



Universidade Federal do Rio Grande – FURG  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

Otimização da produção de carotenoides por *Sporodiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais

Eng. Whallans Raphael Couto Machado

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaína F.M. Burkert

Rio Grande RS, 2013.

Universidade Federal do Rio Grande – FURG  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

Otimização da produção de carotenoides por *Sporodibolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais

Eng. Whallans Raphael Couto Machado

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.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaína F.M. Burkert

Rio Grande RS, 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ademar** e **Odávias**, pois sem eles não  
teria chegado aonde cheguei.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Agradeço a Deus, não sou o que era antes.

**Marthin Luther King**

## AGRADECIMENTOS

Aos **meus familiares**, pelo amor e apoio.

À Deus por estar presente diariamente em minha vida me dando forças para realizar este trabalho.

À minha orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr. Janaína F.M. Burkert**, por ter acreditado em mim, pela eficiência competente na orientação, além do conhecimento adquiridos nesses dois anos, também pela amizade e apoio necessários para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos professores **Susana Juliano Kalil, Jorge Alberto Vieira Costa, Eliana Furlong, Carlos André Veiga Burkert, Carlos Prentice-Hernández**, que contribuíram para o meu crescimento intelectual, na pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. André Burkert**, por disponibilizar o laboratório, para realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto** por varias vezes ter ido ao seu laboratório pedir terra diatomácea.

Ao pessoal dos laboratórios de microbiologia, Laboratório de Ciência de Alimentos, Laboratório de tecnologia de Alimentos e operações unitárias por emprestar reagente e equipamentos, em especial **Ana Sanzo, Jesus e Jaques**.

À **Eliane Cipolatti**, pela ajuda no decorrer deste curso, uma amiga para todas as horas, uma das pessoas que sempre irá fazer parte do meu círculo de amizade. Aos amigos do laboratório pelos momentos de risadas, o que tornou o trabalho mais tranquilo.

À todos os **meus colegas** de sala, pela convivência, e pelos momentos divertidos ao longo do curso.

Aos alunos de iniciação científica, **Julia, Carol, Angelina, Ligia**, pela ajuda no decorrer desse projeto.

**Larine** por ter me ajudado no expecto de varredura.

Às amigadas que forme na pós-graduação (FURG) como **Gisele** (Gica), **Vanessa** (Magali), **Gabriela** (Gabi), pelos momentos de brincadeira, turminha nota 10, sempre levaria no coração para sempre.

À FURG.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro

Termino agradecendo a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o término deste trabalho. **MUITO OBRIGADO!**

## Sumário

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. química dos carotenoides.....	18
3.2. Propriedades dos carotenoides.....	20
3.3. Produção de carotenoides.....	21
3.4. Obtenção de carotenoides por cepas de leveduras silvestres.....	22
3.5. Meios agroindustriais para produção de carotenoides.....	23
3.5.1. Melaço de cana de açúcar.....	24
3.5.2. Água de maceração de milho.....	27
3.5.3. Glicerol.....	29
3.6. Processos de pré tratamento aplicados em coprodutos.....	30
3.7. Considerações finais.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Micro-organismo.....	35
4.1.1. Manutenção e reativação da cultura microbiana.....	35
4.2. Coprodutos agroindustriais.....	35
4.3. Carvão ativo e terra diatomácea.....	35
4.4. Preparo do inóculo.....	35
4.5. Cultivos em frascos agitados.....	36
4.6. Otimização dos meios agroindustriais sem pré tratamento.....	36
4.7. Avaliação de pré tratamentos nos substratos agroindustriais.....	37
4.7.1. Utilização da terra diatomácea.....	37
4.7.2. Pré tratamento com carvão ativo.....	38
4.7.3. Pré tratamento com ácido sulfúrico ou fosfórico.....	38
4.8. Metodologia Analítica.....	38
4.8.1. Determinação do pH.....	38
4.8.2. Determinação da concentração de biomassa.....	38
4.8.3. Determinação da concentração de carotenoides totais.....	38
4.8.3.1. Influência do processo de secagem para recuperação da biomassa.....	39
4.8.4. Determinação da concentração de açúcares redutores totais.....	40
4.9. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1. Espectroscopia de varredura do extrato carotenogênico da <i>Sporidiobolus pararoseus</i> .....	41
5.2. Produção de carotenoides nos meios agroindustriais sem pré tratamento.....	43
5.2.1. Primeiro planejamento para meio formulado com água de maceração de milho e glicerol bruto.....	43
5.3.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa.....	46
5.3.1.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa.....	55

5.4. Validação do modelo para a bioprodução de carotenoides com glicerol e água de maceração de milho .....	58
5.5. Planejamento experimental para o meio formulado com melão e água de maceração de milho .....	60
5.5.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa .....	61
5.6. Validação do modelo para a bioprodução de carotenoides utilizando melão e água de maceração de milho.....	67
5.7. Pré tratamentos dos substratos agroindustriais .....	68
5.7.1. Estudo do pré tratamento com terra diatomácea para melão (100 g.L <sup>-1</sup> ) ..	68
5.7.1.1. Verificação do modelo para açúcar redutor total .....	70
5.7.2. Otimização da terra diatomácea como pré tratamento para o melão.....	72
5.7.2.1. Verificação do modelo para as respostas ART, DO e pH inicial .....	73
5.7.3. Estudo do pré tratamento com terra diatomácea para água de maceração de milho (100 g.L <sup>-1</sup> ).....	76
5.8. Aplicação dos pré tratamentos no meio de cultivo otimizado contendo glicerol bruto e água de maceração de milho.....	81
5.9. Aplicação dos pré tratamentos no meio de cultivo otimizado contendo melão de cana de açúcar e água de maceração de milho.....	85
6. CONCLUSÃO .....	90
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
APÊNDICE 1: Curva padrão da levedura utilizada.....	101
APÊNDICE 2: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para primeiro planejamento formulado com glicerol bruto e água de maceração de milho .....	102
APÊNDICE 3: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o segundo planejamento formulado com glicerol bruto mais água de maceração de milho.....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres. ....	20
Tabela 2: Caracterização parcial da água de maceração de milho. ....	27
Tabela 3: Caracterização parcial dos substratos agroindustriais. ....	28
Tabela 4: Níveis utilizados no primeiro e segundo delineamentos para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol e água de maceração de milho. ....	36
Tabela 5: Níveis utilizados no DCCR 2 <sup>2</sup> para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com melão de cana de açúcar e água de maceração de milho. ....	36
4.7. Avaliação de pré tratamentos nos substratos agroindustriais. ....	37
Tabela 6: Níveis utilizados no primeiro e segundo delineamentos composto central rotacional 2 <sup>3</sup> para o pré tratamento com terra diatomácea para o melão e a água de maceração de milho. ....	37
Tabela 7: Delineamento composto central 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol e água de maceração de milho. ....	44
Tabela 8: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrico carotenoides (PVC) e produção específico carotenoides (PEC), biomassa relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, produtividade em carotenoides específica e produtividade em biomassa. ....	47
Tabela 8 Continuação: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específico carotenoides (PEC), biomassa, relação C/N, e produtividade em biomassa. ....	48
Tabela 9: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> ...	49
Tabela 10: Delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol bruto e água de maceração de milho. ....	53
Tabela 11: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específico carotenoides (PEC), biomassa, relação C/N, e produtividade em biomassa. ....	55
Tabela 12: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> . ....	56
Tabela 13: Respostas da validação do modelo matemático. ....	59
Tabela 14: Delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com melão e água de maceração de milho. ....	62
Tabela 15: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrica carotenoides (PVC), biomassa, relação C/N, e produtividade em carotenoides volumétricos e produtividade em biomassa. ....	65
Tabela 15: Continuação, coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrica carotenoides (PVC), biomassa, relação C/N, e produtividade em carotenoides volumétricos e produtividade em biomassa. ....	66
Tabela 16: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> . ....	66
Tabela 17: Respostas da validação do modelo matemático. ....	68
Tabela 18: Delineamento composto central rotacional valores reais (codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para o melão. ....	69
Tabela 19: Resultados dos efeitos, desvio padrão, t e p para a açúcar redutor total, densidade ótica e pH após o pré tratamento do melão. ....	70
Tabela 20: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>3</sup> utilizando terra diatomácea no melão em função do açúcar redutor total. ....	70
Tabela 21: Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para melão. ....	72

Tabela 22: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta açúcar redutor total e pH inicial. ....	73
Tabela 23: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>3</sup> . ....	74
Tabela 24: Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para água de maceração de milho.....	77
Tabela 25: Resultados dos efeitos, desvio padrão, <i>t</i> e <i>p</i> para o açúcar redutor total, densidade ótica e pH após os pré tratamentos da água de maceração de milho com terra diatomácea.....	77
Tabela 26: Delineamento composto central rotacional valores reais (codificados) para os pré tratamentos com terra diatomácea para água de maceração de milho. ....	78
Tabela 27: Resultados dos efeitos, desvio padrão para a açúcar redutor total, densidade ótica e pH após o pré tratamento da água de maceração de milho. ....	79
Tabela 28: Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta açúcar redutor total e pH inicial. ....	79
Tabela 29: Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2 <sup>3</sup> . ....	80
Tabela 30: Teste de Tukey para os diferentes pré tratamento no meio de cultivo para bioprodução de carotenoides.....	84
Tabela 31: Teste de Tukey para os diferentes pré tratamento no meio de cultivo para bioprodução de carotenoides.....	88
Tabela 32: Métodos de secagem e influência da maceração.....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de carotenoides acíclicos e cíclicos. ....	18
Figura 2: Estruturas de xantofilas.....	19
Figura 3: A adição de um radical peróxido à molécula carotenóide (formação de uma estabilidade por ressonância na cadeia central). ....	21
Figura 4: Esquema de reação entre radical livre e carotenoide.....	21
Figura 5: Varredura em espectrofotômetro da <i>Sporidiobolus pararoseus</i> em meio de cultivo contendo água de maceração de milho (20 g.L <sup>-1</sup> ) e glicerol bruto (20 g.L <sup>-1</sup> ), a 25 °C, 180 rpm em 168h.....	42
Figura 6: Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por <i>S. pararoseus</i> ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm, no delineamento central composto 2 <sup>2</sup> formulado com água de maceração de milho e glicerol bruto nos meios de cultivo.....	45
Figura 7: Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), produção específica (b), biomassa (c) relação C/N (d), produtividade em carotenoides volumétricos (e), produtividade em carotenoides específicos (f) e produtividade em biomassa (g). AMM=Água de maceração de milho.....	51
Figura 8: Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por <i>S. pararoseus</i> ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm, no delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> formulado com glicerol bruto e água de maceração de milho nos meios de cultivo.....	54
Figura 9: Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), biomassa (b) relação C/N (c), produtividade em carotenoides volumétricos (d). AMM=Água de maceração de milho.....	58
Figura 10: Valores médios de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático. ....	59
Figura 11: Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por <i>S. pararoseus</i> ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm e pH inicial de 6, no delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> formulado com melão e água de maceração de milho nos meios de cultivo.....	63
Figura 12: Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), biomassa (b), relação C/N (c), produtividade em carotenoide volumétrico (d), produtividade em biomassa (e). AMM = água de maceração de milho.....	67
Figura 13: Valores médios de biomassa, pH produção específica e volumétrica de carotenoides no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático. ....	68
Figura 14: Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b, e c) para melão pré tratado.....	71
Figura 15: Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b e c), densidade ótica (d, e) pH (f, g), para melão de cana de açúcar.....	75
Figura 16: Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b, c) e pH (d, e, f) para água de maceração de milho pré tratada.....	81
Figura 17: Cinética da evolução do pH (a), do crescimento celular (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por <i>S. pararoseus</i> ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm, com glicerol bruto (30 g.L <sup>-1</sup> ) e água de maceração de milho (52,9 g.L <sup>-1</sup> ) nos meios de cultivo sob diferentes pré tratamentos, sendo realizado em triplicata. SP: sem tratamento no meio; Ác.Fosf.: ácido fosfórico; Ác. Sulf.: ácido sulfúrico; Terra: terra diatomácea; Carvão: carvão ativo.....	82
Figura 18: Cinética da evolução do pH (a), do crescimento celular (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por <i>S. pararoseus</i> ao longo	

de 168h, a 25°C e 180rpm, com melaço (40 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (6,5 g.L<sup>-1</sup>) nos meios de cultivo sob diferentes pré tratamentos, sendo realizado em triplicata. SP: sem tratamento no meio; Ác.Fosf.: ácido fosfórico; Ác. Sulf.: ácido sulfúrico; Terra: terra diatomácea; Carvão: carvão ativo. .... 87

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

**ART** – Açúcar redutor total

**AMM** - Água de maceração de milho

**Bio.** - Biomassa

**C/N** - Relação carbono e nitrogênio

**DCC** - Delineamento composto central

**DCCR** - Delineamento composto central rotacional

**D.O** – Densidade ótica

**PEC** - Produção específica de carotenoides

**PVC** - Produção volumétrica de carotenoides

## RESUMO

Uma característica importante da produção de um bioproduto é a formulação de um meio de cultivo industrial promissor que possa utilizar matéria prima de custo inferior. Para a bioprodução de carotenoides que exercem função biológica importante, foram combinadas às fontes de carbono e nitrogênio de substratos complexos através de delineamentos experimentais, buscando a otimização na produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus pararoseus*, a 25 °C, 180 rpm e pH inicial 6. Dessa forma, foi definido o meio de cultivo contendo 40 g.L<sup>-1</sup> de melação de cana de açúcar e 6,5 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho em 168h, que alcançou uma produção de carotenoides 520,94 µg.L<sup>-1</sup> (73,19 µg.g<sup>-1</sup>), com uma concentração celular de 7,82 g.L<sup>-1</sup>, com produtividades em carotenoides de 3,10 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,436 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e biomassa 0,05 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Para o meio formulado com glicerol bruto (30 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (52,9 g.L<sup>-1</sup>), ocorreu à produção de 779,60 µg.L<sup>-1</sup> (65,64 µg.g<sup>-1</sup>), com 11,65 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, uma produtividade em carotenoides de 4,64 µg.L<sup>-1</sup> (0,391 µg.g<sup>-1</sup>) e uma produtividade em biomassa de 0,069 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, na bioprodução com substratos pré tratados com ácido sulfúrico para o meio melação (40 g.L<sup>-1</sup>) com água de maceração de milho (6,5 g.L<sup>-1</sup>) foi obtido um incremento em todas as respostas com concentração de carotenoides de 936,35 µg.L<sup>-1</sup> (79,63 µg.g<sup>-1</sup>), com 12,02 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, uma produtividade em carotenoide de 5,57 µg.L<sup>-1</sup> (0,474 µg.g<sup>-1</sup>), sendo a produtividade em biomassa de 0,072 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. No entanto para o meio formulado com glicerol bruto (30 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (52,9 g.L<sup>-1</sup>) pré tratado com ácido sulfúrico foi obtida uma produção de 614,33 µg.L<sup>-1</sup> (46,89 µg.g<sup>-1</sup>), com 13,03 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, sendo sua produtividade em carotenoides de 4,27 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,0326 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e produtividade em biomassa de 0,091 g.L<sup>-1</sup>. Ainda foi observado que o processo de secagem por liofilização apresentou um ganho de aproximadamente 44% na recuperação dos carotenoides. Dessa forma demonstrando o potencial da *Sporidiobolus pararoseus* como fonte de carotenoides utilizando coprodutos agroindustriais.

**Palavras-chaves:** leveduras, coprodutos e planejamento experimental.

## ABSTRACT

An important characteristic in the production of a bioproduct is the formulation of a promising industrial culture medium that can use low cost raw material. For the bioproduction of carotenoids that exert an important biological function, carbon and nitrogen sources of complex substrates were combined through experimental designs, seeking to optimize the production of carotenoids by *Sporidiobolus pararoseus* yeast at 25 °C, 180 rpm and initial pH 6. Thus, the culture medium defined contained 40 g.L<sup>-1</sup> of sugar cane molasses and 6.5 g.L<sup>-1</sup> of corn steep liquor in 168h, reaching a carotenoid production of 520.94 µg.L<sup>-1</sup> (73.19 µg.g<sup>-1</sup>), with a cell concentration of 7.82 g.L<sup>-1</sup>, with a carotenoids productivity of 3.10 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0.436 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) and 0.05 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> biomass. With the medium formulated with raw glycerol (30 g.L<sup>-1</sup>) and corn steep liquor (52.9 g.L<sup>-1</sup>), a production of 779.60 µg.L<sup>-1</sup> (65.64 µg.g<sup>-1</sup>) occurred with 11.65 g.L<sup>-1</sup> of biomass, and a carotenoid production of 4.64 µg.L<sup>-1</sup> (0.391 µg.g<sup>-1</sup>) and biomass productivity of 0.069 g.L<sup>-1</sup>. However, in bioproduction with substrates pretreated with sulfuric acid for a molasses medium (40 g.L<sup>-1</sup>) with corn steep liquor (6.5 g.L<sup>-1</sup>) an increase in all responses was obtained with the carotenoids concentration of 936.35 µg.L<sup>-1</sup> (79.63 µg.g<sup>-1</sup>), with 12.02 g.L<sup>-1</sup> biomass, a carotenoid yield of 5.57 µ.L<sup>-1</sup> (0.474 µg.g<sup>-1</sup>) and biomass productivity of 0.072 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. However, for the medium formulated with raw glycerol (30 g.L<sup>-1</sup>) and corn steep liquor (52.9 g.L<sup>-1</sup>) pre-treated with sulfuric acid a production of 614.33 µg.L<sup>-1</sup> (46.89 µg.g<sup>-1</sup>) was obtained, with 13.03 g.L<sup>-1</sup> biomass, and its carotenoids productivity of 4.27 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0.0326 µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) and biomass productivity of 0.091 g.L<sup>-1</sup>. It was also noted that the freeze-drying process showed a gain of approximately 44% in the recovery of carotenoids. Thereby demonstrating the potential of *Sporidiobolus pararoseus* as a source of carotenoids using agroindustrial byproducts.

**Keywords:** yeast, coproducts and experimental design.

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são hidrocarbonetos lipossolúveis encontrados abundantemente na natureza com mais de 600 estruturas caracterizadas. São pigmentos que tem uma variação de cor do amarelo até o vermelho podendo apresentar ainda colocação roxa, encontrados em frutas, vegetais, flores e micro-organismos (TINOIA *et al.*, 2005), nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenóides. Aproximadamente 80 carotenoides são sintetizados por bactérias fotossintéticas, alguns fungos filamentosos, algas e leveduras (UENOJO *et al.*, 2007).

Os pigmentos carotenogênicos são utilizados na elaboração de cosméticos, fármacos e na indústria de alimentos como aditivo alimentar, corantes e precursores de vitamina A (pró-vitamina A). Nas últimas décadas dentre os pigmentos naturais, os carotenoides apresentam destaque devido às suas propriedades fisiológicas, como ação antioxidante. Seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer, revelando atividades protetoras frente a injúrias causadas por metais, atuando também no fortalecimento do sistema imunológico e redução do risco de doenças como catarata e degeneração macular vêm sendo descrito (FRENGOVA *et al.*, 1994; MULLER *et al.*, 2003; AKSU e EREN, 2005).

Na indústria de alimentos a utilização de corantes obtidos por via sintética, foi popularizada nos anos 80 (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2007), entretanto salienta-se que o uso desses aditivos químicos, pode apresentar potencial alergênico e cancerígeno (MORAIS, 2006). Além disso, nas últimas décadas os aditivos sintéticos foram caracterizados negativamente pelos consumidores que passaram a preferir corantes naturais adicionados aos produtos (ABEROUHAND, 2011). Dessa forma, o aspecto negativo do uso dos corantes sintéticos, promoveu um crescente interesse na utilização de carotenoides obtidos por processos biotecnológicos. Corroborando a este fato, a produção microbiana de pigmentos pode ser obtida em um curto prazo de tempo, em qualquer época do ano, com uso de pequeno espaço para produção, utilizando substratos de baixo custo, com controle das condições de cultivo, além de receberem a denominação de corantes naturais (VALDUGA *et al.*, 2009).

Os carotenoides podem ser tanto produzidos por processos químicos (extração com solvente) a partir de plantas e animais, ou biologicamente sintetizados por micro-organismos que além das vantagens citadas anteriormente ainda apresentam facilidade de aumento da produção pela manipulação ambiental ou genética.

Existem alguns micro-organismos produtores de carotenoides, destacando-se a *Blakeslea trispora* (NANOU e ROUKAS, 2011), *Monascus purpureus* (DHALE *et al.*, 2010), *Sporidiobolus salmonicolor* (VALDUGA *et al.*, 2009), *Phaffia rhodozyma*

(RAMÍREZ, 2000; FRENGOVA e BESHKOVA, 2009; MONTANTI *et al.*, 2011), *Sporidiobolus pararoseus* (CABRAL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011) *Halococcus morrhuae* (MIRANDA, 2010), *Dunaliella bardawil* (GOMEZ *et al.*, 2003; DODDAIAH *et al.*, 2011), *Haematococcus pluvialis* (OLAIZOLA, 2000; REIS, 2012), *Hemerocallis disticha* (HSU *et al.*, 2011), *Agrobacterium aurantiacum* (CHUMPOLKULWO *et al.*, 1997), *Rhodotorula glutinis* (BUZZINI, 2000) e *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU e EREN, 2005).

Dentre as leveduras carotenogênicas destacam-se a *Phaffia rhodozyma*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa* produtoras de astaxantina, toruleno,  $\beta$  - criptoxantina, luteína e  $\beta$  - caroteno, obtidos a partir do aproveitamento de diferentes coprodutos e resíduos agroindustriais, utilizados como substratos alternativos, apresentando potencial antioxidante (SILVA, 2009; SILVA, 2010; OTERO, 2011, CIPOLATTI, 2012).

Porém, a obtenção microbiana de carotenoides é limitada principalmente pelo custo elevado de produção. Entretanto, este custo pode ser minimizado aperfeiçoando/otimizando seu processo e aproveitando coprodutos industriais de menor custo como fontes nutrientes alternativas (MALDONADE *et al.*, 2007).

Coprodutos agroindustriais como farelo de soja, caldo de cana, ureia, mosto de uva, soro de leite, extrato de batata doce, água de maceração de milho, melão de cana, glicerol bruto e água de parbolização de arroz podem ser utilizados como substratos no meio de cultivo, por diferentes micro-organismos para produção de pigmentos, como fontes de carbono e nitrogênio alternativas.

Por outro lado, os meios agroindustriais possuem composição variável devido a sua complexidade, o que pode ser responsável pela inibição na produção de corantes (TREICHEL, 2004). Altas concentrações de metais pesados nos meios de cultivo podem resultar graves problemas durante o cultivo, tais como retardamento do crescimento microbiano, produção de outros bioprodutos que podem ocasionar intoxicação do inoculo e interferência do pH (ROUKAS, 1998; BERWANGER, 2005). Entretanto estes contaminantes encontrados nos meios agroindustriais podem ser removidos parcialmente com pré tratamento adequado promovendo meios com aspecto clarificado, não provocando interferência no cultivo submerso e promovendo uma produtividade maior que os meios sem tratamentos.

Neste contexto, este trabalho visou abordar a produção de carotenoides em coprodutos agroindustriais como substratos alternativos, avaliando o uso de pré tratamentos com a levedura *Sporidiobolus pararoseus*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi estudar a bioprodução de carotenoides em meios agroindustriais com e sem pré tratamentos, através de cultivos submersos por *Sporidiobolus pararoseus*, utilizando os coprodutos a água de maceração de milho, glicerol bruto e melaço de cana de açúcar.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Otimizar as condições de produção de carotenoides em frascos agitados, através da metodologia de planejamento experimental, tendo como variáveis as concentrações dos componentes de dois meios de bioprodução: melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho; e glicerol bruto com água de maceração de milho;

- Realizar estudo para definir a melhor condição do pré tratamento com terra diatomácea para o melaço de cana de açúcar e a água de maceração de milho;

- Avaliar a influência dos pré tratamentos (carvão ativo, terra diatomácea, ácido sulfúrico e ácido fosfórico) na condição otimizada previamente para produção de carotenoides nos dois meios de cultivos agroindustriais propostos;

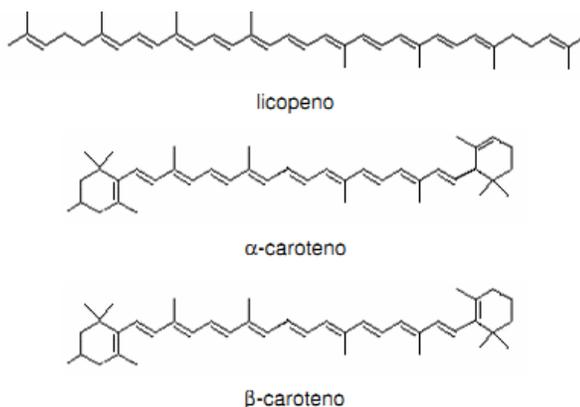
- Verificar a influencia do método de secagem e maceração da biomassa para recuperação dos carotenoides.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Estrutura química dos carotenoides

Os carotenoides são pigmentos orgânicos distribuídos de forma abundante na natureza tendo mais de 600 compostos diferentes identificados, entretanto somente 50 podem ser absorvidos e metabolizados pelo organismo humano, podendo apresentando atividade pró vitamina A (MELLO, 2002; OREOPOULOU, 2006).

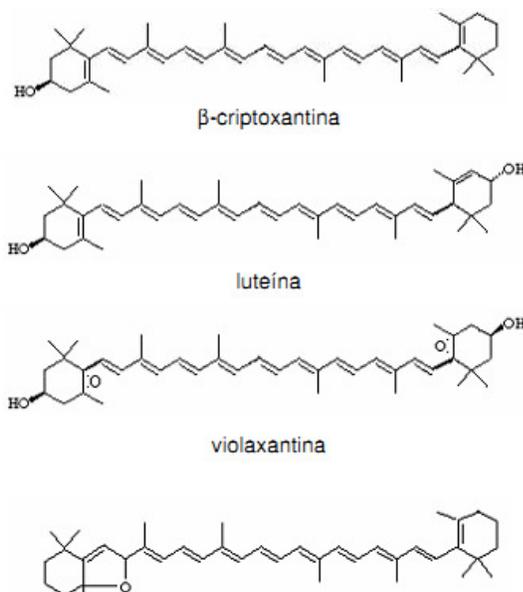
A estrutura básica de um carotenoide consiste em um tetrapenoides  $C_{40}$  (hidrocarbonetos e seus derivados), ou ainda definidos como oito unidades isoprenóides ( $C_5$ ) de cinco átomos de carbono, formando uma estrutura com quarenta átomos de carbono podendo ser ciclizado em ambas as extremidades. Os carotenoides são divididos em duas classes, xantofilas e carotenos. Os compostos que apresentam apenas carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos) são denominados carotenos, os quais estes hidrocarbonetos podem ser acíclicos como o licopeno ou cíclicos como o  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, como apresentado na Figura 1 (SILVA, 2004; NASCIMENTO, 2006).



**Figura 1:** Estruturas de carotenoides acíclicos e cíclicos.

Fonte: NASCIMENTO (2006).

As xantofilas que são o outro grupo de carotenoides apresentam oxigênio, geralmente situados nas extremidades laterais da cadeia, como mostra a Figura 2. Os substituintes mais comuns são os grupos hidroxilas como o  $\beta$ -criptoxantina (mono-hidroxilado) e luteína (di-hidroxilado) e grupos epóxi como da violaxantina e 5,8-monoepoxi- $\beta$ -caroteno.



**Figura 2:** Estruturas de xantofilas

Fonte: NASCIMENTO (2006).

Os carotenoides são de ocorrência natural no cloroplasto e cromoplastos de plantas e outros organismos fotossintetizante como algumas algas, bactérias e fungos (CHUMPOLKULWO *et al.*, 1997; NANOU e ROUKAS, 2011; DODDAIAH *et al.*, 2011). Estes pigmentos apresentam dois papéis fundamentais nas plantas e algas: absorvem a energia da luz para uso no processo de fotossíntese e protegem a clorofila a partir de foto proteção.

Os carotenoides apresentam ao longo de sua cadeia alternância de ligações duplas e simples, e dependendo do número dessas ligações o cromóforo (conjunto de átomos de uma molécula que ao receber uma onda de luz visível, transmite ou reflete outra cor) absorve em regiões diferentes, o que gera pigmentos de cores distintas. Um carotenoide com menos de sete ligações duplas não apresenta coloração (fitoeno e fitoflueno), por outro lado a ciclização também diminui a coloração. Pois os anéis encontram-se fora do plano das ligações duplas das cadeias poliênicas lineares. A quantidade dessas ligações duplas presentes na estrutura também está relacionada intimamente às propriedades funcionais como poder antioxidante, pró vitamina e regulação do sistema imunológico (MELLO, 2005; VALDUGA, 2005; SILVA, 2010).

Os pigmentos carotenogênicos são substâncias altamente reativa na absorção de luz tornando susceptível à isomerização e oxidação. Dessa forma, fatores como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenoides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e propriedades funcionais. Desde modo, no momento da extração e manipulação de

carotenoides, deve se conferir proteção contra luz, análise em curto espaço de tempo e baixa temperatura (SANTOS, 2010).

### 3.2. Propriedades dos carotenoides

Na indústria de alimentos os carotenoides desempenham um papel de colorir o alimento que venha a sofrer uma perda na sua coloração (processo e/ou armazenamento), são utilizados como aditivo em ração para aquicultura, com a finalidade de aumentar a cor rósea de animais como salmão e camarão. Também é utilizado para uniformizar a cor do alimento. Entretanto, nas últimas décadas tem despertado interesse da adição nos alimentos em função de suas propriedades biológicas por conferir proteção contra radicais livres (MELLO, 2002; TATSCH, 2008; MIRANDA, 2010).

Os radicais livres são moléculas instáveis e possuem um número de elétrons ímpar, e são altamente reativas e interagem com outras moléculas para adquirir estabilidade. Dentre estes radicais destaca-se o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), o hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o dióxido de nitrogênio,  $NO_2^{\cdot}$  (SHAMI e MOREIRA, 2004). As formações desses radicais estão relacionadas às ações catalisadoras de enzimas, durante o processo de transferência de elétrons, ou a exposição de fatores exógenos (Tabela 1).

**Tabela 1:** Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

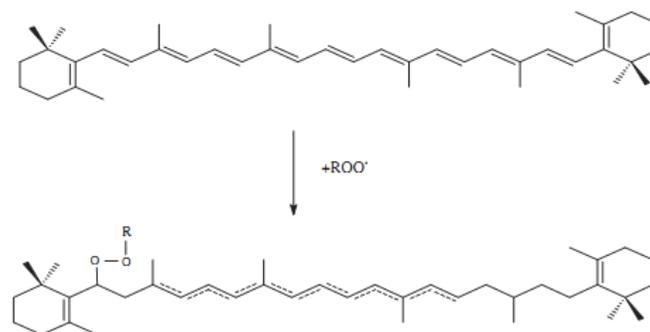
Endógenas	Exógenas
Respiração aeróbica	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxissomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dietas Cigarro

Fonte: Bianch e Antunes (1999).

A capacidade sequestrante dos radicais livres dos carotenoides está associada ao número de ligações duplas presentes em sua estrutura, sendo necessário no mínimo nove ligações duplas conjugadas na molécula para apresentar poder antioxidante (MELLO 2002; SHAMI e MOREIRA, 2004).

