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

Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa*

Engª Tábita Veiga Dias Rodrigues

Profª Dr.ª JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2018

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

Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa*

Engª Tábita Veiga Dias Rodrigues

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos

Profª Dr.ª JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2018

Ficha catalográfica

R696p Rodrigues, Tábita Veiga Dias.
Processos em batelada e batelada alimentada em frascos agitados para produção de carotenoides em meio agroindustrial por *Rhodotorula mucilaginosa* / Tábita Veiga Dias Rodrigues. – 2018.
106 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.
Orientadora: Drª. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert.

1. Biocorante 2. Bioprodução 3. Coprodutos agroindustriais 4. Cultivo submerso I. Burkert, Janaina Fernandes de Medeiros II. Título.

CDU 664.8/.9

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Tábita Veiga Dias Rodrigues e aprovada em 28 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG

Ana Paula Manera - UNIPAMPA

Luisa Sala - FURG

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG

Dedico este trabalho as pessoas que são os maiores exemplos na minha vida: minha mãe, Angela Maria e meus Avós, Nativo e Aracy.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem Ele nada seria possível

A minha mãe, Ângela, por ser minha maior incentivadora, jamais deixando de acreditar na minha capacidade, sempre se orgulhando de cada etapa vencida neste trabalho.

Aos meus avós, Aracy e Nativo, por não medirem esforços na minha formação, pelas orações e pelo carinho e amor que sempre recebi, minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Taiana e Calebe, por estarem sempre ao meu lado independente das circunstâncias.

Aos meus tios, Neuza e Ricardo, pela disposição para me ajudar no que fosse preciso e por me guardar em suas orações.

Aos meus colegas de laboratório LASCQ e ENGEBIO, vocês fizeram do laboratório a minha segunda casa, obrigada pelas sugestões e ajuda durante o trabalho, pelas risadas, pelo tempo de convivência e pelo cafezinho de todo dia!!!

A minha orientadora, Janaína Burkert, por me receber, pela confiança, e pelos ensinamentos que recebi nesses dois anos.

A todos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa etapa: Muito obrigada!

All we have to decide is what to do with the time that is given us.

J.R.R. Tolkien,The Fellowship of the Ring

RESUMO

Os carotenoides são pigmentos naturais que possuem crescente demanda para uma ampla variedade de aplicações no mercado, sendo utilizados comercialmente como corantes alimentícios, em cosméticos, suplementos nutricionais e ainda como compostos antioxidantes. Bactérias, fungos e plantas são produtores de carotenoides. Nas leveduras a síntese de carotenoides tem interessante potencial devido a sua rápida taxa de crescimento e fácil ampliação de escala. O custo da produção de carotenoides pode ser minimizado pelo aproveitamento de matérias-primas de menor custo, como fontes de nutrientes usando coprodutos agroindustriais, tornando sua bioprodução industrial ainda mais viável. Além disso, os processos biotecnológicos podem ser avaliados quanto ao modo de operação, dentre eles a batelada alimentada é umas das técnicas utilizadas para obtenção de uma elevada densidade celular e/ou máxima produção de biocompostos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi à produção de carotenoides em frascos agitados em batelada e batelada alimentada, utilizando coprodutos agroindustriais no meio de cultivo, pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668. A maximização da produção de carotenoides foi realizada através de planejamentos experimentais variando a concentração dos componentes do meio agroindustrial (melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho). No planejamento experimental empregando o processo em batelada o meio de cultivo contendo 70 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho alcançou uma produção máxima de carotenoides totais de 1404 µg L^{-1} (173 µg g^{-1}) e uma concentração celular de 8,1 g L^{-1} em 168 h, havendo um incremento de 17% quando comparado ao meio padrão extrato de malte e levedura (1200 µg L^{-1}). No processo em batelada alimentada foram testados três meios com concentrações diferentes de melaço e água de maceração de milho em diferentes estratégias de alimentação. O meio de cultivo mais promissor em batelada alimentada foi com 30 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 6,5 g L^{-1} de água de maceração de milho alcançando uma produção de carotenoides totais de 3726 µg L^{-1} (118 µg g^{-1}) e uma concentração celular de 16 g L^{-1}, sendo a alimentação realizada com 10 % do volume inicial do cultivo com o meio 10 vezes concentrado, em 96 h. Portanto, foi possível observar que a estratégia do processo em batelada alimentada promoveu um incremento na produção volumétrica de carotenoides, aproximadamente 500 % comparado ao processo em batelada simples utilizando o mesmo meio (740 µg L^{-1}). Sendo assim é possível concluir que esta cepa da levedura *R. mucilaginosa* demonstrou potencial para a produção de carotenoides em meio agroindustrial tanto no processo em batelada quanto em batelada alimentada.

Palavras-chave: Biocorante. Bioprodução. Coprodutos agroindustriais. Cultivo submerso.

Batch and fed batch processes in flasks shaken to production of carotenoids in agro-industrial environment by *Rhodotorula mucilaginosa*

Carotenoids are natural pigments which have an increasing demand for a wide range of market applications, being commercially as food colors, cosmetics products, nutritional supplements, and equally as antioxidant compounds. Carotenoids are produced by bacteria, fungi and plants. In yeast, the synthesis of carotenoids has interesting potential) as a result of its rapid growth rate and easier extension of the scale. The price from the carotenoids production can be reduced by using low cost raw materials as, for example, nutrients sources using agro-industrial co-products, making their industrial bioproduction even more viable. Furthermore, the biotechnological processes for the carotenoids production can be evaluated by the operation mode, among them the fed-batch is one of the techniques used to obtain a high cell density and/or maximum production of biocompounds. Therefore, the aim of this work was the carotenoids production in shake-flasks in batch and fed-batch, using agro-industrial co-products in the culture medium, by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7668. The maximization of the carotenoid production was conducted through experimental designs, changing the components concentration of the agro-industrial environment (sugar cane molasses and corn steep liquor). In the experimental design using the batch process, the medium containing 70 g L^{-1} of sugar cane molasses and 3.4 g L^{-1} of corn steep liquor was defined, reaching a total carotenoid production of 1404 μg L^{-1} (173 μg g^{-1}) and a cell concentration of 8.1 g L^{-1} in 168 h, with an increase of 17% when compared to the standard medium of malt and yeast extract (1200 μg L^{-1}) In the fed-batch process three media were tested with different concentrations of molasses and corn steep liquor, with different feeding strategies. The most promising medium in the fed-batch process was 30 g L^{-1} of sugarcane molasses and 6.5 g L^{-1} of corn steep liquor reaching a total carotenoid production of 3726 μg L^{-1} (118 μg g^{-1}) and a cell concentration of 16 g L^{-1} with the feed being carried out with 10% of the initial volume of the culture with the medium 10 times concentrated in 96 h.. Therefore, we were able to see that the strategy of the fed-batch process indorsed an increase in the volumetric carotenoids production, approximately 500% compared to the simple batch process using the same medium (740 μg L^{-1}). Thus, it can be concluded that this strain of yeast *R. mucilaginosa* indicates potential for the carotenoids production in agro-industrial environment, both in the batch process and in the fed-batch.

Keywords: Biocorante. Bioproduction. Agro-industrial co-products. Submerged cultivation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de carotenoides por diferentes micro-organismos utilizando meios alternativos para o cultivo.....34
Tabela 2 - Produção de carotenoides por diferentes cepas de *Rhodotorula* utilizando meios alternativos para o cultivo.....39
Tabela 3 - Níveis utilizados para DCCR e DCC para a maximização da produção de carotenoides em meio agroindustrial formulado com melaço e água de maceração de milho.47
Tabela 4 - Estratégias de alimentação para processo em batelada alimentada.....48
Tabela 5 - Caracterização parcial dos substratos e razão C:N dos meios testados.....53
Tabela 6- Produção de carotenoides e produtividades pela *R. mucilaginosa* em diferentes meios de cultivo a 25°C, 180 rpm e pH inicial de 6,0.....57
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos.....58
Tabela 8 – Valores máximos para os picos observados no espectro de varredura para os meios YM, AMM+M, AMM+G.....59
Tabela 9 – DCCR 2^2 (valores reais e codificados) para maximização da produção de carotenoides no meio agroindustrial.....60
Tabela 10 – Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nivel de significância para biomassa e carotenoides volumétricos para o DCCR.....66
Tabela 11- Análise de variância para o Delineamento Composto Central Rotacional 2^2.....66
Tabela 12 – Planejamento Central Composto 2^2 (valores reais e codificados) para maximização da produção de carotenoides no meio agroindustrial.....70
Tabela 13 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nivel de significância para biomassa, carotenoides específicos e carotenoides volumétricos para o DCC.....74
Tabela 14 - Análise de variância para o DCC 2^2.....75
Tabela 15: Respostas da validação do modelo empírico do DCC.....78
Tabela 16 – Resultados obtidos nas etapas de seleção e otimização do meio agroindustrial...81
Tabela 17 - Comparação dos resultados em batelada e batelada alimentada para os três meios testados (M1, M2 e M3).....83
Tabela 18 – Resultados obtidos no processo em batelada alimentada nos diferentes tempos de alimentação para o meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M).....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides.....28
Figura 2 - Caminhos biossintéticos de acetil-CoA para β-caroteno, toruleno e torularrodina em espécies de *Rhodotorula* e astaxantina em *P. rhodozyma / X. dendrorhous*.....29
Figura 3 – Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides pela *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio YM.....55
Figura 4 – Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides pela *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio com água de maceração de milho (36,5 g L^{-1}) e melaço (6,0 g L^{-1}). 56
Figura 5 - Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides pela *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio com água de maceração de milho (35,6 g L^{-1}) e glicerol bruto (6,6 g L^{-1}). 56
Figura 6 - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), carotenoides volumétricos (d) e açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCCR 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm**.** 63
Figura 7 - Curvas de contorno para biomassa (a), carotenoides volumétricos (b), açúcares redutores totais (c) para *R. mucilaginosa* no DCCR 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço.....67
Figura 8 - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), e carotenoides volumétrico (d), açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCC 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm.....68
Figura 9 - Curvas de contorno para biomassa (a), carotenoides específicos (b), carotenoides volumétricos (c) para *R. mucilaginosa* no delineamento composto central 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço.....75
Figura 10 - Valores médios de biomassa, produção específica e volumétrica de carotenoides no acompanhamento dos ensaios para validação do modelo matemático..... .77
Figura 11 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M1 (6,5 g L^{-1}AMM +1,8 g L^{-1} M) por 168 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação a cada 12 h.....81

Figura 12 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M2 (3,4 g L^{-1}AMM +70 g L^{-1} M) por 264 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 168 h.....82
Figura 13 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (3,4 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 312 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96 h.....82
Figura 14 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 48h.....84
Figura 15 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 72 h.....85
Figura 16 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 48h e 96h.....85
Figura 17 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 72h e 120h.....86
Figura 18 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96h e 144h.....86
Figura 19 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96h e 168h.....87
Figura 20 – Produção de carotenoides específicos, volumétricos e biomassa nos ensaios em batelada e batelada alimentada para os meios M1 (6,5 g L^{-1} água de maceração de milho +1,8 g L^{-1} melaço), M2 (3,4 g L^{-1} água de maceração de milho +70 g L^{-1} melaço) e M3 (3,4 g L^{-1} água de maceração de milho +30 g L^{-1} melaço).....89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

2. OBJETIVOS 25

2.1 OBJETIVO GERAL 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

3. REVISÃO DA LITERATURA 27

3.1 CAROTENOIDES 27
3.2 BIOSSÍNTESE DE CAROTENOIDES 27
3.3 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DOS CAROTENOIDES 29
3.3.1 Cor 29
3.3.2 Atividade antioxidante 30
3.3.3 Atividade pró-vitamina A 32
3.4 OBTENÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE CAROTENOIDES 32
3.5 MEIOS AGROINDUSTRIAIS 33
3.5.1 Melaço de cana de açúcar 35
3.5.2 Água de maceração de milho 35
3.5.3 Glicerol bruto 36
3.6 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS UTILIZANDO COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS 36
3.7 PROCESSOS EM BATELADA ALIMENTADA 41

4. MATERIAL E MÉTODOS 45

4.1 MICRO-ORGANISMO 45
4.2 MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA 45
4.3 PREPARO DO INÓCULO 45
4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO 45
4.5 COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS 46
4.5.1 Caracterização parcial dos coprodutos agroindustriais 46
4.6 OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES COM DIFERENTES MEIOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSO DE BATELADA 46
4.6.1 Avaliação de diferentes combinações de coprodutos agroindustriais 46
4.6.2 Maximização da produção de carotenoides 47
4.7 BATELADA ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES 47
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS 48
4.8.1 Determinação do pH 48
4.8.2 Determinação da concentração de biomassa 48
4.8.3 Determinação de açúcares redutores totais 49
4.8.4 Determinação de carotenoides totais 49
4.8.5 Determinação dos fatores de conversão do cultivo 50
4.8.6 Análise estatística 51

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 53

5.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS SUBSTRATOS 53

5.2 ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVOS EM BATELADA....54
5.3 ESPECTROSCOPIA DE VARREDURA DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS ...58
5.4 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM PROCESSO BATELADA....59
5.4.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR)....59
5.4.1.1. Verificação de modelos empíricos para o DCCR....65
5.4.2 Planejamento Composto Central 2² (DCC)....68
5.4.2.1 Verificação de modelos empíricos para DCC....73
5.5 VALIDAÇÃO DO MODELO PARA A BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES COM MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO....77
5.6 PROCESSOS EM BATELADA ALIMENTADA....79

6. CONCLUSÕES....91

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS....93

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....95

ANEXO 1- Laudo do Melaço de cana de açúcar. 104

APÊNDICE 1 - Curva padrão de biomassa....101

APÊNDICE 2 – Curva padrão de glicose....103

APÊNDICE 3 - Efeito das variáveis sobre as respostas estudadas para o DCCR formulado com melaço e água de maceração de milho.....105

APÊNDICE 4 - Efeito das variáveis sobre as respostas estudadas para o DCC formulado com melaço e água de maceração de milho.....107

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais abundantes na natureza, dos quais já foram isolados e caracterizados mais de 600 moléculas. Industrialmente são obtidos por síntese química ou pela extração de plantas (VALDUGA, et al., 2009). Nacionalmente a produção de carotenoides obtidos naturalmente aumentou devido ao crescimento do mercado por alimentos mais saudáveis e que propiciam benefícios à saúde, além da preocupação com a utilização de aditivos químicos nos alimentos (SENSIENT, 2011). O mercado mundial de carotenoides em 2014 foi US$ 1,5 bilhões podendo chegar a quase US$ 1,8 bilhões em 2019 (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2016).

Os carotenoides proporcionam efeitos benéficos à saúde, dentre eles a capacidade antioxidante (JOMOVA; VALKO, 2013), a atividade pró-vitamina A, a ação na redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas (KIM; AHN; LEE-KIM, 2001) e doenças cardiovasculares (WOLAK; PARAN, 2013). Esses biocompostos são produzidos por uma gama de bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas (MIRANDA, 2010; RIOS et al., 2015; PAPAIOANNOU; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2012; MACHADO et al., 2016).

Porém, a produção de carotenoides por processos biotecnológicos ainda possui um elevado custo. Assim, uma alternativa para viabilizar este processo é o aproveitamento de coprodutos agroindustriais como fontes de nutrientes alternativas. O gênero de levedura *Rhodotorula* vem sendo estudado com a utilização de substratos de baixo custo como melaço de cana de açúcar (CHENG; YANG, 2016) e efluente de cervejaria (SCHNEIDER et al. 2013), apresentando vantagens na produção industrial, em termos de taxa de crescimento (MALISORN; SUNTORNSUK, 2008) em relação a outros micro-organismos.

As leveduras carotenogênicas *Sporodiobolus pararoseus, Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, esta última utilizada neste trabalho, foram isoladas e produziram carotenoides em meios contendo os coprodutos agroindustriais água de parboilização de arroz, glicerol bruto e melaço de cana de açúcar (OTERO, 2011). Posteriormente, Cipolatti (2012) substituiu a água de parboilização de arroz pela água de maceração de milho e comprovou a produção de β-caroteno como carotenoide majoritário por esta cepa de levedura *R. mucilaginosa*, além da capacidade antioxidante dos extratos. Lopes et al. (2017) avaliaram a recuperação dos extratos carotenogênicos por diferentes métodos de ruptura celular, como químicos e mecânicos, enquanto Braga (2016) promoveu a microencapsulação dos extratos carotenogênicos em diferentes materiais de parede através da liofilização e atomização.

Assim, considerando que a capacidade de produção de carotenoides aproveitando coprodutos agroindustriais no meio de cultivo, e que a extração e recuperação desses biocompostos podem ser realizadas por técnicas simples que possibilitem escalonamento industrial, a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* foi selecionada para este estudo.

Além desses aspectos, os processos biotecnológicos para a produção de carotenoides podem ser avaliados quanto ao modo de operação. A batelada alimentada é na grande maioria das vezes mais eficiente e versátil quando comparada a outros modos de cultivo. Em tais processos a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em cultivos microbianos (KLEMAN et al., 1991). O sistema em batelada alimentada permite o controle da concentração de substrato, podendo assim minimizar os efeitos de inibição pelo substrato, considerando a possibilidade de sua adição em momentos indicados como propícios durante o processo (SCHMIDELL et al., 2001; LUNA-FLORES et al., 2010).

Neste contexto, complementando e continuando as pesquisas que vem sendo desenvolvidas no grupo de pesquisa do Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade conjuntamente com o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de Rio Grande, este trabalho visa a maximização da produção de carotenoides pela *Rhodotorula mucilaginosa* em frascos agitados com a utilização de coprodutos agroindustriais, em processo de batelada e batelada alimentada.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a produção de carotenoides, utilizando coprodutos agroindustriais no meio de cultivo em frascos agitados, pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, em processo de batelada e batelada alimentada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar um meio de cultivo formulado com coprodutos agroindustriais (melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho ou água de maceração de milho e glicerol bruto) e maximizar a produção de carotenoides em batelada;

Avaliar diferentes estratégias em processo de batelada alimentada na produção de carotenoides.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CAROTENOIDES

Dentre os pigmentos naturais, os carotenoides constituem importante grupo devido à sua ampla distribuição na natureza e diversidade estrutural. O nome científico é derivado da cenoura, que foi reconhecida por Wackenroder em 1831 como a primeira fonte de caroteno (GOODWIN, 1952). Os carotenoides possuem diversas aplicações, dentre elas, a utilização como corantes, em suplementos alimentares, fármacos, cosméticos e para fins biotecnológicos (KIRTI et al., 2014).

