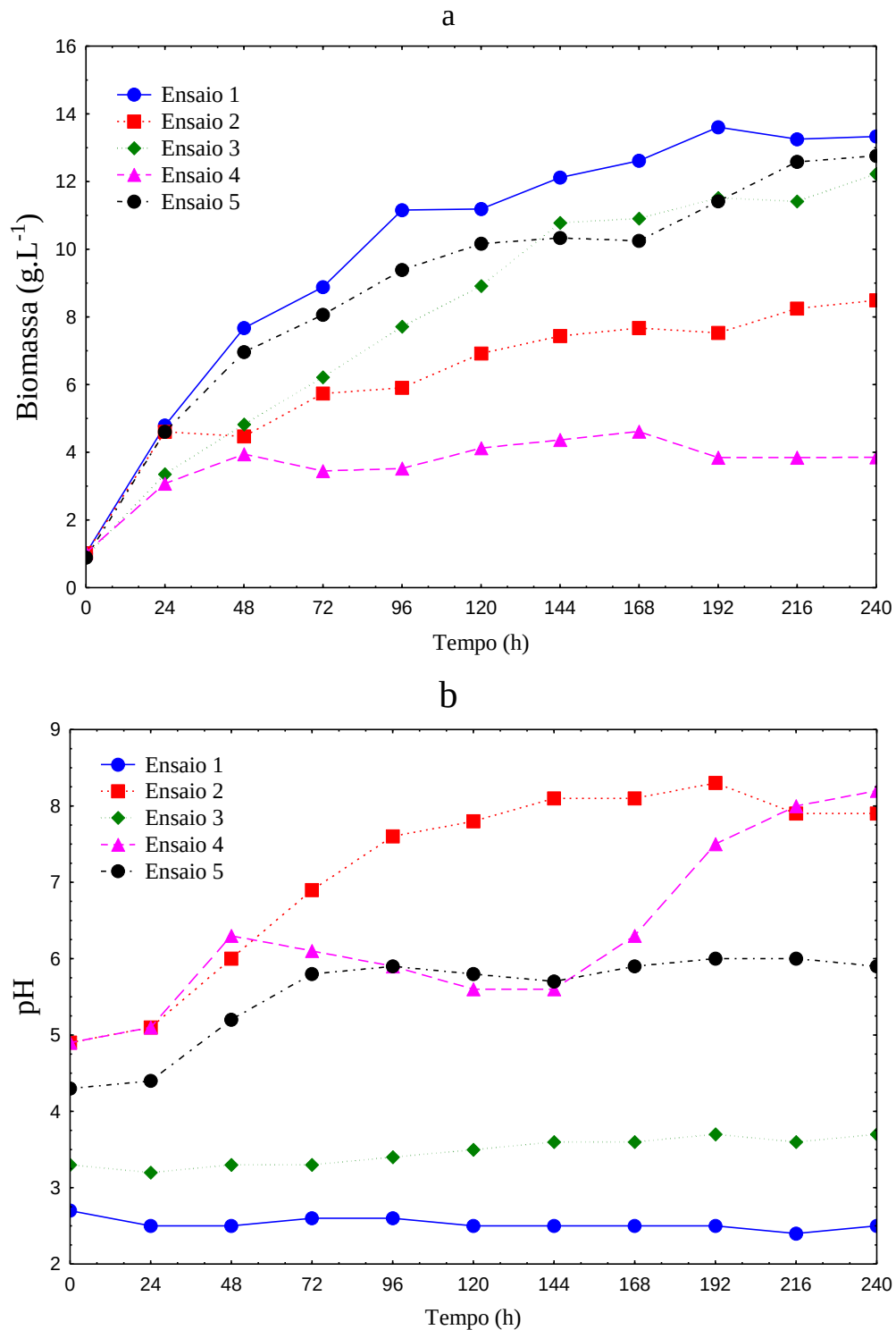
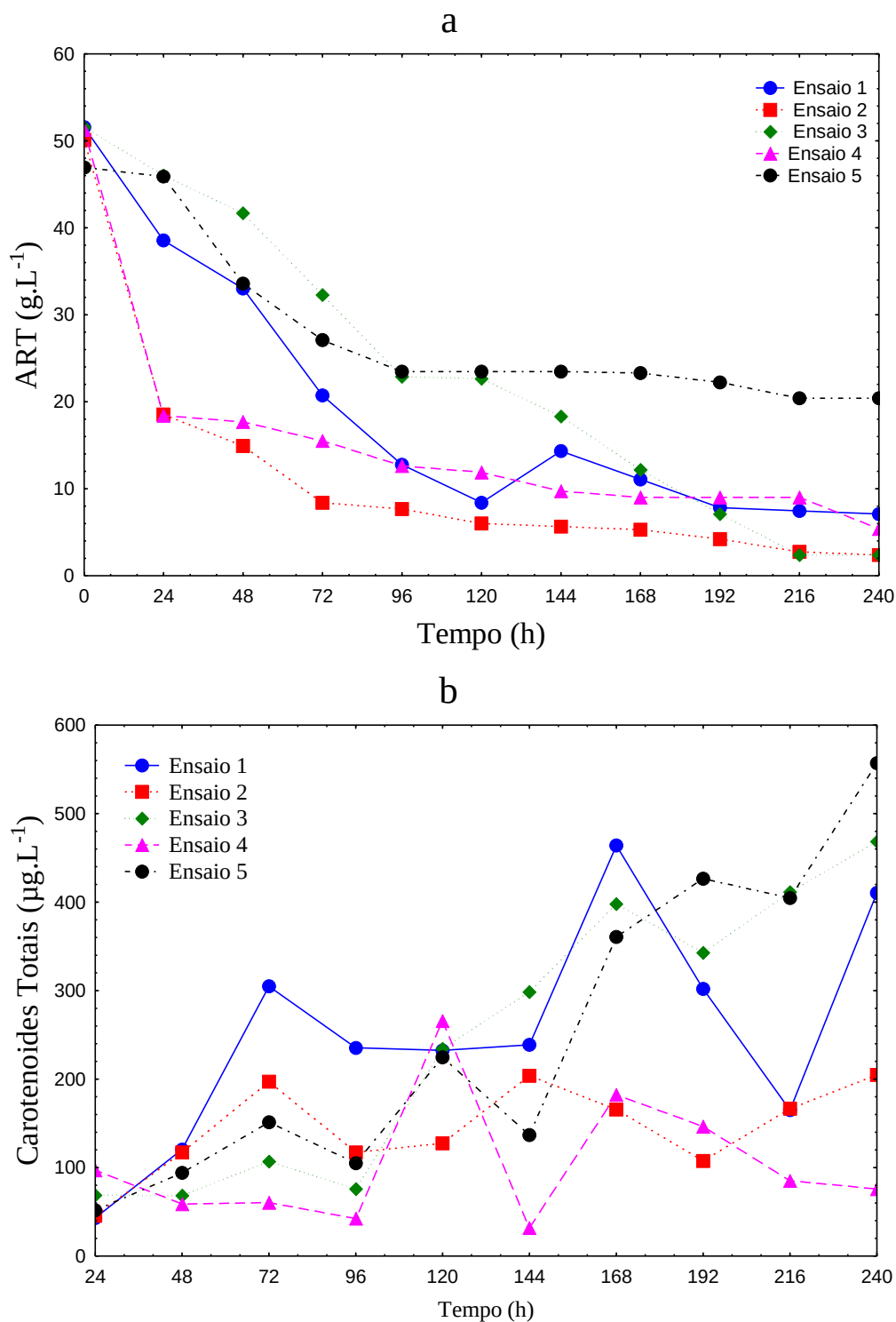