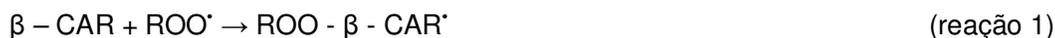
Um antioxidante pode ser definido como sendo uma substância sintética ou natural adicionada a um produto oxidativo que vai promover ação de retardamento ou prevenção à oxidação. Dessa forma, os carotenoides são considerados antioxidantes eficazes (YOUNG 2001; MIRANDA, 2010).

O  $\beta$ -caroteno possui onze duplas ligações alternadas o que torna muito suscetível à reação com os radicais livres (Figura 3), observado também na Figura 4, reação 1, onde ocorre o início do mecanismo de reação antioxidante. A cadeia central reage rapidamente e reversivelmente com o oxigênio para transportar o peróxido (Figura 4, reação 2). A cadeia central é então estabilizada por ressonância de tal modo quando a pressão do oxigênio é reduzida o equilíbrio da reação dente para a esquerda para diminuir a concentração de radicais peróxido de forma a reduzir a quantidade de auto oxidação do sistema. Entretanto se o carotenoide estiver com o radical livre e o mesmo for exposta a outro radical livre ocorrerá uma anulação, Figura 4, reação 3 (KIOKIAS e OREOPOULOU, 2006).



**Figura 3:** A adição de um radical peróxido à molécula carotenóide (formação de uma estabilidade por ressonância na cadeia central).

Fonte: KIOKIAS e OREOPOULOU (2006).



**Figura 4:** Esquema de reação entre radical livre e carotenoide.

Fonte: KIOKIAS e OREOPOULOU (2006).

Devido às propriedades antioxidantes dos carotenoides eles apresentam atividade biológica importante, tais como imunomoduladoras, anticarcinogênicas, capacidade de prevenir a fotossensibilização em certas doenças de pele, prevenção de algumas doenças crônicas degenerativas, propriedades antienvhecimento e sendo precursores de certos compostos nutricionais (BAKÓ *et al.*, 2002; STRINGHETA *et al.*, 2006).

### 3.3. Produção de carotenoides

O valor de mercado para carotenoides foi estimado em torno de 1,2 bilhões para o ano de 2010, e somente para  $\beta$ -caroteno de 262 milhões e para luteína de 233

milhões, sendo que as perspectiva até o ano de 2018 é de 1,4 bilhões, com uma taxa de crescimento anual de 2,3%, tendo surgido novas tecnologias de fabricação (ADAMS, 2011).

Com o conhecimento do processo de cultivo para obtenção de carotenoides microbianos objetiva-se a diminuição significativa do custo de produção, como para a astaxantina sintética que é de aproximadamente 2.500,00.kg<sup>-1</sup> em plantas na Suíça e Alemanha (LOURENÇO, 2006).

Dentre os vários tipos de micro-organismos produtores de carotenoides, as leveduras se destacam pela sua simples necessidade básica de requerer uma fonte de carbono e de nitrogênio para a biossíntese, dessa forma a inserção de substratos alternativos (coprodutos) é uma forma de minimizar o custo de produção e diminuir os impactos ambientais ou mesmo os custos com os tratamentos dos coprodutos agroindustriais gerados.

A inserção dos coprodutos agroindustriais como substrato para o desenvolvimento de um bioproduto tem ganhado importância cada vez mais acentuada pela sua vasta aplicação em diversos cultivos. No Brasil, a uma grande variedade de coprodutos agroindustriais, cujo sua utilização ainda não é tão efetiva. Sendo importante encorajar novas tecnologias para sua utilização como ganho energético ou desenvolvimento de um novo produto a partir desses coprodutos, que são gerados em grandes quantidades no país (BRINGHENTI *et al.*, 2007; OTERO, 2011).

### **3.4. Obtenção de carotenoides por cepas de leveduras silvestres**

Otero (2011) isolou e selecionou leveduras silvestres produtoras de carotenoide a partir de solo, flores, folhas e frutos presentes na área do Litoral Médio e na região do Escudo Sul-Rio-Grandense. Foram isoladas 683 colônias, das quais 65 tinham apresentado coloração, sendo realizado cultivos em meio YM a 25 °C 150 rpm por 168h e pH inicial de 6,0. Três leveduras foram identificadas como sendo as mais promissoras produtoras de carotenoides através da técnica de sequenciamento de DNA, a *Sporobolomyces pararoseus* isolada de cascas de árvores coletada na cidade de Caçapava do Sul, a *Pichia fermentans* isolada de folhas coletada na cidade São José do Norte e a *Rhodotorula mucilaginosa* isolada de flor coletada na cidade Encruzilhada do Sul.

Serra *et al.* (2011) isolaram e selecionaram leveduras silvestres produtoras de carotenoides a partir de solo, folhas, frutas, chás e produtos em decomposição, onde identificaram a levedura *Sporidiobolus pararoseus*, através de sequenciamento de DNA, a qual foi submetido a uma otimização variando os componentes dos meio de

cultivo onde os fatores foram pH (4,0 a 8,0), extrato de malte (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>), peptona (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>) e glicose (2 a 40 g.L<sup>-1</sup>), alcançando a máxima produção de 856 µg.L<sup>-1</sup> (carotenoides totais) em 102h no meio contendo 60 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 15 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 15 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, a 25 °C, 180 rpm e pH inicial 4,0.

Yang *et al.* (2011) isolaram e identificaram 88 cepas de leveduras marinhas vermelhas através de sequenciamento de DNA, de diferentes áreas de Zhanjiang (China), em ambientes de cultivo de camarão. A produção de carotenoides totais e específicos de novas espécies da levedura *Rhodospiridium paludigenum* (2,83 mg.L<sup>-1</sup>; 305,9 µg.g<sup>-1</sup>), *Rhodospiridium toruloides* (2,38 mg.L<sup>-1</sup> e 253,1 µg.g<sup>-1</sup>), *Rhodotorula Mucilaginosa* (1,70 mg.L<sup>-1</sup> e 171,4 µg.g<sup>-1</sup>), *Rhodotorula sphaerocarpum* (2,59 mg.L<sup>-1</sup> e 244,1 µg.g<sup>-1</sup>), *Rhodospiridium Glutinis* (2,27 mg.L<sup>-1</sup> e 239,2 µg.g<sup>-1</sup>) *Rhodotorula diobovatum* (1,77 mg.L<sup>-1</sup> e 184,3 µg.g<sup>-1</sup>), *Rhodotorula sp.* (2,40 mg.L<sup>-1</sup> e 286,2 1 µg.g<sup>-1</sup>), *Sporidiobolus pararoseus* (2,72 mg.L<sup>-1</sup> e 305,3 µg.g<sup>-1</sup>), *Sporidiobolus ruineniae* (2,04 mg.L<sup>-1</sup> e 202,1 µg.g<sup>-1</sup>), foram constatadas em meio contendo 2,5% de glicose, 0,2% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,01% de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 28°C, 150 rpm por 72h sem ajuste de pH.

Segundo Libking *et al.* (2006) que estudaram o efeito da ocorrência de compostos fotoprotetores em leveduras de água doce do ecossistema de Northwestern Patagônia (Argentina) utilizando a radiação UV-A (320-400 nm) e UV-B (295-320 nm) com irradiâncias de 1,6x10<sup>-3</sup> e 1,27x10<sup>-5</sup> W.s<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> através de cepas isoladas de *Rhodotorula*, *Rhodospiridium Sporobolomyces* e *Sporidiobolus* verificando a produção de torularrodina, toruleno, γ-caroteno e β-caroteno.

### 3.5. Meios agroindustriais para produção de carotenoides

Os coprodutos apresentam um meio rico em minerais e certos compostos essenciais, o que possibilita sua utilização em vários cultivos. Os meios contendo coprodutos como mostos de uvas, xarope de glicose, melaço de beterraba, extrato da farinha de soja, extrato de farinha de milho foram estudados a fim de verificar a produção de carotenoides pela *Rhodotorula glutinis*. O mosto de uva destacou-se apresentando um máximo de 5,95 mg.L<sup>-1</sup> (630 µg.g<sup>-1</sup>) a 30°C, 180 rpm por 120h (BUZZINI e MARTIN, 2000).

Montanti (2011) utilizou a palha da cevada (oriundo da produção de etanol pelas biorefinarias), que é um substrato rico em celulose e hemicelulose, que através da hidrólise pode formar a glicose, xilose e arabinose. Três micro-organismos mutantes oriundos da cepa *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 (UCD 67-210) foram

utilizados, onde a cepa *P. rhodozyma* mutante (JTM 185) apresentou uma produção máxima de 2,25 g.L<sup>-1</sup> de carotenoides a 22 °C, 250 rpm, em 168h e pH inicial de 5,0.

Aksu e Eren (2005), estudaram o potencial de produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* através de um processo de otimização tendo as variáveis de efeito como a glicose (5 a 20 g.L<sup>-1</sup>), melaço de beterraba (2,5 a 20 g.L<sup>-1</sup>), soro de leite (3,3 a 13,2 g.L<sup>-1</sup>), pH (3 a 8), temperatura (25 a 35 °C), taxa de aeração (0,0 a 2,4 vvm), sulfato de amônia (0,5 a 5 g.L<sup>-1</sup>) e 1% (v.v<sup>-1</sup>) de ativador (óleo de semente de algodão ou Tween 80). A melhor condição foi com pH 7, a 30 °C, aeração de 2,4 vvm, sulfato de amônia 3 g.L<sup>-1</sup> e 1% óleo de semente de algodão. O ativador só aumentou a produção de carotenoide na presença de glicose. Sendo que a maior concentração de carotenoides totais (89,0 mg.L<sup>-1</sup>) foi em meio contendo melaço de beterraba (20 g.L<sup>-1</sup>), enquanto que a produção específica (35,0 mg.g<sup>-1</sup>) foi em meio formulado com soro de leite, a 30 °C, 2,4 vvm, em 240h a pH 7,0.

Taskin e Erdalb (2011) pesquisaram o uso de biomassas hidrolisadas como os grãos de sementes de ameixa amarela com presença ou não de um processo de desintoxicação (Ca(OH)<sub>2</sub>), para ser utilizada como substrato para linhagens de dez leveduras da *Rhodotorula glutinis*, variando as concentrações de 20 a 70 g.L<sup>-1</sup>, nos dois tratamentos, sendo que o tratamento desintoxicante alcançou máxima concentração celular e carotenoides volumétrico com *Rhodotorula glutinis* (MT-5) de 12,64 g.L<sup>-1</sup> e 72,36 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, a 30 °C, 200 rpm, por 120h e o pH inicial de 6,0.

### 3.5.1. Melaço de cana de açúcar

No Brasil, a produção de açúcar é a partir da cana de açúcar, que durante as etapas do processo ocorre à formação do melaço. Varias pesquisas nacionais vem utilizando este subproduto como um meio para cultivo como uma forma de aproveitamento, diminuição de custo com tratamento, minimizando impactos ambientais e ao mesmo tempo tornando viável o processo em escala industrial (TREICHEL, 2004; VALDUGA, 2009). Pois o melaço apresenta certos nutrientes como açúcares, minerais que podem favorecer o cultivo submerso. Na produção de açúcar o melaço é resultante das etapas de centrifugação e decantação, sendo composto por açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada.

Bhosale e Gadre (2001) estudaram o potencial de produção de carotenoides entre nove linhagens de leveduras selvagens e quatro mutantes da *Rhodotorula spp.* utilizando coprodutos como o melaço de cana. Dessa forma foi verificado que a levedura *Rhodotorula glutinis* (mutante 32) apresentou melhor produção de carotenoides com 14 mg.L<sup>-1</sup> sendo que o β-caroteno representava 70% dos

carotenoides totais. A formação de toruleno (20%) em melão simples foi verificada. Entretanto, com a adição de extrato de levedura foi constatado um aumento de 31% no teor de carotenoides totais, sendo a condições do cultivo a 28°C, 240 rpm, por 72h e pH inicial de 6,0.

Park *et al.* (2005) realizaram dois planejamentos experimentais para aumentar a produção de carotenoides a partir do melão de cana pela levedura *Rhodotorula glutinis*. No primeiro planejamento fatorial fracionário, o pH (4,0 a 7,0), concentração do substrato industrial (10 a 30 g.L<sup>-1</sup>), ureia (1 a 5 g.L<sup>-1</sup>) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0 a 3 g.L<sup>-1</sup>), foi avaliado resultando na melhor condição com 30 g.L<sup>-1</sup> do substrato, 3 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 5 g.L<sup>-1</sup> de ureia, obtendo uma concentração celular de 8,0 g.L<sup>-1</sup>, produção específica de 159 µg.g<sup>-1</sup> e volumétrica de 1,27 mg.L<sup>-1</sup>. A segunda etapa foi realizada com outro enfoque avaliando a relação do substrato: ureia (C/N) de 4 a 50 g.L<sup>-1</sup> e fosfato de potássio de 0 a 3,0 g.L<sup>-1</sup>. A otimização foi alcançada com a relação C/N 4 e com 3 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, atingindo um produção celular de 11,9 g.L<sup>-1</sup>, carotenoides específico de 455 µg.g<sup>-1</sup> e volumétrica de 5,41 mg.L<sup>-1</sup>. Os processos ocorreram a 20°C, 150 rpm, por 120h e o pH inicial ajustado para 5,5.

Libkind e Broock (2006) realizaram um screening dentre 15 leveduras isoladas da Patagônia com finalidade de obter linhagens de alta produção para carotenoides em meio formulado com coprodutos (80 a 85% de glicose para melão de cana e xarope de milho e 0,5 g.L<sup>-1</sup> farinha do extrato de malte) como fontes de carbono e sulfato de amônio (1 g.L<sup>-1</sup>) e ureia (1 g.L<sup>-1</sup>) como fontes de nitrogênio. As linhagens identificadas como *Cryptococcus sp.* (CRUB 1046) e *Rhodotorula mucilaginosa* (CRUB 0138) foram descritas como novas espécies com produção de 1325 g.L<sup>-1</sup> (277 µg.g<sup>-1</sup>) e 1273 g.L<sup>-1</sup> (250 µg.g<sup>-1</sup>), respectivamente. Entretanto a *R. mucilaginosa* (CRUB 0195) foi a maior produtora de carotenoides de 1.444 µg.L<sup>-1</sup> (300 µg.g<sup>-1</sup>) a 25°C, 25 rpm por 96h, e pH inicial 5,0.

A eficiência da utilização do melão para a bioprodução está geralmente inferior a ideal, devido à adição de anidrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) etapa de sulfitação no processo industrial, que resulta na formação de sais férricos (promove a coloração escura do melão), ferrosos (que é incolor), fosfato de cálcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), sulfeto de cálcio (CaSO<sub>3</sub>), impurezas de sais inorgânicos, açúcares não fermentescíveis e cinzas surfactantes. Dessa forma quando é realizado um cultivo com este substrato agroindustrial, o micro-organismo é suspenso e apresenta um crescimento lento podendo ser fortemente afetado pelas impurezas presentes no meio (KOKUGAN, 1997). Necessitando de uma etapa para remoção desses inibidores para não prejudicar o cultivo submerso garantindo maior facilidade na recuperação e purificação

do bioproduto (HERNALSTEENS, 2006). Portanto, existe a possibilidade da necessidade de realização de pré tratamentos nos substratos agroindustriais.

Otero (2011) isolou, selecionou e identificou cepas de leveduras silvestres como *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, através de coletas de amostras em solos, flores e frutos em dois ecossistemas distintos do Rio Grande do Sul, sendo que os carotenoides identificados foram à luteína,  $\beta$  - criptoxantina e  $\beta$  - caroteno por estas leveduras. As cepas foram avaliadas em dois meios formulados com 39,91 g.L<sup>-1</sup> de água de parboilização de arroz adicionado de 17,31 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto, e o segundo com 44,01 g.L<sup>-1</sup> de água de parboilização de arroz e 23,6 g.L<sup>-1</sup> de melaço. A *Sporobolomyces pararoseus* apresentou uma produção de 86,46  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (820  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 106,20  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (710  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), respectivamente, para o primeiro e segundo meio de cultivo, sendo as condições operacionais do processo a 25°C, 180 rpm por 168h e pH inicial de 6,0.

Cipolatti (2012) realizou um estudo da produção de carotenoides e da atividade antioxidante (*in vitro*) pelas leveduras *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans*, e *Rhodotorula mucilaginosa*, isoladas de ecossistemas gaúchos por (Otero 2011), e *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-7268, formulando dois tipos de meios com coprodutos agroindustriais o primeiro com 35,6 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 4,8 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto e o segundo com 36,5 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração e 6,0 g.L<sup>-1</sup> de melaço, juntamente com o meio complexo YM (3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose). A *S. pararoseus* apresentou destaque na produção com os meios agroindustriais alcançando, respectivamente, para o primeiro e segundo meios de cultivo uma produção de carotenoides totais de 634,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (87,3  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e 830,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (68,1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), a 180 rpm, 25°C por 168h com pH inicial ajustado a 6. A atividade antioxidante para estes extratos carotenogênicos foi de 7,5 e 4,1% inibição. $\mu\text{g}^{-1}$ ; 32,0 e 22,2% inibição. $\mu\text{g}^{-1}$ , respectivamente para os métodos DPPH e ABTS, para o primeiro e segundo meio de produção. O meio com água de maceração de milho (36,5 g.L<sup>-1</sup>) e melaço (6,0 g.L<sup>-1</sup>), ainda apresentou absorvância superior a 1,0 para o método de determinação da atividade antioxidante FRAP.

Estudos comparativos aproveitando os coprodutos agroindustriais melaço e água de maceração de milho em relação a meios complexos possibilitam a completa substituição desses últimos substratos na produção de diferentes bioprodutos. Entretanto quando estes mesmos coprodutos passam por um pré tratamento para promover melhor clarificação e remoção de interferentes, podem potencializar sua eficiência (TREICHEL, 2004; MENDES, 2006, VALDUGA, 2009, CIPOLATTI, 2012).

### 3.5.2. Água de maceração de milho

A produção mundial de amido esta relacionada a quatro matérias-primas, sendo elas milho, batata, batata doce e mandioca. Dessas, o milho representa 75% da produção mundial de amido. A dependência desse tipo de amido é maior para os EUA (99% da produção) e Europa (46%). A produção de amido mundial no ano de 2005 foi de 60 milhões de toneladas e prevê para o ano de 2010 um aumento em 10 milhões (CEREDA e VILPOUX, 2005).

Nos Estados Unidos a produção de etanol ocorre pela moagem úmida ou seca do milho e tal processo gera a formação do coproduto que é comercializado com baixo valor e destinado à alimentação de animais (MONTANTI 2011). No Brasil, a produção de amido de milho modificado, amido pré gelatinizado e óleo de milho, promove a geração da água de maceração de milho. Este coproduto apresenta certos nutrientes como nitrogênio (Tabela 2) que podem ser aproveitados para conversão de compostos de alto valor agregado como os carotenoides, além disso, quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B, com exceção de tiamina, que normalmente é baixa ou ausente, provavelmente devido ela ser destruída pelo tratamento  $SO_2$  durante a maceração do milho, sendo ainda rico em minerais (K, P, Mg, Na, Ca, Fe, Zn, Mn, Cr, Cu), A quantidade de nutrientes presentes na água de maceração vai dependendo do processo que o milho vai sofrer (LIGGETT e KOFFLER, 1948; GAO e YUAN, 2011).

**Tabela 2:** Caracterização parcial da água de maceração de milho.

Determinação	Concentração (%)	Determinação	Concentração (%)
Umidade	45-55	Ácido láctico	5-15
Total de N	2,7-4,5	Acetil-CoA	0,1-0,3
Nitrogênio volátil	0,15-0,40	Açúcares redutores	0,1-11,0

Fonte: Adaptada de Liggett e Koffler (1948).

A utilização de água de maceração de milho como substrato alternativo apresenta variações na composição, devido a diferentes cultivares de milho, período de colheita, processo de fabricação. Dessa forma, a maioria desse coproduto disponível no mercado apresenta um padrão como peso seco (> 40%), proteína bruta (>40%), sulfitos (<0,3%) e acidez, <14% (GAO e YUAN, 2011). Além disso, a água de maceração de milho, bem como os demais coprodutos utilizados neste trabalho, foram caracterizados previamente e apresentam teores de carbono e nitrogênio (Tabela 3) variáveis, sendo aplicados em estudos de produção de carotenoides microbianos.

**Tabela 3:** Caracterização parcial dos substratos agroindustriais.

Substratos agroindustriais	% C	% H	% N
Água de maceração de milho <sup>c</sup>	17,83	2,41	3,80
Melaço <sup>b</sup>	36,50	-	0,30
Glicerol bruto <sup>a</sup>	49,30	3,41	1,05

<sup>a</sup> (SILVA, 2010); <sup>b</sup> (OTERO, 2011); <sup>c</sup> (CIPOLATTI, 2012). %C = concentração de carbono; %H = concentração de hidrogênio; %N = concentração de nitrogênio.

Kesava *et al.* (1998) otimizaram um meio contendo amido de milho hidrolisado e água de maceração de milho variando os dois substratos de 3,344 a 116,6 g.L<sup>-1</sup>, para a produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* 2A2N, onde a máxima produção foi com 100 g.L<sup>-1</sup> de amido hidrolisado e 3,44 g.L<sup>-1</sup> com água de maceração de milho, a 20 °C, 120 rpm por 48h. Foi realizado ainda outro cultivo em fermentador contendo, 300 mL de amido hidrolisado, 90 mL de água de maceração de milho, 1,2 g.L<sup>-1</sup> de ureia e 6 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, com taxa de aeração ajustada para manter 50% de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, com temperatura mantida 20 °C, pH controlado a 5,0. Obtendo a máxima produção em 108h de operação, no qual a bioprodução de carotenoide foi de 42,0 mg.L<sup>-1</sup>. Foi estudado também a produção de carotenoide com alimentação constante, realizada com duas alimentações, uma com hidrolisado a 70% de glicose equivalente, e a outra alimentação com 90 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho, 1,2 g.L<sup>-1</sup> de ureia e 6 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sendo a maior produção de carotenoides totais de 52,4 mg.L<sup>-1</sup>, realizando ambos os processo a 20 °C, por 120h, agitação em relação a 50% do oxigênio dissolvido, e pH fixado a 5,0.

Buzzini (2001) verificou a produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula glutinis* (DBVPG 3853) em associação com espécies de *Debaryomyces castellii* (17 linhagens) em meio formulado com água de maceração de milho (805 g.L<sup>-1</sup> carboidratos totais, 8,3 g.L<sup>-1</sup> glicose, 22,7 g.L<sup>-1</sup> maltose e 4,65 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio). Constando que a associação da *Debaryomyces castellii* (DBVPG 3503) com a levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou uma produção volumétrica de 8.2 g.L<sup>-1</sup>, o pigmento principal sintetizado foi torularrodina (74%), enquanto toruleno e β-caroteno representaram 12 e 14%, respectivamente, sendo realizado o cultivo a 30 °C, 220 rpm, por 120h sem ajuste de pH.

A composição do meio do cultivo submerso tem um importante papel na formação do produto pelo micro-organismo presente. A utilização de meios contendo extrato de levedura e de malte, peptona de carne e glicose torna se onerosa sua produção quando ampliado sua escala, sendo desejável encontrar meios alternativos e complexos e com eficácia similar. Dessa forma, a utilização de água de maceração de milho apresenta certas características semelhantes a estes substratos comerciais,

proporcionando um meio rico em nutrientes essenciais para o desenvolvimento celular e formação do produto reduziria o custo global do processo (REN *et al.*, 2006; MADDIPAT *et al.*, 2011).

### 3.5.3. Glicerol

O Biodiesel é um combustível renovável e biodegradável, obtido da reação de transesterificação, entre lipídios, óleos ou gorduras com um álcool na presença de um catalisador, formando como subproduto o glicerol bruto (80 a 90% de pureza), propano-1,2,3-triol (entre 5 a 10% do produto bruto). Este glicerol bruto não pode ser utilizado como aditivo alimentar por apresentar certas impurezas como metanol, somente para outras aplicações industriais como de tinta e fumo (FAIRBANKS, 2009).

O governo brasileiro criou um programa de adição de biodiesel (B4), em combustível não renovável, como forma de equilibrar o aumento do combustível, entretanto a produção de biodiesel origina 260 mil toneladas de glicerol por ano, podendo gerar um excedente no mercado deste coproduto. A produção mundial de glicerol é em torno de 600.000 t.ano<sup>-1</sup>, sendo que para cada litro de biodiesel produzido gera 0,680 kg de glicerol. Dessa forma, uma indústria que produz 30 milhões de L.ano<sup>-1</sup> vai gerar 12.700 t.ano<sup>-1</sup>, saturando o mercado. Uma quantidade bastante expressiva, fazendo-se necessários avanços na área de biotecnologia com intuito de utilizar este subproduto (TAHERZADEH, 2002; USDA Rural Development, <http://www.rurdev.usda.gov/rbs/pub/jul07/Evolving.htm>).

Otero (2011) isolou linhagens de levedura silvestres para produção de carotenoides de dois ecossistemas distintos (Brasil – Rio Grande do Sul). Três linhagens de leveduras foram isoladas e identificadas como promissoras na produção de carotenoides a *Sporobolomyces pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O cultivo em substratos agroindustriais como glicerol bruto, melão de cana, água de parboilização de arroz e meio sintético (YM - *Yeast malt*) foi realizado. Sendo a levedura *Sporobolomyces pararoseus* que se destacou apresentando valores de  $Y_{P/X}$  de 19,56  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para o YM, 7,89  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para o meio contendo água de parboilização de arroz e glicerol bruto e 10,94  $\mu\text{g.g}^{-1}$  para o meio contendo água de parboilização e melão de cana, sendo que a máxima produção de carotenoides em meio YM (123,64  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), a 25°C, 150 rpm por 168h e o pH inicial de 6,0.

Silva (2010) estudou o uso do glicerol bruto e água de parboilização de arroz como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, para a bioprodução de carotenoide pela *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268. Um planejamento Plackett Burman estudando o efeito da glicerol bruta (10 a 60 g.L<sup>-1</sup>), água de parboilização (0 a 90 g.L<sup>-1</sup>), glicose (1 a 10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (1 a 10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de malte (1 a

10 g.L<sup>-1</sup>), peptona (1 a 10 g.L<sup>-1</sup>) e pH inicial (4 a 6) foi realizado, obtendo valores máximo de concentração celular de 8,3 g.L<sup>-1</sup>, produção específica de 326,8 µg.g<sup>-1</sup> e volumétrica de 4,1 µg.mL<sup>-1</sup>, a 25°C, 150 rpm por 168h. O segundo planejamento foi fracionário 2<sub>IV</sub><sup>6-2</sup> com as variáveis significativas como glicerina bruta (10 a 60 g.L<sup>-1</sup>) água de parboilização (0 a 90 g.L<sup>-1</sup>) glicose (0 a 5 g.L<sup>-1</sup>), extrato de malte (5 a 20 g.L<sup>-1</sup>) peptona (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>), pH (4 a 7) fixando o extrato de levedura em 1 g.L<sup>-1</sup>, onde a produção máxima alcançada foi 312,0 µg g<sup>-1</sup> e 3,3 µg mL<sup>-1</sup>. Através desses resultados foi realizado um DCCR 2<sup>3</sup>, no qual a bioprodução máxima encontrada foi de 209,9 µg g<sup>-1</sup> e 3,2 µg mL<sup>-1</sup>, em meio contendo 35 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, 7,5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 6,4 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 90 g.L<sup>-1</sup> de efluente, 20 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 1 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, a 25°C, 150 rpm, 168h e pH inicial 4,0.

Mantzouridou *et al.* (2008) utilizaram três tipos de glicerol, puro (99%), oriundo da produção de sabão e o terceiro de biodiesel (purificado para remoção de metanol) em meio com glicose (50 g.L<sup>-1</sup>), água de maceração de milho (80 g.L<sup>-1</sup>), caseína hidrolisada (2 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (1 g.L<sup>-1</sup>), L-asparagina (2 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g.L<sup>-1</sup>), e tiamina (0,005 g.L<sup>-1</sup>), suplementando com estes três coprodutos (10, 30, 60, 90, e 180 g.L<sup>-1</sup>), utilizando as linhagens fungicas *Blakeslea trispora* ATCC 14271 e *Blakeslea trispora* ATCC 14272. No qual o micro-organismo *B. trispora* ATCC 14271 apresentou a maior produção de β-caroteno (15,0 mg.g<sup>-1</sup>) com 60,0 g.L<sup>-1</sup> glicerol puro, sendo que o glicerol do sabão e do biodiesel apresentaram uma produção máxima de 10 e 8 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente, a 26°C, 250 rpm, por 288h e pH inicial de 7,0.

### 3.6. Processos de pré tratamento aplicados em coprodutos

Para suprir as necessidades básicas nutricionais de um micro-organismo é necessária geralmente uma fonte de C (carbono), N (nitrogênio) e às vezes P (fósforo), para ocorrer o cultivo submerso e assim a biossíntese. Embora uma fonte interessante para desenvolvimento do micro-organismo seja a glicose comercial, uma ampliação da escala de processo torna inviável esta operação gerando um produto caro, devido à alta quantidade de glicose necessária ao processo (BRANDÃO *et al.*, 2010). Por este razão vem aumentando muito o interesse por substratos alternativos como melaço, água de maceração de milho e glicerol.

Na bioprodução de compostos como carotenoides, gomas, enzimas, e outros têm verificado a inserção do uso de coprodutos agroindustriais como uma forma alternativa de minimizar o custo da bioprodução, valorar estes coprodutos, e ao mesmo tempo minimizar impactos ambientais causado pelos mesmos (NASCIMENTO, 2007). Entretanto estes subprodutos apresentam uma série de impurezas que podem

promover uma ineficiência do desenvolvimento microbiano, resultando em uma baixa produtividade do processo ou ainda dificultando a recuperação e purificação do bioproduto (KALOGIANNIS *et al.*, 2003; TREICHEL, 2004). Um pré tratamento que vise remover as impureza e clarificar o meio de cultivo é necessária para garantir um melhor aproveitamento do coproduto, e com isso aumentando a produção do bioproduto pelo micro-organismo.

Na produção de pululana (biopolímero) a partir de *Aureobasidium pullulans* foram empregados cinco pré tratamentos em melaço de beterraba, como a resina de troca catiônica (20 g), ácido sulfúrico (1 N), fosfato tricálcico, ferrocianeto de potássio (100 ppm), ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (100 ppm), verificando que a adição de ácido sulfúrico apresentou um incremento de 47% de polissacarídeo se comparado ao meio sem pré tratamento. No entanto, os maiores valores de concentração de polissacarídeo ( $17,0 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), rendimento ( $124,6 \pm 1,2\% \text{ I.U.c}^{-1}$ ) e consumo de açúcar ( $98,5 \pm 1,5\%$ ) foi em meio contendo melaço ( $70 \text{ g.L}^{-1}$ ), a  $28^\circ\text{C}$ , 200 rpm por 120h, com uma faixa ótima de pH 6,5 a 7,5 (ROUKAS, 1998)

Lazaridou *et al.* (2002) utilizaram um pré tratamento com ácido sulfúrico (1N) e carvão ativo ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) no meio contendo melaço de beterraba para produção de pululana pelo *Aureobasidium pullulans*, em um fermentador de 9 L com volume de trabalho 6 L a  $28^\circ\text{C}$  com fornecimento de ar seco  $1,4 \text{ dm}^3.\text{min}^{-1}$ , no qual foi testado rotações de 300, 500 e 700 rpm, onde foi constatado que a combinação de ácido e carvão apresentou uma concentração de pululana máxima de  $49 \text{ g.L}^{-1}$ , e biomassa seca de  $25 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo o rendimento de pululana de 50% com agitação de 700 rpm, se comparado com o de menor agitação (300 rpm) com consumo de açúcar de 97%. O meio apresentava uma concentração inicial de açúcar de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  as condições do processo foi a  $28^\circ\text{C}$ , com melhor agitação de agitação de 700 rpm por 196h e pH 7.