O Brasil possui uma variedade extraordinária de fontes de carotenoides. Dentre elas podemos destacar as frutas de polpa amarela como melão e caju, ricas em β-caroteno. Frutas de polpa alaranjada como cajá, nectarina, mamão e laranja são ricas em β-criptoxantina, dentre inúmeras outras fontes de carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Os carotenoides não são só responsáveis pela coloração intensa de frutas, mas também de hortaliças, flores, algas, bactérias e fungos. A coloração varia do amarelo ao vermelho e se deve ao grande número de insaturações conjugadas presentes na molécula (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

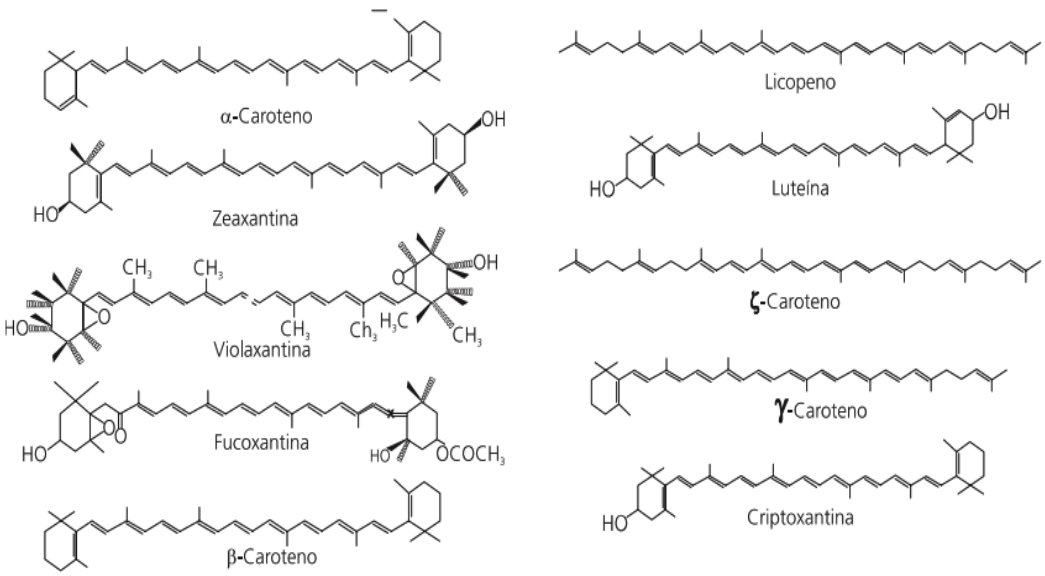
Existem identificados mais de 600 tipos de carotenoides, que são divididos em dois grupos estruturais: carotenos hidrocarbonetos e as xantofilas oxigenadas. Sua base estrutural é constituída de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, de tal forma que a molécula é linear e simétrica (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A estrutura básica pode ser representada pelo licopeno a partir do qual pode ser modificada através de ciclização, hidrogenação, oxidação ou combinações dessas, resultando em imensa variedade de configurações. Na Figura 1 é possível observar algumas estruturas de carotenoides e nas extremidades o anel cíclico é denominado de β-ionona (BOBBIO; BOBBIO, 1992; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

3.2 BIOSSÍNTESE DE CAROTENOIDES

Todos os carotenoides são derivados da via terpenoide e sua biossíntese geralmente envolve três etapas: (i) formação de isopentenilo pirofosfato (IPP), (ii) formação

de fitoeno e (iii) ciclização e outras reações de licopeno (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2015). Começando com os compostos simples acetil-CoA, gliceraldeído-3-fósforo e piruvato, que surgem através dos patentes centrais do metabolismo, o intermediário-chave o difosfato de isopentenilo é formado por duas rotas independentes. É então convertido por bactérias, fungos, plantas e animais em milhares de produtos que ocorrem naturalmente.

Figura 1 - Estrutura química de alguns carotenoides.

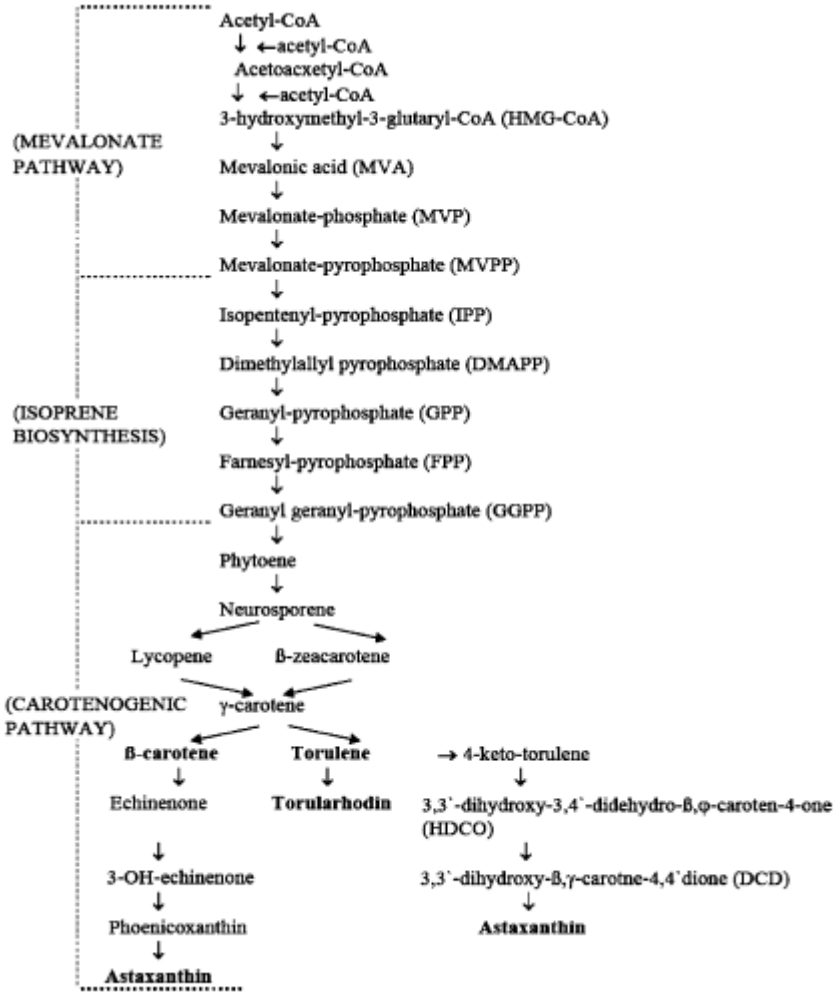


Fonte: AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006.

Nos fungos, os carotenoides são derivados por reações de sequências através da biossintética do mevalonato. O principal produto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) é reduzido para o ácido mevalônico. Essa redução de dois passos de HMG-CoA para mevalonato é altamente controlado e também é um fator de controle principal da síntese de esteróis (MAROVA; CERTIK; BREIEROVA, 2015). A Figura 2 apresenta a via biossintética a partir do acetil-CoA para a produção de carotenoides (β-caroteno, toruleno e torularrodina) em espécies de *Rhodotorula* e astaxantina em *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous).*

A acumulação de pigmentos carotenoides na maioria das leveduras começa na fase logarítmica e continua na fase estacionária, na presença de uma fonte de carbono adequada importante para a biossíntese de carotenoides (GOODWIN, 1972 apud FRENGOVA e BESHKOVA, 2009).

Figura 2 - Caminhos biossintéticos de acetil-CoA para β-caroteno, toruleno e torularrodina em espécies de *Rhodotorula* e astaxantina em *Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)*



Fonte: FRENGOVA e BESHKOVA, 2009.

3.3 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DOS CAROTENOIDES

3.3.1 Cor

Os carotenoides possuem propriedades de absorção da luz que são oriundas da presença de grupos cromóforos, que possui duplas ligações conjugadas. O aumento do número destas faz com que ocorram maiores bandas de absorção e consequentemente maiores comprimentos de onda. O número mínimo de sete ligações conjugadas resulta na coloração amarelada; aumentando o número das ligações conjugadas, os carotenoides passam a apresentar cores de tons alaranjados a vermelho (BOBBIO; BOBBIO, 1992; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Derivados carotenoides sintéticos, idênticos aos naturais, são produzidos em larga escala para a utilização industrial. Geralmente o objetivo do uso de carotenoides como corantes nas indústrias alimentícias é em consequência da cor perdida durante o processamento e armazenamento (VALDUGA et al., 2009). A aplicação uniformiza a coloração dos produtos, sendo que os corantes mais utilizados são o β-caroteno e a astaxantina (KIRTI et al., 2014).

Tradicionalmente, os carotenoides são comercializados na forma de pó seco ou extratos de plantas, tais como urucum, páprica e açafrão. Podem ser utilizados no preparo de emulsões oleosas e aquosas, suspensões coloidais e complexos com proteínas (FERREIRA; ZAMITH; ABRANTES, 2014; GOUVEIA et al., 2006). Diversos estudos têm sido realizados com a aplicação de carotenoides em produtos alimentícios como iogurtes (RUTZ et al., 2016; TAKSIMA; LIMPAWATTANA; KLAYPRADIT, 2015), massas (VALCAREGGIS et al., 2016), maioneses e pães (ZARAGOZA, 2015), margarina, manteigas e sorvetes (KAUR et al., 2016), sucos de frutas, bebidas, sopas, molhos para saladas, xaropes, medicamentos, entre outros (KIRTI et al., 2014).

Ainda podem ser aplicados na alimentação de salmões criados em cativeiro. A finalidade da suplementação com carotenoides é de que este seja absorvido e depositado na carne, conferindo a coloração característica destes peixes (PASSOS, 2007). Em seu habitat natural esses peixes adquirem a coloração rosada em sua carne principalmente da presença de astaxantina obtida pela ingestão de plantas marinhas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

3.3.2 Atividade antioxidante

A eliminação de radicais livres é feita por compostos que tem duplas ligações conjugadas, possuindo assim o efeito antioxidante. Os carotenoides são exemplos desses compostos, que podem ser facilmente oxidados, desativando o oxigênio singlete (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; STRINGHETA et al., 2006).

A eficácia dos carotenoides quanto ao poder oxidativo está relacionada com o número de duplas ligações conjugadas presentes na molécula, por isso nem todos os carotenoides são igualmente eficazes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; STAHL; SIE, 2003). A atividade antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas. O licopeno possui onze duplas ligações

conjugadas, enquanto o β-caroteno possui nove e cadeia cíclica nas extremidades, logo o licopeno é um antioxidante mais eficaz que o β-caroteno (MCBRIDE, 1996).

A utilização na dieta, sendo na ingestão de medicamentos ou de alimentos ricos em carotenoides, pode desempenhar efeito benéfico no organismo humano pelo sequestro e extinção dos radicais livres, protegendo o organismo contra danos celulares oxidativos, reduzindo o risco de desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas (STRINGHETA et al., 2006).

Um estudo realizado por Southon (2000) investigou a ingestão de suplemento combinado de carotenoides (óleo de palma, luteína ou licopeno) e tocoferol durante 4 semanas em adultos de diversos países. O maior consumo de suplemento rico em carotenoides diminuiu a suscetibilidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à oxidação, houve relação significativa entre as concentrações de carotenoides no sangue e os baixos níveis de DNA danificado. A partir dos resultados também concluiu que carotenoides obtidos a partir da dieta normal realizam de fato papel protetor no corpo, confirmando a hipótese antioxidante oriunda dos carotenoides presentes nas frutas e vegetais contra danos oxidativos.

Stajčić et al. (2015) realizaram estudos em resíduos de tomate e observaram que estes continham quantidades consideráveis de carotenoides (licopeno e β-caroteno) e apresentavam atividades antioxidantes. Sendo assim, uma possível fonte alternativa de compostos bioativos, que teriam papel protetor ao organismo contra os danos oxidativos.

Cipolatti (2012) avaliou a atividade antioxidante por diferentes métodos de extratos carotenogênicos produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia fermentans e Sporidiobolus pararoseus*, em meio extrato de malte e levedura (YM) e meios agroindustriais com água de maceração de milho e glicerol (M1) e água de maceração de milho e melaço (M2). A atividade antioxidante foi medida através da capacidade de interação com os radicais DPPH e ABTS e pelo poder de redução do ferro (FRAP). O extrato de *R. mucilaginosa* apresentou uma atividade antioxidante de 29,4, 102,3 e 61,3 % inibição μg^{-1} para os meios YM, M1 e M2, respectivamente pelo método ABTS. O DPPH não foi capaz de inibir o radical livre. O extrato de *S. pararoseus* obtido a partir do meio YM apresentou atividade superior em reduzir o ferro, os meios utilizando os coprodutos agroindustriais, resultaram em 50% da atividade do meio YM. O extrato proveniente *P. fermentans* em meio M2 se mostrou mais promissor com relação a atividade antioxidante pelos métodos estudados com 129,6 e 293,1 % inibição μg^{-1} para DPPH e ABTS, respectivamente, e valores superiores a 1,0 de absorvância pelo método FRAP.

3.3.3 Atividade pró-vitamina A

A vitamina A desempenha importante papel nutricional sendo essencial para a promoção do crescimento ósseo, desenvolvimento embrionário e função visual (HOF et al., 2000). Esta vitamina é um grupo de hidrocarbonetos insaturados como o retinol, retinal e ácido retinoico (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Dentre os 600 carotenoides conhecidos, cerca de 50 apresentam alguma atividade pró-vitamínica. Estruturalmente o retinol é essencialmente a metade da molécula de β-caroteno, portanto é o mais potente pró-vitamínico ao qual 100 % da atividade é atribuída. Assim, o α-caroteno e a β-criptoxantina, têm cerca de 50 % da atividade do β-caroteno. A luteína, zeaxantina e licopeno não possuem atividade, pois o requisito mínimo para os carotenoides apresentarem atividade pró-vitamínica é a presença do anel β-ionona e uma cadeia lateral isoprenoide com terminação de uma função álcool, aldeído ou carboxila (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; RODRIQUEZ- AMAYA, 2001).

Inicialmente o β-caroteno é quebrado na mucosa intestinal, dando origem a duas moléculas ativas de retinol. A eficiência na absorção dos carotenoides é afetada pela quantidade de carotenoide ingerido e pelo processamento e/ou cozimento dos alimentos. Ainda, alguns ingredientes alimentares podem estimular ou inibir a absorção como efeito de matriz, interações entre os carotenoides, variação individual e infestação parasitária (SCOTT; RODRIQUEZ- AMAYA, 2000).

3.4 OBTENÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE CAROTENOIDES

O mercado mundial de carotenoides foi de US$ 1,5 bilhões em 2014 e projeta-se que este mercado chegue a quase US$ 1,8 bilhões em 2019, com taxa de crescimento anual de 3,9 % (BCC RESEARCH MARKET FORECASTING, 2016). A preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos fez com que o interesse em carotenoides obtidos naturalmente crescesse. A produção biotecnológica se destaca por ser de curto período de obtenção, não estando sujeita as condições ambientais, portanto, o produto de interesse pode ser produzido em qualquer época do ano (VALDUGA et al., 2009).

Os carotenoides podem ser biossintetizados por micro-organismos como algas (MACHADO et al., 2016, REIS, 2012), cianobactérias (MULLER; RODRIGUEZ-AMAYA; LOURENÇO, 2003), bactérias (MIRANDA, 2010), fungos (PAPAIOANNOU;

LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2012) e leveduras (AKSU; EREN, 2005, CIPOLATTI et al., 2015, LOPES et al., 2017, MACHADO; BURKERT, 2015; RIOS et al., 2015; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2012). Apesar de vários micro-organismos possuírem a capacidade de biossíntese de carotenoides nem todos são industrialmente interessantes. No entanto, as leveduras se destacam pela necessidade básica de uma fonte de carbono e de nitrogênio para a biossíntese, o que é relativamente simples quando comparada a outros micro-organismos. A produção de carotenoides ainda pode ser realizada com a utilização de coprodutos agroindustriais no meio de cultivo, reduzindo o custo de produção (VALDUGA et al., 2009).

Um outro aspecto muito importante é a recuperação dos carotenoides para possibilitar a aplicação desses extratos nas indústrias de alimentos e cosméticos, surgindo a necessidade de estudos de produção de pigmentos e técnicas de rompimento celular, possibilitando a utilização dos carotenoides de fontes microbianas (ALBUQUERQUE, 2015). Os carotenoides são compostos intracelulares, sendo assim faz-se necessário a utilização de técnicas de ruptura da parede celular, disponibilizando estes compostos para aplicação industrial (LOPES et al., 2017; MICHELON et al., 2012; MONK et al., 2013).

Lopes et al (2017) realizaram estudo sobre métodos de recuperação de carotenoides utilizando técnicas químicas, mecânicas e enzimáticas com as leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilagionosa*. Dentre as técnicas de ruptura celular estudadas para *S. pararoseus*, o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram os melhores resultados, 84,79 e 76,87 μg g^{-1}, respectivamente. Para *R. mucilaginosa*, o maior valor de carotenoides recuperados foi obtido com o uso do banho ultrassônico (193,5 μg g^{-1}), sendo considerado o método mais efetivo na ruptura celular de ambas as leveduras.

3.5 MEIOS AGROINDUSTRIAIS

Um fator limitante na produção de carotenoides microbianos é o elevado custo de produção. Portanto, é interessante procurar alternativas para viabilidade do processo industrial, sendo uma possibilidade a utilização de coprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes alternativas. Além disso, o aproveitamento desses coprodutos agrega valor aos mesmos e consequente provoca uma redução na geração dos resíduos oriundos dos processamentos, diminuindo o impacto ambiental (ROMERO et al., 2001). A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que utilizaram meios alternativos na produção de carotenoides.

Tabela 1 - Produção de carotenoides por diferentes micro-organismos utilizando meios alternativos para o cultivo.