Figura 15- Acompanhamento de ART (a) e Carotenoides totais (b)



O efeito da OTR para produção de β -caroteno por *Blakeslea trispora* foi avaliado por Mantzouridou; Roukas; Acharz (2005). Para isso foram variados os fatores volume de meio (15, 25 e 50 mL em *Erlenmeyer* de 250 mL) e agitação (100, 150, 200 e 250 rpm). Os valores de OTR variaram de 2,93 (50 mL e 100 rpm) até 32,8 mmol. L⁻¹.h⁻¹

(15 mL e 200 rpm). No menor valor de OTR, tanto a biomassa (peso seco) quanto o teor de β -caroteno apresentaram os menores valores de produção de 11,0 g.L⁻¹ e 120,66 mg.L⁻¹, respectivamente, enquanto que no de OTR de 20,5 mmol. L⁻¹.h⁻¹ foi observado o maior valor para produção de β -caroteno, 704,1 mg.L⁻¹. Segundo os autores uma aeração suficiente parece ser de extrema importância para o progresso da produção, sendo pré-requisito para a produção satisfatória de β -caroteno, sendo destacado que na bibliografia alguns autores descrevem que certo nível de stress oxidativo auxilia na produção de carotenoides, visto que estimula a produção de compostos antioxidantes como o β -caroteno. Porém valores de OTR muito altos podem acarretar a oxidação desses pigmentos, resultando em menores valores de produtividade.

Na Figura 14 está apresentado o acompanhamento de biomassa (a) e pH (b) e na Figura 15 ART (a) e carotenoides totais (b). Os ensaios 1, 3 e 5 apresentaram mudanças de pH pouco acentuadas, sendo que os ensaios 2 e 4 essas mudanças foram mais perceptíveis, Esses dois ensaios apresentaram consumo de substrato superior a 60% nas primeiras 24 h e os menores valores de biomassa, podendo essas três observações estarem relacionadas.

Durante o estudo da produção de carotenoides por *S. salmonicolor* (CBS 2636) em dois meios de cultivo, um meio sintético e outro agroindustrial (5 g.L⁻¹ água de maceração de milho, 10 g.L⁻¹ de melaço e 5 g.L⁻¹ de hidrolisado de levedura - Prodex Lac®), os autores perceberam que em aproximadamente 100 h, ponto onde ocorreram as maiores produções de carotenoides (913 μ g.L⁻¹ para o meio sintético e 502 μ g.L⁻¹ para o meio agroindustrial), as concentrações de glicose eram de 20 e 0,2 g.L⁻¹, para o meio sintético e agroindustrial, respectivamente. O pH do meio sintético apresentou pouca variação (de 4 para 3,7), enquanto que o meio agroindustrial apresentou elevação considerável de 4 para 8,5, comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Os autores relacionam essas alterações de pH a possível proteólise das células, um fenômeno natural devido a escassez de substrato e consequente degradação dos aminoácidos, o que leva a liberação de compostos amoníacos que elevam o pH a faixas alcalinas, principalmente quando o micro-organismo não possui capacidade de assimilar outra fonte de carbono (VALDUGA et al. 2009b).

Mantzouridou et al. (2002) citado por Valduga et al. (2009b) atribui a elevação do pH de 5,0 para 7,5 durante a produção de carotenoides por *B. trispora* em meio composto por água de maceração de milho, óleo de oliva, óleo de soja e suplementos, a desaminação dos aminoácidos presentes na água de maceração de milho.

5.2.1 Avaliação dos efeitos das variáveis pH e relação entre volume de meio e volume de reator para as respostas estudadas

A avaliação dos coeficientes de regressão e assim o desenvolvimento de modelos para as variáveis respostas na faixa estudada não foi estatisticamente significativa ($p > 0,1$). O efeito principal de uma variável independente pode ser entendido como a variação causada na resposta (variável dependente), quando percorremos todos os níveis de variação da variável independente que está sendo avaliada, em separado das demais variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Nenhum dos efeitos foi estatisticamente significativo, portanto, apenas os efeitos que demonstram a variação na resposta quando ocorre o incremento das variáveis independentes está apresentado nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

Para os carotenoides totais o pH e a interação entre pH e $V_{\text{reator}}:V_{\text{meio}}$ apresentaram efeito negativo, enquanto que a relação de volume de meio para volume de reator apresentou efeito positivo (Figura 18).

A análise dos efeitos sobre a resposta biomassa e conversão de substrato em produto está apresentada na Figura 19, onde é possível perceber que a relação entre volume de meio e volume de reator e sua interação com o pH apresentaram efeitos positivos sobre a conversão de biomassa em produto, enquanto o pH afetou a resposta negativamente. A conversão de biomassa em produto sofreu efeito negativo das duas variáveis e de sua interação.

A interação entre as duas variáveis avaliadas apresentou efeito positivo sobre a conversão de substrato em produto e a produtividade em carotenoides. Já as variáveis individualmente apresentaram efeitos negativos (Figura 18).

Para as variáveis velocidade específica máxima, conversão de substrato em biomassa e produtividade em biomassa (Figura 19) a interação entre pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ apresentaram efeito positivo sobre $\mu_{\text{máx}}$ e P_x , e negativo sobre $P_{x/s}$. Os efeitos da variável pH e pH e relação $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ isoladamente foram negativos sobre essas três respostas,