Para a bioprodução de goma por *Sphingomonas capsulata* foi utilizado ácido sulfúrico (1N) como um pré tratamento no melaço de cana associado por uma filtração (gases e algodão) na possibilidade de remoção de inibidores, no qual verificou que o meio pré tratado apresentou uma produtividade de  $0,290 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  sendo superior ao meio bruto de  $0,190 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e um aumento de 34% na produção deste biopolímero, a  $28^\circ\text{C}$ , 208 rpm por 72h e pH de 4,0. (BERWANGER, 2005).

Valduga *et al.* (2007) otimizaram o pré tratamento com carvão ativo para definir a melhor condição para aplicação nos coprodutos (melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho) para a bioprodução de carotenoide pela *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). As faixas de carvão ( $40$  a  $80 \text{ g.L}^{-1}$ ), temperatura ( $70$  a  $90^\circ\text{C}$ ) e tempo de contato 60 minutos foram estudadas, sendo a melhor condição de pré tratamento com  $80 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativo durante 1h em frascos agitados (150rpm) a

90 °C. Também foram estudados outros pré tratamentos como ácido sulfúrico e fosfórico (1N) no substrato melaço e água de maceração de milho. Além disso, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  sem pré tratamento, onde as variáveis estudadas foram melaço de cana de açúcar (10 a 40 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>) e hidrolisado de levedura (0 a 10 g.L<sup>-1</sup>), obtendo máxima produção de 479 µg.L<sup>-1</sup>, na condição de 40 g.L<sup>-1</sup> melaço e 0 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 10 g.L<sup>-1</sup> de hidrolisado de levedura. O segundo planejamento foi realizado com os substratos pré tratados na melhor condição do estudo para o carvão, com os mesmas variáveis e níveis estudados no planejamento anterior, onde foi verificado que a máxima produção de carotenoide foi de 208,6 µg.L<sup>-1</sup> com 10 g.L<sup>-1</sup> melaço (pré tratado), 10 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho (pré tratado) e 10 g.L<sup>-1</sup> de hidrolisado de levedura. O terceiro planejamento foi com os ácidos sulfúricos e fosfóricos, onde as variáveis estudadas foram melaço (2,9 a 17,1 g.L<sup>-1</sup>), água de maceração de milho (5 g.L<sup>-1</sup>) e hidrolisado de levedura (1,4 a 8,5 g.L<sup>-1</sup>), onde a produção máxima foi de 580,6 µg.L<sup>-1</sup> com 10 g.L<sup>-1</sup> de melaço, 5 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 5 g.L<sup>-1</sup> hidrolisado de levedura, no qual foram superiores ao meio tratado com carvão ativo. Os cultivos foram realizados a 25 °C, 180 rpm por 120h com pH inicial de 4,0.

Treichel (2004) estudou o efeito do ácido sulfúrico e/ou fosfórico e terra diatomácea como pré tratamento no melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho, a fim de viabilizar sua utilização como substratos para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-7571). Sendo que realizou também uma metodologia de pré tratamento com carvão ativo, a fim de verificar a melhor forma de utilização para aplicação nos substratos agroindustriais (água de maceração de milho e melaço de cana). Dessa forma, o melhor pré tratamento foi com o carvão ativo (8%, a 70 °C, 150 rpm por 1h de contato) sendo que a máxima atividade obtida foi de 1300 U.mL<sup>-1</sup>, com um incremento de 23% se comparado ao sem pré tratamento, nas concentrações de 150 g.L<sup>-1</sup> de melaço, 50 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho e 6 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura. No qual os cultivos foram realizando a 36 °C, 150 rpm por 72h, com pH inicial 5,0.

Lee *et al.* (2006) realizaram um pré tratamento em chips de madeira mista (hidrolisados e pré hidrolisados) para produção de etanol pelo *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (MO1442). A utilização de carvão ativo (10,0 g), foi capaz de remover hidroximeilfurfural e furfural que são os principais compostos tóxicos, que interferem na produção do etanol, no entanto o rendimento do etanol foi de 80% se comparado ao sem pré tratamento (100%). Isso é devido ao carvão ativo remover além dos inibidores, 8,9% dos açúcares diminuindo o rendimento do etanol. Sendo que cultivo foi realizando a 51 °C por 68h e pH 5,8.

Chang *et al.* (2011) utilizaram lodo e glicose para produção de hidrogênio biológico por bactérias, realizando pré tratamento com ácido clorídrico ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), clorofórmio ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e 2-bromo-etane sulfonato,  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (BES). Demonstrando que o melhor tratamento foi com ácido clorídrico alcançando um rendimento de hidrogênio máximo de  $1,51 \text{ mol.mol}^{-1}$  de glicose consumida e a produção de hidrogênio específica máxima de  $22,81 \text{ mmol.H}_2\text{.g}^{-1}$ , gerando um incremento de 80,8% na produção máxima de hidrogênio se comparando ao controle, realizando o cultivo a  $35^\circ\text{C}$ , 150 rpm por 48h e sendo o pH inicial de 7.

Squarezi *et al.* (2009) pesquisaram a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-7571), usando melão de cana e água de maceração de milho como fonte de carbono e de nitrogênio respectivamente, utilizando ácido sulfúrico (1N) e/ou fosfórico (1N) como pré tratamento para remoção de interferentes presentes como metais que possa ocasionar uma ineficiência do processo e clarificando o meio para facilitar a recuperação da enzima. Dessa forma o melhor tratamento foi com ácido fosfórico apresentando uma redução de cor aproximadamente de 70% em ambos os substratos, a qual contribui de 50 para 80% nos custos totais de purificação da enzima, e um máxima atividade de  $1,139 \text{ U.m.L}^{-1}$ . Sendo o meio formado com  $100 \text{ g.L}^{-1}$  água de maceração de milho,  $100 \text{ g.L}^{-1}$  melão de cana, e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de Prodex Lac. O cultivo foi realizado a  $36^\circ\text{C}$ , 150 rpm, por 108h, tendo o pH inicial de 5,0.

Na produção de inulinase *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-7571) foi realizando um estudo da melhor condição de aplicação do carvão ativo ( $4\% \text{ p.v}^{-1}$ , 150 rpm, tempo de contato de 10 min. a  $60^\circ\text{C}$ ) no meio composto por melão de cana de açúcar ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho ( $188 \text{ g.L}^{-1}$ ) e extrato de levedura ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Constando que o carvão promove uma clarificação do meio e atingiu uma atividade enzimática máxima igual a  $562 \text{ U.mL}^{-1}$  e uma concentração de biomassa final de  $45 \text{ g.L}^{-1}$ . O cultivo foi realizado a  $36^\circ\text{C}$ , 450 rpm, com taxa de aeração de 1,5 vvm e com pH controlado a 4,5 (MENDES, 2006).

Mussatto e Roberto (2001) realizaram um estudo de pré tratamento com carvão ativo para a produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*, na tentativa de remoção de interferentes como furfural, hidroximetilfurfural, compostos aromáticos, ácido acético, taninos e metais como cromo, ferro, cobre e níquel que possivelmente possam estar presentes na palha de arroz que foi o substrato hidrolisado e pré tratado para o cultivo, no qual o meio era formado por hidrolisados de palha de arroz ate diluição conter  $90 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. Foi verificado que a conversão de xilose para xilitol foi de 22% se comparado ao ensaio sem pré tratamento. Isso é devido à remoção de 27% de compostos fenólicos presentes no meio de cultivo que foi estudado através da

absorbância a 279 nm. Sendo realizado o cultivo a 30 °C, 250 rpm, por 96h e com pH inicial de 6,5.

### **3.7. Considerações finais**

Tendo em vista a vasta gama de trabalhos científicos com diferentes pré tratamentos em vários tipos de coprodutos, onde o aumento da bioprodução pode chegar até 50% se comparado os cultivos sem o pré tratamento, se faz necessário o estudo de pré tratamentos para os substratos alternativos para o melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho, a fim de aumentar a produção e produtividade de carotenoides em cultivos submersos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus*.

Com a utilização de substratos alternativos verifica-se a necessidade de uma etapa que clarifique o meio para possibilitar a maximização da bioprodução e diminuição nos custos de purificação do produto.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Micro-organismo**

Foi utilizado a levedura *Sporidiobolus pararoseus* previamente isolada e identificada por Otero (2011).

#### **4.1.1. Manutenção e reativação da cultura microbiana**

O micro-organismo foi mantido com repiques trimestrais (3 meses) em tubos de ensaio contendo ágar GYMP (2 g.L<sup>-1</sup> glicose, 1 g.L<sup>-1</sup> extrato de malte, 0,5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 0,2 g.L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,8 g.L<sup>-1</sup> ágar) inclinado com óleo mineral sob refrigeração a 4°C (COELHO, 2005). Para a reativação, a partir das culturas estoques foi realizados repiques para outros tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48h a 25°C. Após foi realizada uma ressuspensão celular (pré inóculo) em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL no meio YM modificado (3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, adicionados de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>) segundo Parajó e Vázquez (1998), sendo incubados nas mesmas condições descritas anteriormente.

### **4.2. Coprodutos agroindustriais**

Os substratos industriais utilizados neste trabalho foram doados por agroindústrias: o glicerol, oriundo da síntese do biodiesel (BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A - Passo Fundo - RS); o melão de cana-de-açúcar (Guimarães Indústria e Comércio Ltda. - RS) e a água de maceração de milho (Corn Products de Balsa Nova - PR) e previamente caracterizados quanto ao teor de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (SILVA, 2010; OTERO, 2011; CIPOLATTI, 2012).

### **4.3. Carvão ativo e terra diatomácea**

Para os pré tratamentos nos substratos agroindustriais foi utilizado carvão ativo da marca Labsynth com diâmetro de partícula de 1-2mm e terra diatomácea da marca Vetec, com massa específica de 280 kg.m<sup>-3</sup> e esfericidade de 0,8 Φ.

### **4.4. Preparo do inóculo**

O inóculo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do meio de cultivo YM modificado (PARAJÓ e VÁZQUEZ, 1998), previamente esterilizado a 121°C por 15 min., e adicionado dos 10 mL do pré inóculo, sendo incubado a 25°C, 150 rpm

por 48h ou tempo necessário para atingir no mínimo  $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, contadas através de câmara de Neubauer (MICHELON, 2012).

#### 4.5. Cultivos em frascos agitados

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 500 mL com 225 mL dos meios, o pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inoculo, iniciando o cultivo com  $1 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, sendo as condições operacionais do processo 25°C, 180 rpm por 168h (SILVA, 2009). As amostras foram retiradas em intervalos regulares a cada 24h até o término do processo (168h), para acompanhar biomassa, pH, açúcares e carotenoides totais.

#### 4.6. Otimização dos meios agroindustriais sem pré tratamento

Visando maximizar a bioprodução de carotenoides microbianos foi realizados estudos dos efeitos da composição dos meios de cultura através de um delineamento composto central (DCC) 2<sup>2</sup> (4 ensaios + 3 pontos centrais) seguido de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> (4 ensaios + 4 ensaios no ponto axial + 3 pontos centrais) para os coprodutos agroindustriais água de maceração de milho e glicerol bruto, apresentados na Tabela 4. A Tabela 5 apresenta os níveis de outro DCCR 2<sup>2</sup> (4 ensaios + 4 ensaios no ponto axial + 3 pontos centrais) para os coprodutos agroindustriais água de maceração de milho e melão de cana de açúcar.

**Tabela 4:** Níveis utilizados no primeiro e segundo delineamentos para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol e água de maceração de milho.

Variáveis independentes/ Níveis	DCC			DCCR				
	-1	0*	+1	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	5	7,5	10	10	15,8	30	44,2	50
AMM (g.L <sup>-1</sup> )	20	25	30	30	44,5	55	65,5	80

\*Ponto central; AMM = Água de maceração de milho.

**Tabela 5:** Níveis utilizados no DCCR 2<sup>2</sup> para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com melão de cana de açúcar e água de maceração de milho.

Variáveis independentes/ Níveis	-1,41	-1	0*	+1	+1,41
Melão (g.L <sup>-1</sup> )	1,8	10	30	50	58,2
AMM (g.L <sup>-1</sup> )	2,27	3,5	6,5	9,5	10,73

\*Ponto central; AMM = Água de maceração de milho.

As respostas avaliadas para cada planejamento foram os máximos valores alcançados na produção volumétrica de carotenoides (µg.L<sup>-1</sup>) em cada ensaio, com os respectivos valores alcançados na produção específica de carotenoides (µg.g<sup>-1</sup>) no mesmo tempo da produção volumétrica, a biomassa (g.L<sup>-1</sup>) em cada ensaio no mesmo

tempo da produção volumétrica, a produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) determinada como o máximo valor alcançado na produção volumétrica de carotenoides em cada ensaio dividido pelo seu respectivo tempo de processo e calculada a relação C/N de cada meio de produção.

Para realização da otimização dos meios de cultivo os substratos, água de maceração de milho e melaço, foram armazenados sob congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), e antes de seu uso para formulação do meio de cultura foram realizadas lavagens e centrifugações sucessivas até total retirada dos nutrientes solúveis dos coprodutos.

#### 4.7. Avaliação de pré tratamentos nos substratos agroindustriais

Os diferentes pré tratamentos utilizados nos coprodutos, melaço e água de maceração de milho, visando aumentar a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, foram realizados avaliando a eficiência de cada pré tratamento em termos de concentração de glicose e densidade ótica (ROUKAS, 1998).

##### 4.7.1. Utilização da terra diatomácea

Para avaliar a terra diatomácea como pré tratamento para o substrato melaço ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ) (VALDUGA *et al.*, 2007) foram estudados separadamente através de dois DCCR  $2^3$  (8 ensaios + 6 ensaios no ponto axial + 3 pontos centrais), estudando as variáveis independentes concentração da terra diatomácea, tempo de contato da terra diatomácea com o substrato agroindustrial e a temperatura do pré tratamento (TREICHEL, 2004) apresentados na Tabela 6.

Os experimentos foram realizados em frascos agitados a 150 rpm. Após o pré tratamento os substratos foram centrifugados ( $3439 \text{ xg}$  por 10min) e filtrados por um funil sobre um balão kitasato, contendo uma coluna de filtração, composta de papel de filtro, 3,5 g de terra diatomácea e uma camada de algodão, estando acoplados a uma bomba a vácuo para agilizar o processo de filtração.

**Tabela 6:** Níveis utilizados no primeiro e segundo delineamentos composto central rotacional  $2^3$  para o pré tratamento com terra diatomácea para o melaço e a água de maceração de milho.

Variáveis independentes/ Níveis	DCCR					DCCR				
	-1,68	-1	0*	+1	+1,68	-1,68	-1	0*	+1	+1,68
Terra (%)	5,23	6	7	8	8,68	3,33	4	5	6	6,67
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	60	64	70	76	80	25	27,80	32	36,20	39
Contato (h)	1,33	1,5	1,75	2	2,17	05	0,7	1	1,3	1,5

\*Ponto central

A melhor condição de utilização da terra diatomácea como pré tratamento foi aplicado nas condições ótimas da bioprodução de carotenoides, no item 4.6.

#### **4.7.2. Pré tratamento com carvão ativo**

Nas melhores condições definidas na otimização dos meios agroindustriais sem pré tratamento (item 4.6.) foram utilizados 8% (p.v<sup>-1</sup>) de carvão ativo granular, 1-2 mm (Labsynth) em frascos, com agitação de 150 rpm durante 1h de contato a 90°C. Após o pré tratamento os substratos foram centrifugados (3439 xg), por 10 min (VALDUGA *et al.*, 2007) e filtrados por um funil sobre um balão kitasato, adaptando uma coluna de filtração, composta de papel de filtro, 3,5 g de terra diatomácea (tendo um efeito de filtro físico) e uma camada de algodão, acoplado a uma bomba a vácuo.

#### **4.7.3. Pré tratamento com ácido sulfúrico ou fosfórico**

Os ensaios com tratamento ácido foram realizados de acordo com Treichel (2004) e Valduga *et al.*, (2007). Nas melhores condições definidas na otimização dos meios agroindustriais sem pré tratamento (item 4.6.), os substratos separados nessa condição foram ajustados ao pH 3,0 com a utilização de ácido sulfúrico 1N ou ácido fosfórico 1N. Os meios permaneceram em repouso por 24h a temperatura ambiente, e após foi realizado uma centrifugação a 3439 xg por 10 min, ajustando seu pH para 6,0 com solução de NaOH (ROUKAS, 1998).

### **4.8. Metodologia Analítica**

#### **4.8.1. Determinação do pH**

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um potenciômetro, segundo AOAC (2000).

#### **4.8.2. Determinação da concentração de biomassa**

A concentração celular ao longo da bioprodução dos carotenoides foi estimada por leitura da absorbância a 620 nm, através de uma curva padrão de biomassa (KUSDIYANTINI, *et al.* 1998).

#### **4.8.3. Determinação da concentração de carotenoides totais**

Para a determinação da concentração de carotenoides totais a biomassa foi seca por 48h a 35°C (FONSECA *et al.*, 2011), posteriormente macerada em um grau e padronizada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012). Uma amostra de 0,05 g de células secas em tubos de ensaios foram congeladas por 48h. Posterior à etapa de

congelamento, estes mesmos tubos foram revestidos com proteção contra luz onde foi submetidos a uma lise com 2 mL de dimetilsulfóxido - DMSO ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), homogeneizadas em vórtex, sendo que a cada intervalo de tempo, 15 min., foi novamente homogeneizado em vórtex por 1 min. até completar um período de 1h de contato (FONSECA *et al.*, 2011).

Após a ruptura foi adicionado 6 mL de acetona, um solvente que promove melhor a extração do carotenoide. A amostra foi centrifugada a 3439 xg por 10 min., a fase solvente separada (armazenada em frasco âmbar 50 mL) e o procedimento de ruptura foi repetido até o branqueamento total da célula. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p.v<sup>-1</sup>) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases foi coletado a fase polar e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), originando os extratos carotenogênicos (MICHELON *et al.* 2012). A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizado em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) através do valor médio da máxima absorvância a 448 nm (Cabral *et al.* 2011), utilizando a Equação 1 (Davies, 1976), que foi expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β-caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de  $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ ) de acordo com Davies (1976).

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

Onde:

CT = concentração específica de carotenoides de totais (μg.g<sup>-1</sup>)

A = absorvância;

V = volume (mL);

$m_{\text{amostra}}$  = massa celular seca (g);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$  = absortividade específica.

Para o cálculo da produção volumétrica de carotenoides totais (μg.L<sup>-1</sup>) foi realizada uma conversão de unidades utilizando o resultado de concentração de carotenoides totais (μg.g<sup>-1</sup>) e da concentração da biomassa (g.L<sup>-1</sup>).

#### 4.8.3.1. Influência do processo de secagem para recuperação da biomassa

A influência da operação de secagem da biomassa descrita acima como 48h a 35°C (FONSECA *et al.*, 2011) foi avaliada sendo a mesma substituída pelo processo de liofilização. Uma amostra de biomassa de 0,4 g obtida no final do processo (168h), utilizando meio de cultivo formulado com melação (30 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de

milho ( $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), obtida a  $25^\circ\text{C}$ , 180rpm com pH inicial de 6, foi recuperada por centrifugação (3439 xg por 10min.) e lavada com água destilada para remoção do meio. A biomassa foi transferida para placa de Petri e armazenada por 24h em ultrafreezer ( $-80^\circ\text{C}$ ), sendo realizada a liofilização por 24h (até restar 2% de umidade na amostra). Os testes foram realizados em triplicata, com ausência e presença de maceração em mesh 115, as demais condições de extração seguiram o protocolo descrito acima (5.8.3).

#### **4.8.4. Determinação da concentração de açúcares redutores totais**

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada através do método DNS (MILLER, 1959).

#### **4.9. Análise estatística**

Para avaliação do desempenho dos pré tratamentos nos substratos agroindustriais, os ensaios foram conduzidos em triplicata para posterior análise de variância (ANOVA) verificando a influência dos diferentes tratamentos nos meios agroindustriais, seguido por teste de diferença de médias (tukey) a 5% de significância.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software Statistica V 6.0 (Startsoft).

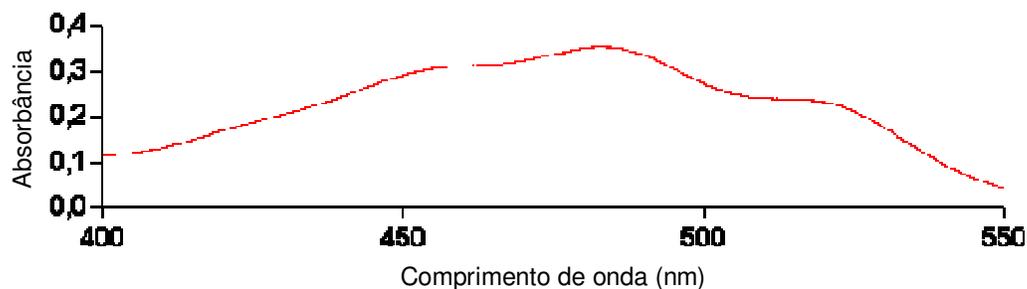
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Espectroscopia de varredura do extrato carotenogênico da *Sporidiobolus pararoseus*

A levedura utilizada para este estudo, *Sporidiobolus pararoseus*, foi previamente selecionada, por apresentar a maior produção de carotenoides totais e fatores de conversão em meios formulados com diferentes combinações de coprodutos agroindustriais, quando comparada com as demais cepas de leveduras silvestres *R. mucilaginoso* e *P. fermentans* isoladas por Otero (2011). Em meios contendo água de parboilização de arroz mais glicerol e água de parboilização de arroz mais melação Otero (2011) verificou a produção de  $634,49 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $87,28 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e  $830,33 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $68,07 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), respectivamente. Enquanto Cipolatti (2012) modificando a fonte de nitrogênio, observou em meios de produções contendo água de maceração de milho mais glicerol e água de maceração de milho mais melação  $820 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $86,46 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) e  $710 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $106,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), respectivamente, com destaque para a produção de  $\beta$ -caroteno de aproximadamente 90 e 95% dos carotenoides totais, para estes meios.

Inicialmente foi realizada uma varredura em espectrofotômetro no comprimento de onda variando entre 400 a 550 nm e a absorbância entre 0 a 0,3 (Figura 5), com uma amostra obtida do cultivo utilizando água de maceração de milho ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) e glicerol ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ), a  $25^\circ\text{C}$ , 180 rpm no tempo de 168h.

Através da Figura 4 pode-se verificar 3 picos de absorbância, onde o 1º pico tem o valor aproximado de 455,08 nm, que pode representar a presença da Capsantina. O 2º pico é de aproximadamente 480 nm, característico do  $\beta$ -caroteno, sendo responsável pela maior absorção em éter de petróleo, e o 3º pico tem o valor aproximado a 525,06 nm, sugerindo a presença de Rodoxantina, em menor quantidade na amostra analisada (DAVIES, 1976).



**Figura 5:** Varredura em espectrofotômetro da *Sporidiobolus pararoseus* em meio de cultivo contendo água de maceração de milho (20 g.L<sup>-1</sup>) e glicerol bruto (20 g.L<sup>-1</sup>), a 25 °C, 180 rpm em 168h.

Otero (2010) realizou uma identificação dos carotenoides produzidos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* através de uma Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em meio YM (3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona e 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose), a 25 °C, 180 rpm por 168h com pH inicial de 6, alcançando uma produção volumétrica de 905 µg.L<sup>-1</sup> (123,64 µg.g<sup>-1</sup>). Foi verificado que o carotenoide majoritário produzido foi o β-caroteno seguido pela luteína. Já Cipolatti (2012) para o mesmo micro-organismo identificou os mesmos carotenoides nos meios de cultivos M<sub>1</sub> (4,8 g.L<sup>-1</sup> de glicerol + 35,6 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho) e M<sub>2</sub> (6,0 g.L<sup>-1</sup> de melaço + 36,5 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho) a 25 °C, 180 rpm, por 168h, com pH inicial de 6, identificando por HPLC dois carotenoides sendo o majoritário β-caroteno seguido por luteína, com 771 µg.L<sup>-1</sup> e 93 µg.L<sup>-1</sup> no meio M<sub>1</sub> e 1421 µg.L<sup>-1</sup> e 85 µg.L<sup>-1</sup> no meio M<sub>2</sub>, respectivamente.

Assim, verifica-se que a levedura *Sporidiobolus pararoseus* apresenta a capacidade de produzir o β-caroteno como sendo o carotenoide majoritário, independente da formulação de meios complexo (fontes alternativas de nutrientes) utilizados. Portanto, neste trabalho foi aplicada à ferramenta da metodologia de planejamento experimental para otimização de dois meios de cultivo água de maceração de milho com glicerol e água de maceração de milho com melaço, para a produção de carotenoides, no qual será empregado o método de espectrofotometria para a estimativa da concentração de β-caroteno.

## 5.2. Produção de carotenoides nos meios agroindustriais sem pré tratamento

### 5.2.1. Primeiro planejamento para meio formulado com água de maceração de milho e glicerol bruto

Nesta primeira etapa, foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de bioprodução para água de maceração de milho e glicerol bruto. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como suas respostas. Enquanto a Figura 6 mostra o acompanhamento desta bioprodução de carotenoides, envolvendo a produção de biomassa (a), pH (b), a produção específica (c) e volumétrica (d) para os ensaios deste DCC.

Analisando a Tabela 7 é possível verificar uma variação nas repostas, como a máxima produção volumétrica de carotenoides de  $154,86 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 1) a  $640 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 4), máxima produção específica de  $35 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 1) a  $99,06 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 4), concentração de biomassa de  $4,42 \text{g.L}^{-1}$  (ensaio 1) a  $6,47 \text{g.L}^{-1}$  (ensaio 4) e a razão C/N dos meios de produção que apresentaram pequenas modificações de 6,55 (ensaio 3) a 9,82 (ensaio 2). A produtividade em carotenoides volumétricos variou de  $0,922 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 1) a  $3,813 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 4), a produtividade em carotenoides específicos de  $0,208 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 1) a  $0,59 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 4) e a produtividade em biomassa variando entre  $0,026 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 1) a  $0,039 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 4). Em geral observa-se também que os máximos valores de carotenoides volumétricos, específicos e biomassa encontrados estão no maior nível de concentração do glicerol bruto, indicando uma provável necessidade de ampliação da faixa de concentração para ambos este substrato.

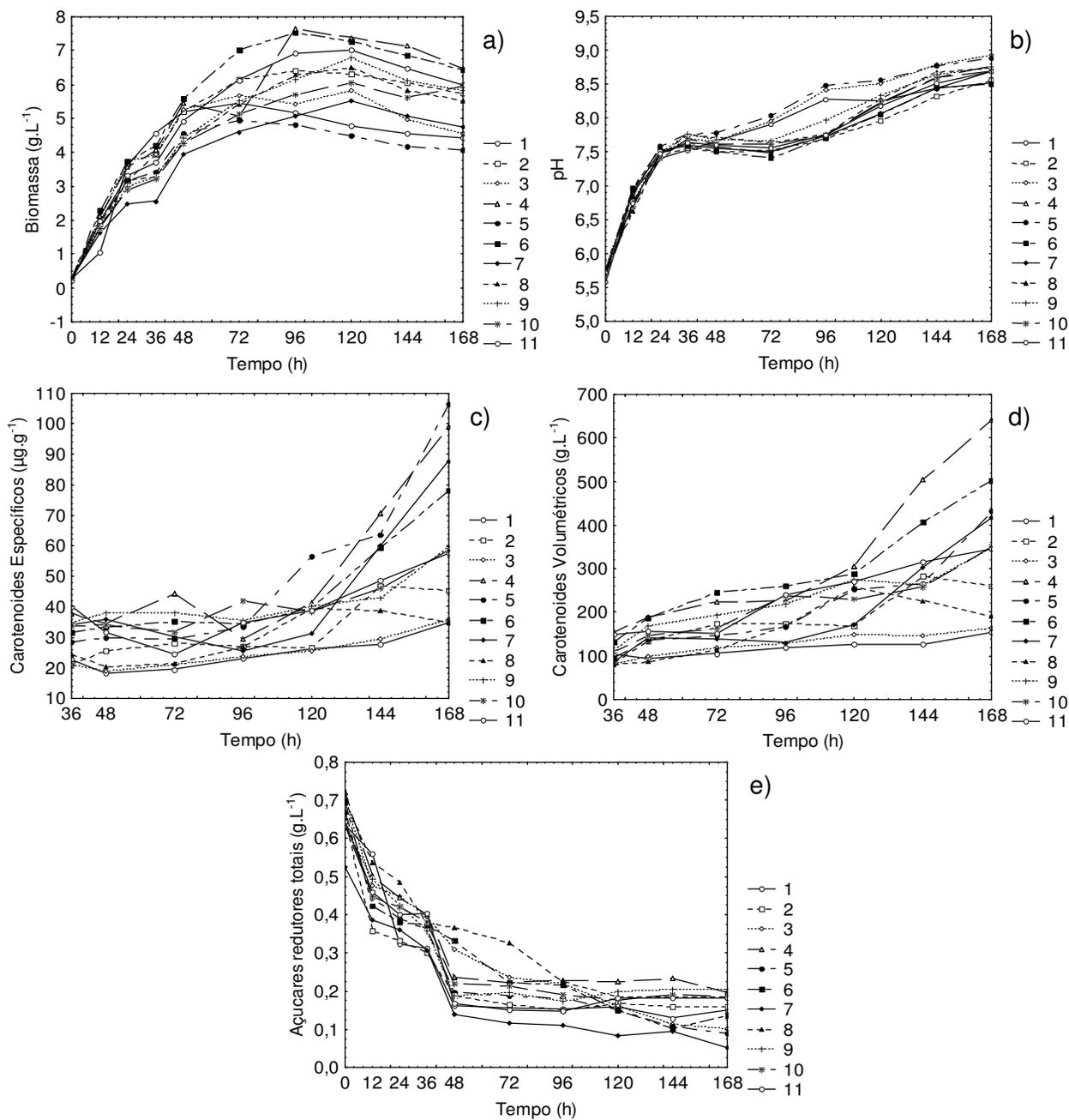
Nota-se na Tabela 7 que a condição do ensaio 4, formulada com  $10 \text{g.L}^{-1}$  de glicerol e com  $30 \text{g.L}^{-1}$  de água de maceração de milho, apresentou uma relação C/N de 8,26, e resultou nas maiores respostas para bioprodução de carotenoides  $640 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $99,06 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), em 168h de cultivo, a partir de  $4,42 \text{g.L}^{-1}$  de biomassa, apresentando produtividades em carotenoides de  $3,816 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ( $0,208 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e produtividade em biomassa  $0,039 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

O perfil de pH dos cultivos (Figura 6b) de todos os ensaios para *S. pararoseus* apresentou um comportamento crescente ao longo das 168h de processo, já observado anteriormente por Otero (2011) e Cipolatti (2012), para este mesmo micro-organismo em diferentes composições de meios formulados com estes coprodutos agroindustriais. Além disso verifica-se que o açúcar disponível no meio de cultivo foi quase todo consumido pela levedura ao final do processo (Figura 6e).