Referência	Micro-organismo	Coproduto Agroindustrial
Buzzini e Martini (1999)	*Rhodotorula glutinis*	Mosto de uva Extrato de soja Farinha de milho
Aksu e Eren (2005)	*Rhodotorula mucilaginosa*	Melaço de cana de açúcar
Otero (2011)	*Sporidiobolus pararoseus* *Rhodotorula mucilaginosa* *Pichia fermentans* *Phaffia rhodozyma*	Água de parboilização de arroz Melaço de cana de açúcar Glicerol bruto
Cipolatti (2012)	*Sporidiobolus pararoseus* *Rhodotorula mucilaginosa* *Pichia fermentans*	Água de maceração de milho Melaço de cana de açúcar Glicerol bruto
Banzatto, Freita e Mutton (2013)	*Rhodotorula rubra*	Caldo, melaço e xarope de cana de açúcar
Schneider et al. (2013)	*Rhodotorula glutinis*	Efluente de cervejaria
Freitas et al. (2014)	*Rhodosporidum toruloides*	Xarope de polpa de alfarroba
Rios et al. (2015)	*Phaffia rhodozyma*	Água de parboilização de arroz
Machado e Burkert (2015)	*Sporidiobolus pararoseus*	Água de maceração de milho Melaço de cana de açúcar Glicerol bruto
Borba (2015)	*Sporidiobolus pararoseus*	Água de maceração de milho Melaço de cana de açúcar
Silva et al. (2012)	*Phaffia rhodozyma*	Água de parboilização de arroz Glicerol bruto

3.5.1 Melaço de cana de açúcar

O plantio da cana de açúcar é amplamente difundido no Brasil que é o maior produtor mundial. Segundo a União da Indústria de Cana de Açúcar (UNICA) a produção nacional para a safra 2016/2017 foi cerca de 666.824 milhões de toneladas/ano.

O Brasil é também o maior produtor de açúcar, com 36 milhões de toneladas produzidas e 24 milhões de toneladas exportadas entre 2016/2017 (UNICA, 2016). Cerca de 70,8 % do açúcar no país é produzido na região Sudeste, 11,2 % na Região Centro-Oeste, 9,4 % na Região Nordeste, 8,5 % na Região Sul e 0,1 % na região Norte (CONAB, 2015).

Na indústria açucareira o principal coproduto é o melaço, sendo produzido na proporção de 40 a 60 kg por tonelada de cana processada (EMBRAPA, 2016a). É um coproduto que tem sido utilizado como substrato na produção de produtos fermentados, tornando-se de grande interesse econômico. O melaço é o licor resultante da cristalização final do açúcar, sendo composto por: água, açúcares (em média 62%, incluindo glicose, frutose e sacarose), compostos nitrogenados (aminoácidos, vitaminas e proteínas) e uma fração mineral composta principalmente por cálcio, magnésio, sódio e potássio (RAMBLA et al., 1999). Feltrin et al. (1999) determinaram a composição físico química do melaço de cana-de-açúcar apresentando 48,50% de açúcares totais, sendo o maior percentual constituído de sacarose, nitrogênio (0,58 %), fósforo (0,015 %), potássio (1,63 %) e cinzas (9,98 %).

3.5.2 Água de maceração de milho

Água de maceração de milho, milhocina ou “corn steep liquor” (CSL) é um coproduto obtido do processamento do milho, resultante da água de lavagem dos grãos quando ocorre o fracionamento em amido e germe (óleo) (SOBRINHO, 2007). Esse coproduto é rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato. Assim, é um meio favorável aos processos fermentativos. Devido à sua composição tem sido estudado como fonte de nutrientes para micro-organismos (RIVAS et al., 2004).

A produção mundial de milho é concentrada basicamente em três grandes produtores: Estados Unidos da América, China e Brasil representando 65,62 % da produção mundial de milho (USDA, 2017). O Brasil mais do que dobrou a produção de milho nos últimos 10 anos. Na safra 2014/2015 houve incremento de produtividade de 6,8 % e a produção alcançou 85,2 milhões de toneladas. O estado do Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de milho do Brasil (CONAB, 2016).

3.5.3 Glicerol bruto

O glicerol bruto é gerado como coproduto da produção de biodiesel, sendo considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica (DILLIS et al., 1980). O mercado de glicerol bruto está diretamente relacionado com a produção de biodiesel. O volume total de biodiesel gera cerca de 10 % de glicerol bruto, podendo ser utilizado como fonte de carbono na obtenção de produtos de maior valor agregado (EMBRAPA, 2016b).

Segundo o Ministério de Minas e Energia (MME) no Brasil a produção de biodiesel atingiu 1.196 mil m³ em 2016, sendo que a região sul do Brasil foi responsável por 40,1 % de todo biodiesel produzido nacionalmente (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2016).

O glicerol obtido na reação de transesterificação (necessária para a produção do biodiesel) contém algumas impurezas, como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que diminuem o valor agregado do mesmo. Cabe então encontrar alternativas para o aproveitamento direto do glicerol bruto, já que a sua purificação tem custo elevado o que torna inviável para pequenos e médios produtores de biodiesel (EMBRAPA, 2016b). Os processos de biotransformação do glicerol bruto podem tornar a produção de biodiesel mais rentável e também incentivar ainda mais o estabelecimento de biorrefinarias (CHATZIFRAGKOU; PAPANIKOLAOU, 2012).

3.6 PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR LEVEDURAS UTILIZANDO COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Razavi e Marc (2006) avaliaram o crescimento e a produção de carotenoides por *Sporobolomyces ruberrimus* H110 usando fontes de carbono como a glicose, glicerol puro e glicerol técnico formulado com 67% glicerol puro, 2% ácidos graxos, 3% sais e 28% água. O cultivo foi realizado em frascos agitados a 210 rpm, 27°C, pH inicial 6 por 50 h. O crescimento celular (4,16 g L^{-1}) e a concentração de carotenoides (1,15 mg g^{-1}) observadas foram superiores utilizando glicerol técnico. A biomassa obtida após 24 h alcançou 1,98 g L^{-1} no meio contendo glicose, enquanto que a mesma concentração de biomassa foi obtida após 43 h com glicerol puro.

Silva et al. (2012) avaliaram o uso de glicerol puro e glicerol bruto no meio de produção de carotenoides por *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-17268, além do efeito da

temperatura (20 e 25ºC) os cultivos foram realizados em frascos agitados (150 rpm). O meio de cultivo utilizado continha 5,5 g L^{-1} de extrato de malte, 5,5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 5,5 g L^{-1} de glicose, 10 g L^{-1} de peptona, 15 g L^{-1} de água de parboilização de arroz e glicerol puro ou bruto nas concentrações de 0, 10 ou 40 g L^{-1}. O aumento da temperatura de 20 para 25°C conduziu ao aumento na concentração de células em todas as concentrações de glicerol puro, atingindo níveis máximos de 8,9 g L^{-1} de biomassa em 168 h de cultivo, produção de carotenoides de 2000 μg L^{-1} (91,1 μg g^{-1}) com 40 g L^{-1}. Os melhores resultados com o meio contendo glicerol bruto foi na concentração de 40 g L^{-1}, a produção de carotenoides foi de 1700 μg L^{-1} (275,5 μg g^{-1}), não havendo diferença estatística ($p>0,5$) no uso do glicerol bruto ou puro.

Em seu trabalho, Freitas et al. (2014), estudaram *Rhodosporidum toruloides* NCYC 921 para a produção de carotenoides e lipídios. A fonte de carbono de baixo custo empregada no meio de cultivo foi xarope de polpa de alfarroba e melaço de cana de açúcar, variando em 75 e 100 g L^{-1} os açúcares totais. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados (150 rpm) a 30ºC e pH inicial de 5,5. No meio contendo xarope de polpa de alfarroba na concentração de açúcares totais de 75 g L^{-1} foi obtido a maior produtividade em carotenoides totais de 9,79 μg L^{-1} h^{-1}. Com o meio melaço de cana de açúcar contendo uma concentração de açúcares de 75 g L^{1} foi obtido a maior produtividade de carotenoides totais de 1,60 μg L^{-1} h^{-1}.

Rios et al. (2015) avaliaram a utilização de água de parboilização de arroz no meio de cultivo para *Phaffia rhodozyma* na produção de carotenoides. O cultivo foi realizado em frascos agitados (150 rpm), 25ºC por 168 h. Através de planejamentos experimentais foi avaliado a composição do meio com extrato de malte (1 a 16,25 g L^{-1}), peptona (1 a 16,25 g L^{-1}), sacarose (5 a 35 g L^{-1}) e água de parboilização de arroz (4 a 162,5 g L^{-1}). A maximização da produção volumétrica de carotenoides foi alcançada no meio de produção com 16,25 g L^{-1} de extrato de malte, 8,75 g L^{-1} de peptona, 15 g L^{-1} de sacarose, 87,5 g L^{-1} de água de parboilização de arroz em 144 h de cultivo obtendo 5300 μg L^{-1} (628,8 mg g^{-1}) de carotenoides totais.

Machado e Burkert (2015) estudaram a otimização na produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos agroindustriais para a formulação do meio de cultivo. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados a 180 rpm, 25ºC por 168 h. A partir de planejamentos experimentais os efeitos de dois meios foram estudados, glicerol bruto (5 a 50 g L^{-1}) e água de maceração de milho (20 a 80 g L^{-1}) e melaço (10 a 58 g L^{-1}) com água de maceração de milho

(3,5a 9,5 g L^{-1}). A utilização de 30 g L^{-1} de glicerol bruto e 52,9 g L^{-1} de água de maceração de milho resultou na máxima produção volumétrica em carotenoides de 779,6 μg L^{-1} (65,6 μg g^{-1}). O meio com 40 g L^{-1} de melaço e 6,5 g L^{-1} água de maceração de milho alcançou produção em carotenoides de 520,9 μg L^{-1} (73,1 μg g^{-1}).

O gênero *Rhodotorula* tem sido estudado devido ao seu potencial para produção de carotenoides e também pela possibilidade do uso de substratos de baixo custo como caldo ou melaço de cana-de-açúcar (BANZATTO; FREITA; MUTTON, 2013; CHENG; YANG, 2016), efluente de cervejaria (SCHNEIDER et al., 2013), borra de café (PETRIK et al., 2014), mosto de uva, extratos de soja e farinha de milho (BUZZINI; MARTINI, 1999). Este gênero abrange as espécies como: *R. aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *R. minuta*, *R. lactosa*, *R. graminis* e *R. mucilaginosa*, que são bem distribuídas na natureza, sendo encontradas em ambientes marinhos, aquáticos e no solo (COSTA, 1992). Na Tabela 2 estão resumidos estudos da literatura que utilizaram meios alternativos para a produção de carotenoides por diferentes cepas de *Rhodotorula.*

Buzzini e Martini (1999) estudaram a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* com diferentes matérias-primas de origem agro-industrial (concentrado de mostos de uva, xarope de glicose, melaço de beterraba, extrato de soja e extrato de milho). Os cultivos submersos foram realizados a 180 rpm, 30°C durante 5 a 7 dias. O máximo de carotenoides obtido foi no meio com concentrado de mosto de uva (5950 μg L^{-1}) seguido pelo meio com extrato de soja (4240 μg L^{-1}), extrato de milho (3820 μg L^{-1}), melaço (3090 μg L^{-1}) e xarope de glicose (1800 μg L^{-1}), mostrando assim que estes coprodutos podem ser utilizados para a produção de carotenoides.

Otero (2011) isolou leveduras silvestres a partir de solo, flores, folhas e frutos presentes na área do Litoral Médio e na região do Escudo Sul-Rio-Grandense, e selecionou três leveduras com maior potencial para produção de carotenoides, identificadas como *Sporidiobolus pararoseus, Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*. A bioprodução de carotenoides foi realizada através de cultivos submersos em frascos agitados a 150 rpm, pH inicial de 6,0, a 25ºC, por 168 h. Foram avaliados os coprodutos agroindustriais no meio de cultivo, glicerol bruto e água de parboilização de arroz, nas concentrações de 17,31 g L^{-1} e 39,91 g L^{-1}, respectivamente; melaço e água de parboilização de arroz, nas concentrações de 23,6 g L^{-1} e 44,01 g L^{-1}, respectivamente; e meio complexo YM (3 g L^{-1} extrato de levedura, 3 g L^{-1} de extrato de malte, 5 g L^{-1} de peptona e 10 g L^{-1} de glicose). *R. mucilaginosa* resultou em concentração final de carotenoides de 230 μg L^{-1} (30,16 μg g^{-1}) utilizando o meio

agroindustrial com melaço, 250 μg L^{-1} (28,06 μg g^{-1}) para o meio YM e para meio contendo glicerol bruto 360 μg L^{-1} (18,76 μg g^{-1}).

Tabela 2 - Produção de carotenoides por diferentes cepas de *Rhodotorula* utilizando meios alternativos para o cultivo.

Referência	Micro-organismo	Meios utilizados	Condições de cultivo	Carotenoides (μg L^{-1})
Buzzini e Martini (1999)	*R. glutinis*	a) Mosto de uva b) Extrato de soja c) Farinha de milho	30°C, pH 5,5, 180 rpm	a) 5950 b) 4240 c) 3820
Aksu e Eren (2005)	*R. mucilaginosa*	Melaço de cana de açúcar	30°C, pH 7, 100 rpm	8900
Otero (2011)	*R. mucilaginosa*	a) Água de parboilização de arroz e melaço de cana de açúcar b) Água de parboilização de arroz e glicerol bruto	25°C, pH 6, 180 rpm	a) 230 b) 360
Cipolatti (2012)	*R. mucilaginosa*	a) Água de maceração de milho com melaço b) Água de maceração de milho com glicerol	25°C, pH 6, 180 rpm	a) 150,6 b) 224
Banzatto, Freita e Mutton (2013)	*R. rubra*	a) Caldo de cana de açúcar b) Melaço de cana de açúcar c) Xarope de cana de açúcar	30°C, pH 5,5, 200 rpm	a) 2000 b) 2700 c) 1700
Schneider et al. (2013)	*R. glutinis*	Efluente de cervejaria	25°C, pH 7, 115 rpm	600
Cheng e Yang (2016)	*R. mucilaginosa*	Melaço	25°C, pH 5, 120 rpm	2611

Cipolatti (2012) realizou estudos com *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, em cultivos submersos a 25ºC, 180 rpm, por 168 h, avaliando a produção de carotenoides a partir de meios contendo água de maceração de milho e glicerol bruto (M1), e água de maceração de milho e melaço (M2), comparando com o meio convencional (YM). *S. pararoseus* se destacou nos meios alternativos, apresentando 634,5 μg L^{-1} (87,3 μg g^{-1}) e 830,3 μg L^{-1} (68,1

μg g^{-1}) e para M1 e M2, respectivamente. Com relação à produção de β-caroteno de *S. pararoseus* obteve maior produção com 89,2 e 94,4 % dos carotenoides identificados no M1 e M2, respectivamente. Apresentando elevados valores de biomassa, com 7,3; 9,8 e 12,2 g L^{-1} para M1, YM e M2, respectivamente. Já a levedura *R. mucilaginosa* mostrou maior produção de carotenoides no meio YM (1068,5 μg L^{-1}) seguido do meio M1 (224 μg L^{-1}) e M2 (150 μg L^{-1}). O perfil carotenogênico para *R. mucilaginosa* foi identificado e quantificado através de um cromatógrafo liquido de alta eficiência. A maior produção foi de β-caroteno para os meios testados seguido da astaxantina, com exceção do meio M2 onde não foi detectado a presença e por último a luteína em menor proporção. Sendo observada a maior concentração de β-caroteno de 5,4 e 6 vezes superior em relação ao M1 e M2, respectivamente.

Banzatto, Freita e Mutton (2013) avaliaram a produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* utilizando meios de cultivo a base de caldo, melaço e xarope de cana de açúcar, com 40 g L^{-1} de açúcar redutor. A produção de carotenoides foi realizada em cultivos submersos em frascos agitados (200 rpm), 30ºC, pH 5,5 por 72 h. A concentração de carotenoides totais para o caldo, melaço e xarope de cana foi 2000, 2740 e 1700 μg L^{-1}, respectivamente. Ainda foi realizada a identificação dos principais carotenoides produzidos pela levedura sendo eles, o toruleno, torularrodina e β-caroteno.

Schneider et al. (2013), estudaram a produção de lipídios microbianos e carotenoides por *Rhodotorula glutinis*. O cultivo submerso foi realizado a 115 rpm, 25°C por 168 h, testando três meios como fontes de carbono: efluente de cervejarias, efluente de cervejaria suplementado com glicose e meio sintético, alcançando 600, 1200 e 1000 μg L^{-1}, respectivamente. Assim, os efluentes advindos das indústrias cervejeiras podem ser considerados como fonte adequada de nitrogênio, carbono e outros nutrientes para a produção de carotenoides pela levedura *R. glutinis.*

Cheng e Yang (2016) estudaram em seu trabalho a biossíntese de carotenoides utilizando *Rhodotorula mucilaginosa*. O cultivo submerso foi realizado a 115 rpm, 25°C por 168 h. Foram utilizados três resíduos agroindustriais, melaço de cana de açúcar, resíduos de ketchup e bebida (*health drink*). Os resultados revelaram que o pH e temperatura ótimos para a síntese de carotenoides foram de 5 e 25°C, respectivamente. A concentração de carotenoides com os meios ketchup, melaço e bebida (*health drink*) foram 2234,9, 2611,0, 1107,4 μg L^{-1}, respectivamente. Os melhores resultados da síntese de carotenoides foram obtidos com resíduos de melaço, podendo ter potencial como resíduos aceitáveis devido ao seu baixo custo e capacidade de produção de carotenoides naturais.

3.7 PROCESSOS EM BATELADA ALIMENTADA

O processo em batelada alimentada é conhecido desde 1900 sendo utilizado para regulação do crescimento de *Saccharomyces cerevisae*. Também denominado por "cultura por processo descontínuo alimentado", se referindo a uma fermentação descontínua continuamente alimentada por açúcares (CARVALHO; SATO, 2001). A batelada alimentada é uma das técnicas utilizadas em processos biotecnológicos onde é realizada a alimentação com um ou mais nutrientes no meio de cultivo durante o processo. Este método tem por objetivo minimizar os problemas em relação à inibição da produção pela concentração de substrato ou por repressão catabólica (SILVA et al., 1998). Os cultivos em batelada alimentada são comumente empregados para se obter elevada densidade celular e/ou máxima formação de produto (KLEMAN et al., 1991).