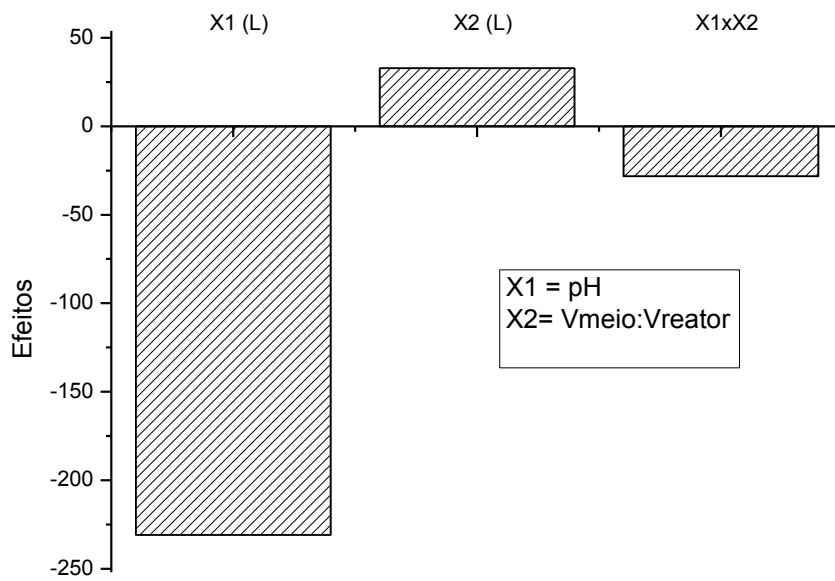
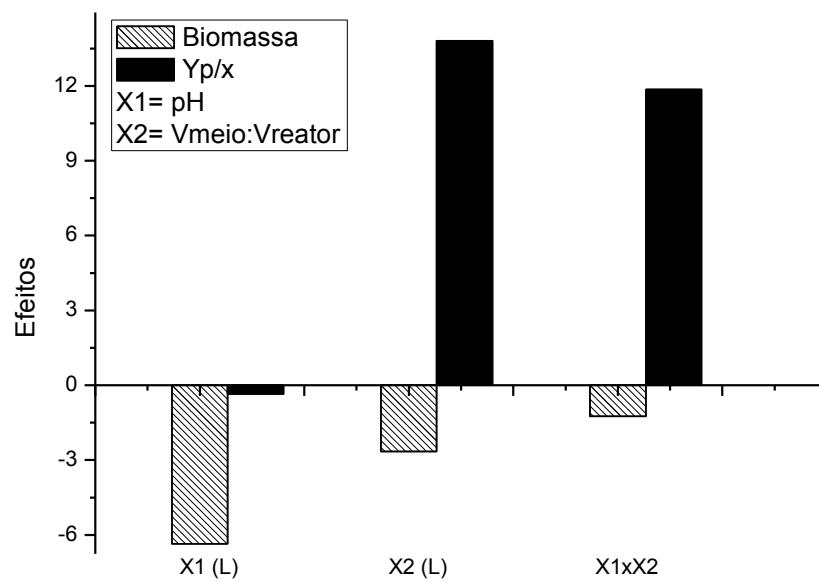
Figura 16- Análise de efeitos para carotenoides totais**Figura 17-** Análise de efeitos para biomassa e $Y_{p/x}$ 

Figura 18- Análise de efeitos para $Y_{p/s}$ e P_c

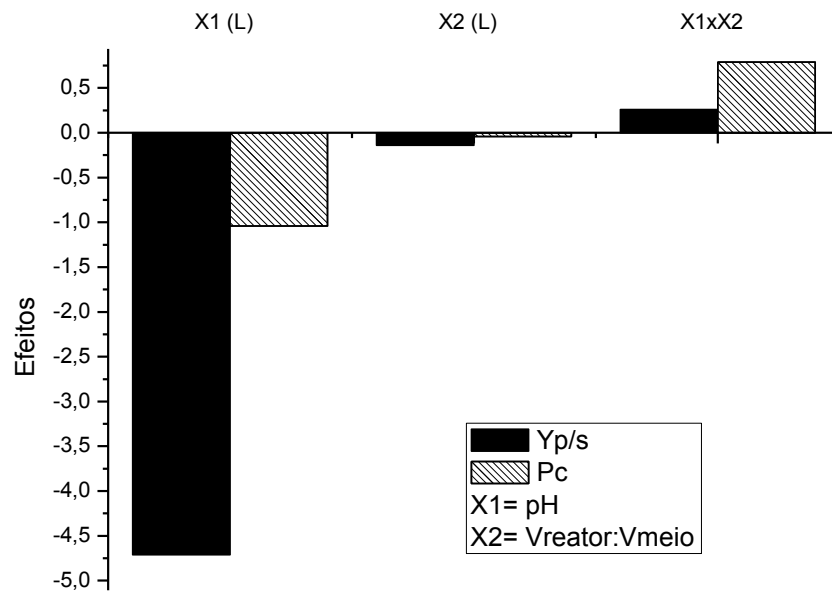
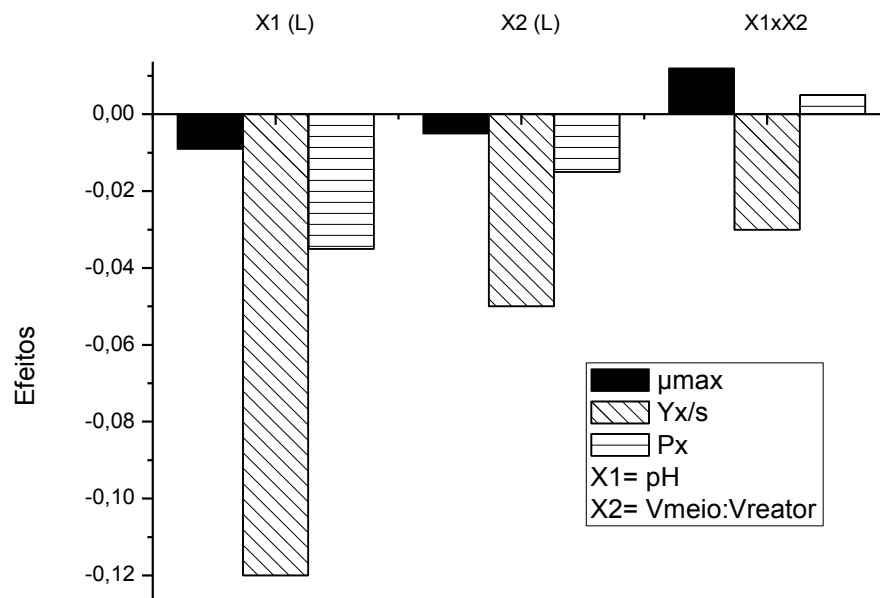


Figura 19- Análise de efeitos para $\mu_{\max}$, $Y_{x/s}$ e P_x



5.3 Avaliação da agitação e aeração na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* em reator de bancada

Na Tabela 9 são apresentados os valores máximos de carotenoides totais, biomassa, $Y_{p/s}$, $Y_{x/s}$, $Y_{x/p}$, produtividade em biomassa e produtividade em carotenoides obtidos para as duas condições de agitação e aeração estudadas em biorreator.

Tabela 9- Parâmetros cinéticos dos cultivos em biorreator de bancada.