**Tabela 7:** Delineamento composto central  $2^2$  (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol bruto e água de maceração de milho.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Dr <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Dr <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Dr <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Dr <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Dr <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>	Dr <sub>6</sub>	Y <sub>7</sub>	Dr <sub>7</sub>	Dr <sub>5</sub>
1	5 (-1)	20 (-1)	154,86 (168h)	-6,57	35,00	-2,40	4,42	-6,68	7,42	-3,85	0,922	-6,72	0,208	-2,40	0,026	-3,85	-6,72
2	10 (+1)	20 (-1)	283,19 (144h)	-7,82	46,78	-1,85	6,05	-7,37	9,82	2,38	1,967	-3,10	0,325	-1,85	0,042	2,38	-3,10
3	5 (-1)	30 (+1)	163,03 (168h)	-6,23	35,84	-2,81	4,55	-3,75	6,55	<0,01	0,97	-6,39	0,213	-2,82	0,027	<0,01	-6,39
4	10 (+1)	30 (+1)	640,54 (168h)	-3,46	99,06	-1,19	6,47	-0,53	8,26	2,86	3,813	-1,65	0,59	-1,19	0,039	-5,13	-1,65
5	7,5 (0)	25 (0)	348,95 (168h)	6,41	59,82	4,49	5,83	3,83	7,93	5,55	2,078	4,72	0,356	4,49	0,035	2,86	4,72
6	7,5 (0)	25 (0)	349,63 (168h)	6,59	58,53	2,30	5,97	6,08	7,93	5,55	2,081	4,85	0,348	2,30	0,036	5,56	4,85
7	7,5 (0)	25 (0)	345,83 (168h)	5,57	57,70	0,87	5,99	6,40	7,93	5,55	2,059	3,84	0,343	0,87	0,036	5,56	3,84

X<sub>1</sub> = Glicerol (g.L<sup>-1</sup>); X<sub>2</sub> = Água de maceração de milho (g.L<sup>-1</sup>). Y<sub>1</sub> = Produção volumétrica (µg.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub> = Produção específica (µg.g<sup>-1</sup>); Y<sub>3</sub> = Biomassa (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>4</sub> = C/N (relação Carbono e nitrogênio no meio de cultivo), Y<sub>5</sub> = Produtividade em Carotenoides volumétricos. (µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>6</sub> = Produtividade em carotenoides específicos. (µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>7</sub> = Produtividade em Biomassas (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) Dr<sub>1</sub> = Desvio relativa (%) para a resposta produção volumétrica; Dr<sub>2</sub> = Desvio relativa (%) para a resposta produção específica; Dr<sub>3</sub> = Desvio relativo (%) para a resposta biomassa; Dr<sub>4</sub> = Desvio relativo (%) para a resposta C/N. Dr<sub>5</sub> = Desvio relativo (%) para a resposta produtividade em carotenoides volumétrico; Dr<sub>6</sub> = Desvio relativo (%) para a resposta produtividade de carotenoides específica, Dr<sub>7</sub> = Desvio relativo (%) para a resposta produtividade em Biomassas.



**Figura 6:** Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por *S. pararoseus* ao longo de 168h, a 25°C e 180 rpm, no delineamento central composto  $2^2$  formulado com água de maceração de milho e glicerol bruto nos meios de cultivo.

### **5.3.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa**

Considerando as variáveis glicerol bruto e água de maceração de milho foi realizada a verificação dos modelos de primeira ordem analisando as respostas produção volumétrica e específica de carotenoides totais, biomassa, relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, produtividade em carotenoides específica e produtividade em biomassa em função das concentrações dos componentes do meio de cultura.

Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, desvio padrão, limites de confiança apresentados no Apêndice 2. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentando nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Na Tabela 8 para a as respostas produção volumétrica e específica de carotenoides percebe-se que todos os coeficiente do modelo foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). Na concentração celular somente o coeficiente glicerol bruto (L), foi significativo ( $p \leq 0,05$ ), já para a relação C/N do meio todos os coeficientes foram significativos.

Para as produtividades em carotenoides volumétrica e específica percebe-se todos os coeficientes glicerol bruto (L), água de maceração de milho (L) e interação glicerol bruto x água de maceração de milho foram significativas ( $p \leq 0,05$ ). A produtividade em biomassa somente o coeficiente glicerol bruto (L) apresentou significativo para 95% de confiança. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 9.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,99; 0,99; 0,91; 0,99; 0,99; 0,99 e 0,93 foram calculados na ANOVA (Tabela 9), respectivamente, para produção volumétrica em carotenoides, produção específica em carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, produtividade em carotenoides específicos e produtividade em biomassa, com isso pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão  $F_{calculado}$  sobre  $F_{tabelado}$  foi 6,85 para produção volumétrica em carotenoides, 8,03 para a produção específica em carotenoides 3,85 para biomassa, 36,68 para relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo, 14,09 para produtividade em carotenoides volumétrica, 21,55 para produtividade em carotenoides específicos e 3,21 para produtividade em biomassa.

**Tabela 8:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrico carotenoides (PVC) e produção específico carotenoides (PEC), biomassa relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, produtividade em carotenoides específica e produtividade em biomassa.

	Carotenoide Volumétricos ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )					Carotenoides Específicos ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )			
	CR	EP	t (3)	p		CR	EP	t (3)	p
Média**	326,58	10,80	30,24	<0,01	Média**	56,10	1,33	42,15	<0,01
X <sub>1</sub> (L)**	151,46	14,29	10,60	<0,01	X <sub>1</sub> (L)**	18,75	1,76	10,64	<0,01
X <sub>2</sub> (L)**	91,38	14,29	6,40	0,01	X <sub>2</sub> (Q)**	13,28	1,76	7,54	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	87,30	14,29	6,11	0,01	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	12,86	1,76	7,30	0,01
	Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )					Relação C/N			
	CR	EP	t (3)	p		CR	EP	t (3)	p
Média**	5,61	0,16	34,74	<0,01	Média**	7,98	0,02	338,42	<0,01
X <sub>1</sub> (L)**	0,89	0,21	4,15	0,03	X <sub>1</sub> (L)**	1,03	0,03	32,95	<0,01
X <sub>2</sub> (L)	0,14	0,21	0,64	0,57	X <sub>2</sub> (L)**	-0,61	0,03	-19,48	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,07	0,21	0,39	0,76	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	0,17	0,03	-5,53	0,01

\*\* ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Glicerol bruto; X<sub>2</sub>: Água de maceração de milho;

**Tabela 8 Continuação:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específico carotenoides (PEC), biomassa, relação C/N, e produtividade em biomassa.

	Produtividade em Carot. Volumétricos ( $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )				Produtividade em Carot. Específicos ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )				
	CR	EP	t (3)	p	CR	EP	t (3)	p	
	Média**	1,98	0,04	44,75	<0,01	Média**	0,34	0<0,01	71,83
X <sub>1</sub> (L)**	0,97	0,06	16,57	<0,01	X <sub>1</sub> (L)**	0,12	0,01	19,70	<0,01
X <sub>2</sub> (L)**	0,47	0,06	8,07	<0,01	X <sub>2</sub> (Q)**	0,07	0,01	10,77	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	0,44	0,06	7,66	<0,01	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	0,07	0,01	10,37	<0,01

	Produtividade em Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )			
	CR	EP	t (3)	p
Média**	0,034	0<0,01	53,45	<0,01
X <sub>1</sub> (L)**	0<0,01	0<0,01	8,21	<0,01
X <sub>2</sub> (L)	0<0,01	0<0,01	-0,59	0,60
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0<0,01	0<0,01	-1,17	0,33

\*\* ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Glicerol bruto; X<sub>2</sub>: Água de maceração de milho;

**Tabela 9:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
Fonte de variação	PVC	PEC	PVC	PEC	PVC	PEC	PVC	PEC
Regressão	155643,4	2773,21	3	3	51881,13	924,40	63,56	74,55
Resíduo	2448,8	37,20	3	3	816,27	12,4		
Total	158092,2	2810,41	6	6				
	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
Fonte de variação	Bio.	CN.	Bio.	C/N	Bio.	C/N	Bio.	C/N
Regressão	3,16	5,813	1	3	3,16	1,94	24,31	340,35
Resíduo	0,64	0,017	5	3	0,13	0,0057		
Total	3,80	5,83	6	6				
	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
Fonte de variação	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.	Prod. Vol.	Prod. Esp.
Regressão	5,489	0,096134	3	3	1,83	0,032	130,71	200
Resíduo	0,041	0,000472	3	3	0,014	1,57.10 <sup>-4</sup>		
Total	5,53	0,096606	6	6				
	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
Fonte de variação	Prod. Bio.	Prod. Bio	Prod. Bio	Prod. Bio	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.	Prod. Bio.
Regressão		0,000196	4		0,000049		16,67	
Resíduo		0,000014	5		0,000003			
Total		0,000210	6					

PVC=Produção volumétrica de carotenoides; PEC=produção específica de carotenoides; Bio.=Biomassa; C/N=Relação carbono e nitrogênio; Prod. Vol.=Produtividade em carotenoides volumétricos; Prod. Esp.=Produtividade em carotenoides específicos e Prod. Bio.=Produtividade em biomassa. PVC (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28); PEC (R: 0,99, F<sub>3; 7; 0,95</sub> = 9,28), Bio. (R: 0,91, F<sub>1; 5; 0,95</sub> = 6,61), C/N (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28), Prod.Vol. (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28), Prod. Esp. (R: 0,99, F<sub>3; 3; 0,95</sub> = 9,28) e Prod. Bio. (R: 0,93, F<sub>4; 5; 0,95</sub> = 5,19).

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas em função das variáveis glicerol bruto, água de maceração de milho nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

$$\text{Carotenoides volumétricos } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 326,57 + 151,46.\text{GLI} + 91,38.\text{AMM} + 87,30.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (8)$$

$$\text{Carotenoide Especifico } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 56,10 + 18,75.\text{GLI} + 13,28.\text{AMM} + 12,86.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (9)$$

$$\text{Biomassa } (\text{g.L}^{-1}) = 5,61 + 0,89.\text{GLI} \quad (10)$$

$$\text{C/N} = 7,98 + 1,03.\text{GLI} - 0,61.\text{AMM} - 0,017.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (11)$$

$$\text{Prod. Vol. } (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 1,98 + 0,972.\text{GLI} + 0,474.\text{AMM} + 0,450.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (12)$$

$$\text{Prod. Esp. } (\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 0,340 + 0,124.\text{GLI} + 0,068.\text{AMM} + 0,065.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (13)$$

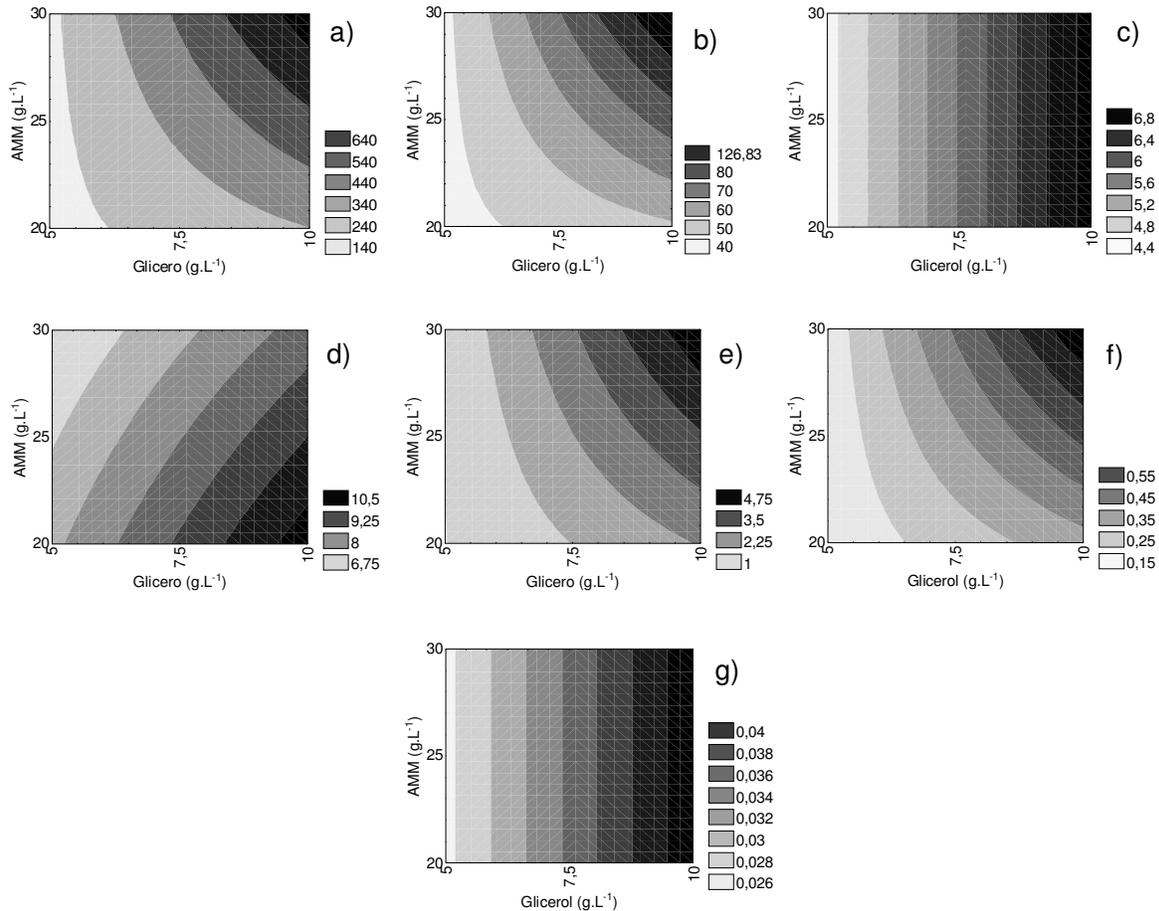
$$\text{Prod. Bio. } (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 0,034 + 0,007.\text{GLI} \quad (14)$$

Onde: GLI: glicerol bruto, AMM: água maceração de milho.

Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, apresentados na Tabela 9, foram inferiores a 20% (RODRIGUES e IEMMA, 2009), dessa forma as Equações 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 prevêem bem o comportamento da produção de carotenoides volumétrica, biomassa, relação carbono e nitrogênio, produtividade em carotenoides volumétricos, produtividade em carotenoides específicos e produtividade em biomassa, frente às variáveis estudadas.

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (Figura 6), podendo-se obter as concentrações das variáveis: glicerol bruto e água de maceração de milho para a máxima produção de carotenoides volumétricos, biomassa, C/N, produtividade em carotenoides volumétricos, produtividade em carotenoides específicos e produtividade em biomassa.

Com as curvas de contorno expostas nas Figuras 7a e 7b verifica-se que para obter elevada produção volumétrica e específica de carotenoides é possível trabalhar na faixa 9 a 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto combinado com 26 a 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Na utilização de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto associado a qualquer variação de 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho, é possível obter maiores concentrações de biomassa (Figura 7 c).



**Figura 7:** Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), produção específica (b), biomassa (c) relação C/N (d), produtividade em carotenoides volumétricos (e), produtividade em carotenoides específicos (f) e produtividade em biomassa (g). AMM=Água de maceração de milho.

Para aumentar a relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo deve-se trabalhar com glicerol bruto na faixa de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> e baixa concentração de água de maceração de milho 20 a 22 g.L<sup>-1</sup> (Figura 7d). No entanto, vale ressaltar que as maiores produções de carotenoides e produtividades do processo não foram observadas nestas maiores relações C/N (aproximadamente 10) e sim em relações C/N intermediárias (6 aproximadamente) onde as maiores produção de carotenoides foram de 640,54 µg.L<sup>-1</sup> (99,06 µg.g<sup>-1</sup>) tendo as produtividades de 3,813 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,59 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)

Quando utilizado água de maceração de milho na faixa 28 a 30 g.L<sup>-1</sup> juntamente com glicerol bruto entre 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> é possível obter as maiores produtividades volumétricos (Figura 7e) e específicas de carotenoides (Figura 7f). Para se ter uma elevada produtividade em biomassa deve-se trabalhar com glicerol bruto na faixa de 9,5 a 10 g.L<sup>-1</sup> e água de maceração de milho entre 20 a 30 g.L<sup>-1</sup> (Figura 7g).

Assim, a partir da análise conjunta de todas as superfícies de contorno da Figura 6 percebe-se que o aumento da concentração dos substratos pode favorecer

um incremento na produção e produtividade em carotenoides. Portanto, um novo sequenciamento do planejamento experimental foi realizado numa segunda etapa para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de bioprodução para água de maceração de milho e glicerol bruto, onde as faixas destes coprodutos foram ampliadas.

A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como suas respostas. Enquanto a Figura 8 mostra o acompanhamento desta bioprodução de carotenoides, envolvendo a produção de biomassa (a), pH (b), a produção específica (c) e volumétrica (d).

A produtividade volumétrica em carotenoides foi de  $2,82 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 4) a  $4,9 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 9), já para a produtividade específica em carotenoides foi de  $0,396 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 2) a  $0,579 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 8) e para produtividade em biomassa foi de  $0,0046 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 3) a  $0,071 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 7) de acordo com a Tabela 10. Comparando-se com o primeiro planejamento nota-se um ganho de 22,20% na produção volumétrica de carotenoides, 34,65% na biomassa, 22,18% na produtividade volumétrica em carotenoides e 45,07% na produtividade em biomassa.

Observando a Figura 8 percebe-se que uma evolução na concentração celular ao longo das 168h de cultivo além disso verifica-se que para quase todos os ensaio com exceção do ensaio um que houve um aumento no pH nas primeiras horas de cultivo e um queda brusca a partir de 24h e subsequentes aumento posterior a este período, tendo se mantido quase estável ao longo do processo.

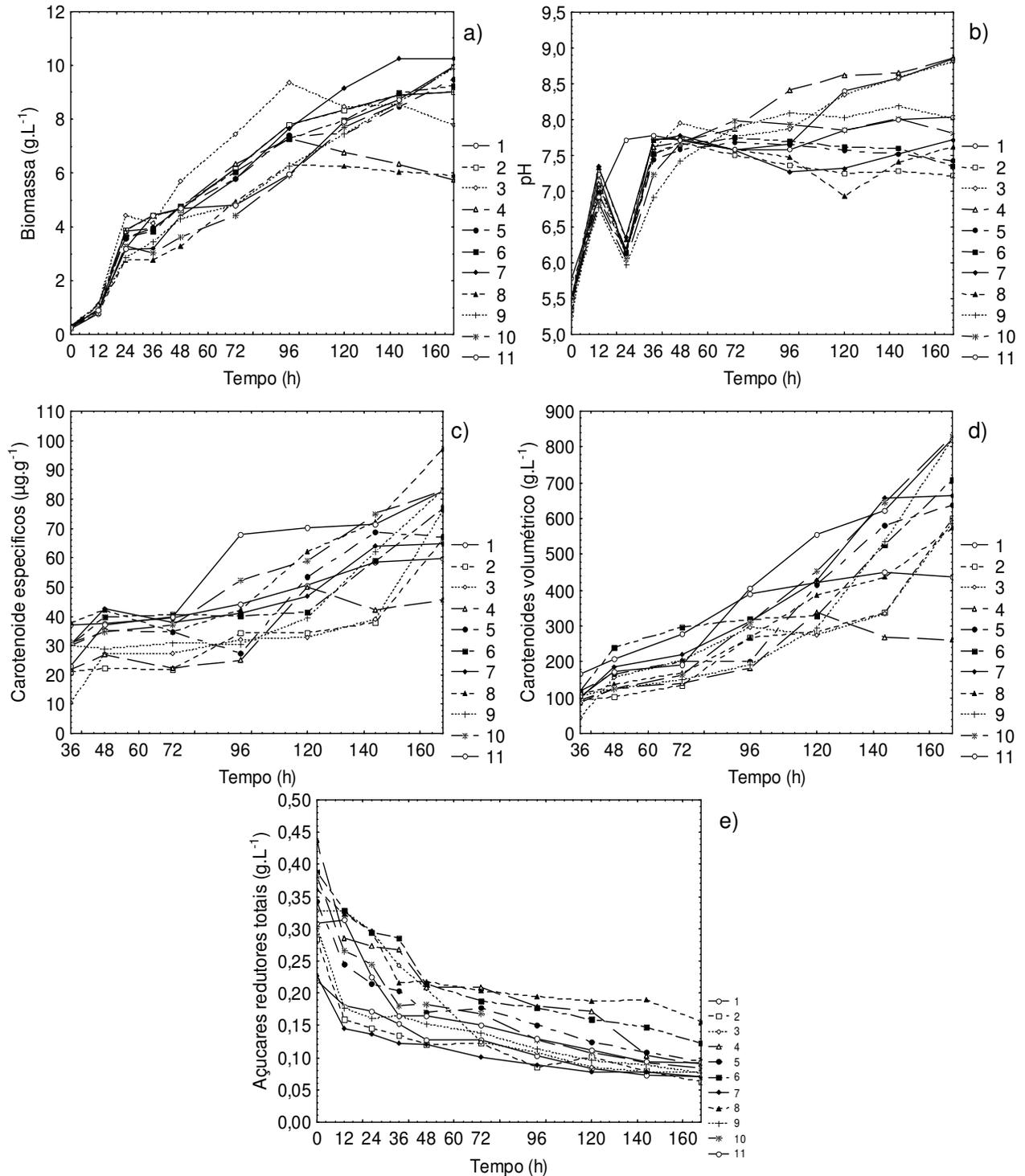
A característica de mudança no pH, é provavelmente devido ao fato da levedura excretar um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo ácido acético, álcool ou intermediário do ciclo do ácido cítrico, ocasionando a queda no pH. Esse intermediário é posteriormente reassimilado e estimula uma intensa carotenogênese, que resultará no aumento do pH. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo (BONFIM, 1999; ZENI, 2011).

A concentração final de açúcar foi aproximadamente 50% da inicial, provavelmente devido a levedura está consumindo outros nutrientes presentes na água de maceração de milho.

**Tabela 10:** Delineamento composto central rotacional  $2^2$  (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com glicerol bruto e água de maceração de milho.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Dr <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Dr <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Dr <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Dr <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>7</sub>
1	15,8 (-1)	44,5 (-1)	450 (144h)	-10,46	58,41	8,32	-9,61	7,42	8,47	3,13	-15,97	0,406	0,058
2	44,2 (+1)	44,5 (-1)	599,5 (168h)	-16,54	66,48	9,02	-8,87	9,82	13,79	3,57	-1,68	0,396	0,054
3	15,8 (-1)	65,5 (+1)	591,72 (168h)	-8,17	75,94	7,79	0,64	6,55	7,33	3,52	-3,13	0,452	0,046
4	44,2 (+1)	65,5 (+1)	338,03 (120h)	-29,70	49,82	6,78	0,88	8,26	11,33	2,82	-28,72	0,415	0,057
5	10 (-1,41)	55 (0)	637,64 (168h)	6,13	67,19	9,49	4,01	6,47	6,71	3,80	4,01	0,40	0,056
6	50 (+1,41)	55 (0)	707,78 (168h)	15,44	76,72	9,23	3,76	9,28	13,18	4,21	13,36	0,457	0,055
7	30 (0)	30 (-1,41)	656,2 (144h)	11,17	63,93	10,26	9,33	9,07	13,84	4,56	20,45	0,444	0,071
8	30 (0)	80 (+1,41)	575,32 (168h)	13,05	97,30	5,91	-3,96	7,26	8,66	3,42	-6,07	0,579	0,035
9	30 (0)	55 (0)	822,57 (168h)	0,02	83,10	9,90	-0,50	7,93	10,23	4,9	<0,01	0,495	0,059
10	30 (0)	55 (0)	820,79 (168h)	-0,19	83,13	9,98	0,30	7,93	10,23	4,89	-0,20	0,495	0,059
11	30 (0)	55 (0)	822,03 (168h)	-0,04	82,58	9,95	<0,01	7,93	10,23	4,89	-0,20	0,492	0,059

X<sub>1</sub>=Glicerol bruto (g.L<sup>-1</sup>); X<sub>2</sub>=Água de maceração de milho (g.L<sup>-1</sup>). Y<sub>1</sub>=Produção volumétrica (µg.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>=Produção específica (µg.g<sup>-1</sup>); Y<sub>3</sub>=Biomassa (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>4</sub>=C/N (relação Carbono e nitrogênio no meio de cultivo), Y<sub>5</sub>=Produtividade em carotenoides volumétricos (µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>6</sub>=Produtividade em carotenoides específicos (µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>7</sub>=Produtividade em biomassas (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Dr<sub>1</sub>=Desvio relativa (%) para a resposta produção volumétrica; Dr<sub>3</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta biomassa; Dr<sub>4</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta C/N. Dr<sub>5</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta produtividade em carotenoides volumétrico.



**Figura 8:** Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por *S. pararoseus* ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm, no delineamento composto central rotacional  $2^2$  formulado com glicerol bruto e água de maceração de milho nos meios de cultivo.

### 5.3.1.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa

Considerando as variáveis glicerol bruto e água de maceração de milho foi realizada a verificação dos modelos de segunda ordem analisando as respostas produção volumétrica de carotenoides totais, biomassa, relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, em função das concentrações dos componentes do meio de cultura.

Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, desvio padrão, limites de confiança que sem encontra em Apêndice 3. Os coeficientes de regressão e bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentando nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

**Tabela 11:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção específico carotenoides (PEC), biomassa, relação C/N, e produtividade em biomassa.

	Carotenoides Volumétricos ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )					Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (2)	p
Média**	822,39	0,53	1560,76	<0,01	Média**	9,95	0,02	426,28	<0,01
X1(L)	-0,66	0,65	-2,05	0,176	X1(L)**	-0,08	0,01	-5,93	0,03
X <sub>1</sub> (Q)**	-112,59	0,77	-292,0	<0,01	X <sub>1</sub> (Q)**	-0,48	0,02	-28,13	<0,01
X <sub>2</sub> (Q)**	-29,31	0,65	-90,70	<0,01	X <sub>2</sub> (Q)**	-1,12	0,01	-78,01	<0,01
X <sub>2</sub> (Q)**	-141,24	0,77	-366,29	<0,01	X <sub>2</sub> (Q)**	-1,12	0,02	-65,69	<0,01
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	-100,80	0,91	-220,89	<0,01	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	-0,43	0,02	-21,16	<0,01

	Produtividade em carotenoides volumétrico ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )					Relação C/N			
	CR	EP	t (5)	p		CR	EP	t (4)	p
Média**	4,90	0,30	16,32	<0,01	Média*	10,23	0,50	20,31	<0,01
X1(L)	0,04	0,37	0,22	0,84	X1(L)*	2,31	0,50	9,16	<0,01
X <sub>1</sub> (Q)**	-0,63	0,44	-2,88	0,03	X <sub>1</sub> (Q)	-0,24	0,67	-0,70	0,52
X <sub>2</sub> (Q)	-0,25	0,37	-1,34	0,24	X <sub>2</sub> (Q)*	-1,37	0,50	-5,41	0,01
X <sub>2</sub> (Q)**	-0,64	0,44	-2,91	0,03	X <sub>2</sub> (Q)	0,42	0,67	1,26	0,28
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	-0,29	0,52	-1,10	0,32	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	-0,33	0,71	0,93	0,41

\*: ( $p \leq 0,10$ ); \*\*: ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Glicerol bruto; X<sub>2</sub>: Água de maceração de milho;

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas é possível observar na Tabela 11 que para a produção volumétrica em carotenoides percebe-se que os coeficientes do modelo, como glicerol bruto (Q) água de maceração tanto (L) e (Q) bem como a interação glicerol bruto x água de maceração de milho foram significativas ao nível de 95%.

Para biomassa (Tabela 11) todos os coeficientes foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). Para produtividade em carotenoides volumétricos somente os coeficientes quadráticos com o glicerol bruto (Q) e água de maceração de milho (Q) estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ). A relação carbono e nitrogênio foi verificado que o glicerol bruto (L), glicerol bruto (Q) e água de maceração de milho (Q) foram significativas ao nível de 90%. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 12.

**Tabela 12:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	PVC	Bio.	PVC	Bio.	PVC	Bio.	PVC	Bio.
Regressão	190487,6	17,92	4	5	47621,9	3,58	5,84	7,16
Erro puro	48936	2,53	6	5	8156	0,5		
Total	239423,6	20,45	10	10				

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	C/N	Prod. Vol.	C/N	Prod. Vol.	C/N	Prod. Vol.	C/N	Prod. Vol.
Regressão	27,52	3,52	2	2	28,76	1,76	54,26	6,52
Erro puro	4,23	2,17	8	8	0,53	0,27		
Total	31,75	5,69	10	10				

PVC=Produção volumétrica de carotenoides; Bio.=Biomassa; C/N=Relação carbono e nitrogênio; Prod. Vol.=Produtividade em carotenoides volumétricos. PVC (R: 0,89,  $F_{4; 6; 0,95} = 4,53$ ); Bio (R: 0,94,  $F_{5; 5; 0,95} = 5,05$ ), C/N. (R: 0,97,  $F_{2; 8; 0,90} = 3,11$ ), Prod.Vol (R: 0,79,  $F_{2; 8; 0,95} = 4,46$ )

Os coeficientes de correlações (R) de 0,89; 0,94; 0,97 e 0,79 foram calculados na ANOVA (Tabela 12), respectivamente, para produção volumétrica em carotenoides, biomassa, relação C/N e produtividade em carotenoides volumétrica, com isso pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão Fcalculado sobre Ftabelado foi 1,29 para produção volumétrica em carotenoides, 1,41 para a biomassa, 17,45 para relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo, 1,46 para produtividade em carotenoides volumétrica.