Neste processo é possível controlar a concentração de substrato no meio de cultivo, o que permite a utilização de diferentes vazões com o meio nutriente. Através desse mecanismo de alimentação o metabolismo microbiano é deslocado para determinada via metabólica levando ao acúmulo de um produto específico. Assim, em muitos processos de produção de carotenoides, a condução do processo em batelada alimentada leva a uma melhoria na produção, mostrando que esse tipo de processo pode ser vantajoso (CARVALHO; SATO, 2001).

Ho, Tam e Zhou (1999) estudaram a produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* em batelada alimentada utilizando alimentação contínua e exponencial. A composição do meio utilizado foi 3 g L^{-1} $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 g L^{-1} KH_2PO_4, 1,5 g L^{-1} $MgSO_4.7H_2O$, 1 g L^{-1} extrato de levedura, 10 g L^{-1} de água de maceração de milho, 4 g L^{-1} peptona e 35 g L^{-1} de glicose. A alimentação consistiu em 50% (m/v) de solução de glicose. O pH controlado a 5,0 e a temperatura foi mantida constante em 20ºC. A vazão de alimentação da glicose no processo contínuo foi 0,76 g L^{-1} h^{-1} e no exponencial o perfil foi calculado segundo Yee; Blanch (1992). No processo contínuo foi obtido 16,2 g L^{-1} de biomassa e concentração de carotenoides de 5,80 μg mL^{-1}, já para a alimentação exponencial a biomassa foi 14,7 g L^{-1} e maior concentração de carotenoides de 6,04 μg mL^{-1}. Para comparação foi realizada a produção em processo de batelada, encontrando 15,8 g L^{-1} de biomassa 5,50 μg mL^{-1} de carotenoides, concluindo que o concentração de carotenoides foi similar para os tipos de alimentação estudados no trabalho.

Saenge et al. (2011) avaliaram a produção por *R. glutinis* TISTR 5159 de lipídios e carotenoides em processos de batelada e batelada alimentada utilizando um meio composto por glicerol bruto, sulfato de amônio, nitrogênio e surfactante (Tween 20). O processo de batelada ocorreu em cultivos submerso, incubados a 30°C, 200 rpm por 72 h, em meio onde a concentração inicial de glicerol e razão C:N foram 9,5 % e 85, respectivamente. No processo de batelada alimentada a alimentação começou no meio da fase exponencial e a cada 12 h para manter a concentração de glicerol. O pH do meio de alimentação foi controlado e mantido em 6, agitação e a taxa de aeração, 100 rpm e 2 vvm, respectivamente. O processo em batelada alimentada aumentou a concentração de biomassa de 8,17 para 13,77 g L^{-1}, o teor de lipídios de 52,91 para 60,70 % e a produção de carotenoides de 125,75 para 180,20 mg g^{-1}.

Colet, Luccio e Valduga (2015) avaliaram a produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em batelada alimentada. A composição do meio utilizado foi 15 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de extrato de malte e 80 g L^{-1} de glicerol bruto ou puro. A taxa de alimentação variou de 37,5-150 mL de substrato a cada 12 h, mantendo as configurações fixas para volume de ar e taxa de aeração por unidade de volume de meio de cultura por minuto (1,5 vvm), velocidade de agitação (180 rpm), temperatura (25ºC) e o pH inicial de 4,0. A alimentação teve início após 24 h de cultivo. O rendimento com a batelada alimentada foi 29 % maior do que o obtido no processo de batelada. Neste estudo, a concentração de carotenoides totais máximo obtido foi 4400 μg L^{-1}, em 96 h com alimentação de 112,5 mL, utilizando glicerol puro. O uso de glicerol bruto resultou na produção de 3000 μg L^{-1} de carotenoides em 96 h de cultivo. Embora a produção total de carotenoides com glicerol bruto foi 32 % inferior do que a obtida com o glicerol puro, o uso de glicerol bruto é justificado uma vez que não há etapas de purificação, sendo esta uma alternativa para a adição de valor para um coproduto da indústria de biodiesel.

Gharibzahedi, Razavi e Mousavi (2014) avaliaram a produção de carotenoides a partir de melaço hidrolisado por *Dietzia natronolimnaea* utilizando processos em batelada e batelada alimentada. As condições do cultivo foram: taxa de aeração por unidade de volume de meio de cultura por minuto (3 vvm), 180 rpm e 30ºC, com pH inicial de 7,0. O meio contendo 10 g L^{-1} glicose, 5 g L^{-1} extrato de levedura, 5 g L^{-1} peptona, 3 g L^{-1} extrato de malte e 36,5 ppm Fe^{3+}. A fim de manter a concentração total de carboidratos durante o processo de fermentação, foi adicionada entre 56 e 136 h a solução de alimentação com 25 g L^{-1} (melaço ou melaço hidrolisado) usando diferentes taxas de fluxo ao longo da fermentação. A produtividade de carotenoides com batelada e em batelada alimentada com melaço hidrolisado foi 0,040 e 0,065 mg $L^{-1}h^{-1}$, respectivamente, enquanto os valores correspondentes

para o melaço sem pré-tratamento foram 0,038 e 0,051 mg $L^{-1}h^{-1}$, respectivamente. Desta forma o trabalho mostrou a possibilidade da utilização de melaço hidrolisado como fonte de carbono na biossíntese de carotenoides.

Com base na revisão da literatura é possível verificar que ainda não existem trabalhos com a cepa microbiana, *Rhodotorula mucilaginosa,* abordando a produção de carotenoides em processos de batelada alimentada, tornando interessante o estudo da produção destes biocompostos, uma vez que esta levedura é promissora na produção de β-caroteno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* previamente isolada, identificada por Otero (2011) e depositada na Coleção de Cultura André Toselo (CCT 7668), foi utilizada neste estudo.

4.2 MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO DA CULTURA MICROBIANA

O micro-organismo foi mantido com repiques trimestrais em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura modificado (YM) composto por 3 g L^{-1} de extrato de levedura, 3 g L^{-1} de extrato de malte, 5 g L^{-1} de peptona, 10 g L^{-1} de glicose e adicionados de 0,2 g L^{-1} de KNO_3 a 4ºC (PARAJÓ; VÁZQUEZ, 1998).

Para a reativação, a partir das culturas estoques foi realizado repiques para outros tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h a 25ºC. Posteriormente foi realizado o pré- inóculo, onde a biomassa dos tubos da etapa de reativação foi ressuspendida em 1 mL de água peptonada 0,1%, transferida para tubos de ensaios com 9 mL no meio YM e incubados por 48 h a 25ºC (VALDUGA, 2005).

4.3 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em frascos agitados de 250 mL contendo 90 mL do meio de cultivo YM modificado (PARAJÓ; VÁZQUEZ, 1998), previamente esterilizado a 121ºC por 15 min, e adicionado 10 mL do pré inóculo, sendo incubado a 25°C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir no mínimo $1x10^8$ células mL^{-1}, contadas através de câmara de Neubauer (MICHELON et al., 2012).

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O cultivo foi realizado em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 225 mL do meio de produção agroindustrial, com pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, iniciando o cultivo com $1x10^7$ células mL^{-1} a 25ºC, 150 rpm por 168 h (RIOS et al., 2015). As amostras

foram retiradas em intervalos regulares a cada 24 h até o término do processo, para realizar o acompanhamento de biomassa, pH, açúcares redutores totais e carotenoides totais.

4.5 COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Os coprodutos agroindustriais utilizados no presente trabalho foram a água de maceração de milho, obtida da empresa Corn Products (Balsa Nova – PR); melaço de cana-de açúcar, adquirido da empresa Melaços Brasileiros (Saltinho – SP) e glicerol bruto oriundo da síntese do biodiesel, da BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A (Passo Fundo – RS). A caracterização do melaço foi enviada pela empresa fornecedora (Anexo 1).

4.5.1 Caracterização parcial dos coprodutos agroindustriais

As determinações de carbono, nitrogênio e hidrogênio para os coprodutos agroindustriais e para os componentes do meio YM, foram realizadas em Analisador Elementar CHNS/O 2400 Series II da Perkin Elmer de acordo com Wallner-kersanach, Ribeiro, Machado (2010). Para o melaço foi realizada a determinação do percentual de carbono por analisador de carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (NT) (modelo TOC-VCSH, Shimadzu, Japão).

4.6 OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES COM DIFERENTES MEIOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSO DE BATELADA

4.6.1 Avaliação de diferentes combinações de coprodutos agroindustriais

Neste trabalho foi realizado a avaliação de dois meios de cultivos agroindustriais no processo de batelada, água de maceração de milho (35,6 g L^{-1}) com glicerol bruto (6,6 g L^{-1}) e água de maceração de milho (36,5 g L^{-1}) com melaço de cana de açúcar (6 g L^{-1}), comparativamente ao meio complexo YM (CIPOLATTI, 2012), visando a seleção do meio agroindustrial mais promissor para a maximização do mesmo na produção de carotenoides.

4.6.2 Maximização da produção de carotenoides

A bioprodução de carotenoides foi estudada analisando os efeitos da composição dos meios de cultivo através de 2 delineamentos experimentais. Primeiramente foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 (4 ensaios + 4 ensaios no ponto axial + 3 pontos centrais), seguido por um delineamento composto central (DCC) 2^2 (4 ensaios + 3 pontos centrais). Os níveis e as variáveis independentes estudadas estão apresentadas na Tabela 3. No planejamento experimental as respostas avaliadas foram os valores máximos alcançados de carotenoides volumétricos ($\mu g\ L^{-1}$) ao longo da produção, os carotenoides específicos ($\mu g\ g^{-1}$) e concentração de biomassa ($g\ L^{-1}$) determinados no mesmo tempo dos valores máximos carotenoide volumétrico de cada ensaio.

Tabela 3 - Níveis utilizados para DCCR e DCC para a maximização da produção de carotenoides em meio agroindustrial formulado com melaço e água de maceração de milho.

Variáveis	DCCR				
Independentes / Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Melaço ($g\ L^{-1}$)	1,8	10	30	50	58,2
Água de maceração de milho ($g\ L^{-1}$)	2,3	3,5	6,5	9,5	10,7
	DCC				
		-1	0	1	
Melaço ($g\ L^{-1}$)		50	60	70	
Água de maceração de milho ($g\ L^{-1}$)		0,6	2,0	3,4	

4.7 BATELADA ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES

O processo de batelada alimentada foi realizado em frascos agitados a 25ºC e 180 rpm (RIOS, 2015). As estratégias de alimentação utilizadas basearam-se no procedimento descrito por Chang et al. (2013). Os meios testados e as diferentes estratégias de alimentação estão descritos na Tabela 4, selecionados do item 4.6.2, nas melhores condições definidas na maximização da produção de carotenoides. As concentrações dos componentes no pulso foram estabelecidas de forma que a mesma quantidade inicial de cada componente fosse adicionado. Os ensaios foram realizados em triplicata, e a cada 24 h foram retiradas amostras para quantificação de biomassa, carotenoides e pH.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

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

Tabela 4 - Estratégias de alimentação para processo em batelada alimentada

Ensaios	Meio agroindustrial	Volume de alimentação (mL)*	Pulsos de alimentação
1	M1	10	A cada 24h até 168h
2	M2	50	168h
3	M3	25	48h
4	M3	25	72h
5	M3	25	96h
6	M3	25	48h e 96h
7	M3	25	72h e 120h
8	M3	25	96h e144h
9	M3	25	96h e 168h

M1: 1,8 g L^{-1} Melaço + 6,5 g L^{-1} Água de maceração de milho; M2: 70 g L^{-1} Melaço + 3,5 g L^{-1} Água de maceração de milho; M3: 30 g L^{-1} Melaço + 6,5 g L^{-1} Água de maceração de milho. *volume adicionado ao cultivo a cada pulso.

4.8.1 Determinação do pH

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

4.8.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa ao longo do processo foi estimada por leitura de absorbância a 620 nm, através de curva padrão de biomassa (Apêndice 1) previamente construída (CHOI; PARK, 2003).

4.8.3 Determinação de açúcares redutores totais

Para o acompanhamento de açúcares redutores totais (ART) foi utilizado o método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico de acordo com Miller (1959), com curva padrão de glicose (Apêndice 2). A determinação de ART foi realizada nos meios de cultivo previamente centrifugados. O meio agroindustrial contendo melaço foi submetido previamente a hidrólise com 2 mL de HCl 2 mol L^{-1} em banho fervente de água durante 10 min seguindo a adição de 2 mL de NAOH 2 mol L^{-1} para neutralização de ácido (MALDONADE, CARVALHO, FERREIRA, 2013).

4.8.4 Determinação de carotenoides totais

Para a determinação da concentração de carotenoides, a biomassa foi seca por 48 h a 35°C (FONSECA et al., 2011), posteriormente macerada com gral e pistilo e padronizada em peneira com mesh 115 (CIPOLATTI, 2012). As amostras foram congeladas por 48 h a -18°C (FONSECA et al., 2011). O processo de rompimento celular foi realizado com dimetilsulfóxido (DMSO), segundo a metodologia de Michelon et al. (2012). Em tubos contendo 0,05 g de biomassa foram adicionados 2 mL de DMSO a 55ºC e homogeneizadas por 1 min em vórtex, em intervalos de tempo de 15 min, até completar 1 h de contato.

Após a ruptura celular foram adicionados 6 mL de acetona, a fim de promover a extração dos carotenoides. A amostra centrifugada a 1745 x*g* por 10 min. A fase solvente foi separada e o procedimento de ruptura foi repetido até o branqueamento total das células. Aos sobrenadantes adiciona-se 10 mL de solução de NaCl 20% (m v^{-1}) e 10 mL de éter de petróleo. Após a formação de duas fases a fase apolar foi filtrada com sulfato de sódio (Na_2SO_4), dando origem aos extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 448 nm, utilizando a Equação 1, e sendo expresso em termos de seu carotenoide majoritário (CIPOLATTI, 2012), β-caroteno em éter de petróleo com absortividade específica de 2592, de acordo Davies (1976). Para o cálculo da produção volumétrica de carotenoides totais (μg L^{-1}) foi realizada uma conversão de unidades utilizando o resultado de concentração de carotenoides específicos (μg g^{-1}) e da concentração da biomassa (g L^{-1}).

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

Onde: CT = concentração específica de carotenoides totais (μg g^{-1});

A = absorvância;

V = volume (mL);

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

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

4.8.5 Determinação dos fatores de conversão do cultivo

Para obtenção dos fatores de conversão, foram utilizados os dados obtidos a partir das metodologias analíticas. Estes parâmetros foram calculados de acordo com Hiss (2001). Para o cálculo dos fatores de conversão, foi considerado que a concentração final de açúcares redutores totais (S_0) e a concentração de biomassa máxima (X_m) foram determinadas no tempo de cultivo onde foi obtido a concentração máxima de carotenoides volumétricos (P_m) para cada ensaio.

Os fatores de conversão de substrato em produto - $Y_{p/s}$ (μg g^{-1}), substrato em biomassa - $Y_{x/s}$ (g g^{-1}) e biomassa em produto - $Y_{p/x}$ (μg g^{-1}) foram calculados através das equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$Y_{p/s} = \frac{P_m - P_O}{S_O - S} \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X_O}{S_O - S} \quad (3)$$

$$Y_{p/x} = \frac{P_m - P_O}{X_m - X_O} \quad (4)$$

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

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

$$P_c = \frac{P_m - P_O}{t_f} \quad (5)$$

$$P_x = \frac{X_m - X_O}{t_f} \quad (6)$$

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

4.8.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar a diferença entre os parâmetros estatísticos e quando necessário as diferenças entre as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Para comparação entre dois tratamentos foi utilizado o teste t ($p<0,05$). As superfícies de resposta ou contorno foram construídas de acordo com Rodrigues; Iemma, 2014. Todos os dados foram tratados com auxílio de Statistica 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS SUBSTRATOS

A caracterização parcial dos substratos utilizados na formulação dos meios para a produção de carotenoides e a relação Carbono (C) Nitrogênio (N) dos meios de produção estão apresentados na Tabela 5.

Os meios de cultivo devem atender as necessidades dos micro-organismos que utilizam como fonte de carbono e frequentemente de energia, diversos açúcares e polissacarídeos, bem como a fonte de nitrogênio onde podem ser usados sais e aminoácidos (SCHIMIDELL et al., 2001). A relação C:N tem influência na produção de diversas biomoléculas, como carotenoides (MACHADO, 2013), lipídeos (LADEIRA, 2016) e exopolissacarídeos (RIBEIRO, 2015). Sendo assim, os coprodutos agroindustriais e a relação C:N dos mesmos é muito importante para a composição dos meios de produção para as leveduras.

Tabela 5 - Caracterização parcial dos substratos e razão C:N dos meios testados

Substrato	% C	%N	%H	Meio de cultivo ($g\ L^{-1}$)	Relação C:N
Água de maceração de milho (AMM)[a]	17,83	3,80	2,41	AMM (36,5 $g\ L^{-1}$) + M (6,0 $g\ L^{-1}$)	6,04
Melaço de cana de açúcar (M)	31,47	0,04	-	AMM (35,6 $g\ L^{-1}$) + G (6,6 $g\ L^{-1}$)	6,20
Glicerol bruto (G)	31,50	<0,07	2,27		
Extrato de levedura	41,26	11,45	5,35	YM (Extrato de malte e levedura)	8,28
Extrato de malte	42,11	1,41	5,42		
Peptona	12,16	2,70	1,46		

[a]Cipolatti (2012)

O meio YM está caracterizado por uma relação C:N de 8,28 e as concentrações de carbono 8,39% e 1,02% de nitrogênio foram superior ao observado por Cipolatti, (2012) (C:N 6,20), em função dos diferentes lotes dos substratos utilizados. Os meios agroindustriais apresentaram uma relação C:N muito similar, onde a contribuição da concentração de carbono

(8,39%) e de nitrogênio (1,37%) para o meio AMM+M e concentração de carbono (8,42%) e de nitrogênio (1,35%) para o meio AMM+G foram observadas.

Corroborando com este trabalho, Vustin, Belykh, Kishilova (2004) descreveram que um dos fatores que influencia positivamente na produção de carotenoides é a razão C:N superior a 5,0. Portanto, é possível afirmar que os três meios de cultivo apresentam essa condição, tornando-os boas fontes de carbono e nitrogênio para esta bioprodução.