Condições	158 rpm 1,2 vvm	300 rpm 1,7 vvm
Carotenoides Totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1969,3	1042,1
Biomassa (g.L^{-1})	18,05	14,30
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,044	0,049
$Y_{p/s}$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	37,08	24,05
$Y_{x/s}$ (g.g^{-1})	0,33	0,33
$Y_{p/x}$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	112,48	77,66
P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,10	0,08
P_c ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	11,48	5,93

Na Figura 20 estão apresentados os acompanhamentos de biomassa (a), pH (b) e na Figura 21 ART (a) e carotenoides totais (b) para as duas condições estudadas. Foi possível observar que o comportamento para produção de biomassa, pH e consumo de substrato foi bastante similar até 120 h, sendo que as respostas carotenoides totais, biomassa, $Y_{p/s}$, $Y_{p/x}$, P_x e P_c foram 47, 21, 35, 31, 20 e 48% maiores para a condição de 158/1,2vvm do que para 300 rpm/1,7vvm.

Os maiores valores relacionados à formação de produto em menor agitação e aeração podem estar relacionados ao fato de que apesar da característica aeróbica do processo de carotenogênese, o estresse hidrodinâmico causado pelo aumento da agitação e da aeração podem ocasionar danos às células, levando-as a utilizar os carotenoides produzidos como compostos antioxidantes (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009; GARCIA-OCHOA et al., 2010; MANTZOURIDOU; ROUKAS; ACHARZ, 2005).

Outra possibilidade é que o aumento da aeração e agitação tenha alterado a rota metabólica do micro-organismo, levando a produção de outros carotenoides. Como observado por Davoli; Mierau; Weber (2004), onde a levedura *S. roseus*, em resposta ao estresse oxidativo gerado pela aeração, passou a produzir maiores quantidades de γ -caroteno, desviando a biossíntese do β -caroteno diretamente para toruleno e torularrodina.

Figura 20- Acompanhamento de biomassa (a), pH (b)

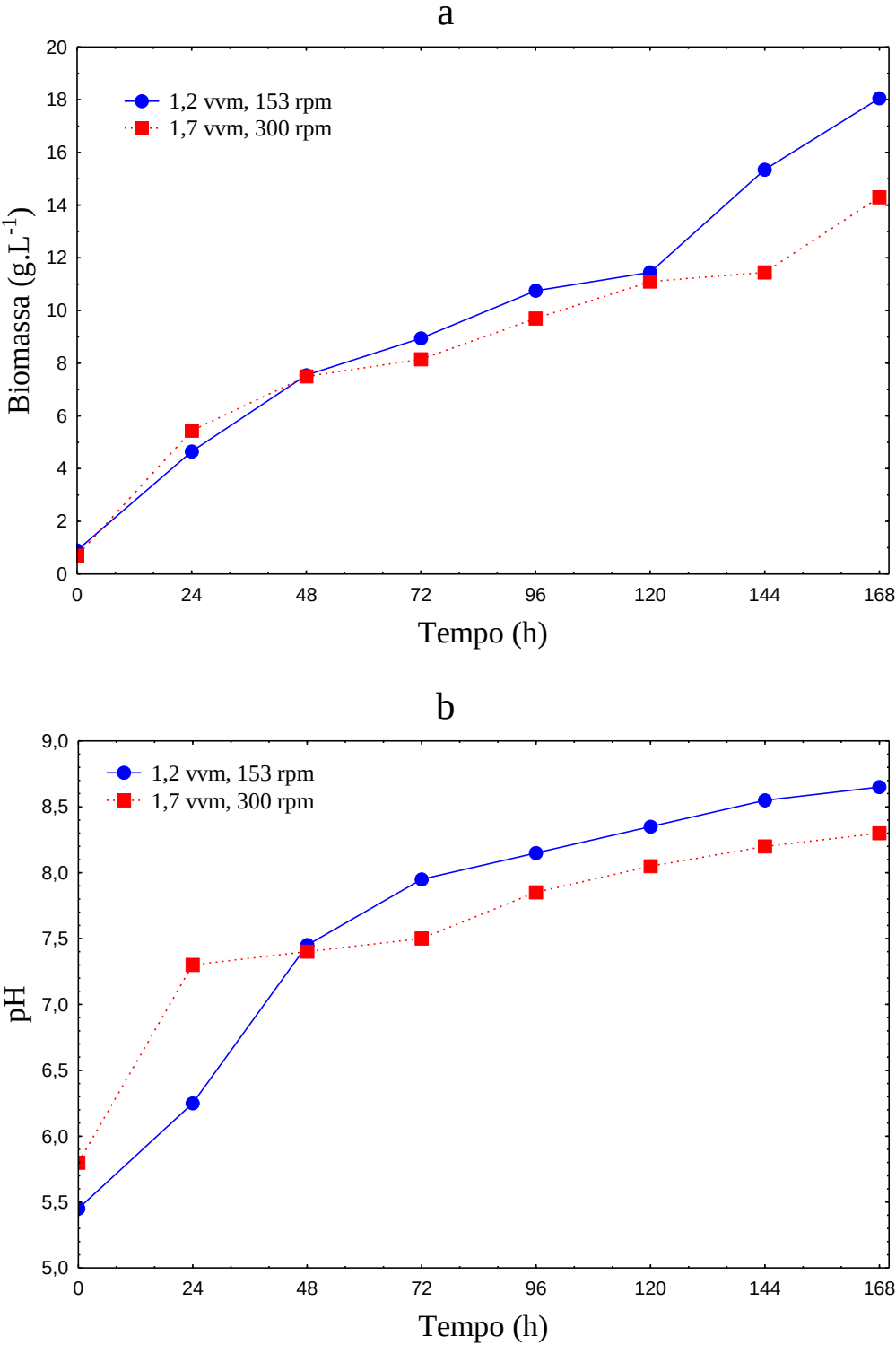
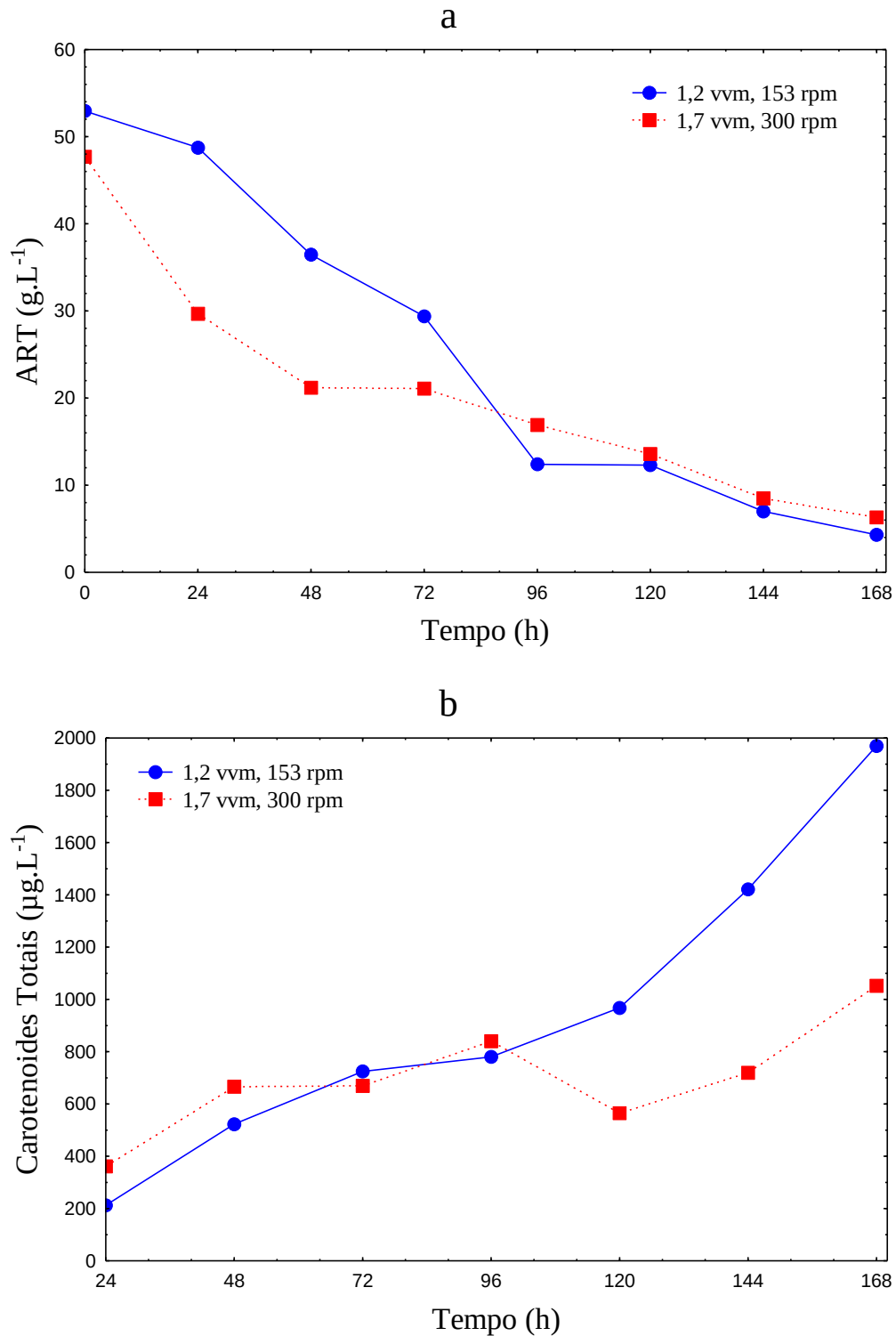