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas do delineamento composto rotacional em

função das variáveis glicerol bruto, água de maceração de milho nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 15, 16, 17 e 18.

$$\text{Carotenoides volumétricos } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 822,39 - 112,60.\text{GLI}^2 - 29,31.\text{AMM} - 141,24.\text{AMM}^2 - 100,80.\text{GLI}.\text{AMM} \quad (15)$$

$$\text{Biomassa } (\text{g.L}^{-1}) = 9,95 - 0,08.\text{GLI} - 0,48.\text{GLI}^2 - 1,12.\text{AMM} - 1,12.\text{AMM}^2 - 0,43.\text{AMM}.\text{GLI} \quad (16)$$

$$\text{C/N} = 10,38 + 2,31.\text{GLI} - 1,37.\text{AMM} \quad (17)$$

$$\text{Produtividade volumétrica em carotenoides } (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 4,90 - 0,63.\text{GLI}^2 - 0,64.\text{AMM}^2 \quad (18)$$

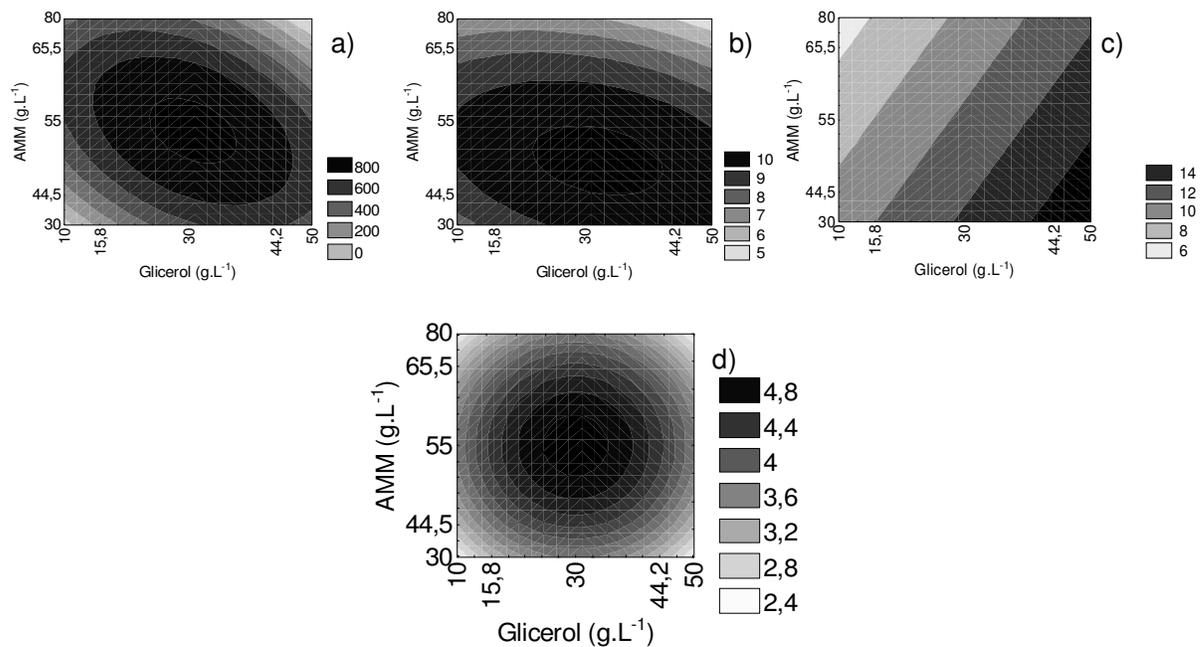
Onde: GLI: glicerol bruto, AMM: água maceração de milho.

Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, apresentados na Tabela 10, foram inferiores a 20% (RODRIGUES e IEMMA, 2009) nas regiões de interesse de máximos valores, dessa forma as Equações 15, 16, 17 e 18 prevêem bem o comportamento da produção de carotenoides volumétrica, biomassa, relação carbono e nitrogênio, produtividade em carotenoides volumétricos, frente às variáveis estudadas.

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (Figura 9), podendo-se obter as concentrações das variáveis: glicerol bruto e água de maceração de milho para a máxima produção de carotenoides volumétricos, biomassa, C/N e produtividade em carotenoides volumétricos.

Com as curvas de contorno expostas na Figura 9a observa-se que para obter elevada produção de carotenoides volumétricos deve-se trabalhar de 24,32 g.L<sup>-1</sup> a 35,68 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto e 50,8 g.L<sup>-1</sup> a 59,2 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Para obter um ganho maior em biomassa deve ter em torno de 24,32 g.L<sup>-1</sup> a 41,36 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto e 44,5 g.L<sup>-1</sup> a 55 g.L<sup>-1</sup> água de maceração de milho, para um aumento na relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo deve ter 41,36 g.L<sup>-1</sup> a 50 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto e 30 g.L<sup>-1</sup> a 52,9 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Entretanto vale ressaltar que as maiores produções de carotenoides e produtividades do processo de obtenção de carotenoides não foram observadas nestas maiores relações C/N (aproximadamente 14) e sim em relações C/N intermediárias (10,42 aproximadamente), onde as maiores produção de carotenoides foram de 822,57 μg.L<sup>-1</sup> (83,1 μg.g<sup>-1</sup>) tendo as produtividades de 4,9 μg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (0,579 μg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

Portanto, após análise da Figura 9 é possível verificar que glicerol bruto e a água de maceração de milho devem estar nas concentrações de 30 g.L<sup>-1</sup> e 52,9 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente para se alcançar uma ótima resposta, sendo que essa condição é caracterizada com uma relação carbono e nitrogênio de 10,42.

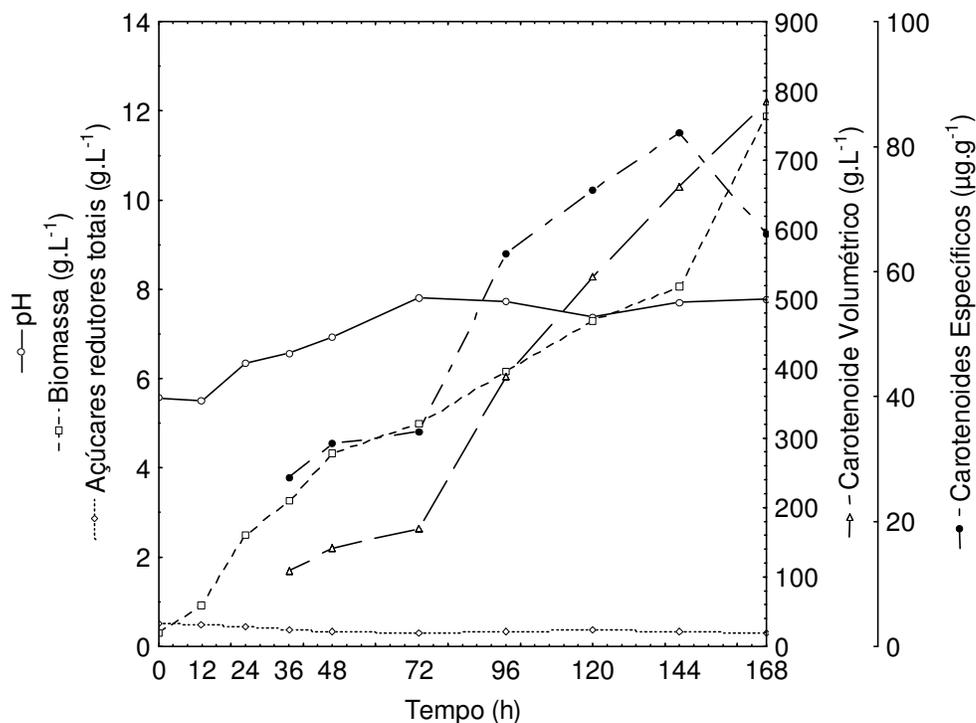


**Figura 9:** Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), biomassa (b) relação C/N (c), produtividade em carotenoides volumétricos (d). AMM=Água de maceração de milho.

#### 5.4. Validação do modelo para a bioprodução de carotenoides com glicerol e água de maceração de milho

Para a validação do modelo selecionou-se o meio de cultivo onde as variáveis se encontram nos níveis para máxima bioprodução de carotenoides: glicerol bruto 30 g.L<sup>-1</sup> e água de maceração de milho 52,9 g.L<sup>-1</sup>. A bioprodução foi realizada de acordo com o item 4.6. A Figura 10 mostra os resultados médios da cinética, dos ensaios realizados em triplicata, para a concentração de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides e pH.

Na Figura 10 percebe-se que o pH apresentou uma variação ao longo da 168h cultivo, apresentando um valor final de 7,79. Além disso nota-se que o açúcar foi praticamente esgotado pela levedura ao término do processo 0,30 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 10:** Valores médios de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático.

A Tabela 13 mostra os resultados da validação para as respostas carotenoide volumétrico, biomassa e produtividade em carotenoides volumétricos.

**Tabela 13:** Respostas da validação do modelo matemático

	Carotenoides volumétrico (µg.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Prod. Carot. volumétrico (µg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Resposta prevista</b>	755,44	9,95	3,63
<b>Resposta experimental</b>	779,60	11,65	4,64
<b>Desvio do modelo</b>	3,10	14,59	-5,60

\*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas.

Otero (2011) que utilizou a mesma levedura, no meio formulado com água de parboilização de arroz (44,01 g.L<sup>-1</sup>) e glicerol bruto (17,31 g.L<sup>-1</sup>), a 25°C, 180 rpm, tendo uma relação C/N de 6,20 atingindo 820 µg.L<sup>-1</sup> (86,46 µg.g<sup>-1</sup>) com uma biomassa de 12,06 g.L<sup>-1</sup>, em 168h alcançou resultados semelhantes a este trabalho.

Cipolatti (2012) ao cultivar a mesma linhagem da levedura, no meio com água de maceração de milho (35,6 g.L<sup>-1</sup>) e glicerol bruto (4,8 g.L<sup>-1</sup>) com a mesma relação

C/N de 6,20, alcançou uma produção de carotenoides de  $634,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $87,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) com  $7,3 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomassa (120h). Portanto, neste trabalho com o novo meio proposto ocorreu um ganho de 22,86% na produção volumétrica e 26,26% na biomassa. Provavelmente estes resultados positivos são devido ao aumento da concentração da água de maceração milho que por apresentar uma variedade de nutrientes e sais pode se tornar um ótimo meio de cultivo para diversas leveduras (GAO, 2011).

No estudo realizado por Cabral *et al.* (2011) que avaliou a composição do meio de cultivo através de um planejamento do tipo Plackett–Burman, para produção de carotenoides por uma outra linhagem de *Sporidiobolus pararoseus*, variando as concentrações de glicose ( $26,4$  a  $23,4 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), peptona ( $6,6$  a  $23,4 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e extrato de malte ( $6,6$  a  $23,4 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), obtiveram  $856 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $229.69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) de carotenoides totais com  $3.69 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Portanto, resultados de produção volumétrica superior a este trabalho, no entanto, com um meio formulado com  $60 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glicose,  $15 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptona e  $15 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de malte em 120h, a  $25^\circ\text{C}$ , 180 rpm e com pH inicial 4.

Outros trabalhos para produção de carotenoides com outros gêneros de micro-organismos como Santos (2010) que utilizou dois tipos de glicerol bruto e P.A ( $10$ ,  $20$  e  $30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a  $30^\circ\text{C}$ , 150 rpm, por 96h, com pH inicial de 7,0, para *Rhodotorula glutinis* observou a maior produção de biomassa ( $4,05 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com  $30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  o glicerol bruto, isso é devido à presença de micronutrientes (K, Na e P, os de maior teor), tais nutrientes presente na sua composição contribuíram para o crescimento celular da levedura. Sendo que o glicerol puro não apresentou um crescimento superior, isso é devido ao processo de purificação que remove estes nutrientes.

Buzzin *et al.* (2005) realizou uma otimização para produção e carotenoides pela levedura *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021, variando as concentrações de metais de 0 a 50 ppm ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ), em meio YNB adicionado de 2% de glicose, a qual foi constatado uma produção máxima de  $803,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , sendo as condições operacionais do processo a  $25^\circ\text{C}$ , por 120h, com 150 rpm, sem ajuste do pH.

### **5.5. Planejamento experimental para o meio formulado com melaço e água de maceração de milho**

Nesta terceira etapa, foi realizado um planejamento experimental para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de bioprodução para o melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho.

A Tabela 14 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados das variáveis em estudo, bem como suas respostas. Enquanto a Figura 11 mostra o acompanhamento desta bioprodução de carotenoides, envolvendo a

produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c), produção volumétrica (d) e consumo de açúcares (e), para os ensaios do planejamento fatorial.

Analisando a Tabela 14 é possível verificar uma variação, em diferentes concentrações de melaço e água de maceração de milho, na máxima produção volumétrica de carotenoides de  $125,92 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 3) a  $555,52 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ensaio 6), máxima produção específica de carotenoides em  $26,22 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 1) a  $86,26 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ensaio 7), concentração de biomassa de  $1,03 \text{g.L}^{-1}$  (ensaio 1) a  $7,70 \text{g.L}^{-1}$  (ensaio 4) e a razão C/N dos meios de produção que apresentaram variação de 7,70 (ensaio 5) a 38,41 (ensaio 2). A produtividade em carotenoides volumétricos máxima variou de  $0,75 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 3) a  $4,08 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 10), a produtividade em carotenoides específicos de  $0,16 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 3) a  $0,52 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 5) e a produtividade em biomassa variando entre  $0,001 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 1) a  $0,07 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (ensaio 9 e 10).

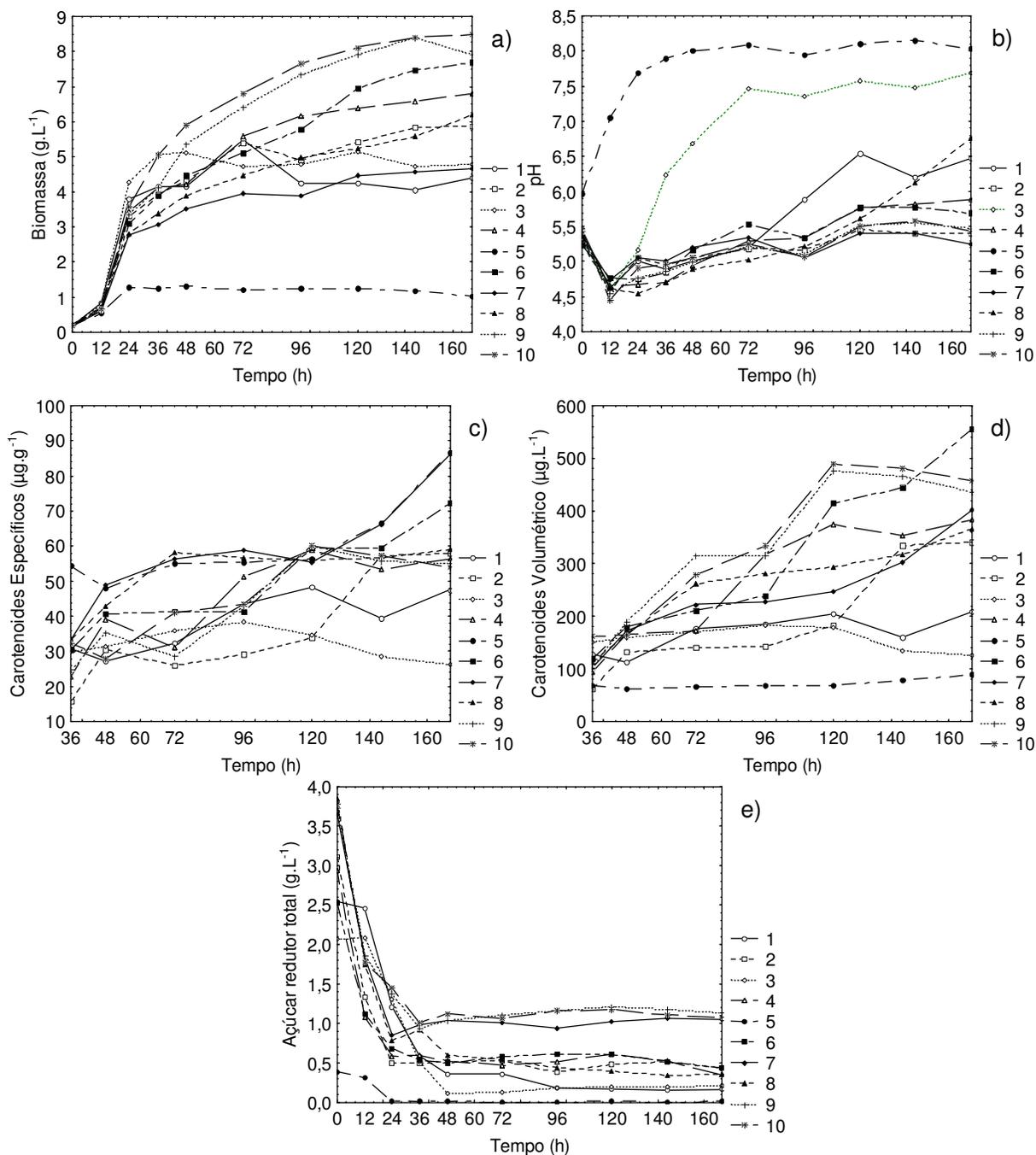
#### **5.5.1. Verificação dos modelos para as respostas produção volumétrica e produção específica de carotenoides, biomassa, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa**

Considerando as variáveis melaço e água de maceração de milho foi realizada a verificação dos modelos de segunda ordem analisando as respostas produção volumétrica de carotenoides totais, biomassa, relação C/N, produtividade em carotenoides volumétrica, em função das concentrações dos componentes do meio de cultura. Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, desvio padrão, limites de confiança que sem encontra em Apêndice 4. Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas é possível observar na Tabela 15 que para a produção volumétrica em carotenoides percebe-se que os coeficientes de regressão do modelo, como melaço (L), melaço (Q), água de maceração tanto (Q) bem como a interação melaço x água de maceração de milho foram significativas ao nível de 90%. Para biomassa (Tabela 15) todos os coeficientes foram significativos ( $p \leq 0,1$ ). A relação carbono e nitrogênio foi verificado que o melaço (L), melaço (Q) e água de maceração de milho (L) foram estatisticamente significativas ao nível de 90%. Já para produtividade em carotenoides volumétricos todos os coeficientes com exceção da interação melaço x água de maceração de milho foram significativos ( $p \leq 0,05$ ). Para a produtividade volumétrica todos foram significativos ao nível de 95% com exceção da água de maceração de milho (L). Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 16.

**Tabela 14:** Delineamento composto central rotacional  $2^2$  (valores reais e codificados) para otimização do meio agroindustrial sem pré tratamento com melaço e água de maceração de milho.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Dr <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Dr <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Dr <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Dr <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>	Y <sub>7</sub>	Dr <sub>7</sub>
1	10 (-1)	3,5 (-1)	209,40	0,21	47,52	4,41	29,02	23,34	5,70	1,25	15,2	0,28	0,03	33,33
2	50 (+1)	3,5 (-1)	340,22	-19,90	57,93	5,87	-8,18	38,41	-2,19	2,03	-29,06	0,34	0,03	-33,33
3	10 (-1)	9,5 (+1)	125,92	-15,93	26,22	4,80	16,46	14,21	13,23	0,75	-41,33	0,16	0,3	33,33
4	50 (+1)	9,5 (+1)	382,66	-23,057	56,23	6,81	-6,17	29,73	0,54	2,28	-14,91	0,33	0,04	<0,01
5	1,8 (-1,41)	6,5 (0)	89,52	-4,68	86,69	1,03	-132,04	7,70	-26,27	0,53	-6,48	0,52	0,01	-61,38
6	58,2 (+1,41)	6,5 (0)	555,52	16,65	72,16	7,70	10,00	34,79	2,18	3,31	16,50	0,43	0,05	11,32
7	30 (0)	2,27 (-1,41)	403,29	15,55	86,26	4,68	-9,26	37,87	3,42	2,4	14,92	0,51	0,03	-0,79
8	30 (0)	58,2 (+1,41)	366,16	6,98	59,09	6,20	-2,49	23,11	0,80	2,18	6,33	0,35	0,04	24,41
9	30 (0)	6,5 (0)	476,51	-1,45	60,00	7,93	-1,13	28,38	-4,83	3,97	-1,51	0,50	0,07	<0,01
10	30 (0)	6,5 (0)	489,26	1,20	60,23	8,12	1,23	28,38	-4,82	4,08	1,22	0,50	0,07	<0,01

X<sub>1</sub>=Melaço (g.L<sup>-1</sup>); X<sub>2</sub>=Água de maceração de milho (g.L<sup>-1</sup>). Y<sub>1</sub>=Produção volumétrica (µg.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>=Produção específica (µg.g<sup>-1</sup>); Y<sub>3</sub>=Biomassa (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>4</sub>=C/N (relação Carbono e nitrogênio no meio de cultivo), Y<sub>5</sub>=Produtividade em carotenoides volumétricos (µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>6</sub>=Produtividade em carotenoides específicos (µg.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>); Y<sub>7</sub>=Produtividade em biomassas (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Dr<sub>1</sub>=Desvio relativa (%) para a resposta produção volumétrica; Dr<sub>2</sub>=Desvio relativa (%) para a resposta produção específica; Dr<sub>3</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta biomassa; Dr<sub>4</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta C/N. Dr<sub>5</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta produtividade em carotenoides volumétricos e Dr<sub>7</sub>=Desvio relativo (%) para a resposta produtividade em Biomassas.



**Figura 11:** Cinética da produção de biomassa (a), pH (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por *S. parvovirus* ao longo de 168h, a 25 °C e 180 rpm e pH inicial de 6, no delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> formulado com melão e água de maceração de milho nos meios de cultivo.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,88; 0,87; 0,99 e 0,94 foram calculados na ANOVA (Tabela 16), respectivamente, para produção volumétrica em carotenoides, biomassa, relação C/N e produtividade em carotenoides volumétrica e produtividade em biomassa, com isso pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados

experimentais. A razão Fcalculado sobre Ftabelado foi 2,64 para produção volumétrica em carotenoides, 2,41 para a biomassa, 25,25 para relação carbono e nitrogênio do meio de cultivo, 4,92 para produtividade em carotenoides volumétrica e 2,59 produtividade em biomassa.

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas do delineamento composto central rotacional em função das variáveis glicerosol bruto, água de maceração de milho nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 19, 20, 21, 22, 23.

$$\text{Carotenoide volumétrico } (\mu\text{g.L}^{-1}) = 483,41 + 130,97.\text{MEL} - 103,13.\text{MEL}^2 - 71,84.\text{AMM}^2 + 31,48.\text{MEL}.\text{AMM} \quad (19)$$

$$\text{Biomassa } (\text{g.L}^{-1}) = 8,02 + 1,61.\text{MEL} - 1,69.\text{MEL}^2 + 0,44.\text{AMM} - 1,15.\text{AMM}^2 \quad (20)$$

$$\text{C/N} = 29,75 + 8,62.\text{MEL}^2 - 3,96.\text{MEL}^2 - 4,84.\text{AMM} \quad (21)$$

$$\text{Prod. Vol. } (\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 4,03 + 0,78.\text{MEL} - 1,19.\text{MEL}^2 - 1,00.\text{AMM}^2 \quad (22)$$

$$\text{Prod. Bio. } (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}) = 0,07 + 0,01.\text{MEL} - 0,02.\text{MEL}^2 - 0,02.\text{AMM}^2 \quad (23)$$

Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, apresentados na Tabela 14, foram inferiores a 20% (RODRIGUES e IEMMA, 2009), dessa forma as Equações 19, 20, 21, 22, 23 prevê bem o comportamento da produção de carotenoides volumétrica, biomassa, relação carbono e nitrogênio, produtividade em carotenoides volumétricos, produtividade em biomassa, frente às variáveis estudadas.

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (Figura 12), podendo-se obter as concentrações das variáveis: melaço e água de maceração de milho para a máxima produção de carotenoides volumétricos, biomassa, C/N e produtividade em carotenoides volumétricos e produtividade em biomassa.

Com as curvas de contorno expostas na Figura 12a é possível verificar que para obter elevada produção de carotenoides volumétricos e também na concentração celular deve-se trabalhar na faixa de 30 a 50 g.L<sup>-1</sup> de melaço na combinação de 5,3 a 8,9 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho. Já para uma relação carbono e nitrogênio alta deve trabalhar em baixa concentração 50 a 58,2 g.L<sup>-1</sup> de melaço, com a água de maceração de milho na faixa de 2,27 a 3,5 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto vale ressaltar que as maiores produções de carotenoides e produtividades do processo de obtenção de carotenoides não foram observadas nestas maiores relações C/N (40) e sim em relações C/N intermediárias (25).

**Tabela 15:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrica carotenoides (PVC), biomassa, relação C/N, e produtividade em carotenoides volumétricos e produtividade em biomassa.

	Carotenoide volumétricos ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )					Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )			
	CR	EP	t (1)	p		CR	EP	t (1)	p
Média**	483,41	6,37	75,82	0,008	Média**	8,02	0,09	84,44	0,007
X <sub>1</sub> (L)**	261,93	6,385	41,03	0,02	X <sub>1</sub> (L)**	3,23	0,1	33,93	0,019
X <sub>1</sub> (Q)**	-206,27	8,47	-24,36	0,03	X <sub>1</sub> (Q)**	-3,38	0,13	-26,81	0,002
X <sub>2</sub> (L)	-23,42	6,38	-3,67	0,169	X <sub>2</sub> (L)*	0,87	0,1	9,15	0,069
X <sub>2</sub> (Q)**	-143,69	8,47	-16,97	0,04	X <sub>2</sub> (Q)**	-2,30	0,13	-18,24	0,035
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> *	62,96	9,02	6,98	0,09	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,28	0,13	2,05	0,289

	C/N					Produtividade em carotenoides volumétricos ( $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )			
	CR	EP	t (4)	p		CR	EP	t (4)	p
Média**	28,38	1,09	26,00	<0,001	Média**	4,03	0,33	12,23	<0,001
X <sub>1</sub> (L)**	17,25	1,09	15,78	<0,001	X <sub>1</sub> (L)**	1,56	0,33	4,73	0,009
X <sub>1</sub> (Q)**	-6,89	1,45	-4,75	0,009	X <sub>1</sub> (Q)**	-2,38	0,44	-5,44	0,006
X <sub>2</sub> (L)**	-9,68	1,09	-8,86	0,001	X <sub>2</sub> (L)	-0,14	0,33	-0,43	0,692
X <sub>2</sub> (Q)	2,41	1,45	1,67	0,171	X <sub>2</sub> (Q)**	-2,01	0,44	-4,59	0,010
X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,22	1,54	0,14	0,892	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,38	0,47	0,80	0,466

\*: ( $p \leq 0,10$ ); \*\*: ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Melaço; X<sub>2</sub>: Agua de maceração de milho;

**Tabela 15:** Continuação, coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta produção volumétrica carotenoides (PVC), biomassa, relação C/N, e produtividade em carotenoides volumétricos e produtividade em biomassa.

	Produtividade em biomassa (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )			
	CR	EP	t (4)	p
Média**	0,06	0,01	11,95	<0,001
X <sub>1</sub> (L)**	0,02	0,01	2,84	0,05
X <sub>1</sub> (Q)**	-0,04	0,01	-5,16	0,007
X <sub>2</sub> (L)	0,01	0,01	1,03	0,362
X <sub>2</sub> (Q)**	-0,04	0,01	-4,51	0,011
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,01	0,01	0,60	0,579

\*\* ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Melaço; X<sub>2</sub>: Água de maceração de milho;

**Tabela 16:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	PVC	Biomassa	PVC	Biomassa	PVC	Biomassa	PVC	Biomassa
Regressão	193342	36,29	4	4	48335,5	9,07	9,29	8,48
Resíduo	2609,2	5,34	5	5	5201,84	1,07		
Total	219351,2	41,63	9	9				

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	C/N	Pro. Vol.	C/N	Pro. Vol.	C/N	Pro. Vol.	C/N	Pro. Vol.
Regressão	867,04	12,66	4	3	216,76	4,22	80,28	23,44
Resíduo	16,19	1,05	6	6	2,7	0,18		
Total	883,23	13,71	9	9				

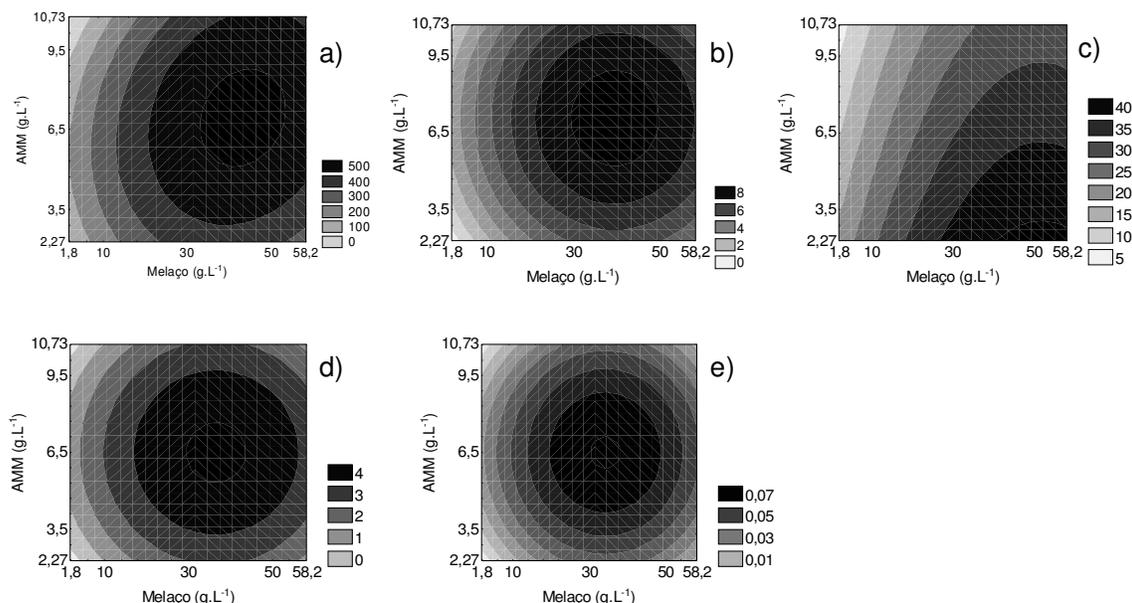
Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.	Pro. Bio.
Regressão	2,83.10 <sup>-3</sup>		4		7,07.10 <sup>-4</sup>		11,74	
Resíduo	3,72.10 <sup>-4</sup>		6		6,02.10 <sup>-5</sup>			
Total	3,20.10 <sup>-3</sup>		9					

PVC=Produção volumétrica em carotenoides; C/N=Relação carbono e nitrogênio; Prod. Vol.=Produtividade em carotenoides volumétricos e Prod. Bio.=Produtividade em biomassa. PVC (R: 0,88, F<sub>4; 5; 0,90</sub> = 3,52); Biomassa (R: 0,87, F<sub>4; 5; 0,90</sub> = 2,41), C/N (R: 0,99, F<sub>4; 6; 0,90</sub> = 25,25) e Prod. Bio. (R: 0,94, F<sub>4; 6; 0,95</sub> = 2,59).

Para ter uma produtividade alta em carotenoide volumétrico deve trabalhar de 30 a 42 g.L<sup>-1</sup> de melaço e de 5,3 a 7,7 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho (Figura

12d). Para elevadas produtividade em biomassa a concentração de melaço deve ser de 30 a 42 g.L<sup>-1</sup> e água de maceração de milho de 5,9 a 7,7 g.L<sup>-1</sup> (Figura 11e).

Portanto, para a obtenção dos máximos para todas as respostas são necessários 30 a 50 g.L<sup>-1</sup> de melaço e 5,3 a 8,9 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho.