5.2 ACOMPANHAMENTO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVOS EM BATELADA

Durante o acompanhamento do processo de produção de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa* para os três meios testados YM (Figura 3), AMM+G (Figura 4) e AMM+M (Figura 5), respectivamente, foi possível observar que o pH para os meios YM e AMM+M apresentou comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h de cultivo, após ocorreu um aumento chegando ao final de cultivo com 8,5 e 9,0, respectivamente. Esse comportamento não foi verificado para o meio AMM+G que no início do cultivo mostrou pH 6,0 e nas primeiras 24 h o pH alcançou 7,0 aumentando gradativamente, chegando a pH 9,0 em 216 h de cultivo.

Este comportamento de pH também foi observado por Cipolatti (2012), que utilizou *R. mucilaginosa* para produção de carotenoides em meios agroindustriais semelhante a este trabalho. Esse declínio no pH ocorre provavelmente em consequência do desenvolvimento celular e da liberação de compostos como ácido acético, álcool ou intermediários do ciclo do ácido cítrico durante a fase de adaptação (VALDUGA et al., 2009).

A biomassa inicial dos cultivos foi aproximadamente em torno de 0,8 g L^{-1}, o meio YM foi o que apresentou maior produção de biomassa (7,1 g L^{-1} em 48 h) seguido do meio AMM+M (4,5 g L^{-1} em 120 h) e do meio AMM+G (4,20 g L^{-1} em 72 h). A levedura *R. mucilaginosa* também foi estudada por Lopes (2014), em meio YM, e após 168 h de cultivo a concentração de biomassa alcançou 4,24 g L^{-1}, valor inferior ao encontrado neste trabalho. Segundo o próprio autor os valores inferiores de biomassa obtida foram provavelmente devido à injúria celular ocorrida na levedura durante o armazenamento a qual foi submetida.

Cheng e Yang (2016) estudaram em seu trabalho a produção de carotenoides utilizando *R. mucilaginosa*. O cultivo submerso foi realizado a 120 rpm, 25°C por 216 h. O meio testado contendo melaço de cana de açúcar e extrato de levedura resultou numa

biomassa ao final do cultivo de 9,72 g L^{-1}, comparativamente ao meio YM de 8 g L^{-1}, havendo um incremento de 24 %. A redução nos teores de açúcares redutores totais no meio de cultivo foi de 10,89 para 0,29 g L^{-1} e 4,26 para 0,12 g L^{-1} no meio YM e agroindustrial, respectivamente.

A concentração de açúcares redutores inicial para o meio YM foi 10,2 g L^{-1} (Figura 3) sendo consumido pela metade nas primeiras 24 h de cultivo e após 120 h a concentração de açúcares caiu para 80 % da concentração inicial. Para o meio AMM+M o comportamento foi semelhante, caindo 50 % (Figura 4) nas primeiras 24 h e após 192 h para 75 %. Cipolatti (2012), também utilizando o meio com água de maceração de milho e melaço para a produção de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa* obteve o mesmo comportamento com queda de 50 % da concentração de açúcar nas primeiras 24 h de cultivo.

Figura 3 – Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio YM.

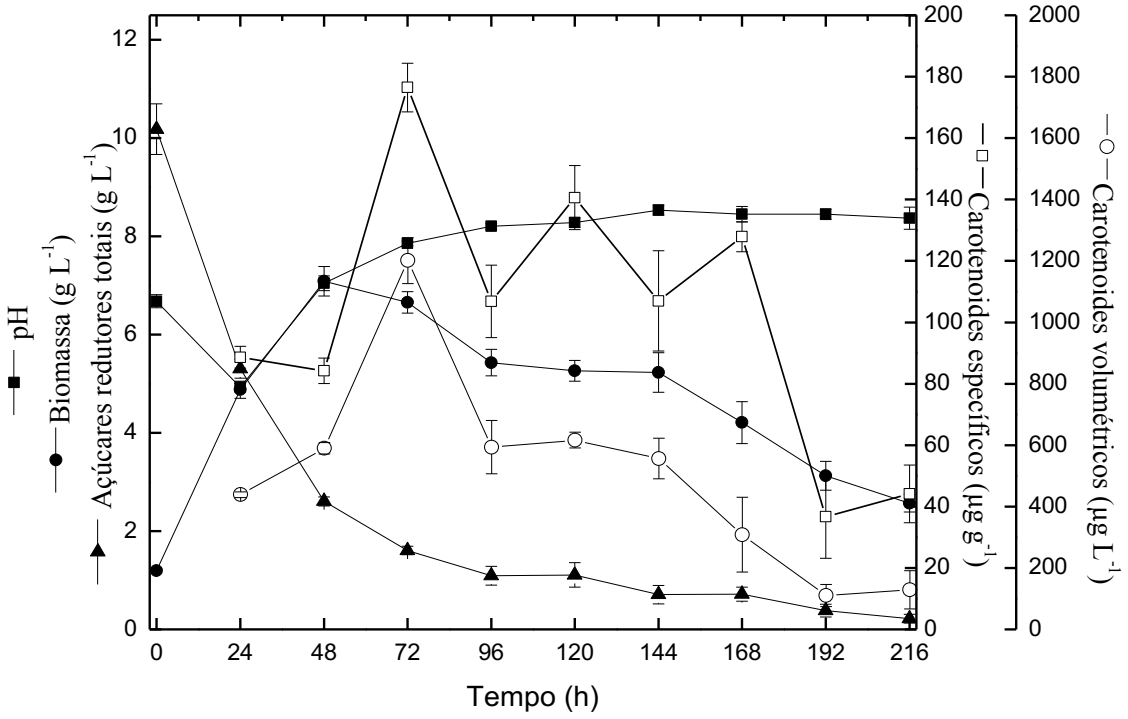


Figura 4 – Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio com água de maceração de milho (36,5 g L^{-1}) e melaço (6,0 g L^{-1}).

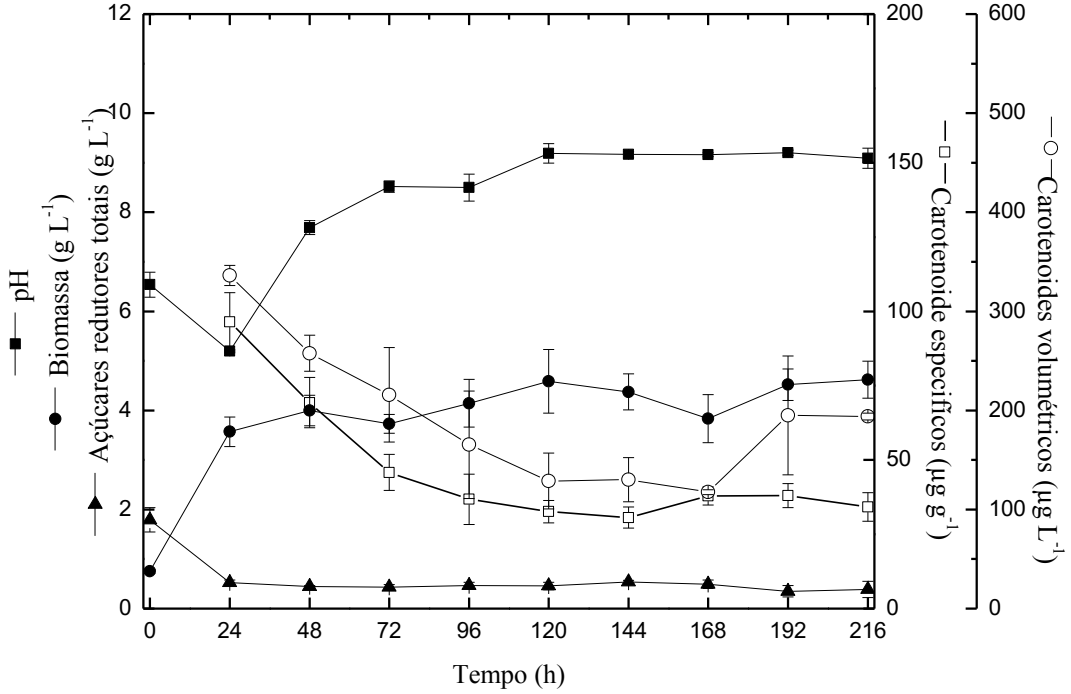
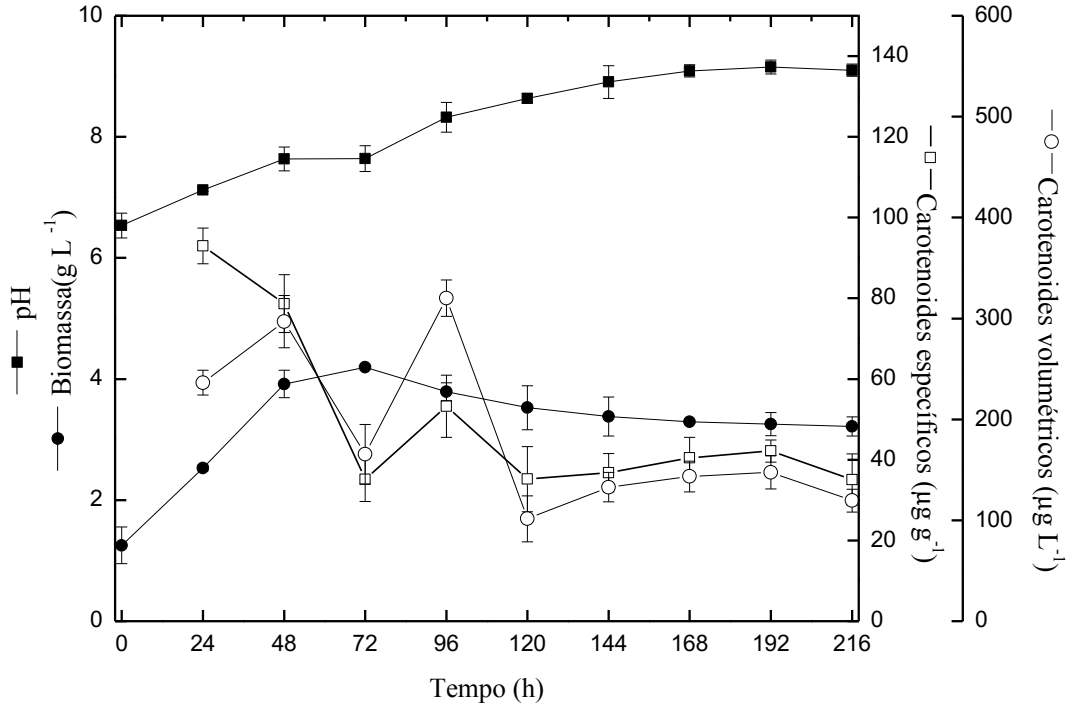


Figura 5 - Acompanhamento de pH, biomassa e açúcares redutores totais, carotenoides específicos e volumétricos da produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* ao longo de 216 h a 25°C e 180 rpm em meio com água de maceração de milho (35,6 g L^{-1}) e glicerol bruto (6,6 g L^{-1}).



O meio YM apresentou as maiores produções de carotenoides específicos e volumétricos, bem como a produtividade volumétrica (Tabela 6), tendo uma relação C:N superior aos dois meios agroindustriais testados, o que pode ter influenciado na produção de carotenoides e biomassa. Porém, a síntese de carotenoides foi similar para ambos os meios agroindustriais avaliados, com uma relação C:N próximo a 6,0 (Tabela 5), uma vez que não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos carotenoides específicos. Como a produção volumétrica máxima e as produtividades específica e volumétrica foram superior 12 %, 60 % e 55 %, respectivamente, para o meio AMM+M em relação ao meio AMM+G, o primeiro foi selecionado para continuidade deste estudo.

Tabela 6- Produção de carotenoides e produtividades pela *R. mucilaginosa* em diferentes meios de cultivo a 25°C, 180 rpm e pH inicial de 6,0.

Meio	CE (μg g^{-1})	CV (μg L^{-1})	Prod. (μg g^{-1} h^{-1})	Prod. (μg L^{-1} h^{-1})
AMM+M	96,4±9,8[a]	336,3±10,1 [a] (24 h)	4,0±0,4 [a]	14,0±0,4 [a]
AMM+G	78,7 ±7,2[a]	296,8±15,3 [b] (48 h)	1,6±0,1 [b]	6,22±0,7[b]

AMM+M: água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar; AMM+G: água de maceração de milho e glicerol bruto; CE: Carotenoides específicos; CV: Carotenoides volumétricos; Prod: produtividade. YM (72 h): CE (176±4,5 μg g^{-1}); CV (1200±74,88 μg L^{-1}); Prod (2,45 ±0,58 μg g^{-1} h^{-1}); Prod (15,13±2,15 μg L^{-1} h^{-1}); Médias ± desvio padrão (n=3); letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$), pelo teste t.

Cipolatti (2012) estudou a produção de carotenoides com a mesma levedura e condições de processo semelhantes ao deste trabalho. Em meio YM alcançou 1068 μg L^{-1} (93,9 μg g^{-1}), com o meio de água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar a produção de carotenoides foi de 150,6 μg L^{-1} (55,7 μg g^{-1}) e no meio contendo água de maceração de milho e glicerol bruto a produção de carotenoides foi 224,8 μg L^{-1} (68,1 μg g^{-1}), valores inferiores aos obtidos nesse trabalho. Um provável fator que pode ter influenciado estes resultados é devido ao fato dos coprodutos agroindustriais utilizados não serem dos mesmos lotes, modificando assim a composição destes e resultando nessa diferença.

Na Tabela 7 estão apresentados os parâmetros cinéticos dos cultivos em meio agroindustrial (AMM+G, AMM+M) e meio padrão (YM). Os fatores de conversão $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ ambos foram superiores para o meio AMM+M e para $Y_{P/X}$ a maior valor foi para o meio AMM+G.

Esses parâmetros cinéticos de conversão também foram relatados por Valduga et al. (2010), que estudaram a otimização do meio de cultivo para produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), em reator de bancada, em meio composto por 80 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de extrato de malte, aeração de 1,5 vvm,

agitação de 180 rpm, pH inicial de 4,0 aos 25ºC. A produção máxima de carotenoides totais foi 3131,3 μg L^{-1}, o fator de conversão de carbono orgânico total (TOC) nas células ($Y_{X/STOC}$) foi de 2,97 g g^{-1} (0-50 h) e 0,254 g g^{-1} (50-100 h), a produção específica de carotenoides foi de 390 μg g^{-1}, o fator de conversão do TOC em carotenoides ($Y_{P/STOC}$) foi de 107,8 μg g^{-1} (0-50 h) e 34,4 μg g^{-1} (50-100 h), enquanto o fator $Y_{P/Sglicose}$ foi de 69,59 μg g^{-1}.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos

Meio de cultivo	$Y_{P/S}$ (μg g^{-1})	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})	$Y_{P/X}$ (μg g^{-1})
YM	18,3±6,8	0,73±0,0	24,6±7,2
AMM+M	56,8±9,3	3,1 ±0,7	25,1±9,7
AMM+G	*	*	46,6±6,1

AMM+M: água de maceração de milho e melaço, AMM+G: água de maceração de milho e glicerol bruto
*não determinado

5.3 ESPECTROSCOPIA DE VARREDURA DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS

Durante o cultivo da levedura *R. mucilaginosa* com os três diferentes meios testados (YM, AMM+M e AMM+G) foi realizado diariamente a varredura dos extratos carotenogênicos, em comprimentos de onda de 200 a 750 nm, apresentados na Tabela 8 através dos picos observados.

A maioria dos carotenoides absorve comprimento de onda, resultando em espectros de três picos. Quanto maior o número de duplas ligações conjugadas maiores são os valores de λ_{max}, para o carotenoide β-caroteno λ_{max} ocorre a 425, 450 e 477 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). No acompanhamento da produção de carotenoides (Tabela 8), é possível observar que os comprimentos de onda ao longo do cultivo submerso praticamente não modificaram, provavelmente não ocorrendo mudança no perfil carotenogênico, para os meios de cultivo avaliados.

Com as mesmas condições de processo e micro-organismo deste trabalho, Cipolatti (2012) usando meio YM e meios agroindustriais M1 (4,8 g L^{-1} de glicerol bruto + 35,6 g L^{-1} de água de maceração de milho) e M2 (6,0 g L^{-1} de melaço + 36,5 g L^{-1} de água de maceração de milho), realizou a identificação dos carotenoides produzidos em 168 h através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Três carotenoides foram identificados, sendo o majoritário β-caroteno, seguido por astaxantina e luteína, exceto no meio M2, onde não se observou a produção de astaxantina, com 4430 μg L^{-1}, 333 μg L^{-1},

65 μg L^{-1} no meio YM, 820 μg L^{-1}, 268 μg L^{-1}, 63 μg L^{-1}no meio M1 e 750 μg L^{-1} e 62 μg L^{-1} no meio M2, respectivamente.

Tabela 8 – Valores máximos para os picos observados no espectro de varredura para os meios YM, AMM+M, AMM+G

	Meio de cultivo								
Tempo (h)	YM			AMM+M			AMM+G		
	Comp. de onda (nm)			Comp. de onda (nm)			Comp. de onda (nm)		
24	460	483	518	456	483	513	451	481	527
48	456	484	518	456	481	513	454	483	522
72	456	485	520	457	481	517	447	484	519
96	459	485	521	458	485	524	462	484	520
120	457	488	519	453	474	525	448	488	522
144	459	488	519	448	474	525	460	484	518
168	397	488	524	445	483	524	449	474	516
192	397	485	521	459	481	526	457	474	524
216	453	488	524	453	486	527	450	486	518

YM: meio extrato de malte e levedura, AMM+M: água de maceração de milho e melaço; AMM+G: água de maceração de milho e glicerol bruto.

Assim, como a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresenta a capacidade de produzir o β-caroteno como carotenoide majoritário, e o perfil espectrofotométrico foi praticamente constante durante o cultivo microbiano, foi adotado a estimativa da concentração de β-caroteno através deste método durante este trabalho. O meio agroindustrial contendo água de maceração de milho e melaço também foi selecionado, alcançando 336,3 μg L^{-1} (96,4 μg g^{-1}) de carotenoides totais, sendo aplicada à ferramenta de planejamento experimental para sua maximização na produção de carotenoides.