Figura 21 - Acompanhamento de ART (a) e carotenoides totais (b)

Malisorn; Suntornsuk (2009) compararam a produção de β -caroteno por *R. glutinis* DM28 em biorreator e *Erlenmeyer*, encontrando valores 2 vezes maiores para o primeiro tipo de cultivo. Segundo os autores esse comportamento indica que a melhor homogeneização do meio e distribuição do oxigênio ocasionada pelo cultivo em biorreator

influência significativamente a acumulação de β -caroteno nas células de levedura, possivelmente por seu envolvimento na estimulação de enzimas que agem no metabolismo desse carotenoide, como por exemplo, a fitoeno desnaturase, β -caroteno hidroxilase e licopeno ciclase. Se compararmos o máximo valor de carotenoides totais ($1969,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) encontrado nos cultivos em biorreator com o encontrado na melhor condição estudada no ensaio 13 (item 5.1, p. 31) pode-se perceber que esse valor foi 3,5 vezes superior ao valor obtido utilizando-se frascos agitados.

Uma agitação vigorosa é necessária para garantir a homogeneidade na distribuição dos nutrientes. Na escala de frascos agitados o transporte do oxigênio é consequência da ação da agitação da incubadora, enquanto que em escala piloto o oxigênio é fornecido por uma linha de ar comprimido e distribuído por um difusor, além da presença das pás de agitação que melhoram a mistura do meio, a distribuição das bolhas de ar e a redução do tamanho dessas bolhas, elevando assim sua área superficial (GARCIA-OCHOA et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

No planejamento experimental DCCR 2³ a produção de carotenoides totais apresentou máximo valor de 565,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e biomassa de 13,6 g.L^{-1} na condição de 27,5 °C, 150 rpm e pH inicial 4,0 e meio composto por 40 g.L^{-1} de melaço e 6,5 g.L^{-1} de água de maceração de milho (ensaio 13) em 240 h.

No planejamento experimental 2², a maior produção foi obtida nas condições 27,5 °C, 150 rpm e pH inicial 4,0 e meio composto por 40 g.L^{-1} de melaço e 6,5 g.L^{-1} de água de maceração de milho em 240 h (ensaio 5), validando assim o modelo obtido no planejamento 2³, com resposta de produção de carotenoides totais de 591,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, valor 10% superior ao previsto pelo modelo.

No cultivo em biorreator de bancada o comportamento para produção de biomassa, pH e consumo de substrato foi bastante similar entre ambas as condições até 120 h. Para 158 rpm/1,2 vvm a produção máxima de carotenoides totais foi 1969,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 11,48 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para produtividade em carotenoides, já para a condição de 300 rpm/1,7 vvm foram obtidos 1042,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 5,93 $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. As respostas carotenoides totais, biomassa, conversão de substrato e produto, conversão de biomassa em produto e produtividade em carotenoides foram 47, 21, 35, 31 e 48% superiores para a condição de 158 rpm/1,2vvm do que para 300 rpm/1,7vvm.

A produção de carotenoides totais encontrado nos cultivos em biorreator foi 3,5 vezes superior ao valor obtido utilizando-se frascos agitados. Sendo assim o presente trabalho pode demonstrar a influência dos parâmetros temperatura, agitação, pH e aeração para a produção de carotenoides totais pela levedura *S. pararoseus*, assim como demonstrar que sua capacidade de obtenção pode ser aumentada através da modificação dos parâmetros aeração e agitação.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a relação de $V_{\text{meio}}:V_{\text{reator}}$ em biorreator;
- Avaliar o efeito de outras faixas de aeração e agitação sobre a produção de carotenoides por *S. pararoseus* em biorreator;
- Estudar o efeito do controle do pH durante o processo de produção de carotenoides;
- Determinar o perfil de carotenoides durante o cultivo, assim como a possível produção concomitante de lipídeos pela cepa de *S. pararoseus*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. **Process Biochemistry**, n.40, p. 2985–2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, n.35, p. 107–113, 2007.

AMBRÓSIO, C. L.; CAMPO, F. de A. C. e S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 19, v. 2, p. 233-243, 2005.