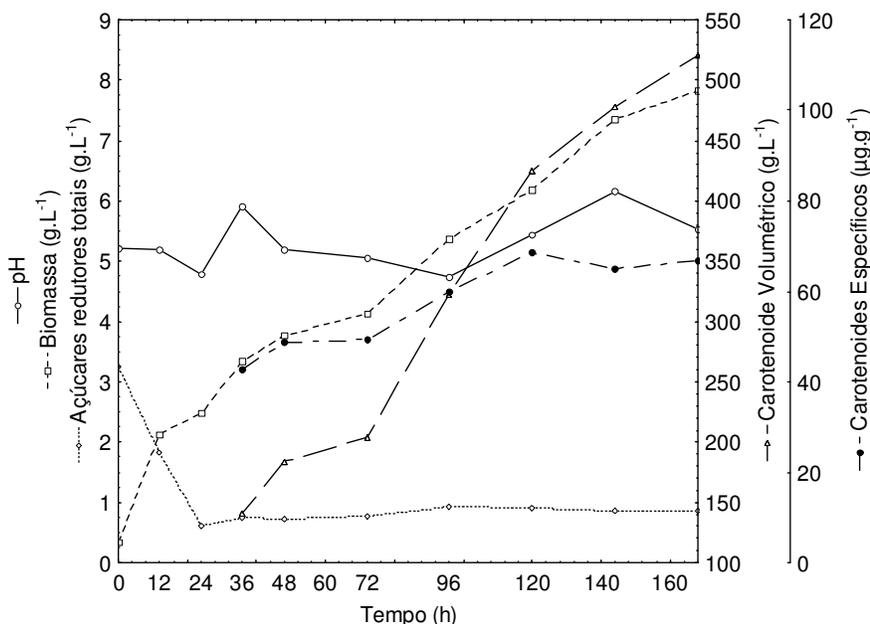


**Figura 12:** Curva de contorno para as respostas produção volumétrica (a), biomassa (b), relação C/N (c), produtividade em carotenoide volumétrico (d), produtividade em biomassa (e). AMM = água de maceração de milho.

## 5.6. Validação do modelo para a bioprodução de carotenoides utilizando melaço e água de maceração de milho

Para a validação do modelo selecionou-se o meio de cultivo onde as variáveis se encontram nos níveis para máxima bioprodução de carotenoides, de forma a aproveitar o máximo do co-produto: melaço 40 g.L<sup>-1</sup> e água de maceração de milho 6,5 g.L<sup>-1</sup>. A bioprodução foi realizada de acordo com o item 4.6. A Figura 13 mostra os resultados médios da cinética, dos ensaios realizados em triplicata, para a concentração de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides e pH.

Na Figura 13 percebe-se que o pH mostrou comportamento característico da levedura, apresentando uma queda inicial, em seguida um aumento, mantendo-se constante até o término do cultivo. A biomassa alcançou o valor de 7,82 g.L<sup>-1</sup> no tempo de 168h, a produção específica em carotenoides 73,19 µg.g<sup>-1</sup> no tempo de 168h h e a produção volumétrica 520,94 µg.L<sup>-1</sup> no tempo de 168h. Além disso nota-se que o açúcar foi praticamente esgotado pela levedura ao término do processo.



**Figura 13:** Valores médios de biomassa, pH produção específica e volumétrica de carotenoides no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático.

A Tabela 17 mostra os resultados da validação para as respostas carotenoides volumétrico, biomassa, produtividade em carotenoides volumétrica e produtividade em carotenoides volumétrica, onde todas obtiveram desvios inferiores a 7%, se adequando bem ao modelo proposto.

**Tabela 17:** Respostas da validação do modelo matemático.

	Carotenoides volumétrico (µg.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Prod. Carot. volumétrico (µg.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Prod. em biomassa (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Resposta prevista</b>	492,07	7,52	4,03	0,053
<b>Resposta experimental</b>	520,94*	7,82*	3,10*	0,05*
<b>Desvio do modelo</b>	5,54	3,86	-4,92	-6,40

\*Resultados são médias dos ensaios em triplicatas.

## 5.7. Pré tratamentos dos substratos agroindustriais

### 5.7.1. Estudo do pré tratamento com terra diatomácea para melão (100 g.L<sup>-1</sup>)

Um delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> foi realizado para avaliar o efeito das variáveis concentração de terra diatomácea, tempo de contato com o

coproduto e temperatura do pré tratamento, verificando a influência na densidade ótica, açúcar redutor total e pH no coproduto agroindustrial melaço (100 g.L<sup>-1</sup>), conforme apresentado na Tabela 18.

**Tabela 18:** Delineamento composto central rotacional valores reais (codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para o melaço

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	6 (-1)	64 (-1)	1,5 (-1)	70,03	0,679	4,20
2	8 (+1)	64 (-1)	1,5 (-1)	28,63	0,610	4,27
3	6 (-1)	76 (+1)	1,5 (-1)	26,37	0,471	4,00
4	8 (+1)	76 (+1)	1,5 (-1)	21,62	0,118	5,14
5	6 (-1)	64 (-1)	2 (+1)	32,74	0,638	4,14
6	8 (+1)	64 (-1)	2 (+1)	26,57	0,314	4,34
7	6 (-1)	76 (+1)	2 (+1)	24,84	0,426	4,26
8	8 (+1)	76 (+1)	2 (+1)	68,77	0,164	5,44
9	5,32 (-1,68)	70 (0)	1,75 (0)	38,94	0,149	5,33
10	8,68 (+1,68)	70 (0)	1,75 (0)	23,46	0,362	4,27
11	7 (0)	60 (-1,68)	1,75 (0)	71,63	0,187	5,33
12	7 (0)	80 (+1,68)	1,75 (0)	49,07	0,497	4,02
13	7 (0)	70 (0)	1,33 (-1,68)	73,19	0,433	4,36
14	7 (0)	70 (0)	2,17 (+1,68)	70,04	0,456	4,52
15	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	73,81	0,256	3,97
16	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	71,24	0,279	3,88
17	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	63,43	0,311	4,31

X<sub>1</sub>: Concentração de terra diatomácea; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h) Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade ótica D.O; Y<sub>3</sub>: pH. Melaço sem pré tratamento: Y<sub>1</sub>: 164,12 g.L<sup>-1</sup>; Y<sub>2</sub>: 0,37 e Y<sub>3</sub>: 5

Na Tabela 18 percebe-se que em todos os dezessete ensaios ocorreram perdas de açúcares redutores totais, entre 56,85% (ensaio 15) a 86,83% (ensaio 4) se comparado ao sem pré tratamento. Para a densidade ótica ocorreu uma variação de 0,118 (ensaio 4) a 0,679 (ensaio 1), portanto para alguns ensaios a terra diatomácea promoveu uma clarificação e para outros mostrou-se ineficiente aumentando a turbidez, quando comparado ao sem pré tratamento (0,37). As diferentes condições de pré tratamento apresentou influência significativa no pH do coproduto com uma variação entre 3,88 (ensaio 17) até 5,14 (ensaio 9 e 10), conforme comprovado na Tabela 18.

Para o melaço, observando-se a Tabela 19 nota-se que nos açúcares redutores totais a variável percentagem de terra foi significativa ( $p \leq 0,05$ ), sendo seu efeito negativo, removendo mais açúcares presentes no coproduto, portanto devendo estar em um nível inferior (-1). Entretanto as interações percentagem de terra x temperatura, percentagem de terra x tempo de contato, bem como temperatura x tempo de contato apresentaram efeito positivo e significativo.

Para a densidade ótica no substrato pré tratado verifica-se que as variáveis concentração de terra, temperatura e tempo de contato, apresentaram efeito significativo negativo ( $p \leq 0,05$ ), aumentando sua turbidez, vale ressaltar também que as interações concentração de terra x temperatura bem como a concentração de terra x tempo de contato, exerceram efeito negativo quando aumenta seu nível, entretanto não foi significativo seu efeito, conforme a Tabela 19. O pH inicial apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,10$ ) no qual a variável concentração de terra apresentou um efeito positivo quando aumentado seu nível.

**Tabela 19:** Resultados dos efeitos, desvio padrão, t e p para a açúcar redutor total, densidade ótica e pH após o pré tratamento do melaço.

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (4)	p
Densidade ótica D.O	Média*	0,388	0,038	10,280	<0,001
	(1) X <sub>1</sub> (L)*	-0,252	0,088	-2,845	0,047
	(2) X <sub>2</sub> (L)*	-0,266	0,088	-3,002	0,039
	(3) X <sub>3</sub> (L)	-0,084	0,088	-0,951	0,395
	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	-0,056	0,088	-0,630	0,563
	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub>	-0,041	0,088	-0,462	0,668
	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub>	0,084	0,088	0,954	0,394
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (4)	p
pH	Média**	4,359	0,105	41,327	<0,001
	(1) X <sub>1</sub> (L)**	0,648	0,247	2,618	0,059
	(2) X <sub>2</sub> (L)	0,473	0,247	1,910	0,1287
	(3) X <sub>3</sub> (L)	0,143	0,247	0,576	0,595
	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> *	0,513	0,247	2,072	0,107
	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub>	0,043	0,247	0,17	0,872
	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub>	0,138	0,247	0,556	0,601

\*\* ( $p \leq 0,10$ ); \* ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Concentração de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h); Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade Ótica; Y<sub>3</sub>: pH.

#### 5.7.1.1. Verificação do modelo para açúcar redutor total

Considerando as três variáveis do processo percentagem de terra, temperatura e tempo de contato com o substrato, foi ajustado um modelo de segunda ordem aos dados experimentais de açúcar redutor total.

Para a verificação do modelo foram calculados coeficientes de regressão e realizada a ANOVA, no qual os resultados estão apresentados na Tabela 20. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância.

**Tabela 20:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> utilizando terra diatomácea no melaço em função do açúcar redutor total.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado
Regressão	3728,12	2	1864,06	6,68
Erro puro	3625,88	13	278,91	
Total	7254,0	15		

Açúcar redutor total (R: 0,71, F<sub>2; 13 0,95</sub> = 3,81).

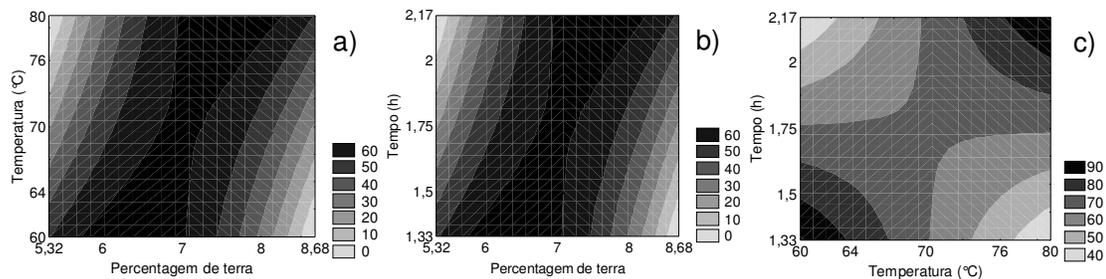
Os coeficientes de correlações (R): 0,71 foi calculado na ANOVA (Tabela 20), para o açúcar redutor total, com isso pode-se concluir que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. A razão  $F_{\text{calculado}}$  sobre  $F_{\text{tabelado}}$  foi de 1,7 para açúcar redutor total tornando o modelo preditivo e significativo para a resposta estudada nessa faixa.

Dessa forma foi possível gerar a equação do modelo com as variáveis codificadas que representa a respostas do DCCR em função das variáveis percentagem de terra, temperatura e tempo de contato, como mostra a Equação 24.

$$\text{ART (g.L}^{-1}\text{)} = 60 - 14,78.X_2^2 + 10,84.X_1.X_2 \quad (24)$$

Onde:  $X_1$ : Concentração de terra diatomácea;  $X_2$ : Temperatura;  $X_3$ : Tempo de contato com o substrato. ART = açúcar reduto total

Através do modelo foi possível construir as curvas de contorno (Figura 14), podendo-se obter as concentrações das variáveis: percentagem de terra, temperatura e tempo de contato com o substrato.



**Figura 14:** Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b, e c) para melão pré tratado.

Para manter uma concentração de ART no substrato elevada pode-se trabalhar com temperatura entre 60 a 64°C e concentração de terra de 6 a 7%, ou com elevadas temperaturas 76 a 80°C com percentagem de terra de 7 a 8% (Figura 14a). A concentração de terra deve ser de 6 a 7% com tempo de contato de 1,33 a 1,5h ou concentração de terra de 7 a 8% e tempo de contato de 2 a 2,17h (Figura 14b). Na utilização de temperatura de 60°C deve-se trabalhar com tempo de 1,33h ou altas temperaturas de 80°C com tempo de 2,17h (Figura 14c).

Portanto, a melhor condição para manutenção do ART presente no substrato é com 6 a 7% de terra diatomácea a 60°C por 1,33 a 1,5h de contato, sob agitação de 150 rpm em reator (300 mL) encamisado, de modo a clarificar o meio de cultivo. No entanto um novo planejamento foi realizado a fim de melhorar a eficiência da terra diatomácea, bem como diminuir custo de processo com energia (temperatura), tempo de contato e concentração de terra diatomácea, o qual está descrito na próxima etapa.

### 5.7.2. Otimização da terra diatomácea como pré tratamento para o melaço

Um DCCR ( $2^3$  com 2 pontos centrais) foi realizado com o intuito de avaliar o efeito das variáveis concentração de terra diatomácea, tempo de contato com o coproduto e temperatura do pré tratamento, para o melaço de cana de açúcar para que fossem definidas as condições que levassem à clarificação do meio de cultivo sem prejuízo na bioprodução de carotenoides. A matriz do planejamento experimental com os valores reais e codificados, bem como as respostas em leitura de densidade ótica e pH para a água de maceração de milho, estão apresentadas na Tabela 21.

Na Tabela 21 percebe-se que o pré tratamento apresentou um efeito na redução de ART com perdas de 51,54% (ensaio 15), a 65,79% (ensaio 14), se comparado ao sem pré tratamento. Para a densidade ótica percebe-se que ocorre uma variação de 0,157 (ensaio 8) a 0,212 (ensaio 6). O pH inicial apresentou uma variação entre 4,85 (ensaio 8) ate 5,08 (ensaio 10). Relacionando o resultado do segundo planejamento com o primeiro planejamento percebe-se um ganho de 7,17% no ART e um incremento da clarificação de 2,61%.

**Tabela 21:** Matriz do planejamento experimental completo (valores reais e codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para melaço.

Ensaios	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	2,8 (-1)	27,80 (-1)	0,7 (-1)	65,94	0,141	4,87
2	5,20 (+1)	27,80 (-1)	0,7 (-1)	71,47	0,174	4,96
3	2,8 (-1)	51,2 (+1)	0,7 (-1)	73,57	0,187	5,04
4	5,20 (+1)	51,2 (+1)	0,7 (-1)	73,83	0,159	5,06
5	62,8(-1)	27,80 (-1)	1,3 (+1)	75,09	0,151	5,04
6	5,20 (+1)	27,80 (-1)	1,3 (+1)	73,97	0,212	5,11
7	2,8 (-1)	51,2 (+1)	1,3 (+1)	71,24	0,115	5,01
8	2,8 (+1)	51,2 (+1)	1,3 (+1)	60,89	0,157	4,85
9	2 (-1,68)	32 (0)	1 (0)	75,29	0,186	4,9
10	6 (+1,68)	32 (0)	1 (0)	69,9	0,192	5,08
11	7 (0)	25 (-1,68)	1 (0)	73,33	0,159	4,97
12	7 (0)	64 (+1,68)	1 (0)	68,18	0,159	4,94
13	7 (0)	32 (0)	1,5 (-1,68)	68,65	0,198	5,04
14	7 (0)	32 (0)	1,5 (+1,68)	56,14	0,212	5,02
15	7 (0)	32 (0)	1 (0)	79,53	0,159	5,02
16	7 (0)	32 (0)	1 (0)	79,81	0,159	5,03
17	7 (0)	32 (0)	1 (0)	79,51	0,153	5

X<sub>1</sub>: Concentração de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato com o substrato; Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade Ótica; Y<sub>3</sub>: pH; Melaço sem pré tratamento: Y<sub>1</sub> 164,12 g.L<sup>-1</sup>; Y<sub>2</sub>: 0,37 e Y<sub>3</sub>: 5.

### 5.7.2.1. Verificação do modelo para as respostas ART, DO e pH inicial

Considerando as variáveis do processo em estudo, foi avaliado um modelo de segunda ordem para as respostas açúcar redutor total, densidade ótica e pH inicial. Para a verificação do modelo foram calculados coeficientes de regressão (Tabela 22).

**TABELA 22:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta açúcar redutor total e pH inicial.

	Açúcar redutor total (g.L <sup>-1</sup> )					Densidade Ótica			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (7)	p
Média**	79,426	0,097	821,911	<0,001	Média*	0,0159	0,012	13,511	<0,001
X <sub>1</sub> (L)**	-1,080	0,045	-23,783	0,002	X <sub>1</sub> (L)	0,001	0,001	1,569	0,161
X <sub>1</sub> (Q)**	-1,849	0,050	-36,964	0,001	X <sub>1</sub> (Q)	0,06	0,002	0,983	0,359
X <sub>2</sub> (L)**	-1,143	0,045	-25,166	0,002	X <sub>2</sub> (L)	-0,004	0,006	-0,797	0,452
X <sub>2</sub> (Q)**	-2,50	0,050	-49,996	<0,001	X <sub>2</sub> (Q)	-0,004	0,006	-0,767	0,468
X <sub>3</sub> (L)**	-1,806	0,045	-39,764	0,001	X <sub>3</sub> (L)	<0,001	0,006	-0,033	0,975
X <sub>3</sub> (Q)**	-5,463	0,050	-109,208	<0,001	X <sub>3</sub> (Q)*	0,012	0,006	1,916	0,097
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub> **	-1,813	0,059	-30,564	0,001	X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-0,010	0,007	-1,388	0,208
X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> **	-2,158	0,059	-36,382	<0,001	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub>	0,012	0,007	1,701	0,133
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub> **	-3,365	0,059	-56,744	<0,001	X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub> *	-0,015	0,007	-2,117	0,072

	pH			
	CR	EP	t (7)	p
<b>Média**</b>	5,017	0,025	199,782	<0,001
<b>X<sub>1</sub> (L)</b>	0,024	0,012	2,002	0,085
<b>X<sub>1</sub> (Q)</b>	-0,001	0,013	-0,069	0,515
<b>X<sub>2</sub> (L)</b>	-0,005	0,012	-0,0437	0,068
<b>X<sub>2</sub> (Q)</b>	-0,021	0,013	-1,640	0,145
<b>X<sub>3</sub> (L)</b>	0,003	0,012	0,029	0,781
<b>X<sub>3</sub> (Q)</b>	-0,005	0,013	0,040	0,698
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>2</sub>**</b>	-0,038	0,015	-2,434	0,045
<b>X<sub>1</sub>xX<sub>3</sub></b>	-0,025	0,015	-1,622	0,149
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub>**</b>	-0,070	0,015	-4,543	0,003

\*: ( $p \leq 0,10$ ); \*\*: ( $p \leq 0,05$ ); X<sub>1</sub>: Concentração de terra diatomácea; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato com o substrato (h).

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas é possível observar na Tabela 22 que para açúcar redutor total apenas as interações dos coeficientes foram significativas ao nível de 95% de confiança. Para o pH inicial apresentou significativo ( $p \leq 0,10$ ), para a concentração de terra (L), temperatura (L) e a interação concentração de terra x temperatura. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 23.

**Tabela 23:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup>.

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	ART	D.O	ART	D.O	ART	D.O	ART	D.O
Regressão	577,68	$3,53 \cdot 10^{-3}$	9	2	64,19	$1,77 \cdot 10^{-2}$	6,65	3,48
Resíduo	67,58	$7,10 \cdot 10^{-3}$	7	14	9,65	$5,07 \cdot 10^{-4}$		
Total	645,26	$1,06 \cdot 10^{-2}$	16					

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	pH		pH		pH		pH	
Regressão	0,05		2		0,025		12,5	
Resíduo	0,03		14		0,002			
Total	0,08		16					

ART= Açúcar redutor total; D.O = Densidade ótica. ART: (R: 0,95,  $F_{9; 7, 0,95} = 3,68$ ); D.O: (R: 0,95,  $F_{9; 7, 0,95} = 3,68$ ) e pH (R: 0,58,  $F_{2; 14, 0,90} = 2,73$ ).

Os coeficientes de correlações (R): 0,95 e 0,95 e 0,58 foram calculados na ANOVA (Tabela 23), respectivamente para açúcar redutor total, densidade ótica e pH inicial, com isso pode-se concluir que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. A razão Fcalculado sobre Ftabelado foi de 1,80 para açúcar redutor total e 1,27 densidade ótica e 3,34 para pH inicial tomando o modelo preditivo e significativo para as respostas estudadas nessa faixa.

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam as respostas do DCCR em função das variáveis percentagem de terra, temperatura e tempo de contato, como mostra a Equação 27, 28 e 29.

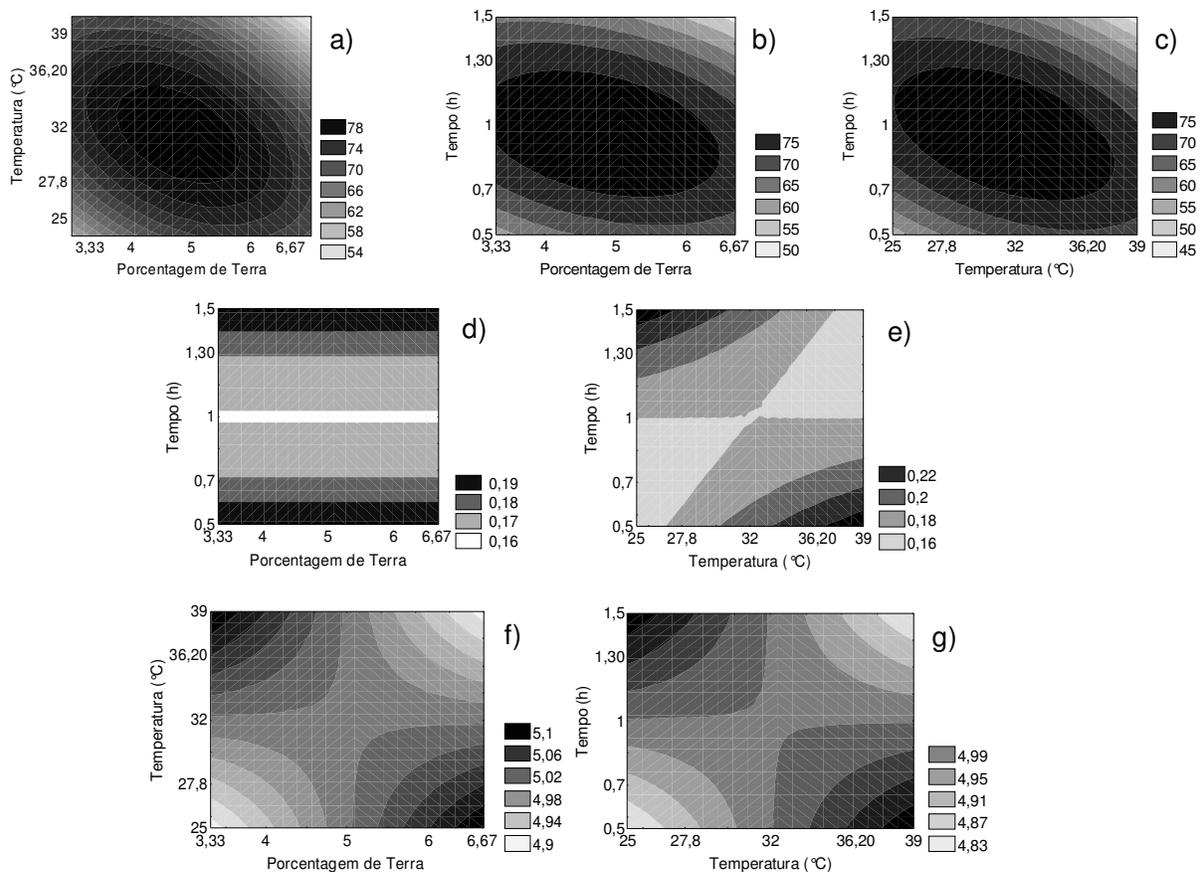
$$\text{Açúcar redutor total (g.L}^{-1}\text{)} = 79,43 - 1,08.X_1 - 1,85.X_1^2 - 1,14.X_2 - 2,50.X_2^2 - 1,81.X_3 - 5,47.X_3^2 - 1,81.X_1.X_2 - 2,16.X_1.X_3 - 3,37.X_2.X_3 \quad (27)$$

$$\text{Densidade ótica} = 0,16 + 0,01.X_3 - 0,02.X_2.X_3 \quad (28)$$

$$\text{pH} = 5 - 0,04.X_1.X_2 - 0,07.X_2.X_3 \quad (29)$$

Onde:  $X_1$ : Concentração de terra diatomácea;  $X_2$ : Temperatura;  $X_3$ : Tempo de contato com o substrato.

Através dos modelos foi possível construir as curvas de contorno (Figura 15), podendo-se obter as concentrações das variáveis: Concentração de terra, temperatura e tempo de contato com o substrato. Com as curvas de contorno expostas na Figura 15a, verifica-se para manter uma taxa de açúcar no substrato elevada deve-se trabalhar com uma concentração de terra na faixa 4 a 5,5% na combinação de 27,8 a 34,1°C de temperatura. Na utilização de 3,33 a 6,67% de terra diatomácea deve ter um tempo de contato de 0,07 a 1,30h (Figura 15b). Com a temperatura entre 25 a 36,20°C o tempo de contato deve ser de 0,7 a 1,30h.



**Figura 15:** Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b e c), densidade ótica (d, e) pH (f, g), para melão de cana de açúcar.

Para ter uma clarificação satisfatória deve-se trabalhar tanto com 3,33 a 6,67% de terra com pouco tempo de contato de 0,5 a 0,6h, ou elevado tempo de contato de 1,40 a 1,5h com 3,33 a 6,67% de terra diatomácea (Figura 15d). Na utilização de 36,20 a 39°C de temperatura deve ter um tempo de 0,5 a 0,6h de contato ou baixa

temperatura de 25 a 26,4°C na combinação de elevado tempo de 1,40 a 1,5h de contato com o substrato (Figura 15e).

Para se aumentar o pH do substrato é possível trabalhar com alta concentração de terra diatomácea 6,34 a 6,67% com combinação de 25 a 26,4°C de temperatura ou ainda baixa quantidade de terra de 3,33 a 4% com uma temperatura de 37,6 a 39°C como se observa a Figura 15f. Quando usar a temperatura na faixa de 37,6 a 39°C o tempo de contato deve ser na faixa de 0,5 a 0,7h, ou ainda baixa temperatura na faixa de 25 a 27,8% na utilização de faixa de tempo de contato de 1,40 a 1,5h, Figura 15g.

Portanto para a melhor condição deve-se trabalhar com 5% de terra diatomácea, temperatura de 32°C, e tempo de contato de 1h sobre agitação de 150 rpm em reator (300 mL) encamisado de modo a remover possivelmente metais pesados e aumentar diversos tipos de bioprodução quando trabalhado com este tipo de coproduto. Desse modo, para bioprodução de carotenoides será usado esta condição para pré tratamento no melão.

### **5.7.3. Estudo do pré tratamento com terra diatomácea para água de maceração de milho (100 g.L<sup>-1</sup>)**

Os mesmos pré tratamentos propostos no DCCR 2<sup>3</sup> para o melão (Tabela 18) foram realizados separadamente para o coproduto agroindustrial água de maceração de milho (Tabela 24) para avaliar a influência das mesmas variáveis e repostas. Em todos os dezessete ensaios ocorreram perda ART (1,0 a 4,12 g.L<sup>-1</sup>), se comparado ao coproduto sem pré tratamento (4,93). Para densidade ótica verificou-se variações de 49,52% (ensaio 8) a 87,94% (ensaio 2) de clarificação. As diferentes condições de pré tratamentos influenciaram o pH do coproduto, conforme comprovado na Tabela 25.

O aumento da concentração de terra diatomácea, da temperatura e do tempo de contato da terra diatomácea com a água de maceração de milho promoveu uma diminuição dos açúcares (Tabela 25) por apresentar um efeito negativo significativo ( $p \leq 0,10$ ). No entanto, para a densidade ótica o incremento das três variáveis independentes, bem como suas interações, exceto porcentagem de terra x temperatura, foram estatisticamente significativas ( $p \leq 0,10$ ) para as faixas estudadas, promovendo uma maior clarificação do coproduto portanto, estas variáveis deveriam estar no nível inferior (-1) ou diminuir esses níveis de estudo.

**Tabela 24:** Delineamento composto central rotacional (valores reais e codificados) para o pré tratamento com terra diatomácea para água de maceração de milho.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	6 (-1)	64 (-1)	1,5 (-1)	4,12	0,148	4,04
2	8 (+1)	64 (-1)	1,5 (-1)	1,77	0,076	4,14
3	6 (-1)	76 (+1)	1,5 (-1)	2,39	0,121	4,05
4	8 (+1)	76 (+1)	1,5 (-1)	2,28	0,202	4,02
5	6 (-1)	64 (-1)	2 (+1)	1,61	0,094	4,12
6	8 (+1)	64 (-1)	2 (+1)	1,63	0,253	4,10
7	6 (-1)	76 (+1)	2 (+1)	1,27	0,281	4,11
8	8 (+1)	76 (+1)	2 (+1)	1,00	0,318	4,11
9	5,32 (-1,68)	70 (0)	1,75 (0)	1,65	0,101	4,12
10	8,68 (+1,68)	70 (0)	1,75 (0)	1,73	0,130	4,09
11	7 (0)	60 (-1,68)	1,75 (0)	1,65	0,094	4,13
12	7 (0)	80 (+1,68)	1,75 (0)	1,07	0,158	4,12
13	7 (0)	70 (0)	1,33 (-1,68)	1,42	0,137	4,15
14	7 (0)	70 (0)	2,17 (+1,68)	1,24	0,094	4,12
15	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,59	0,079	4,07
16	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,59	0,069	4,09
17	7 (0)	70 (0)	1,75 (0)	1,51	0,068	4,08

X<sub>1</sub>: Concentração de terra diatomácea; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h) Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade ótica D.O; Y<sub>3</sub>: pH. Água de maceração de milho sem pré tratamento: Y<sub>1</sub>: 4,93 g.L<sup>-1</sup>, Y<sub>2</sub>: 0,63 e Y<sub>3</sub>: 3,9.

**Tabela 25:** Resultados dos efeitos, desvio padrão, *t* e *p* para o açúcar redutor total, densidade ótica e pH após os pré tratamentos da água de maceração de milho com terra diatomácea

		Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Açúcar Redutor Total (g.L <sup>-1</sup> )	Fator	1,887	0,014	135,595	<0,001
	(1) X <sub>1</sub> (L)**	-0,678	0,033	-20,744	0,002
	(2) X <sub>2</sub> (L)**	-0,548	0,033	-16,764	0,003
	(3) X <sub>3</sub> (L)**	-1,262	0,033	-38,656	<0,001
	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	0,488	0,033	14,927	0,004
	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> **	0,553	0,033	16,917	0,003
	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub> **	0,062	0,033	1,914	0,196
	Média**	0,155	0,002	82,576	<0,001
Densidade ótica (D.O)	(1) X <sub>1</sub> (L)**	0,051	0,004	11,615	0,007
	(2) X <sub>2</sub> (L)**	0,088	0,004	19,961	0,003
	(3) X <sub>3</sub> (L)**	0,100	0,004	22,596	0,002
	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub> **	0,008	0,004	1,817	0,211
	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> **	0,047	0,004	10,585	0,009
	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub> **	0,038	0,004	8,735	0,013
	Média**	4,085	0,003	1354,690	<0,001
pH	(1) X <sub>1</sub> (L)	0,012	0,007	1,768	0,219
	(2) X <sub>2</sub> (L)**	-0,027	0,007	-3,889	0,060
	(3) X <sub>3</sub> (L)**	0,047	0,007	6,718	0,0215
	X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub> **	-0,027	0,007	-3,889	0,060
	X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub> **	-0,023	0,007	-3,182	0,086
	X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub> **	0,027	0,007	3,889	0,060

\*\* ( $p \leq 0,10$ ); \* ( $p \leq 0,05$ ). X<sub>1</sub>: Concentração de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h). \* Fatores estatisticamente significativos ( $p \leq 0,10$ ); X<sub>1</sub>: Percentagem de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h) Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade ótica D.O; Y<sub>3</sub>: pH.