5.4 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM PROCESSO BATELADA

5.4.1 Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR)

Nesta segunda etapa do trabalho o meio contendo água de maceração de milho e melaço (AMM+M) foi selecionado para a maximização da produção de carotenoides através

de um Delineamento Composto Central Rotacional 2². A Tabela 9 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 da biomassa (a), pH (b), produção específica (c), produção volumétrica (d) e açúcares redutores totais (e) para os ensaios da bioprodução de carotenoides do DCCR.

Através da Tabela 9 é possível verificar uma variação nas respostas, como a máxima produção volumétrica de carotenoides de 407 μg L^{-1} (ensaio 3) a 1077 μg L^{-1} (ensaio 4), produção específica de 110,8 μg g^{-1} (ensaio 9) a 467,8 μg g^{-1} (ensaio 5), concentração de biomassa de 1,04 g L^{-1} (ensaio 5) a 8,73 g L^{-1} (ensaio 2), e razão C:N dos meios de produção que apresentaram uma variação de aproximadamente 7 (ensaio 5) a 107 (ensaio 2). A produtividade em carotenoides volumétricos variou de 2,85 μg L^{-1} h^{-1} (ensaio 1) a 7,22 μg L^{-1} h^{-1} (ensaio 2), a produtividade em carotenoides específicos de 0,75 μg g^{-1} h^{-1} (ensaio 8) a 3,25 μg g^{-1} h^{-1} (ensaio 5) e a produtividade em biomassa variou entre 0,01 g L^{-1} h^{-1} (ensaio 5) a 0,06 g L^{-1} h^{-1} (ensaio 2).

A concentração final de açúcares redutores totais variou de 0 g L^{-1} (ensaio 1) a 6,6 g L^{-1} (ensaio 6) sendo este ensaio o que possuía maior concentração de melaço inicial. Os fatores de conversão também obtiveram variações, Yp/s variou de 30,1 μg g^{-1} (ensaio 6) a 223,0 μg g^{-1} (ensaio 5), Yx/s ficou na faixa de 0,2 a 0,5 g g^{-1} e Yp/x variou de 123,5 μg g^{-1} (ensaio 9) a 1023,7 μg g^{-1} (ensaio 5).

Durante o acompanhamento do processo de produção de carotenoides no planejamento experimental (Figura 6) foi possível observar que o pH (Figura 6(a)) inicialmente em média de 5,5 para todos os ensaios, apresentou comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h após ocorrendo um aumento gradual ao longo do cultivo, com exceção do ensaio 5, onde não foi observado esse comportamento. A produção de biomassa máxima (Figura 6(b)) nos ensaios 1, 3 e 5 obtiveram uma concentração muito inferior aos demais ensaios de 2,6 g L^{-1}, 3,1 g L^{-1} e 1,0 g L^{-1}, respectivamente, sendo que estes ensaios possuíam as menores concentrações iniciais de melaço.

O consumo de açúcares redutores totais (Figura 6(e)) destes ensaios (1, 3 e 5) decresceu pela metade nas primeiras 24 h de cultivo e ao término não foi detectado a presença de açúcares redutores totais, indicando o consumo total pela levedura. Nos ensaios onde as concentrações de melaço eram na faixa acima de 10 g L^{-1} o consumo foi mais lento, caindo a 50 % em 96 h de cultivo. Nos ensaios 2, 4 e 6 com maior concentração inicial de melaço ao término do cultivo ainda se observou uma quantidade de açúcares redutores totais, não havendo o consumo total pela levedura.

Em geral através da Tabela 9 é possível observar que a razão C:N acima de 40 promoveu uma maior concentração celular e produção volumétrica de carotenoides. No entanto a produção específica de carotenoides não sofreu grande influência quanto a razão C:N inicial do meio de cultivo, com exceção do ensaio 5 que obteve a maior produção especifica de carotenoides com a menor razão C:N inicial de 7 neste planejamento.

Somashekar e Joseph (2000) estudaram a relação entre produção de lipídios e carotenoides pela levedura *Rhodotorula gracili*s. Os cultivos submersos foram realizados em frascos agitados utilizando-se três meios, MSM1 (g L^{-1}): glicose 40,0, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,4, $CaCl_2$ 0,4, KH_2PO_4 0,75, extrato de levedura 1,5, NH_4NO_3 0,286 e os meios MSM2 e MSM3 com os mesmos constituintes do meio MSM1, modificando a concentração de NH_4NO_3 para 1,144 e 4,576 g L^{-1}, respectivamente. A razão C/N dos meios MSM1, MSM2 e MSM3 foram 160, 40 e 10, respectivamente. A máxima produção de carotenoides específicos (26 mg g^{-1}) foi observada em MSM3 com razão C/N mais baixa de 10, no entanto a produção de lipídeos não foi favorecida gerando 18 %. Já no meio MSM1 com alta razão C/N, a produção de lipídios foi de 57 % e a produção de carotenoides foi de 1,4 mg g^{-1}. O crescimento celular foi de 13, 3,4 e 2,2 g L^{-1}, respectivamente para MSM1, MSM2 e MSM3. Portanto indicando que ambas produções de carotenoides específicos e lipídios não está associada ao crescimento celular.

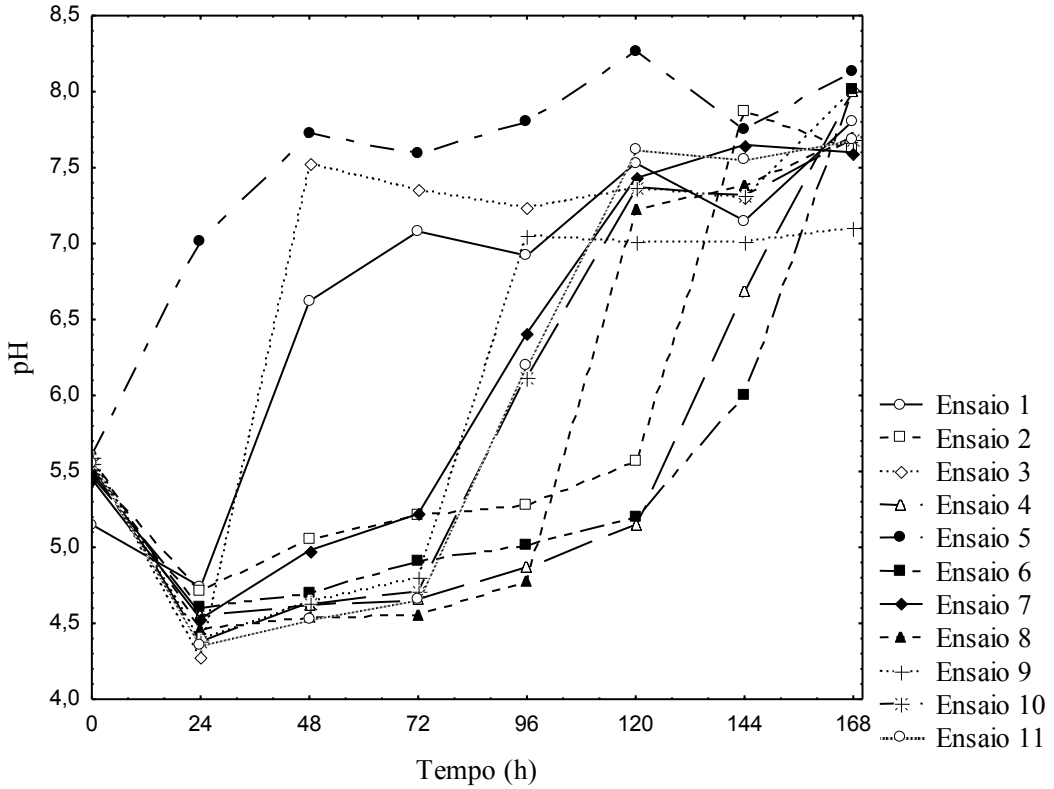
Saenge et al. (2011) estudaram a produção de lipídios e carotenoides pela levedura *Rhodotorula glutinis.* Foi cultivada em efluente do moinho de óleo de palma (POME) com apenas a adição de sulfato de amônio e Tween 20 como fonte de nitrogênio e surfactante, respectivamente. Foi realizado um planejamento experimental para otimizar a produção concomitante de lipídios e carotenoides, sendo três fatores investigados, a demanda química de oxigênio (10 a 40 g L^{-1}), razão C/N (140 a 180) e concentração de Tween 20 (0,5 a 1,5 g L^{-1}). Entre os três fatores investigados, a razão C/N contribuiu com um efeito significativo sobre os lipídios e produção de carotenoides. A análise da superfície de resposta revelou que a razão ótima de C/N para a biomassa (7,91 g L^{-1}) foi 140, enquanto que o conteúdo lipídico (41,08 %) e os carotenoides (148,7 mg L^{-1}) foram máximos em razão C/N de 180 e 170, respectivamente.

Tabela 9 – DCCR 2² (valores reais e codificados) para maximização da produção de carotenoides no meio agroindustrial.

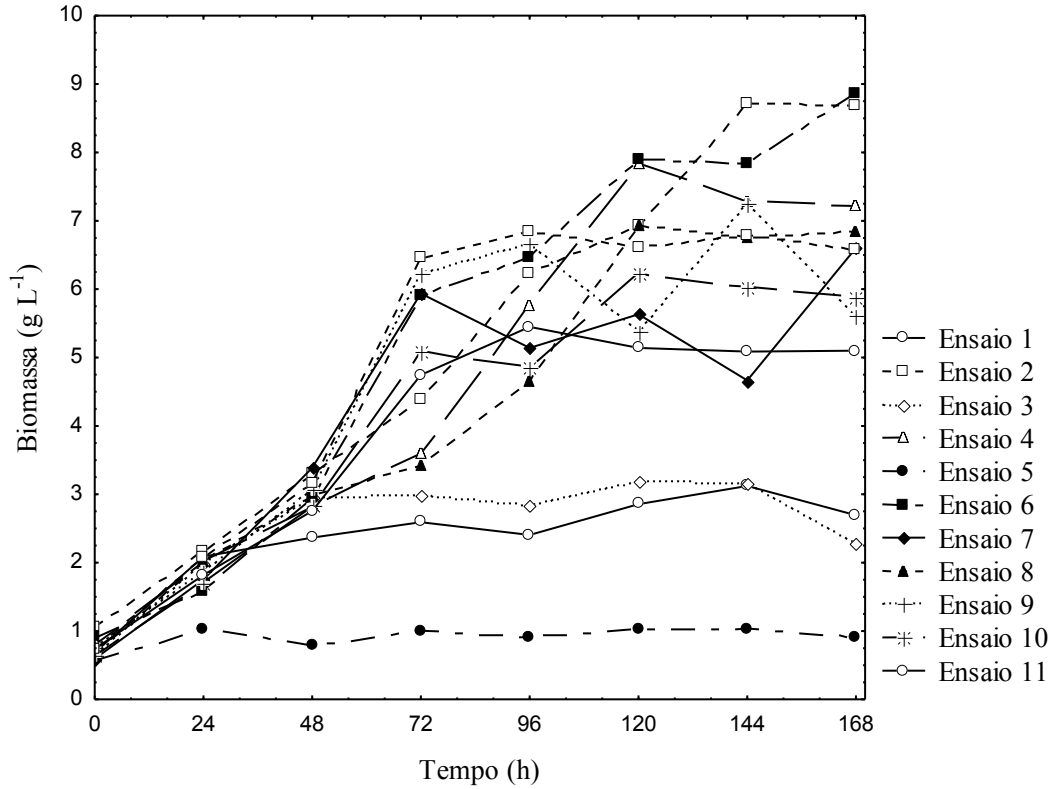
Ensaio	X_1	X_2	R_1	DR_1	R_2	DR_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}
1	-1 (10)	-1 (3,5)	2,6	9,6	479(168h*)	8,3	177,9	0	70,6	0,3	238,8	0,02	2,8	1,0	27,5
2	+1 (50)	-1 (3,5)	8,7	9,8	1040(144h*)	3,1	119,2	5,1	40,2	0,3	135,6	0,06	7,2	0,8	106,9
3	-1 (10)	+1 (9,5)	3,1	7,2	407(120h*)	27,5	128,0	0	57,2	0,3	160,0	0,03	3,3	1,0	13,2
4	+1 (50)	+1 (9,5)	7,2	9,0	1077(168h*)	6,5	149,3	3,5	42,7	0,2	167,7	0,04	6,4	0,8	45,7
5	-1,41 (1,8)	0 (6,5)	1,0	2,6	484(144h*)	13,4	467,8	0	223,0	0,2	1023,7	0,01	3,3	3,2	7,0
6	+1,41 (58,2)	0 (6,5)	7,8	1,4	991(144h*)	11,7	126,5	6,6	30,1	0,2	142,7	0,05	6,9	0,8	72,0
7	0 (30)	-1,41 (2,2)	6,6	3,7	844(168h*)	9,6	127,8	1,5	44,5	0,3	140,4	0,04	5,0	0,7	102,8
8	0 (30)	+1,41 (10,7)	6,8	7,0	859(168h*)	11,1	125,8	1,6	74,7	0,5	139,8	0,04	5,0	0,7	27,1
9	0 (30)	0 (6,5)	7,2	12,5	804(144h*)	5,1	110,8	1,6	39,7	0,3	123,5	0,05	5,5	0,7	42,0
10	0 (30)	0 (6,5)	5,8	8,2	747(168h*)	2,1	127,3	1,3	43,7	0,3	142,7	0,03	4,4	0,7	42,0
11	0 (30)	0 (6,5)	5,1	23,5	670(144h*)	13,8	130,4	1,76	40,4	0,2	152,2	0,04	5,5	1,0	42,0

X_1= Melaço (g L^{-1}); X_2= Água de maceração de milho (g L^{-1}); R_1= Biomassa (g L^{-1}); R_2= Carotenoides volumétricos (µg L^{-1}); R_3=Carotenoides específicos (µg g^{-1}); R_4= Açúcares redutores totais (g L^{-1}); DR_1= Desvio relativo da biomassa; DR_2= Desvio relativo de carotenoides volumétricos; $R_5=Y_{p/s}$ (µg g^{-1}); $R_6= Y_{x/s}$ (g g^{-1}); $R_7=Y_{p/x}$ (µg g^{-1}); $R_8= P_x$ (g L^{-1} h^{-1}); $R_9= P_c$ (µg L^{-1} h^{-1}); $R_{10}= P_c$ (µg g^{-1} h^{-1}); R_{11} = C:N (relação carbono:nitrogênio no meio de cultivo). *tempo de cultivo da máxima produção de carotenoides.

Figura 6 - Cinética de acompanhamento: pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), carotenoides volumétricos (d) e açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCCR 2² no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm**.**

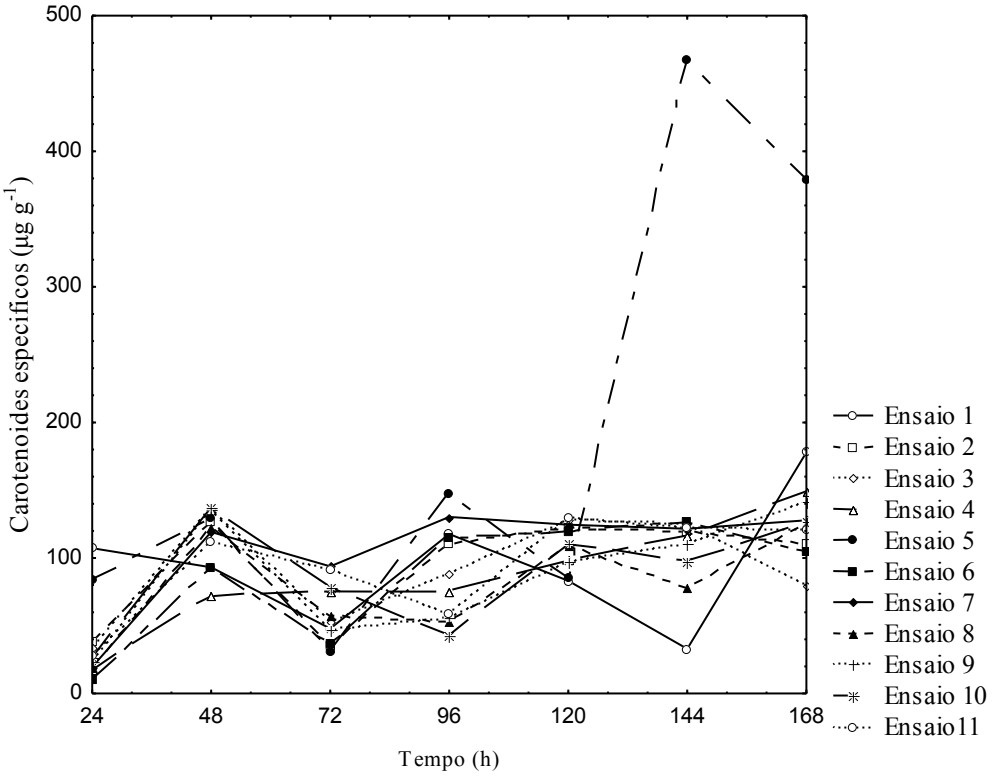


(a)

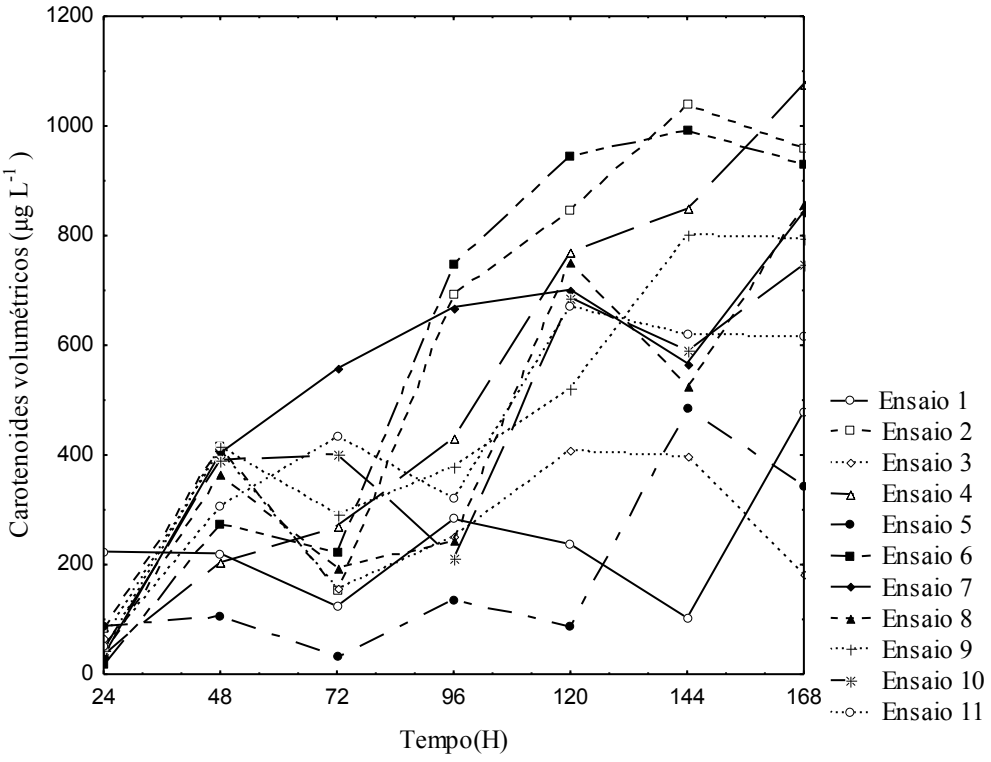


(b)