AOAC – ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 17th edition. Washington, D. C., CD-ROM, 2000

BARBOSA, M. M. **Obtenção de carotenoides de flavonoides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática e prensagem**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BCC RESEARCH MARKET FORECASTING – **The Global Market for Carotenoids**. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html> Acesso: 26 de Setembro de 2013

BERTOLO, A. L. **Avaliação de um processo de extração e recuperação dos carotenoides presentes no resíduo da industrialização do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*)**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

BHATAYA, A.; SCHMIDT-DANNERT, C.; LEE, P. C. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1095-1102, 2009

BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.63 p.351–361, 2004.

BUZZINI, P.; MARTINI, A.; GAETANI, M.; TURCHETTI, B.; PAGNONI, U. M. DAVOLI, P. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p. 687–692, 2005.

CABRAL, M. M. S.; CENCE, K.; ZANI, J.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H. Carotenoids production from a newly

isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 159–166, 2011.

CASTELO BRANCO, L. S. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenoides**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CARVALHO, J. C. de; **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Manascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CHANDI, G. K.; SINGH, S. P; GILL, B. S.; SOGI, D. S.; SINGH, P. Optimization of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. **Food Science Biotechnology**, v.19, n.4, p. 881-887, 2010.

CHISTÉ, R. C. **Avaliação da extração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e corantes presentes em urucum e piquiá**. 2011, 127 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

CHIU, Y. T.; CHIU, C. P.; CHIEN, J. T.; HO, G. H.; YANG, J.; CHEN, B. H. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin an poly(γ -glutamic acid) as carrier. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 5123-5130, 2007.

CHOI, M.H.; PARK, Y.H. Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. **Biomass & Bioenergy**, v. 25, p. 221-226, 2003.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVIES, B. H. **Chemical Biochemistry Plant Pigments**. GOODWIN, T. W., Academic Press: New York, 1976.

DAVOLI, P. MIERAU, V.; WEBER, R. W. S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 392-397, 2004.

DENERY, J. R.; DRAGULL, K. TANG, C. S.; LI, Q. X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. **Analytica Chemical Acta**, v. 501, p. 175–181, 2004.

EL-BANNA; A. A.; EL-RAZEK, A. M. A.; EL-MAHDY, A. R. Some factos affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, vol. 3, p. 64-71, 2012.

FINLEY, J. W.; KONG, A-N.; HINTZE, K. J.; JEFFERY, E. H.; JI, L. L.; LEI, X. G. Antioxidants in foods: state of the Science Important to the Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6837–6846, 2011.

FONSECA, R. A. S.; RAFAEL, R. S.; KALIL, S. J.; BURKERT, A. V.; BURKERT, J. F. M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneus, 2008.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 163–180, 2009.

GARCÍA, E. F. LÉRIDA, I. C.; GALÁN, M.J.; FERNÁNDEZ, J. G.; GÁLVEZ, A. P.; MÉNDEZ, D. H. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438–450, 2012.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; MARCHUK, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 289-307, 2010.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**, v. 41, p. 1082–1088, 2008.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 2001, Cap 6, p.93-121.

LI, Z.; MA, X.; LI, A; ZHANG, C. A novel potential source of b-carotene: *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae) and pilot b-carotene production in bubble column and flat panel photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 257–263, 2012.

LIN, Y.; JAIN, R.; YAN, Y. Microbial production of antioxidante food ingredients via metabolic engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 71-78, 2014.

MACHADO, W. R. C.; BURKERT, J. F. M. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 209-219, 2015.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Comunicado técnico 85: Protocolo para determinação de açúcares totais em hortalças pelo método de DNS**. Brasília: Embrapa Hortaliça, 2013.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 145–150, 2008.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 109-115, 2012.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Improved β -carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 27–32, 2009.

MANOWATTANA, A.; SWWSURIYACHAN, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T. Optimization of Carotenoids Production by Red Yeast *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213 Using Waste Glycerol as the Sole Carbon Source. **KKU Research Journal**, v. 17, n. 4, p. 607-621, 2012.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; BREIEROVA, E. KOCI, R. Production of Carotenoid/Ergosterol Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula*

glutinis Grown Under External Stress. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 56-61, 2010.

MASSETO, A.; COTERA, L. B. F.; DIAZ, C.; LANGLEY, E. SANCHEZ, S. Application of a complete factorial desing for the porduction of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n 1, 55-58, 2001.

MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; dos SANTOS, R. L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, p. 1383–1391, 2011.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. de M. Extration of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-8; 2012.

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

MIRANDA, V. S. **Carotenóides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phyococyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.

NANOU, K.; ROUKAS, T.; PAPADAKIS, E. Oxidative stress and morpological changes in *Blakeslea trispora* induce by enhanced aeration during carotene production in a bubble column reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 172–177, 2011

NGUYEN, A. D. Q.; KIN, S. W.; SEO, Y. G.; CHUNG, I. Y; KIM, D. H, KIM, C. J. Production of β -carotene and acetate in recombinant *Escherichia coli* with or whitout mevalonate pathway at diferente culture temperature or pH. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 1196-1204, 2012.

OLIVEIRA, C. G. **Extração e caracterização do betacaroteno produzido por *Rhodotorula glutinis* tendo como substrato o suco de caju**. 2010. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OTERO, D. M. **Bioprospecção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Feradal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

PARAJÓ, J. C. V. S., VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cell grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998.

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenoides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura**. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

REDAELLI, C. **Estudo da produção de lipídeos e carotenoides por *Chlorella minutíssima* em fotobiorreator**. 2012. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

REIS, D.; MACHADO JR, F.; OLIVEIRA, K.; TREVISOL, T.; BURKERT, C. A.; BURKERT, J. ***Haematococcus pluvialis*: crescimento celular e produção carotenogênica em diferentes meios de cultivo**. In: VIII Encontro de Pós-Graduação, 2011, Pelotas. Anais do VIII Encontro de Pós Graduação. Pelotas: UFPEL, 2011.

RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological Aspects of β -Carotene Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, p. 693–701, 2011.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 1. ed. – São Paulo: Edgar Blucher, 2004.

RIBEIRO, H. S.; CHU, B; S.; ICHIKAWA, S. NAKAJIMA, M. Preparation of nanodispersions containing β –caroteno by solvent displacement method. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 12-17, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYAZ, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington, D. C: ILSI PRESS - International Life Sciences Institute, 2001

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2011.

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

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROG, T. T.; BOURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 210–218, 2011.

SÁNCHEZ, M. D. M.; MANTELL, C. RODRÍGUEZ, M. de la OSSA, E. M.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 245–251, 2005.

SAVE, S. S.; PANDIT, A. B.; JOSHI, J. B. **Microbial cell disruption: role of cavitation**, The Chemical Engineering Journal, v. 55; p. b-67-b72, 1994.

SCHMIDELL, W. (Coord.) **Biotecnologia industrial – Engenharia Bioquímica**. v.2 São Paulo: Blucher, 2001.

SCHWARTZ, C. R. M. **Otimização da produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2010.