Assim, baseado nos resultados dos ensaios anteriores para água de maceração de milho redefiniu-se os níveis sequenciando o estudo através do planejamento experimental apresentado na Tabela 26.

Na Tabela 26 percebe-se que em todos os dezesseis ensaios ocorreram perdas de açúcares redutores totais, tendo uma variação de 1,21 (ensaio 2) a 4,82 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 13). Já para a densidade ótica apresentou uma variações de 76,83% (ensaio 13) a 88,89% (ensaio 7, 10 e 17) de clarificação. Entretanto o pH apresentou um variação 3,87 (ensaio 10) a 4,10 (ensaio 5), dessa forma as diferentes condições do pré tratamento apresentou influência significativa no pH do coproduto, promovendo uma diminuição, conforme comprovado na Tabela 27 que apresenta uma análise de efeitos. Além disso, se comparar com primeiro planejamento para água de maceração de milho percebe-se um ganho nos açúcares de 14,52%, além um pequeno aumento na clarificação desse substrato de 4,82%, em relação às melhores respostas de cada planejamento. Deve-se ressaltar que foi possível promover uma diminuição na temperatura, no tempo de contato, além de uma menor quantidade de terra diatomácea que favoreceu no ganho dessas respostas.

**Tabela 26:** Delineamento composto central rotacional valores reais (codificados) para os pré tratamentos com terra diatomácea para água de maceração de milho.

Ensaios	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
1	4 (-1)	27,8 (-1)	0,7 (-1)	1,92	0,108	3,94
2	6 (+1)	27,80 (-1)	0,7 (-1)	1,21	0,118	4,09
3	4(-1)	36,20 (+1)	0,7 (-1)	2,02	0,094	3,93
4	6 (+1)	36,20 (+1)	0,7 (-1)	1,32	0,085	4,06
5	4 (-1)	27,80 (-1)	1,30 (+1)	2,01	0,131	4,10
6	6 (+1)	27,80 (-1)	1,30 (+1)	1,77	0,105	4,08
7	4 (-1)	36,20 (+1)	1,30 (+1)	1,31	0,070	3,95
8	6 (+1)	36,20 (+1)	1,30 (+1)	1,50	0,100	3,91
9	3,33 (-1,68)	32 (0)	1 (0)	2,16	0,097	3,92
10	6,67 (+1,68)	32 (0)	1 (0)	1,65	0,070	4,00
11	5 (0)	25 (-1,68)	1 (0)	2,00	0,094	3,91
12	5 (0)	39 (+1,68)	1 (0)	3,01	0,166	3,89
13	5 (0)	32 (0)	0,5 (-1,68)	4,82	0,146	3,87
14	5 (0)	32 (0)	1,5 (+1,68)	3,24	0,068	3,96
15	5 (0)	32 (0)	1 (0)	4,52	0,085	3,95
16	5 (0)	32 (0)	1 (0)	4,5	0,095	3,97
17	5 (0)	32 (0)	1 (0)	4,52	0,071	3,90

X<sub>1</sub>: Concentração de terra diatomácea; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h) Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade ótica D.O; Y<sub>3</sub>: pH. Água de maceração de milho sem pré tratamento: Y<sub>1</sub>: 4,93 g.L<sup>-1</sup>, Y<sub>2</sub>: 0,63 e Y<sub>3</sub>: 3,9.

A Tabela 27 apresenta os efeitos, desvio padrão e limites de confiança, onde para a densidade ótica verifica-se que todas as variáveis, com exceção da interação concentração de terra x temperatura, foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95% apresentando efeito positivo.

**Tabela 27:** Resultados dos efeitos, desvio padrão para a açúcar redutor total, densidade ótica e pH após o pré tratamento da água de maceração de milho.

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Densidade Ótica	Média*	0,155	0,002	82,576	<0,001
	(1) X <sub>1</sub> (L)*	0,051	0,004	11,615	0,007
	(2) X <sub>2</sub> (L)*	0,088	0,004	19,961	0,003
	(3) X <sub>3</sub> (L)*	0,010	0,004	22,596	0,002
	X <sub>1</sub> xX <sub>2</sub>	0,008	0,004	1,817	0,211
	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> *	0,047	0,004	10,585	0,009
	X <sub>2</sub> xX <sub>3</sub> *	0,038	0,004	8,732	0,013

\*\* ( $p \leq 0,1$ ); \* ( $p \leq 0,05$ ). X<sub>1</sub>: Concentração de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato com o substrato; Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade Ótica; Y<sub>3</sub>: pH

Para a construção de um modelo empírico que relacione as respostas em função das variáveis estudadas é possível observar na Tabela 28 que para açúcar redutor total percebe-se todos os coeficientes do modelo, foram significativas ao nível de 95%. Já para a densidade ótica os coeficientes temperatura (L) bem como a interação concentração de terra x tempo de contato foi significativo ( $p \leq 0,1$ ). E para o pH pode observar somente a interação concentração de x temperatura foi significativa para um intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 28:** Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nível de significância para a resposta açúcar redutor total e pH inicial.

	Açúcar redutor total (g.L <sup>-1</sup> )					pH			
	CR	EP	t (2)	p		CR	EP	t (2)	p
Média*	4,58	0,007	689,186	<0,01	Média**	5,017	0,025	199,782	<0,001
X <sub>1</sub> (L)*	-0,169	0,003	-54,32	<0,01	X <sub>1</sub> (L)	0,024	0,012	2,002	0,085
X <sub>1</sub> (Q)*	-1,16	0,003	-337,926	<0,01	X <sub>1</sub> (Q)	-0,001	0,013	-0,069	0,515
X <sub>2</sub> (L)*	0,069	0,003	21,963	0,02	X <sub>2</sub> (L)	-0,005	0,012	-0,0437	0,068
X <sub>2</sub> (Q)*	-0,951	0,003	-276,197	<0,01	X <sub>2</sub> (Q)	-0,021	0,013	-1,640	0,145
X <sub>3</sub> (L)*	-0,186	0,003	-59,419	<0,01	X <sub>3</sub> (L)	0,003	0,012	0,029	0,781
X <sub>3</sub> (Q)*	-0,411	0,003	-119,301	<0,01	X <sub>3</sub> (Q)	-0,005	0,013	0,040	0,698
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub> *	0,055	0,004	13,472	<0,01	X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub> **	-0,038	0,015	-2,434	0,045
X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub> *	0,170	0,004	41,641	<0,01	X <sub>1</sub> xX <sub>3</sub>	-0,025	0,015	-1,622	0,149
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub> *	-0,148	0,004	-36,130	<0,01	X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub> **	-0,070	0,015	-4,543	0,003

\*\* ( $p \leq 0,1$ ); \* ( $p \leq 0,05$ ). X<sub>1</sub>: Concentração de terra; X<sub>2</sub>: Temperatura (°C); X<sub>3</sub>: Tempo de contato (h) Y<sub>1</sub>: Açúcar Redutor Total (g.L<sup>-1</sup>); Y<sub>2</sub>: Densidade ótica D.O; Y<sub>3</sub>: pH.

Para a verificação do modelo foram calculados coeficientes de regressão e realizada a ANOVA, no qual os resultados estão apresentados nas Tabelas 29. Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância.

**Tabela 29:** Análise de variância para o delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup>.

Fonte de variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	ART	pH	ART	pH	ART	pH	ART	pH
Regressão	30,24	0,0259	9	2	3,36	0,01295	3,69	2,98
Resíduo	6,35	0,0607	7	14	0,91	0,00434		
Total	36,59	0,0866						

ART=Açúcar redutor total; ART: (R: 0,95, F<sub>9; 7 0,95</sub>= 3,68); pH: (R: 0,55, F<sub>2; 14 0,90</sub>=2,73)

Os coeficientes de correlações (R): 0,95 e 0,55 foram calculados na ANOVA (Tabela 30), para o açúcar redutor total, e pH com isso pode-se concluir que o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. A razão Fcalculado sobre Ftabelado foi de 1,22 e 1,09 para açúcar redutor total e pH tornando o modelo preditivo e significativo para a resposta estudada nessa faixa.

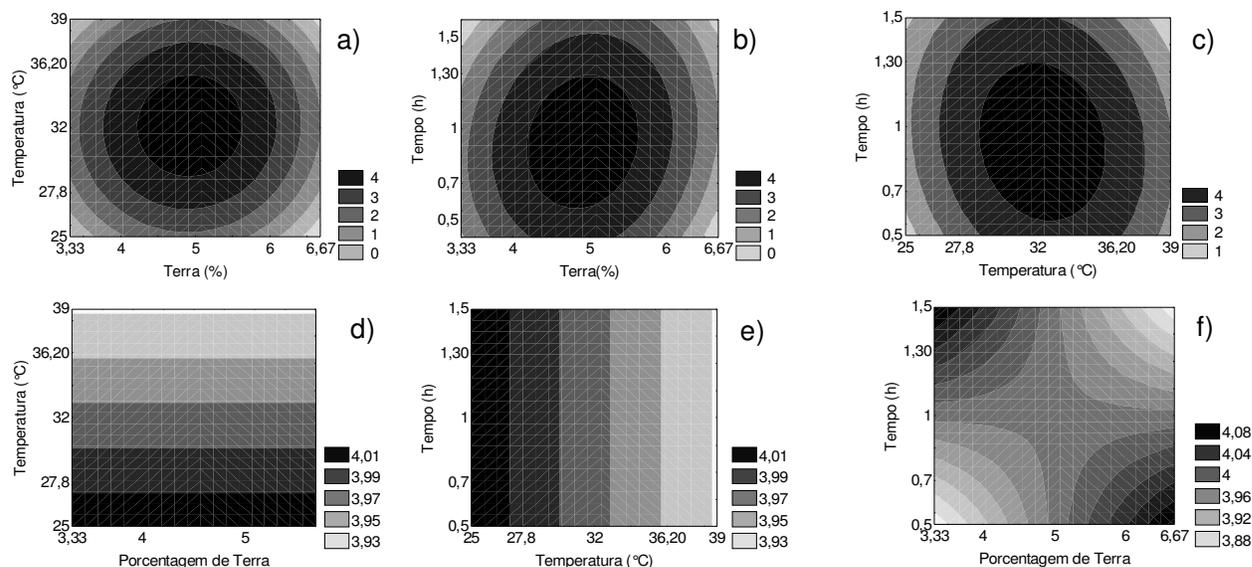
Dessa forma foi possível gerar a equação do modelo com as variáveis codificadas que representa a respostas do DCCR em função da percentagem de terra, temperatura e tempo de contato, como mostra a Equação 25 e 26.

$$\text{Açúcar redutor total (g.L}^{-1}\text{)} = 4,58 - 0,17.X_1 - 1,16.X_1^2 + 0,7.X_2 - 0,95.X_2^2 - 0,19.X_3 - 0,41.X_3^2 + 0,06X_1.X_2 + 0,17 X_1.X_3 + 0,15.X_3.X_2 \quad (25)$$

$$\text{pH} = 3,97 - 0,03.X_2 - 0,04. X_1.X_3 \quad (26)$$

Onde: X<sub>1</sub>: Concentração terra diatomácea; X<sub>2</sub>: Temperatura; X<sub>3</sub>: Tempo de contato com o substrato.

Através do modelo foi possível construir as curvas de contorno (Figura 16) e para manter uma taxa de açúcar no substrato elevada deve-se trabalhar com temperatura entre 27,8 a 36,2°C e concentração de terra de 4,5 a 5,5% (Figura 16a) ou com um tempo de contato de 0,7 a 1,15h (Figura 16b) ou com baixa temperatura de 25 a 27,8°C tendo um tempo de constato de 0,5 a 1,5h (Figura 15c) outro fator para alcançar um aumento no pH é trabalhar com alta concentração de terra diatomácea 6 a 6,67% com baixa tempo de contato de 0,5 a 0,7h ou ainda baixa quantidade de terra diatomácea 3,33, a 4% na combinação de 1,3 a 1,5h de contato (Figura 15e).



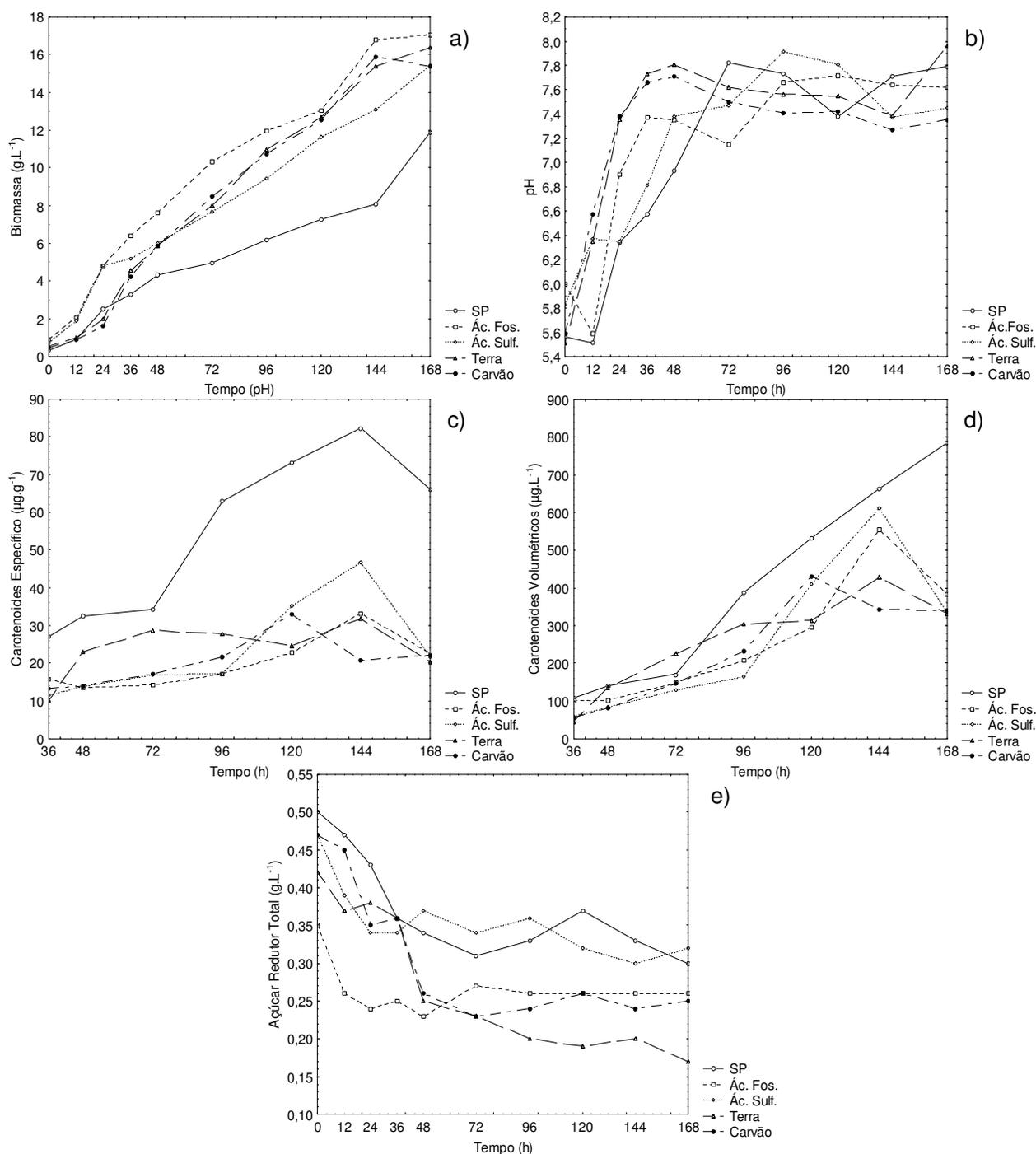
**Figura 16:** Curvas de contorno para resposta açúcar redutor total (a, b, c) e pH (d, e, f) para água de maceração de milho pré tratada.

Comparando os melhores resultados do primeiro planejamento com o segundo, verifica-se um ganho de 14,52% nos açúcares, promovendo uma clarificação de 4,82% além de diminuir a temperatura, o tempo de contato com o pré tratamento bem como a quantidade de terra diatomácea. Portanto, a melhor condição para os açúcares presentes no substrato é que se deve trabalhar com 5% de terra diatomácea, temperatura de 32 °C e tempo de contato de 1h sob agitação de 150 rpm em reator (300 mL) encamisado de modo a manter uma quantidade satisfatória de açúcar no meio de cultivo, promovendo uma clarificação além de remover possivelmente metais pesados.

### 5.8. Aplicação dos pré tratamentos no meio de cultivo otimizado contendo glicerol bruto e água de maceração de milho

Na melhor condição obtida para a otimização do meio com glicerol bruto (30 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (52,9 g.L<sup>-1</sup>), foram realizados quatro diferentes pré tratamentos (ácido sulfúrico, ácido fosfórico, carvão ativo terra diatomácea), bem como o experimento conduzido sem a presença dos pré tratamentos.

Verifica-se que nas primeiras 12h de cultivo o pH diminuiu, aumentando até aproximadamente 48 a 72 h e permanecendo constante até o final do processo, como é observado na Figura 17b.



**Figura 17:** Cinética da evolução do pH (a), do crescimento celular (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por *S. pararoseus* ao longo de 168h, a 25°C e 180 rpm, com glicerol bruto (30 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (52,9 g.L<sup>-1</sup>) nos meios de cultivo sob diferentes pré tratamentos, sendo realizado em triplicata. SP: sem tratamento no meio; Ác.Fos.: ácido fosfórico; Ác. Sulf.: ácido sulfúrico; Terra: terra diatomácea; Carvão: carvão ativo.

Para os cinco pré tratamentos estudados para a bioprodução de carotenoides pela *S. pararoseus* a 25°C, com 180rpm por 168h de cultivo, percebe-se uma produção de biomassa superior comparado ao meio sem pré tratamento (Figura17a). O destaque para a produção de biomassa foi para o meio com tratamento de ácido fosfórico alcançando 17,33 g.L<sup>-1</sup> em 144h de cultivo, apresentando um ganho de 32,78% se comparado ao sem pré tratamento. Além disso, verifica-se que o ensaio com carvão ativo e ácido sulfúrico alcançaram o mesmo desempenho em relação ao crescimento celular que o meio sem pré tratamento.

De acordo com a Tabela 30, apesar do incremento no crescimento celular com o uso de alguns pré tratamentos nos substratos alternativos, a produção de carotenoides foi influenciada negativamente, diminuindo assim a produção carotenogênica em todos os cultivos comparado ao meio sem pré tratamento. Dos diferentes nutrientes citados por Gao e Yuan (2011) na água de maceração de milho, Valduga *et al.* (2007) constataram que Zn, N, P, Cu, Fe, K, P e Mg são nutrientes importantes que apresentam perdas quando se utiliza pré tratamentos em coprodutos, na produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. Provavelmente, a rota metabólica da carotenogênese, para esta linhagem da levedura, pode está fortemente associada à concentração destes nutrientes no meio de cultivo, que possam ter sido diminuídos no processo dos pré tratamentos aplicados neste trabalho. Uma vez que a produção de carotenoides com o uso de todos os pré tratamentos foi inferior ao mesmo cultivo sem a utilização de pré tratamentos nos substratos alternativos.

Na Tabela 30 percebe-se que a produção de carotenoides para o ensaio sem tratamento foi de 779,60 µg.L<sup>-1</sup> (65,64 µg.g<sup>-1</sup>) sendo superior ao demais. Entretanto a produtividade volumétrica para meio de cultivo tratado com ácido sulfúrico foi similar ao obtido sem pré tratamento. Para a produtividade específica percebe-se que o ensaio sem pré tratamento apresentou ser superior em relação aos cinco pré tratados. Entretanto a produtividade em biomassa foi maior para o meio tratado com ácido fosfórico e sulfúrico alcançando valores de 0,120 e 0,107 µg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente, obtendo um ganho de 42,5% e 35,51% quando comparado ao ensaio sem tratamento.

Com a utilização de glicerol bruto e água de maceração foi obtido uma produção de carotenoides 779,60 µg.L<sup>-1</sup> (65,64 µg.g<sup>-1</sup>), Tabela 30, entretanto Davoli *et al.* (2004) utilizaram dois tipos de erlenmeyer um aletado e outro sem aleta utilizando duas leveduras *Rhodotorula glutinis* ATCC 26085 e *Sporobolomyces roseus* D99040, em meio com 4 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> e de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 24°C, verificando uma produção superior em frascos aletados onde a *R. Glutinis* apresentou uma produção de 206 µg.g<sup>-1</sup> e para *Sporobolomyces roseus* foi de 412 µg.g<sup>-1</sup> com 120rpm por 108h sem ajuste de pH.

**Tabela 30:** Teste de Tukey para os diferentes pré tratamento no meio de cultivo para bioprodução de carotenoides.

<b>Tratamento</b>	<b>Cart. Vol. (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Cart. Esp. (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>	<b>Biomassa (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Vol. (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Esp. (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Bio. (<math>\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)</b>
<b>SP*</b>	779,60 $\pm$ 13,49 <sup>a</sup>	65,64 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>	11,65 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	4,64 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,398 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,069 $\pm$ <0,01 <sup>d</sup>
<b>Ác. Fosf.</b>	567,99 $\pm$ 21,71 <sup>b</sup>	73,87 $\pm$ 1,30 <sup>c</sup>	17,33 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	3,94 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	0,235 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,120 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
<b>Ác. Sulf.</b>	614,33 $\pm$ 51,67 <sup>b</sup>	46,89 $\pm$ 3,94 <sup>b</sup>	13,03 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	4,27 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	0,326 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,091 $\pm$ <0,01 <sup>c</sup>
<b>Terra</b>	446,08 $\pm$ 37,11 <sup>c</sup>	29,01 $\pm$ 2,42 <sup>c</sup>	15,37 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	3,10 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	0,202 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,107 $\pm$ <0,01 <sup>ab</sup>
<b>Carvão</b>	443,71 $\pm$ 29,03 <sup>c</sup>	35,37 $\pm$ 2,32 <sup>c</sup>	12,27 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	3,70 $\pm$ 0,24 <sup>bc</sup>	0,295 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,102 $\pm$ <0,01 <sup>bc</sup>

Médias  $\pm$  erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna representam que há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). SP\* = sem pré tratamento no meio de cultivo.

### 5.9. Aplicação dos pré tratamentos no meio de cultivo otimizado contendo melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho

Na melhor condição obtida para a otimização do meio formulado melaço ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho ( $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) na produção de carotenoides, foram realizados cinco diferentes pré tratamentos apresentados na Figura 18, os pré tratamentos ácidos (sulfúrico e fosfórico), com carvão ativo e com a utilização das condições definidas no estudo anterior com a terra diatomácea, bem como o experimento conduzido sem a presença dos pré tratamentos.

Dentre os cinco pré tratamentos estudados para a bioprodução de carotenoides pela levedura *S. paraseus* a  $25^\circ\text{C}$ , com 180rpm por 168h de cultivo, o carvão ativo apresentou um aspecto de maior clarificação dos coprodutos aplicados neste trabalho, seguido posteriormente pela terra diatomácea e dos pré tratamentos com ácidos.

Na Figura 18a é possível observar um crescimento celular contínuo da biomassa para os diferentes pré tratamentos, com exceção do tratamento com carvão ativo que após 48h de cultivo permaneceu constante apresentando menor produção de biomassa. Provavelmente, o carvão além de remover possíveis metais pesados pode ter absorvido nutrientes bem como uma parte dos açúcares no início do processo, onde a taxa inicial de açúcares redutores totais é de  $2,78 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo que no final do processo percebe-se praticamente esgotamento do mesmo ( $0,47 \text{ g.L}^{-1}$ ), provavelmente deve ter sobrado somente açúcar para que a levedura possa consumir. Outro fator que pode explicar a baixa produção de biomassa é a presença de partículas de carvão que não foi removida com a coluna de filtração (algodão, terra e papel de filtro) mesmo após a centrifugação. Possivelmente estas partículas sólidas no meio promoveram um retardo na biossíntese celular bem como também o cisalhamento da parede celular das leveduras, devido o processo está em constante agitação (180 rpm). Comportamento similar de inibição na produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 para um meio com melaço, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho pré tratados com carvão ativo também foi observado por Valduga *et al.*, (2007). De acordo com Treichel (2004) constatou partículas sólidas de carvão para o meio de cultivo formulado com melaço e água de maceração de milho para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. O que geral um efeito inibidor.

De acordo com Valduga (2007) verificou que para os substratos melaço pré tratado com carvão ativo 5% por 60 min. a  $90^\circ\text{C}$  constatou perdas consideradas de minerais como o teor de zinco (92%), nitrogênio (80%), fósforo (80%), cobre (70%) e ferro (70%) além de perdas em potássio (18) e magnésio (24%), que são considerados

importantes nutrientes em cultivo submerso. Dessa forma para meio pré tratado com carvão ativo apresentou os valores mais baixo para bioprodução de carotenoides  $206,84 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $41,17 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), biomassa de  $5,04 \text{g.L}^{-1}$ , produtividade em carotenoides  $1,73 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ( $0,343 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), bem como a produtividade em biomassa ( $0,165 \text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

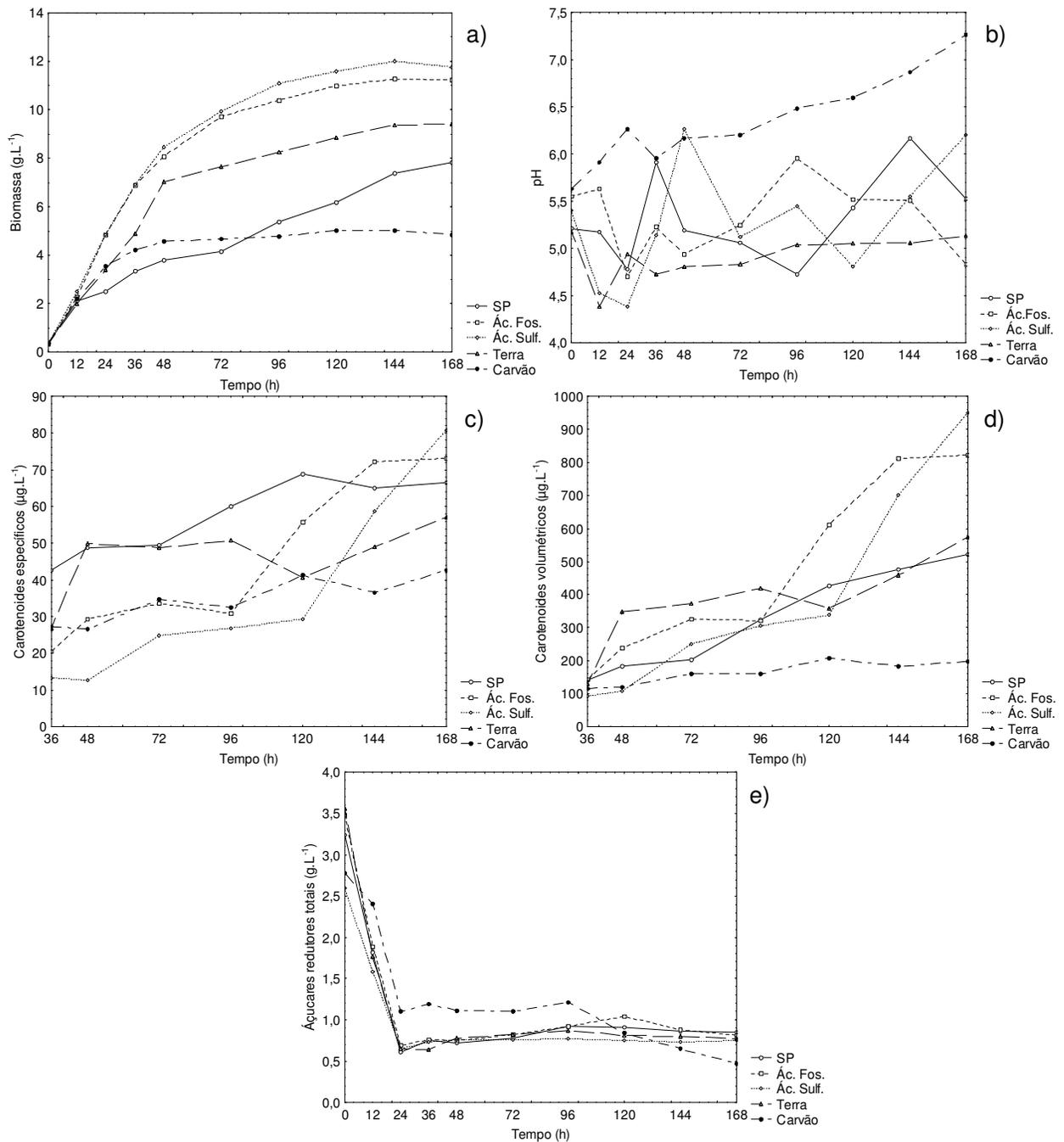
Para o pH verifica-se uma variação ao longo do processo para todos os tratamentos, exceção do carvão ativo que apresentou uma evolução contínua do pH, Figura 18b.

Verifica-se que na Tabela 31 que o melhor pré tratamento foi com ácido sulfúrico para as respostas carotenoides  $936,35 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $79,63 \mu\text{g.g}^{-1}$ ), apresentando um ganho de 44,19% na produção volumétrica e 16,02% se comparado ao ensaio sem pré tratamento. Observa-se que para a biomassa tanto o ácido fosfórico como ácido sulfúrico foram apresentaram os maiores índices de crescimento celular frente ao sem pré tratamento tendo um ganho de 30,35 % e 34,69% respectivamente para ácido fosfórico e ácido sulfúrico. Sendo razoáveis estes resultados uma vez que o pré tratamento com ácido promove além de remover metais pesados, provoca uma solubilidade em outros metais de interesse tendo uma redução de mínima de 30% (VOLGEL, 1981; VALDUGA, 2005). Para o cultivo pré tratado com o carvão ativo foi verificado na produção carotenogênica, sendo inferior a aproximadamente 40% da alcançada sem pré tratamento.

Valduga *et al.* (2007) alcançou resultados de carotenoides totais similares ( $208,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) aos deste trabalho, no pré tratamento com carvão ativo em um meio complexo (fonte de nutrientes alternativo), com o mesmo gênero de levedura deste estudo. No entanto, produções de carotenoides totais superiores foram alcançadas neste trabalho com os demais pré tratamentos propostos com a levedura silvestre isolada e com o meio de produção utilizado previamente otimizado.