Cont. **Figura 6** - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), carotenoides volumétricos (d) e açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCCR 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm**.**

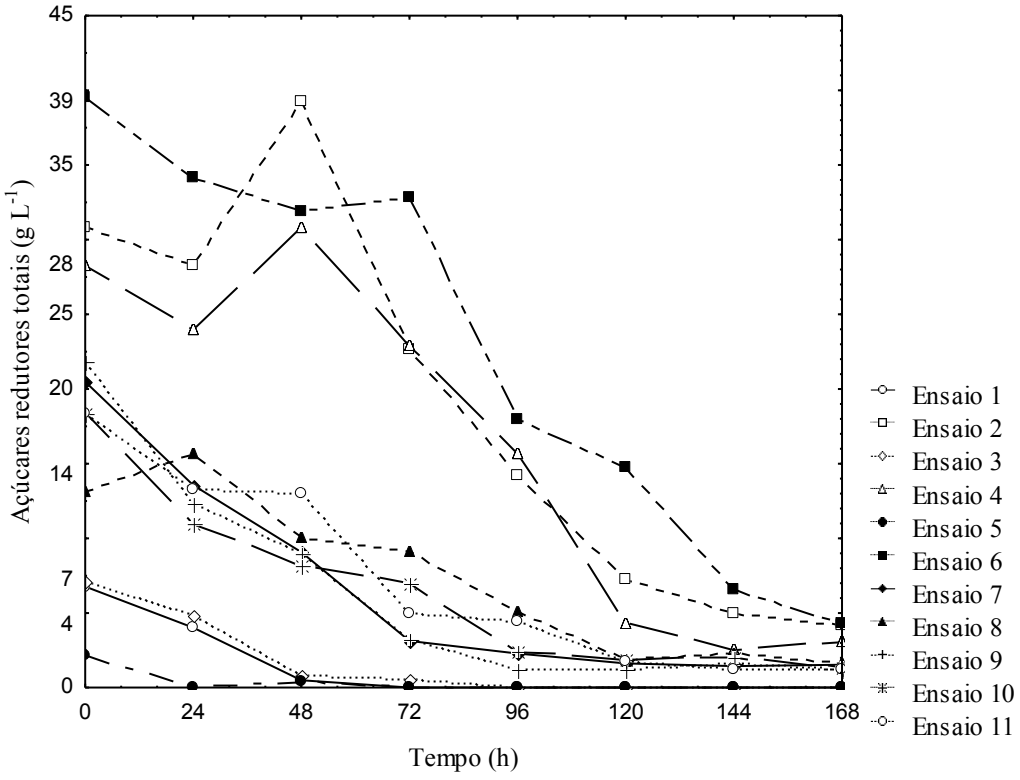


(c)



(d)

Cont. **Figura 6** - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), carotenoides volumétricos (d) e açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCCR 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço por 168h, a 25°C e 180 rpm**.**



(e)

5.4.1.1. Verificação de modelos empíricos para o DCCR

Em função das concentrações das variáveis melaço e água de maceração de milho foi realizado a verificação dos modelos de segunda ordem analisando as respostas carotenoides específicos e volumétricos, biomassa e açúcares redutores totais.

Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, desvio padrão e limites de confiança, apresentados no Apêndice 3. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentando nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Na Tabela 10 para a resposta biomassa é possível verificar que os coeficientes do modelo referentes ao melaço (L) e melaço (Q) foram significativos ($p \leq 0,05$). Na produção volumétrica somente o coeficiente melaço (L) foi significativo ($p \leq 0,05$). Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 11.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,93 e 0,96 foram calculados na ANOVA, bem como a razão $F_{calculado}/F_{tabelado}$ de 13 e 11,77 respectivamente, para carotenoides

volumétricos e biomassa. Portanto, pode-se concluir que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais. A produção de carotenoides específicos e açúcar redutor total não possibilitou a construção de modelos preditivos e significativos.

Tabela 10 – Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nivel de significância para biomassa e carotenoides volumétricos para o DCCR.

Biomassa (g L^{-1})					Carotenoides volumétricos (µg L^{-1})				
	CR	EP	t(5)	p		CR	EP	t(5)	p
Media*	6,35	0,41	14,63	<0,01	Media*	740,50	55,35	13,37	<0,01
X_1(L)*	2,46	0,51	9,66	<0,01	X_1(L)*	243,95	67,89	7,18	<0,01
X_1(Q)*	-0,86	0,60	-2,82	<0,01	X_1(Q)	-12,59	81,00	-0,31	0,76
X_2(L)	-0,87	0,51	-0,34	0,74	X_2(L)	-1,73	67,89	-0,05	0,96
X_2(Q)	0,28	0,60	0,93	0,39	X_2(Q)	44,74	81,00	1,10	0,32
X_1X_2	-0,50	0,72	-1,38	0,22	X_1X_2	27,25	95,86	0,56	0,60

* ($p \leq 0,05$); X_1: Melaço; X_2: Água de maceração de milho.

Tabela 11- Análise de variância para o Delineamento Composto Central Rotacional 2^2

Carotenoides volumétricos (µg L^{-1})				
Fonte de variação	GL	Soma Quadrática	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	1	474713,5	474713,5	66,5
Resíduos	9	64184,1	7131,6	
TOTAL	10	538897,6		
Biomassa (g L^{-1})				
Fonte De variação	GL	Soma Quadrática	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	2	53,9	26,9	52,5
Resíduos	8	4,1	0,5	
TOTAL	10	58,0		

Carotenoides volumétricos (R:0,93, $F_{1; 9; 0,95} = 5,12$); Biomassa (R:0,96, $F_{2; 8; 0,95} = 4,46$).

A partir da análise de variância e dos coeficientes de regressão foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento as

respostas em funções das variáveis carotenoides volumétricos (Equação 7) e biomassa (Equação 8).

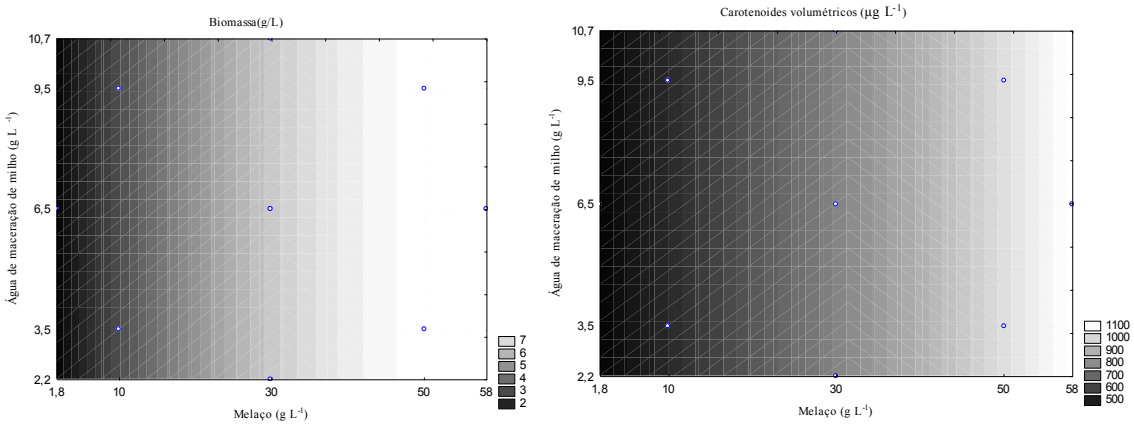
$$\text{Carotenoides volumétricos } (\mu g\ L^{-1}) = 763,8 + 243,9X_1 \quad (7)$$

$$\text{Biomassa } (g\ L^{-1}) = .6,35 + 2,46M - 0,94\ X_1^2 \quad (8)$$

Onde: X_1: melaço.

Na Figura 7, estão apresentadas as curvas de contorno geradas a partir dos modelos preditivos e significativos. O aumento da concentração da água de maceração de milho, independente da concentração de melaço de cana de açúcar, não influenciou na concentração de biomassa (Figura 7(a)) e na produção de carotenoides volumétricos (Figura 7(b)). No entanto, o incremento na concentração do melaço em toda a faixa de concentração de água de maceração de milho estudada aumentou significativamente a produção carotenogênica e a biomassa microbiana.

Figura 7- Curvas de contorno para biomassa (a) e carotenoides volumétricos (b), para *R. mucilaginosa* no DCCR 2² no meio água de maceração de milho e melaço



Estes resultados estão de acordo com os ensaios 2 (50 g L^{-1} de melaço e 3,5 g L^{-1} de água de maceração de milho) e 4 (50 g L^{-1} de melaço e 9,5 g L^{-1} de água de maceração de milho), da Tabela 9, que alcançaram as maiores produções de biomassa (8,73 g L^{-1} e 7,22 g L^{-1}) e carotenoides volumétricos 1040 µg L^{-1} (119,2 µg g^{-1}) e 1077 µg L^{-1} (149,3 µg g^{-1}), respectivamente, do DCCR. Os demais parâmetros do cultivo para os ensaios 2 e 4, respectivamente, foram ART final de 5,1 e 3,5 g L^{-1}, razão C:N 106,2 e 45,7, a produtividade em biomassa 0,06 g L^{-1} h^{-1} e 0,04 g L^{-1} h^{-1}, a produtividade de carotenoides

volumétrica 7,22 μg L^{-1} h^{-1} e 6,4 μg L^{-1} h^{-1} e a produtividade em carotenoides específicos 0,8 μg g^{-1} h^{-1} para ambos ensaios.

Adicionalmente, os desvios relativos entre os resultados experimentais e preditos pelos modelos (DR1, DR2), apresentados na Tabela 9, foram inferiores a 10 % (RODRIGUES e IEMMA, 2012) nesta região de interesse, dessa forma as Equações 7 e 8 prevêem bem o comportamento da produção volumétrica de carotenoides e biomassa, frente às variáveis estudadas.

Assim, a partir da análise dos resultados do planejamento experimental, é possível perceber que o aumento da concentração do melaço pode favorecer um incremento na produção em carotenoides, enquanto que a faixa de concentração empregada para a água de maceração de milho não influenciou significativamente. Portanto, um segundo planejamento experimental foi realizado para avaliar o efeito das concentrações dos componentes do meio de produção, onde a faixa de concentração do melaço foi ampliada e a da água de maceração de milho diminuída.

5.4.2 Planejamento Composto Central 2² (DCC)

A Tabela 12 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 da biomassa (a), pH (b), produção específica (c), produção volumétrica (d) e açúcares redutores totais (e) para os ensaios da bioprodução de carotenoides do DCC.

Através da Tabela 12 é possível verificar uma variação nas respostas, como a produção volumétrica de carotenoides de 623 μg L^{-1} (ensaio 1) a 1404 μg L^{-1} (ensaio 4), produção específica de 127,71 μg g^{-1} (ensaio 1) a 173,39 μg g^{-1} (ensaio 4), concentração de biomassa de 4,88 g L^{-1} (ensaio 1) a 8,10 g L^{-1} (ensaio 4), e razão C:N dos meios de produção variou de 109,26 (ensaio 3) a 435,75 (ensaio 2). A produtividade em carotenoides volumétricos variou de 3,71 μg L^{-1} h^{-1} (ensaio 1) a 8,36 μg L^{-1} h^{-1} (ensaio 4), a produtividade em carotenoides específicos de 0,71 μg g^{-1} h^{-1} (ensaio 6) a 1,15 μg g^{-1} h^{-1} (ensaio 7) e a produtividade em biomassa variou entre 0,03 g L^{-1} h^{-1} (ensaio 1) e 0,05 g L^{-1} h^{-1} (ensaio 2, 4, 6 e 8). O teor final de açúcares redutores totais variou de 3,14 g L^{-1} (ensaio 3) a 15,66 g L^{-1} (ensaio 2) sendo este o que possuía maior concentração de melaço. Para os fatores de conversão também foi observado variações, Yp/s de 17,24 μg g^{-1} (ensaio 1) a 36,34 μg g^{-1} (ensaio 4), Yx/s ficou na faixa de 0,12 a 0,19 g g^{-1}, Yp/x variou de 133,6 μg g^{-1} (ensaio 6) a 208,2 μg g^{-1} (ensaio 7).

Durante o acompanhamento do processo de produção de carotenoides no planejamento experimental (Figura 8) foi possível observar que o pH, inicialmente em média de 5,5 para todos os ensaios, apresentou comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h, após ocorrendo um aumento gradual ao longo do cultivo. Os açúcares redutores totais destes ensaios decresceram em média 50% nas primeiras 72 h de cultivo. Nos ensaios 2 e 4 a levedura ao fim do cultivo não foi capaz de consumir por completo o ART no meio, apresentando ao final em média de 12 g L^{-1}, sendo estes ensaios os que continham a maior concentração de melaço do planejamento (70 g L^{-1}).

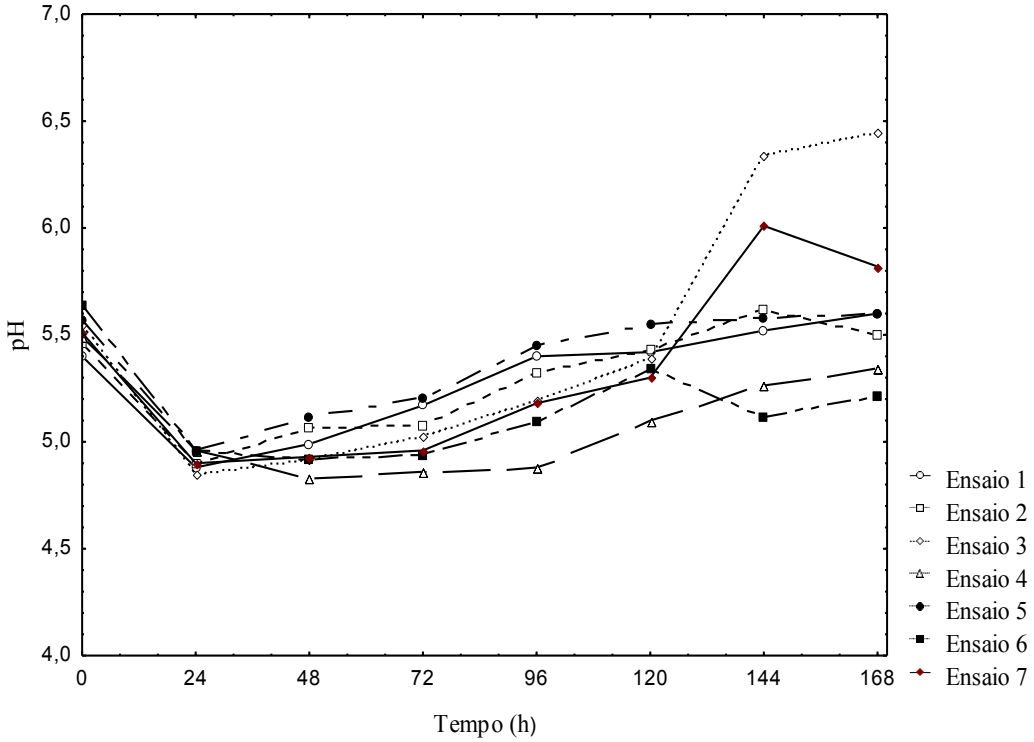
É possível verificar também que em geral a razão C:N superior a 200 (ensaio 1 e ensaio 2) resultou em menor concentração celular e produção volumétrica de carotenoides. O ensaio 1 com razão C:N inicial do meio de 370,17 resultou em 4,88 g L^{-1} de biomassa, já no ensaio 4 que alcançou a maior concentração celular de 8,1 g L^{-1} a razão C:N do meio de cultivo foi de 143,65. Sugerindo que a razão C:N superior levou a uma inibição do crescimento celular. Em termos de produção volumétrica de carotenoides é possível perceber que a razão C:N entre 109,26 e 192,39 obteve valores superiores a 1000 μg L^{-1}, e em razão C:N de 370 ocorreu uma diminuição da produção de carotenoides. No entanto, para a produção específica de carotenoides não sofreu influência da razão C:N.

Tabela 12 – Planejamento Central Composto 2² (valores reais e codificados) para maximização da produção de carotenoides no meio agroindustrial.