SEO, J. S.; BURRI, B. J.; QUAN, Z.; NEIDLINGER, T. R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 371–375, 2005.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* utilizando água de parboilização do arroz**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

SILVA, C. M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* CEPA NRRL-Y 17268 utilizando glicerina e a água de parboilização de arroz**. 2010, 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 115-121, 2004. .

SIMPSON, K. L.; NAKAYAMA, T. O. M.; CHICHESTER, C. O. Biosynthesis of yeast carotenoids. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 6, p. 1688-1694, 1964.

TATSCH, P. O. **Produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2008.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour substrate. **Process Biochemistry**, v.40, p. 2551–2557, 2005.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila***. 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

UENOJO, M.; MARÓSTICA Jr, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G. ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009a.

VALDUGA, E, VALERIO, A., TREICHEL, H., FURIGO, A.J., Di LUCCIO, M., Kinetic and stoichiometric parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 61-69, 2009b.

VALDUGA, E, VALERIO, A., TREICHEL, H., Di LUCCIO, M., FURIGO, A.J. Study of the bio-production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using pre-treated agro-industrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1267–1274, 2008.

VIEIRA, J. M. M. **Maceração enzimática de película comestível de cajá (*Spondias mombin* L.) para extração de carotenoides**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

YOO, J.J.; CHOI, S. P.; KIM, B. W.; SIM, S. J. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Hematococcus pluvialis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 3, p. 309–315, 2012.

ZENI, J. **Screening de microrganismos produtores de carotenoides e poligalacturonases**. 2009. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2009.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark/low-temperature cultivation. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 149-153, 2014.

ZHENG, Y. G.; HU, Z. C.; WANG, H. Z.; SHEN, Y. C. Large-scale production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, p. 164-166, 2006.

ANEXO 1: Caracterização da água de maceração de milho.

Componente	%
Carbono	17,83
Hidrogênio	2,41
Nitrogênio	3,80

Fonte: CIPOLATTI (2012)

ANEXO 2: Caracterização do melaço de cana-de-açúcar.

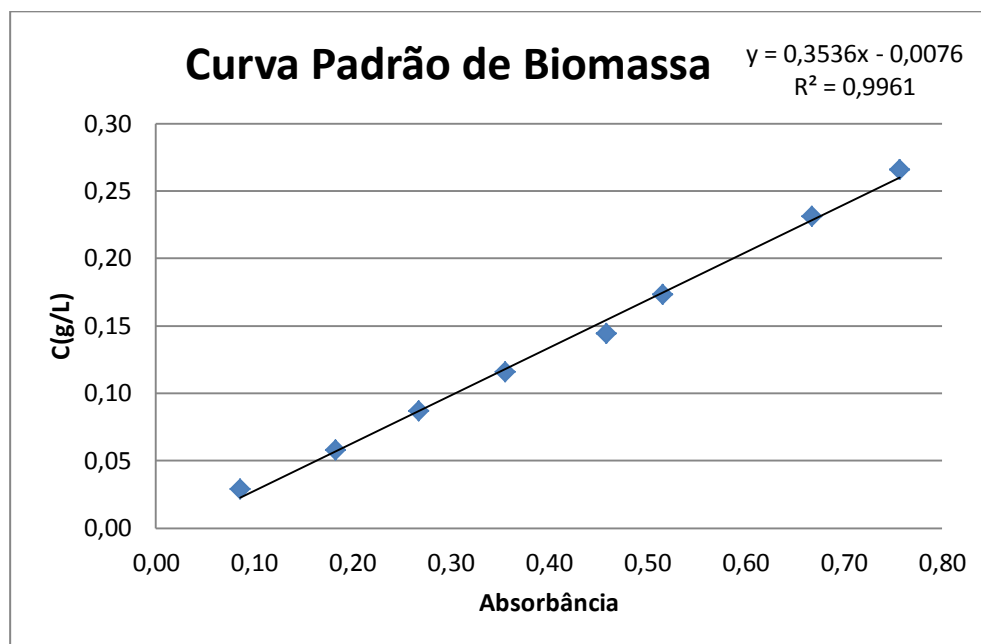
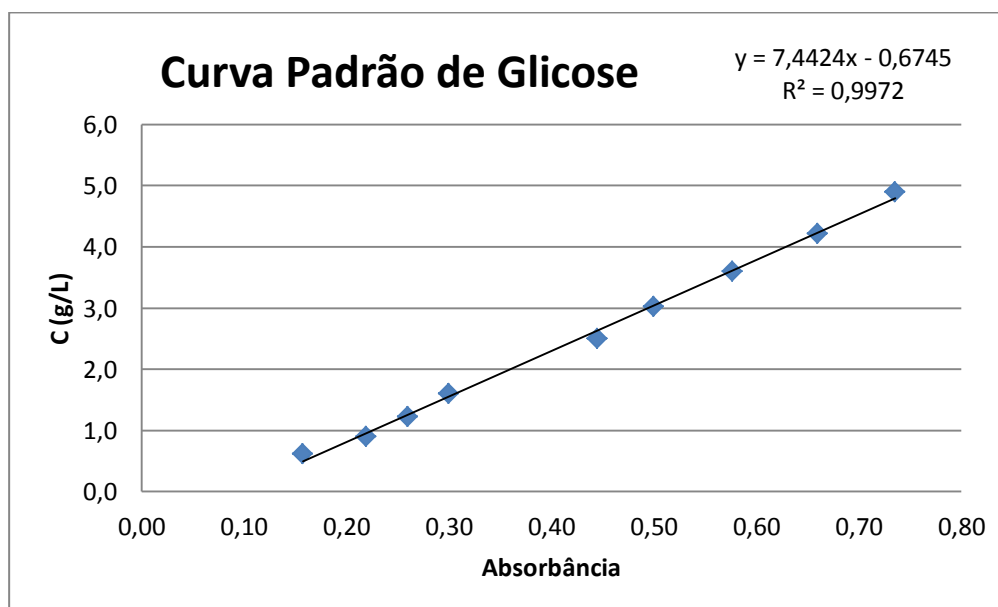
 Brasileiros		CERTIFICADO DE ANALISE			
Unidade:	MELACOS BRASILEIROS LTDA	Nº do Laudo:	5327/2014	Data de Emissão:	08/01/2014
Produto:	MELAÇO LÍQUIDO DE CANA	Lote:	2014		
Cliente:	CARINA MOLINS BORBA			NOTA FISCAL	5327
CARACTERÍSTICAS		UNIDADE	RESULTADO		
Acidez total (ácido acético)		g/Kg	5,6		
ART		%	59,68		
Água - karl fischer		% m/m	20,48		
Amido		mg/kg	1709		
Brix refratometro 20°C		%	82,62		
Cálcio		mg/kg	11455		
Cinzas		% m/v	8,7		
Cobalto		mg/kg	1		
Cobre		mg/kg	4,2		
Cor		UI	63573		
Dextrana		mg/kg	6073		
Ferro		mg/kg	71		
Fósforo Total		mg/L	863		
Frutose		% m/m	7,9		
Glucose		% m/m	6,98		
Magnésio		mg/kg	3991		
Manganês		mg/kg	29,1		
PH		-	5,92		
Potássio		mg/kg	25572		
Pureza		%	42,1		
Resíduos Insolúveis gravimétrico		mg/kg	952		
Sacarose		% m/m	39,9		
Sódio		mg/kg	119		
Sulfito		mg/kg	2114		
Zinco		mg/kg	6,2		