De acordo com Roukas (1998) utilizou ácido sulfúrico para pré tratar o melão de beterraba para produção de pululana, onde verificou uma produção foi de  $17,8 \text{g.L}^{-1}$  e um rendimento de 27% sendo superior a diferentes pré tratamentos a qual ele testou, demonstrando que estes coprodutos apresentavam metais pesados que interferindo no crescimento da levedura, quando utilizando sem nenhum tratamento.

Para o novo tratamento desenvolvido com a terra diatomácea verifica-se que para as respostas carotenoides, produtividade volumétrica e específica, não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), somente para biomassa ( $9,43 \text{g.L}^{-1}$ ) apresentou ser superior e com ganho de 16,76% comparado ao sem pré tratamento (Tabela 31).



**Figura 18:** Cinética da evolução do pH (a), do crescimento celular (b), produção específica (c) e produção volumétrica (d) de carotenoides por *S. pararoseus* ao longo de 168h, a 25 °C e 180rpm, com melão (40 g.L<sup>-1</sup>) e água de maceração de milho (6,5 g.L<sup>-1</sup>) nos meios de cultivo sob diferentes pré tratamentos, sendo realizado em triplicata. SP: sem tratamento no meio; Ác.Fos.: ácido fosfórico; Ác. Sulf.: ácido sulfúrico; Terra: terra diatomácea; Carvão: carvão ativo.

**Tabela 31:** Teste de Tukey para os diferentes pré tratamento no meio de cultivo para bioprodução de carotenoides.

<b>Tratamento</b>	<b>Cart. Vol. (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Cart. Esp. (<math>\mu\text{g.g}^{-1}</math>)</b>	<b>Biomassa (<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Vol. (<math>\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Esp. (<math>\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Prod. Bio. (<math>\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}</math>)</b>
<b>SP*</b>	522,62 $\pm$ 3,74 <sup>c</sup>	66,87 $\pm$ 0,48 <sup>bc</sup>	7,85 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	3,11 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,398 $\pm$ <0,01 <sup>bc</sup>	0,047 $\pm$ <0,01 <sup>a</sup>
<b>Ác. Fosf.</b>	812,32 $\pm$ 5,37 <sup>b</sup>	72,35 $\pm$ 5,37 <sup>ab</sup>	11,27 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	4,83 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	0,43 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	0,067 $\pm$ <0,01 <sup>a</sup>
<b>Ác. Sulf.</b>	936,35 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>	79,63 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>	12,02 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	5,57 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	0,474 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,072 $\pm$ <0,01 <sup>a</sup>
<b>Terra</b>	570,95 $\pm$ 3,51 <sup>c</sup>	60,68 $\pm$ 3,51 <sup>c</sup>	9,43 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	3,40 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>	0,361 $\pm$ 0,02 <sup>cd</sup>	0,056 $\pm$ <0,01 <sup>a</sup>
<b>Carvão</b>	206,84 $\pm$ 0,87 <sup>d</sup>	41,17 $\pm$ 0,87 <sup>d</sup>	5,04 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	1,73 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	0,343 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	0,165 $\pm$ <0,01 <sup>a</sup>

Médias  $\pm$  erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna representam que há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). SP\* = sem pré tratamento no meio de cultivo.

## 5. 12. Influência do tipo de método de secagem de e de maceração biomassa

O método de secagem é uma técnica antiga para preservação de alimentos, entretanto existem diversos tipos de secagem como leito fixo ou liofilização na qual estes promovem uma desidratação na amostra e podem interferir diretamente no grau dos constituintes do produto, podendo remover mais água ou acarretar maior dano nas propriedades nos alimentos (SANTOS *et al.*, 2012).

Percebe-se na Tabela 36 que o método de secagem por liofilização apresenta uma recuperação maior dos carotenoides se comparado a secagem por estufa de circulação de ar forçado. Além de verificar que a recuperação de carotenoides da biomassa sem maceração apresenta um ganho de aproximadamente 20%, comparando com a biomassa macerada. Confrontando estes dados com o método de secagem convencional percebe ganho de cerca de 44% aproximadamente, quando trabalhado com liofilização sem maceração. O processo de liofilização remove a água livre do sistema, enquanto que no processo de trituração da amostra com o grau e pistilo pode gerar atrito liberando calor, provocando possivelmente uma redução no teor desse carotenoide, constatado neste trabalho. Além desse procedimento verificasse que por outro lado, quando a biomassa é macerada e padronizada (mesh 125) ocorre um maior tempo de exposição dessa amostra com o ambiente, possibilitando também perdas no teor de carotenoides.

**Tabela 32:** Métodos de secagem e influência da maceração

<b>Tipo de tratamento</b>	<b>Carot. Específico</b>	<b>Carot. Volumétrico</b>
<b>Secagem em estufa (25 °C)</b>	58,79±3,36 <sup>c</sup>	486,06±27,75 <sup>c</sup>
<b>Liofilização sem trituração (-80 °C)</b>	105,24±3,14 <sup>a</sup>	870,04±25,97 <sup>a</sup>
<b>Liofilização com trituração (-80 °C)</b>	85,27±10,65 <sup>b</sup>	704,99±88,01 <sup>b</sup>

Letras minúsculas distintas na mesma coluna significam que as amostras diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), n: 3. Meio: melaço (30 g.L<sup>-1</sup>) e AMM (6,5 g.L<sup>-1</sup>) a 25 °C, 180rpm em 168h de cultivo.

Segundo Santos *et al.* (2012), verificou que a desidratação em leito fixo provocou perda de carotenoide no coentro, apresentando valores de 2,47 mg.g<sup>-1</sup> e na liofilização foi 2,02 mg.g<sup>-1</sup>, esta diferença entres os tratamento é decorrente da temperatura de exposição que provoca degradação nos constituintes, sendo que Mariano (2006) verificou que perdas de  $\beta$ -caroteno em pequi de 30,83%, 32,0% e 43,90% quando expostos a temperatura de 60, 70 e 105 °C, demonstrando que a biomolécula apresenta de sensibilidade a temperatura além da luz e acidez.

## 6. CONCLUSÃO

Na otimização do meio agroindustrial formulado com melaço de cana de açúcar ( $40\text{g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho ( $6,5\text{ g.L}^{-1}$ ), obteve-se valores máximos para produção de carotenoides de  $520,94\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $73,19\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) com  $7,82\text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, além de uma produtividade em carotenoides de  $3,10\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ( $0,436\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e produtividade em biomassa  $0,05\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , a  $25^\circ\text{C}$ , com  $180\text{ rpm}$ , em  $168\text{h}$  de cultivo, com pH inicial de  $6.0$ . No entanto, o meio contendo glicerol bruto ( $30\text{ g.L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho ( $52,9\text{ g.L}^{-1}$ ) alcançou uma produção volumétrica em carotenoides superior alcançando  $779,60\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $65,64\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) com  $11,65\text{ g.L}^{-1}$  de biomassa, sendo sua produtividade em carotenoides de  $4,64\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $0,391\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e uma produtividade em biomassa de  $0,069\text{ g.L}^{-1}$ , nas mesmas condições descritas anteriormente.

A melhor condição de pré tratamento para o melaço de cana de açúcar e a água de maceração de milho foi utilizando  $5\%$  de terra diatomácea, sob  $1\text{h}$  de agitação ( $150\text{ rpm}$ ) a  $32^\circ\text{C}$ , seguido de centrifugação ( $15\text{ min}$ ) e filtração (papel de filtro, terra diatomácea e algodão), para cada  $100\text{ g.L}^{-1}$  de coproduto separadamente.

No meio de cultivo otimizado com melaço e água de maceração de milho o pré tratamento com ácido sulfúrico foi positivo promovendo um incremento na produção de carotenoides  $936,35\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $79,63\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ), proporcionando um ganho de aproximadamente  $44\%$  na produção volumétrica e  $16\%$  na específica comparado ao meio sem tratamento, além de um crescimento celular  $34,69\%$  superior. Porém, os pré tratamentos no meio otimizado com glicerol bruto e água de maceração de milho não foram eficientes promovendo um incremento na produção de carotenoides. O pré tratamento que apresentou maior destaque também foi com ácido sulfúrico alcançando  $614,33\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  ( $46,89\text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Além disso para produtividade em biomassa foi constatado que o meio tratado com ácido fosfórico e sulfúrico alcançou valores de  $0,120$  e  $0,107\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, obtendo um ganho de  $42,5\%$  e  $35,51\%$  quando comparado ao ensaio sem tratamento.

O processo de secagem de biomassa através da liofilização proporcionou uma maior recuperação de carotenoides que a secagem convencional por circulação de ar forçado, com um ganho de aproximadamente  $44\%$  em carotenoides (volumétricos e específicos) sem maceração da biomassa.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Testar cultivo em erlenmeyers aletados;

Realizar um estudo de adição de diferentes minerais a base de fosfato, a fim de incrementar mais a bioprodução de carotenoides microbianos;

Utilizar ativadores como resíduo de óleo de pescado, óleo de girassol, azeite de oliva e resíduos oleosos de diferentes plantas;

Avaliar outros tipos de pré tratamento como micro filtração em membrana de acetado de celulose e resina de troca catiônica; e pré tratamento do glicerol com ácido fosfórico, para remoção de compostos saponificáveis, ácidos graxos insaturados e metais pesados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. **O mercado Global de carotenoides**. Disponível em: <  
<http://pt.yooarticles.com/article/the-global-market-for-carotenoids-reportsnreports-com>>. Acesso em 17 de novembro de 2011.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC.; Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists, 18<sup>th</sup> ed., AOAC International: Washington, 2000.
- ABEROUMAND, A. A. Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n.1, p. 71-78, 2011.
- AKSU<sup>1</sup>, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, Issue 9, p. 2985-2991, 2005. Doi:10.1016/j.procbio.2005.01.011.
- AKSU<sup>2</sup>, Z.; EREN, T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985-2991, 2005. Doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.011.
- BAKÓ, E.; DELI, J.; TÓTH, G. HPLC study on the carotenoid composition of calendula products. **J. Biochem and Biophys. Methods**, v. 53, p. 242-250, 2002. Doi:10.1016/S0165-022X(02)00112-4.
- BAE, S.; SHODA, M.; Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, Issue 5, p. 1366–1371, 2004. Doi: 10.1021/bp0498490.
- BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. Erechim – RS, 2005, 96p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.
- BIANCH, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev. Nutr.**, v.12, n.2, p. 123-130, 1999. Doi: 10.1590/S1415-5273199900200001.
- BHOSALE, P.; GADRE, R. V.  $\beta$ -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 327-332, 2001. Doi: 10.1038/sj.jim.7000138.
- BRANDAO, L. V.; ESPERIDIAO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Utilização do soro de mandioca como substrato fermentativo para a biossíntese de goma xantana: viscosidade aparente e produção. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.20, n.3, p. 175-180, 2010. Doi: 10.1590/S0104-14282010005000029.
- BRINGHENTI, L.; CABELLO, C.; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana. **Ciência Agrotecnológica, Lavras**, v. 31, n. 2, p. 429-432, 2007. Doi: 10.1590/S1413-70542007000200024.
- BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. Tese (PhD Thesis) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

BUZZINI, P. An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 41-45, 2000. Doi: 10.1038/sj.jim.2900765.

BUZZINI, P. Batch and fed-batch carotenoid production by *Rhodotorula glutinis*-*Debaryomyces castellii* co-cultures in corn syrup. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p. 843-847, 2001. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01319.x.

BUZZINI, P.; MARTIN, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresour Technol**, v. 71, p. 41-44, 2000. Doi: 10.1016/S0960-8524(99)00056-5.

CABRAL, M. M. S.; CENCE, K.; ZENI, 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. **Eur Food Res Technol**, v. 233, p. 159-166, 2011. Doi: 10.1007/s00217-011-1510-0.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. O mercado de amido no Mundo. Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca – ABAM, n.9, 2005.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. Rio Grande – RS, 2012, 138p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

CHANG, S.; LI, Jian-Zheng; LIU, F. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. **Renewable Energy**, v. 36, Issue 5, p. 1517-1522, 2011. Doi:10.1016/j.renene.2010.11.023.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P; FONTANA, J. D. Cultivation of *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) yeast in discontinuous system to obtain astaxanthin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, 2002. Doi: 10.1590/S1516-93322002000400008.

CHUMPOLKULWONG, N.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S.; NISHIO, N. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v.83, n.5, p.429-434, 1997. Doi: 10.1016/S0922-338X(97)82996-0

COELHO, A.R. **Controle de penicillium expansum / biodegradação de patulina: perfil cromatográfico de composto bioativo de leveduras killer visando aplicação pós-colheita**. Tese. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2005.

DHALE, M. A.; PUTTANANJIAH, Mohan-Kumari H.; SUKUMARAN, Umesh-Kumar G. Production of *Monascus purpureus* pigments; influenced by amidase and acid protease activity. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, Issue 4, p.1231–1241, 2010. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00447.x.

DAVIES, B. H. *Chemical Biochemistry Plant Pigments*; GOODWIN, T.W., ed.; 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. Doi: 10.1023/B:ABIM.0000033917.57177.f2.

DODDAIAH, K. M.; NARAYAN, A.; GOKARE, R. A.; RAVI, S. Effect of metabolic inhibitors on growth and carotenoid production in *Dunaliella bardawil*. **Journal of Food Science and Technology**, 2011. Doi: 10.1007/s13197-011-0429-6.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; PONC E-NOYOLA, T.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis* : a comparative study. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, p. 783-791, 2007. Doi 10.1007/s00253-007-0889-9.

FAIRBANKS, M. Crescimento do biodiesel provoca inundação no mercado de glicerina, incentivando a descobrir novas aplicações **Revista Química e Derivados** Edição n. 487, 2009

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.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 163-180, 2009. Doi: 10.1007/s10295-008-0492-9.

FRENGOVA, G.; SIMOVA E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnol Bioeng**, v. 44, p. 888-894, 1994. Doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.075.

GAO, Y.; YUAN, Ying-Jin. Comprehensive Quality Evaluation of Corn Steep Liquor in 2-Keto-l-gulononic Acid Fermentation **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 18, p. 9845-9853. 2011. Doi: 10.1021/jf201792u.

GOMEZ, P. I; BARRIGA, A.; CIFUENTES, S.; GONZÁLEZ, M. A. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861). **Chlorophyta. Biol. Res.**, Santiago, v. 36, n. 2, 2003. Doi: 10.4067/S0716-97602003000200008.

HERNALSTEENS, S. **Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileira**. Campinas – SP, 2006. 186p. Tese (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

HSU, Yu-Wen; TSAI, Chia-Fang; CHEN, Wen-Kang; YUNG-CHYUAN, H; LU, Fung-Jou. Determination of lutein and zeaxanthin and antioxidant capacity of supercritical carbon dioxide extract from daylily (*Hemerocallis disticha*). **Food Chemistry**, v. 129, Issue 4, p.1813-1818. Doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.116.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, Issue 2, p. 249-256, 2003. Doi: 10.1016/S0032-9592(03)00067-0.

KESAVA, S. S.; AN, Gil-Hwan; KIM, Chul-Ho; RHEE, Sang-Ki; CHOI, Eui-Sung. An industrial medium for improved production of carotenoids from a mutant strain of

*Phaffia rhodozyma*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 19, n. 3, p. 165-170, 1998. Doi: 10.1007/PL00009009.

KIOKIAS, S.; OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, Issues 1-2, p. 132-139, 2006. Doi:10.1016/j.ifset.2005.12.004.

KOKUGAN, K. T. The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, Issue 6, p. 577-582, 1997. Doi:10.1016/S0922-338X(97)81140-3.

KUSDIYANTINI, E., GAUDIN, P., GOMA, G.; PHILIPPE, J. BLANC. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* o glycerol as a carbon source durin batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929–934, 1998. Doi: 10.1023/A:1005445808265.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, Issues 1-2, p. 122-132, 2002. Doi: 10.1016/S0141-0229(02)00082-0.

LEE, J. M.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H.; KENEALY, W. R. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p.626-636, 2006. Doi:10.1016/j.biombioe.2010.10.021.

LIBKIND, D.; BROOCK, M. V. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 687-692, 2006. Doi: 10.1007/s11274-005-9091-3.

LIBKIND, D.; DIEGUEZ, M. C.; MOLINE, M.; PEREZ, P.; ZAGARESE, H. E.; Broock, M. V. Occurrence of Photoprotective Compounds in Yeasts from Freshwater Ecosystems of Northwestern Patagonia (Argentina). **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 972-980, 2006.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriol Rev.**, v. 12, n. 4, p. 297-311, 1948.

LIU, X.; JENSEN, P. R.; WORKMAN, M. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Bioresource Technology**, 2011. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.065.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP, Editora Rima, p. 442-446, 2006.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H. K.; BELLMER, D. D., HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by *Clostridium strain* (P11) using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102, Issue 11, p. 6494-6501, 2011. Doi:10.1016/j.biortech.2011.03.047.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoids- producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n.1, p. 65-70, 2007. Doi:10.1590/S1517-83822007000100014.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimizatio of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. **Bioresource Technology**, v. 99, Issue 7, p. 2281-2287, 2008. Doi:10.1016/j.biortech.2007.05.019.

MANTZOURIDOU, F.; NAZIRI, E.; TSIMIDOU, M. Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of  $\beta$ -carotene by *Blakeslea trispora*. **Agric. Food Chem.**, v, 56, p. 2668–2675, 2008. Doi: 10.1021/jf703667d.

MARIANO, R. G. Comparação da perda percentual de beta-caroteno no pequi (*Caryocar brasiliense*) desidratado a 60 °C, 70 °C e 105 °C. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 20, 2006, Curitiba. **Anais...** Curitiba: TECART, 2006.

MENDES, G.L. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré tratados.** Campinas – SP, 2006, 89p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Doi: 10.1021/ac60147a030.

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

MIRANDA, V. S. **Carotenoides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante.** Campinas – SP, 2010, 83p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

MONTANTI, J.; NGHIEM, N. P.; JOHNSTON, D. B. Production of Astaxanthin from Cellulosic Biomass Sugars by Mutants of the Yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 5, p. 655–665, 2011. Doi: 10.1007/s12010-011-9165-7.

MELLO, M.C. **Flores e microalgas como fontes alternativas de carotenóides.** Campinas – SP, 2002, 113p. Tese (Pós-Graduação em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos.

MORAIS, F. L., **Carotenoides: Características biológicas químicas.** Brasília – DF, 2006, 70p. Monografia (Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos), Universidade de Brasília, Centro de Excelência em Turismo (CET).

MULLER, M.C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; LOURENÇO, S.O. Carotenoids of the cyanobacterium *Synechocystis pevalekii* produced under normal conditions and under nutrient limitation. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 39, n.4, p.415-423, 2003. Doi:10.1590/S1516-93322003000400009.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v, 23, n. 20, p. 1681–1684, 2001. Doi: 10.1023/A:1012492028646.

NASCIMENTO, P. **Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata doce**. São José do Rio Preto - SP, 2006, 79p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* Termofílico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.2, p. 417-421, 2007. Doi:10.1590/S0101-20612007000200035.

NANOU, K.; ROUKAS, T. Stimulation of the biosynthesis of carotenes by oxidative stress in *Blakeslea trispora* induced by elevated dissolved oxygen levels in the culture médium. **Bioresource Technology**, v. 102, Issue 17, p. 8159-8164, 2011. Doi:10.1016/j.biortech.2011.06.027.

OLAIZOLA, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 499-506, 2000. Doi: 10.1023/A:1008159127672.

OREOPOULOU, S. K. V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p. 132-139, 2006. Doi: 10.1016/j.ifset.2005.12.004.

OTERO, D. M. **Bioprospeção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. Rio Grande – RS, 2011, 114p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

PARAJÓ, J. C. V. S.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998. Doi: 10.1016/S0032-9592(97)00045-9.

PARK, P. K.; CHO, D. H.; KIM, E. Y.; CHU, K. H. Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 429-434, 2005. Doi: 10.1007/s11274-004-1891-3.

RAMÍREZ, J.; NUÑEZ, M. L.; VALDIVIA, R. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 187-190, 2000. Doi: 10.1038/sj.jim.2900792.

REIS, D. F. **Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis***. Rio Grande – RS, 2012, 81p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

REN, X.; YU, D.; HAN, S.; FENG, Y. Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 97, Issue 18, p. 2345-2349, 2006. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.10.027.

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

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, v. 33, Issue 8, p 805-810, 1998. Doi: 10.1016/S0032-9592(98)00048-X.

SANTOS, G.; OLIVEIRA, M. C.; MORAES, M. H.; PAGANI, A., A., C. Comparative study of coriander coriander (*Coriandrum sativum* L. ) obtained in dry different drying method, **Geintec**, v. 2 , n. 3, p. 236-244, 2012. Doi: 10.7198/S2237-0722201200030004.

SANTOS, J. R. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis***. Fortaleza – CE, 2010, 48p. Monografia (Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia.

SANTOS, M. V. **Carotenoides de bactérias halófilas: produção, caracterização e atividade antioxidante**. Campinas – SP, 2010, 83p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

SERRA, M. M. C.; CENCE, K.; ZENI, 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. **Eur Food Res Technol**, v. 233, p. 159-166, 2011. Doi: 10.1007/s00217-011-1510-0.

SGUAREZI, C.; Longo, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M. F.; LUCCIO, M. D.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H. Inulinase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 409-414, 2009. Doi: 10.1007/s11947-007-0042-x.

SILVA, D. A. **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz**. Rio Grande, RS, 2009, 91p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

SILVA, C. M. **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* CEPA NRRL-Y 17268 utilizando glicerina e a água de parbolização de arroz**. Rio Grande – RS, 2010, 100p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Escola de Química e Alimentos Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Campinas - SP, 2004, 134p. Tese (Pós- Graduação em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v.17, n.2, p. 227-236, 2004. Doi: 10.1590/S1415-52732004000200009.

STRINGHETA, P. C.; NACHTIGALL, A. M.; OLIVEIRA, T. T.; RAMOS, A. M.; SANT'ANA, H. M. P.; GONÇALVES, M. P. J. C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alim. Nutr., Araraquara**, v.17, n.2, p.229-238, 2006.

TAHERZADEH, M. J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, Issues 1-2, p. 53-66, 2002. Doi:10.1016/S0141-0229(02)00069-8.

TASKIN, M.; ERDALB, S. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* (MT-5) in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. **J. Sci. Food Agric.**, v. 9, p.1440-1445, 2011. Doi: 10.1002/jsfa.4329.

TATSCH, P. O. **Produção de carotenoides em meios sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. Erechim – RS, 2008. 94p. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

TINOIA, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochem**, v. 40, Issue 7, p. 2551-2557, 2005. Doi: 10.1016/j.procbio.2004.11.005.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré tratados**. Campinas – SP, 2004, 99p. Tese (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VALDUGA, E., VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, MARCO. Pré tratamento de melaço de cana de açúcar e água de maceração para a bioprodução de carotenoides. **Química Nova**, v. 30, n.8, p. 1860-1866, 2007. Doi: 10.1590/S0100-40422007000800012.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS2636**. Florianópolis - SC, 2005, 200p. Doutorado (Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O; TIGGEMANN, L; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D. Produção de carotenoides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n.9, p. 2429-2436, 2009. Doi: 10.1590/S0100-40422009000900036.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; COLET, R.; CANSIAN, J. M.; TREICHEL, H., LUCCIO, M. Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. **International Journal of Food Science & Technology**, v 44, Issue 12, p. 2445–2451, 2009. Doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02032.x.

VALDUGA, E.; SCHWARTZ, C. R. M.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H. Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor. **European Food Research and Technology**, v. 232, Issue 3, p. 453-462, 2011. Doi: 10.1007/s00217-010-1410-8

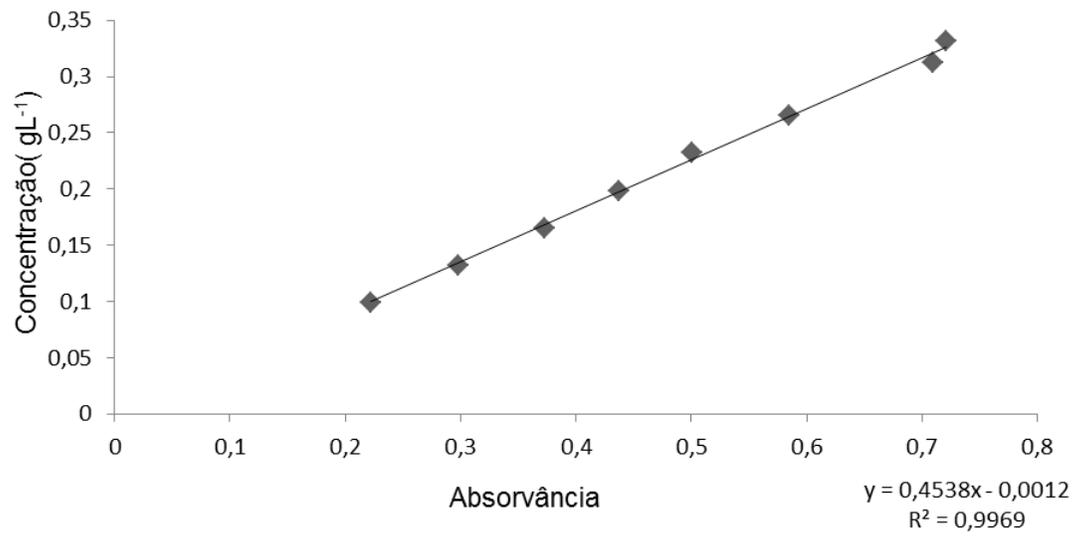
VOGEL, A. I. Química analítica qualitativa, 5 ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981, 665p.

ZENI, J. ; COLET, R. ; CENCE, K. ; TIGGEMANN, L. ; TONIAZZO, G. ; CANSIAN, R. L. ; Di LUCCIO, M. ; OLIVEIRA, D. ; VALDUGA, E. . Screening of microorganisms for production of carotenoids Selección de microorganismos para la producción de carotenoides. **J. of Food**, v. 9, p. 160-166, 2011.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M; PASTORE, G. M. Carotenoids: properties, applications and biotransformation in flavor compounds. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-621, 2007. Doi: 0.1590/S0100-40422007000300022.

YANG, Shi-Ping; WU, Zao-He; JIAN, Ji-Chang. Distribution of Marine Red Yeasts in Shrimps and the Environments of Shrimp Culture. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1638–1642, 2011. Doi: 10.1007/s00284-011-9910-8.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n 1, p. 20-27, 2001. Doi: 10.1006/abbi.2000.2149.

**APÊNDICE 1: Curva padrão da levedura utilizada**

Curva padrão de biomassa para *Sporidiobolus pararoseus*.

**APÊNDICE 2: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para primeiro planejamento formulado com glicerol bruto e água de maceração de milho**

Efeitos, desvio padrão para produção volumétrica e específica de carotenoides, relação C/N, produtividade volumétrica, produtividade específica e produtividade em biomassa

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
Produção volumétrica ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Média**	326,57	10,80	30,24	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	302,92	28,57	10,60	<0,01
	(2) AMM (L)**	182,76	28,57	6,40	<0,01
	Glicerol x AMM**	174,59	28,57	6,11	0,01
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (1)	P
Produção específica ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Média**	56,10	1,33	42,15	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	37,56	3,52	10,65	<0,01
	(2) AMM (L)**	26,56	3,52	7,54	<0,01
	Glicerol x AMM**	25,72	3,52	4,30	0,01
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Média**	5,61	0,16	34,74	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	1,78	0,43	4,15	0,03
	(2) AMM (L)	0,28	0,43	0,64	0,57
	Glicerol x AMM	0,15	0,43	0,34	0,76
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
Relação carbono e nitrogênio	Média**	7,98	0,02	338,42	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	2,06	0,06	32,95	<0,01
	(2) AMM (L)**	-1,22	0,06	-19,48	<0,01
	Glicerol x AMM**	-0,35	0,06	-5,53	0,01
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
Produtividade Volumétrica em carotenoides ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Média**	1,98	0,04	44,75	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	1,94	0,12	16,57	<0,01
	(2) AMM (L)**	0,95	0,12	8,07	<0,01
	Glicerol x AMM**	0,90	0,12	7,66	<0,01
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
Produtividade específica em carotenoides ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Média**	0,34	0<0,01	71,82	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	0,25	0,01	19,70	<0,01
	(2) AMM (L)**	0,14	0,01	10,77	<0,01
	Glicerol x AMM**	0,13	0,01	10,37	<0,01
	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Produtividade em biomassa ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Média**	0,034	0<0,01	157,77	<0,01
	(1) Glicerol (L)**	0,01	0<0,01	24,25	<0,01
	(2) AMM (L)	<0,01	0<0,01	-1,73	0,23
	Glicerol x AMM	<0,01	0<0,01	-3,47	0,01

\* ( $p\leq 0,10$ ); \*\* ( $p\leq 0,05$ ); AMM: água de maceração de milho.

**APÊNDICE 3: Efeitos das variáveis sobre as respostas estudadas para o segundo planejamento formulado com glicerol bruto mais água de maceração de milho**

Efeitos, desvio padrão para produção volumétrica e produtividade volumétrica em carotenoides, produtividade específica em carotenoides

	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
Produção volumétrica ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Média**	634,949	0,3450	1840,698	<0,001
	(1) Glicerol (L)**	-52,095	0,913	-57,081	<0,001
	(2) AMM (L)**	-59,875	0,913	-65,606	<0,001
	Glicerol x AMM**	-201,595	0,913	-220,889	<0,001
Produção específica ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
	Média*	71,351	5,793	12,316	<0,01
	(1) Glicerol (L)	-9,025	15,328	-0,588	0,597
	(2) AMM (L)	0,435	15,328	0,028	0,979
Glicerol x AMM	-17,095	15,328	-1,115	0,346	
Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média**	8,820	0,015	577,405	<0,001
	(1) Glicerol (L)*	-0,155	0,040	-3,835	0,0617
	(2) AMM (L)**	-1,385	0,040	-34,270	<0,001
Glicerol x AMM**	-0,855	0,040	21,156	<0,001	
Relação Carbono e nitrogênio	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média**	10,230	0,002	6776,454	<0,001
	(1) Glicerol (L)**	4,663	0,004	1260,949	<0,001
	(2) AMM (L)**	-1,798	0,004	-485,961	<0,001
Glicerol x AMM**	-0,662	0,004	-179,069	<0,001	
Produtividade volumétrica em carotenoides ( $\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média**	3,960	0,002	1814,700	<0,001
	(1) Glicerol (L)**	-0,130	0,006	-22,517	0,002
	(2) AMM (L)**	-0,180	0,006	-31,177	0,001
Glicerol x AMM**	-0,57	0,006	-98,727	<0,001	
Produtividade específica em carotenoides ( $\mu\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p
	Média**	0,450	0,001	687,605	<0,001
	(1) Glicerol (L)**	-0,235	0,002	-13,568	0,005
	(2) AMM (L)**	0,0325	0,002	18,764	0,002
Glicerol x AMM**	-0,0135	0,002	-7,794	0,016	
Produtividade biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Fator	Efeito	Desvio padrão	t (3)	p
	Média*	0,056	0,002	37,333	<0,001
	(1) Glicerol (L)	0,004	0,004	0,882	0,442
	(2) AMM (L)	-0,005	0,004	-1,134	0,339
Glicerol x AMM	0,008	0,004	1,890	0,155	

\* ( $p \leq 0,10$ ); \*\* ( $p \leq 0,05$ ); AMM: água de maceração de milho.