OBSERVAÇÕES

VALIDADE PRODUTO NÃO TEM PRAZO DE VALIDADE. DESDE QUE NÃO SEJA MISTURADO A OUTROS PRODUTOS E SEJA MANTIDO FECHADO EM LOCAL SECO E FRESCO

METODOLOGIA: Reichert AR200 - Digital Refractometer Catalog Nº 13950000

Laboratório CTC

APÊNDICE 1: Curva padrão de biomassa**APÊNDICE 2: Curva padrão de glicose**

APÊNDICE 3: Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para as respostas $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$.

$Y_{x/s} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$					$Y_{p/s} \text{ (}\mu\text{g.g}^{-1}\text{)}$				
	Efeito	EP	t(9)	p		Efeito	EP	t(9)	p
Média	0,165	0,03	5,589	<0,01	Média	0,029	0,004	7,04	<0,01
X₁ (L)	-0,022	0,06	-0,339	0,74	X₁ (L)	-0,015	0,009	-1,69	<0,01
X₂ (L)	0,069	0,06	1,081	0,30	X₂ (L)	0,003	0,009	0,41	<0,01
X₃ (L)	-0,071	0,06	-1,112	0,29	X₃ (L)	-0,006	0,009	-0,64	<0,01
X₁X₂	-0,001	0,08	-0,019	0,98	X₁X₂	0,009	0,012	0,82	0,01
X₁X₃	0,005	0,08	0,065	0,95	X₁X₃	-0,009	0,012	-0,83	0,01
X₂X₃	0,021	0,08	0,256	0,80	X₂X₃	-0,008	0,012	-0,67	0,01

$P_x \text{ (g.L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$				
	Efeito	EP	t(9)	p
Média	0,037	0,007	5,35	<0,01
X₁ (L)	0,001	0,015	0,11	0,92
X₂ (L)	0,005	0,015	0,36	0,73
X₃ (L)	-0,022	0,015	-1,48	0,17
X₁X₂	-0,002	0,019	-0,13	0,90
X₁X₃	0,007	0,019	0,38	0,71
X₂X₃	-0,002	0,019	-0,13	0,90

APÊNDICE 4: Coeficiente de regressão, erro padrão e nível de significância para as respostas carotenoides totais, biomassa, $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{\text{p/s}}$, $Y_{\text{x/s}}$, $Y_{\text{p/x}}$, e P_{c} .

Carotenoides Totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					Biomassa (g.L^{-1})				
	Efeito	EP	t(9)	p		Efeito	EP	t(9)	p
Média*	284,0	37,0	7,7	<0,1	Média*	7,0	0,4	16,7	<0,01
X₁ (L)	-135,0	80,2	-1,7	0,12	X₁ (L)*	-4,7	0,9	-5,1	<0,01
X₂ (L)	89,0	80,2	1,1	0,29	X₂ (L)*	2,6	0,9	2,8	0,02
X₃ (L)	-115,6	80,2	-1,4	0,18	X₃ (L)*	-4,0	0,9	-4,4	<0,01
X₁X₂	39,8	104,7	-0,4	0,71	X₁X₂	0,37	1,2	0,3	0,76
X₁X₃	32,6	104,7	0,3	0,76	X₁X₃	1,2	1,2	1,0	0,35
X₂X₃	61,8	104,7	0,6	0,56	X₂X₃	0,3	1,2	0,2	0,82
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})					$Y_{\text{p/s}}$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$)				
	Efeito	EP	t(9)	p		Efeito	EP	t(9)	p
Média*	0,0243	<0,01	19,7	<0,01	Média*	5,403	0,8	6,62	<0,01
X₁ (L)*	-0,0238	<0,01	-8,9	<0,01	X₁ (L)*	-3,364	1,8	-1,90	0,1
X₂ (L)	<0,0007	<0,01	0,3	0,79	X₂ (L)	1,696	1,8	0,96	0,4
X₃ (L)	0,0025	<0,01	0,9	0,37	X₃ (L)	-1,490	1,8	-0,80	0,4
X₁X₂	-0,0047	<0,01	-1,4	0,21	X₁X₂	0,028	2,3	-0,01	1,0
X₁X₃*	0,0072	<0,01	2,0	0,07	X₁X₃	0,522	2,3	0,23	0,8
X₂X₃	-0,0037	<0,01	-1,1	0,31	X₂X₃	0,919	2,3	0,40	0,7
$Y_{\text{x/s}}$ (g.L^{-1})					$Y_{\text{p/s}}$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$)				
	Efeito	EP	t(9)	p		Efeito	EP	t(6)	p
Média*	0,165	0,03	5,59	<0,01	Média*	0,030	0,004	7,05	<0,01
X₁ (L)	-0,02	0,06	-0,3	0,7	X₁ (L)	-0,015	0,009	-1,69	0,12
X₂ (L)	0,069	0,06	1,08	0,3	X₂ (L)	0,003	0,009	0,41	0,69
X₃ (L)	-0,071	0,06	-1,11	0,3	X₃ (L)	-0,006	0,009	-0,65	0,53
X₁X₂	-0,002	0,08	-0,02	1,0	X₁X₂	0,010	0,012	0,082	0,43
X₁X₃	0,005	0,08	0,06	0,9	X₁X₃	-0,010	0,012	-0,83	0,42
X₂X₃	0,021	0,08	0,26	0,8	X₂X₃	-0,008	0,012	-0,67	0,52
P_{x} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)					P_{c} ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)				
	Efeito	EP	t(9)	p		Efeito	EP	t(9)	p
Média*	0,0367	<0,01	5,31	<0,01	Média*	1,3	0,2	5,29	<0,01
X₁ (L)	-0,0005	0,01	-0,03	1,0	X₁ (L)	-0,9	0,5	-1,66	0,13
X₂ (L)	0,0041	0,01	0,28	0,8	X₂ (L)	0,2	0,5	0,35	0,73
X₃ (L)	-0,0211	0,01	-1,41	0,2	X₃ (L)	-0,3	0,5	-0,63	0,54
X₁X₂	-0,0025	0,02	-0,13	0,9	X₁X₂	-0,2	0,7	-0,28	0,78
X₁X₃	0,0063	0,02	0,32	0,75	X₁X₃	0,3	0,7	0,38	0,71
X₂X₃	-0,0007	0,02	-0,04	0,97	X₂X₃	0,1	0,7	0,15	0,88