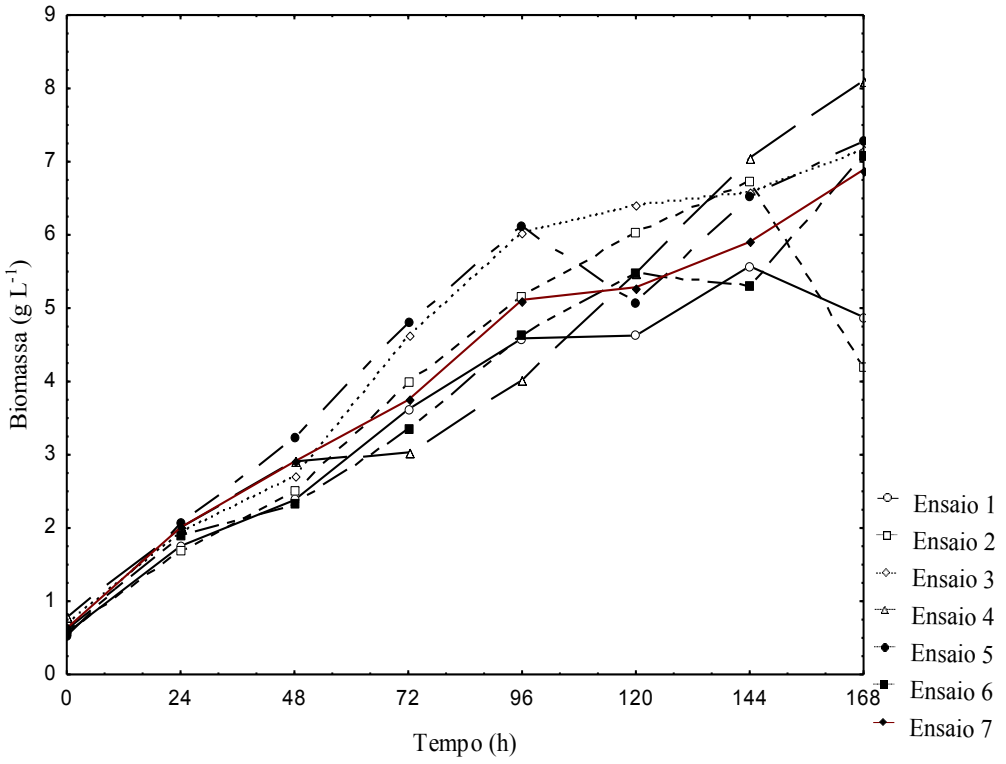
Ensaio	X_1	X_2	R_1	DR_1	R_2	DR_2	R_3	DR_3	R_4	R_5	R6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}
1	-1 (50)	-1 (0,58)	4,88	8,20	623(168h*)	9,31	127,71	7,17	4,86	17,24	0,12	144,45	0,03	3,71	0,76	370,14
2	+1 (70)	-1 (0,58)	6,74	0,89	909(144h*)	8,14	134,98	1,57	15,66	26,58	0,18	147,57	0,05	6,31	0,93	435,75
3	-1 (50)	+1 (3,41)	7,17	0,98	1077(168h*)	6,87	163,62	6,50	3,14	27,54	0,17	166,27	0,04	6,41	0,97	109,26
4	+1 (70)	+1 (3,41)	8,1	4,94	1404(168h*)	3,49	173,39	0,35	12,69	36,34	0,19	191,76	0,05	8,36	1,03	143,65
5	0 (60)	0 (2)	7,28	5,36	1209(168h*)	11,75	166,15	6,72	4,57	27,40	0,18	156,11	0,04	5,23	0,85	192,39
6	0 (60)	0 (2)	7,07	2,55	1104(168h*)	3,35	156,22	0,74	3,67	21,07	0,16	133,60	0,05	5,77	0,71	192,39
7	0 (60)	0 (2)	6,98	1,29	1141(168h*)	6,49	165,61	6,15	3,55	29,61	0,14	208,21	0,04	7,33	1,15	192,39

X_1= Melaço (g L^{-1}); X_2= AMM (g L^{-1}); R_1= Biomassa (g L^{-1}); R_2= Carotenoides volumétricos (µg L^{-1}); R_3=Carotenoides específicos (µg g^{-1}); R_4= Açúcares (g L^{-1}); DR_1= Desvio relativo biomassa; DR_2= Desvio relativo carotenoides volumétricos; DR_3= Desvio relativo carotenoides especifico; $R_5=Y_{p/s}$ (µg g^{-1}); $R_6= Y_{x/s}$ (g g^{-1}); $R_7=Y_{p/x}$ (µg g^{-1}); $R_8= P_x$ (g L^{-1} h^{-1}); $R_9= P_c$ (µg L^{-1} h^{-1}); $R_{10}= P_c$ (µg g^{-1} h^{-1}); R_{11} = C:N (relação carbono: nitrogênio no meio de cultivo). *Horas de cultivo

Figura 8 - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), e carotenoides volumétricos (d), açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCC 2² no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm.

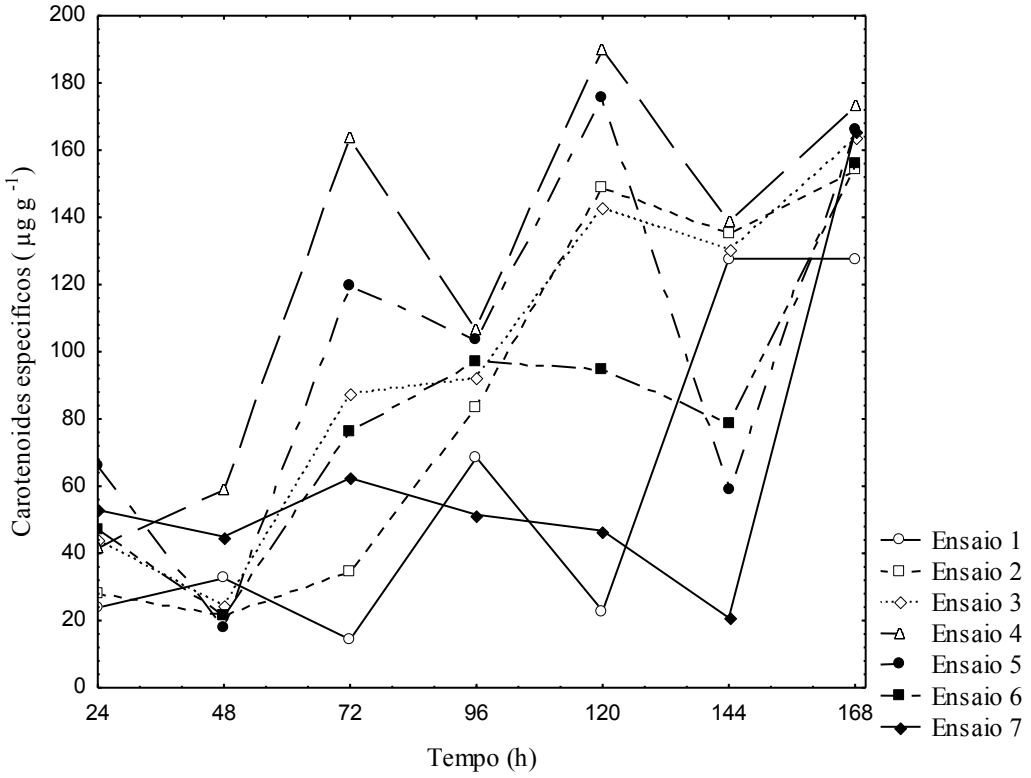


(a)

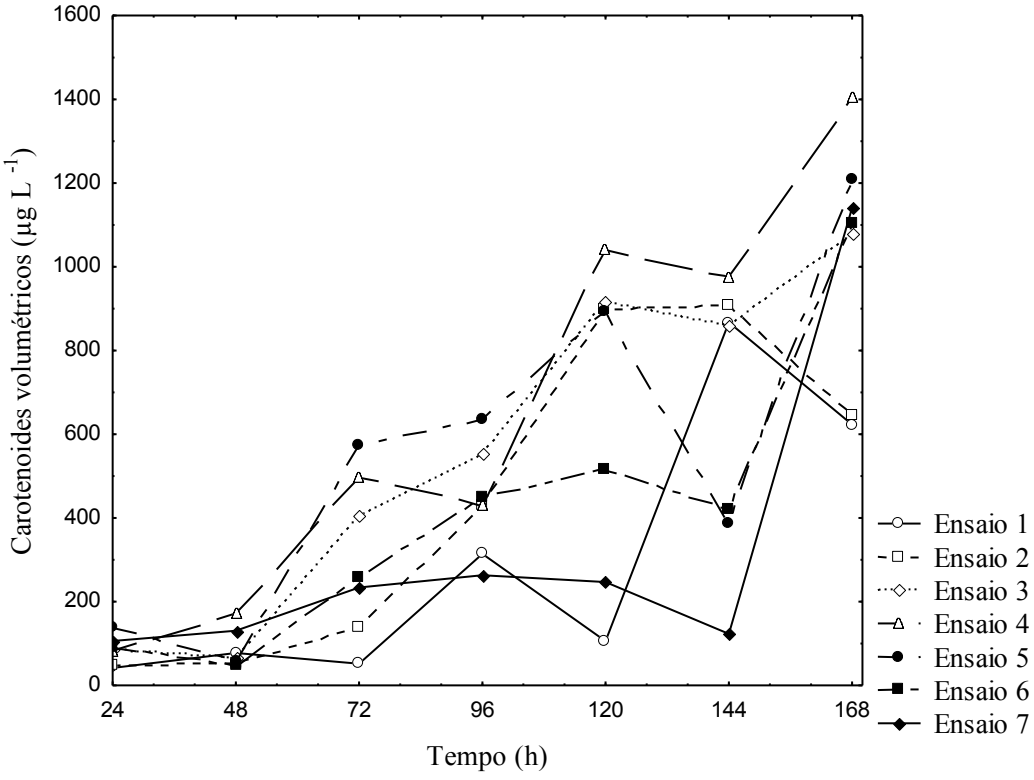


(b)

Cont. **Figura 8** - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), e carotenoides volumétricos (d), açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCC 2² no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm.

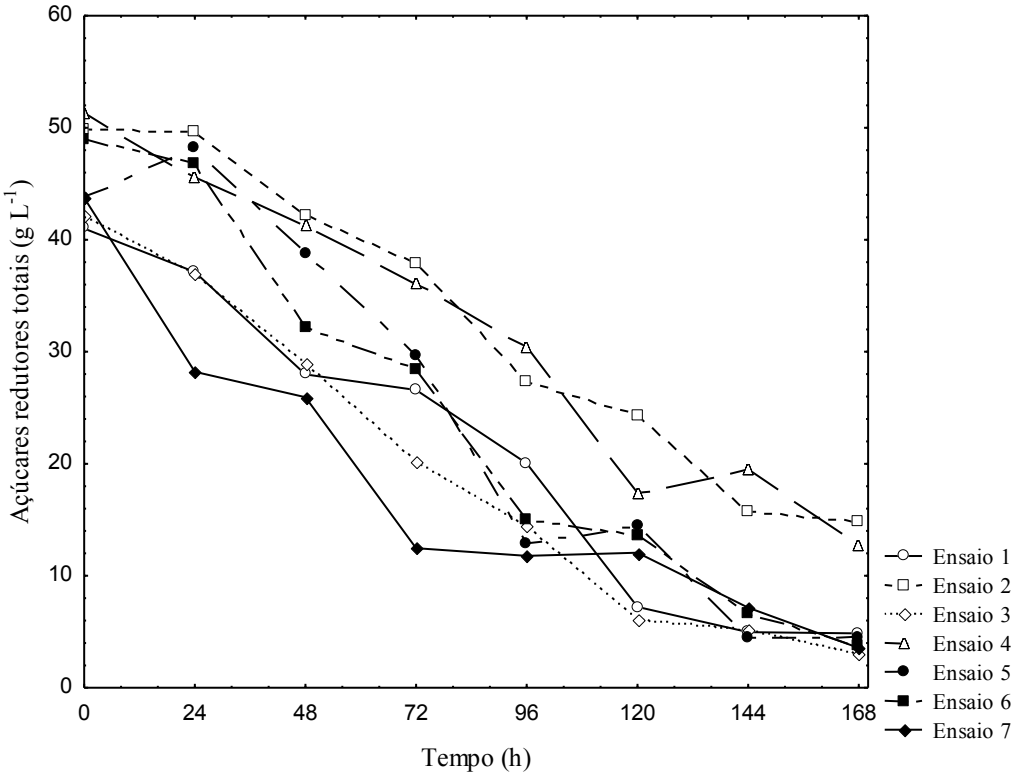


(c)



(d)

Cont. **Figura 8** - Cinética de acompanhamento do pH (a), biomassa (b), carotenoides específicos (c), e carotenoides volumétricos (d), açúcares (e) para *R. mucilaginosa* no DCC 2^2 no meio água de maceração de milho e melaço por 168 h, a 25°C e 180 rpm.



(e)

5.4.2.1 Verificação de modelos empíricos para DCC

Em função das concentrações das variáveis melaço e água de maceração de milho foi realizada a verificação dos modelos de primeira ordem, analisando as respostas carotenoides específicos e volumétricos, biomassa e açúcares redutores totais. Para a verificação do modelo foram calculados os efeitos, desvio padrão e limites de confiança, apresentados no Apêndice 4. Os coeficientes de regressão, bem como análise de variância (ANOVA), estão apresentando nas Tabelas 13 e 14, respectivamente.

Na Tabela 13, para as respostas biomassa e carotenoides volumétricos, é possível verificar que os coeficientes do modelo referentes ao melaço (L) e água de maceração de milho (L) foram significativos a 95% e 90% de confiança, respectivamente. Na produção específica somente o coeficiente água de maceração de milho (L) foi significativo ($p \leq 0,05$). Os termos que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da Análise de Variância (ANOVA), como mostra a Tabela 14.

Os coeficientes de correlações (R) de 0,93, 0,87 e 0,96 foram calculados na ANOVA, respectivamente, para carotenoides volumétricos, específicos e biomassa. Com isso pode-se concluir que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais. A razão $F_{calculado}/F_{tabelado}$ foi 3,4 (carotenoides volumétricos), 2,48 (carotenoides específicos) e 2,91 (biomassa).

Tabela 13 - Coeficiente de regressão (CR), erro padrão (EP) e nivel de significância para biomassa, carotenoides específicos e carotenoides volumétricos para o DCC.

Biomassa (g L^{-1})					Carotenoides específicos (µg g^{-1})				
	CR	EP	t(3)	P		CR	EP	t(3)	P
Média*	6,88	0,12	57,17	p<0,01	Média*	154,85	4,10	37,71	p<0,01
X_1(L)*	0,69	0,31	4,37	p<0,01	X_1(L)	4,25	10,86	0,78	0,49
X_2(L)*	0,91	0,31	5,72	p<0,01	X_2(L)*	18,75	10,86	3,45	p<0,01
X_1X_2	-0,23	0,31	-1,45	0,24	X_1X_2	0,75	10,86	0,13	0,89

Carotenoides volumétricos (µg L^{-1})				
	CR	EP	t(3)	P
Média**	1067,71	44,92	23,7	p<0,01
X_1(L)**	151,5	118,8	2,54	0,083
X_2 (L)**	235,5	118,8	3,96	0,028
X_1X_2	12	118,8	0,20	0,85

* ($p \leq 0,05$); ** ($p \leq 0,1$); X_1: Melaço; X_2: Água de maceração de milho

A partir da análise de variância e dos coeficientes de regressão foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas que representam o comportamento das respostas em funções das variáveis carotenoides volumétricos (Equação 9), carotenoides específicos (Equação 10) e biomassa (Equação 11).

$$\text{Carotenoides volumétricos (µg } L^{-1}) = 1067,7 + 151,50\ X_1 + 235,50\ X_2 \quad (9)$$

$$\text{Carotenoides específicos (µg } g^{-1}) = 154,85 + 18,75\ X_2 \quad (10)$$

$$\text{Biomassa (g } L^{-1}) = .6,38 + 0,7\ X_1 + 0,91\ X_2 \quad (11)$$

Onde: X_1: melaço; X_2 :água de maceração de milho

Os desvios relativos entre os resultados experimentais e preditos pelos modelos, apresentados na Tabela 12, foram inferiores a 15 % (RODRIGUES e IEMMA, 2014). Dessa forma, as Equações 9, 10 e 11 prevêem bem o comportamento da produção volumétrica e especifica de carotenoides e biomassa, frente às variáveis estudadas.

Tabela 14 - Análise de variância para o DCC 2^2

Carotenoide volumétricos (μg L^{-1})				
Fonte de variação	GL	Soma quadrática	Média quadrática	Fcalculado
Regressão	2	3136650	156825,4	14,6
Resíduos	4	42957,4	10739,3	
TOTAL	6	356607,4		
Carotenoides específicos (μg g^{-1})				
Fonte de variação	GL	Soma quadrática	Média quadrática	Fcalculado
Regressão	1	1406,2	1406,25	16,40
Resíduos	5	428,6	85,72	
TOTAL	6	1843,8		
Biomassa (g L^{-1})				
Fonte de variação	GL	Soma Quadrática	Média quadrática	Fcalculado
Regressão	2	5,2	2,6	20,2
Resíduos	4	0,5	0,1	
TOTAL	6	5,7		

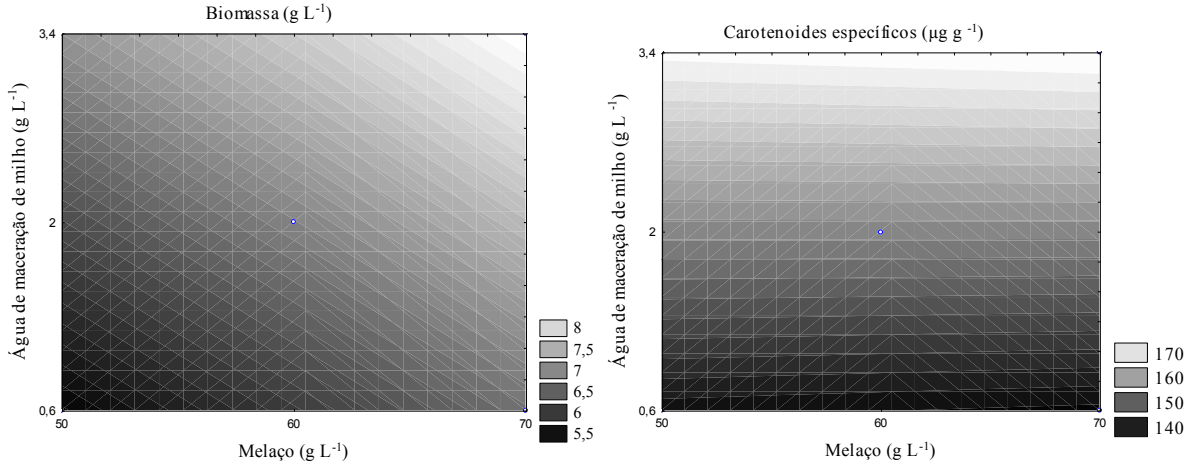
Carotenoides volumétricos (R: 0,93, $F_{2;\,4;\,0,90} = 4,32$); Carotenoides específicos (R: 0,87, $F_{1;\,5;\,0,95} = 6,61$); Biomassa (R: 0,96, $F_{2;\,4;\,0,95} = 6,94$).

Na Figura 9, estão apresentadas as curvas de contorno geradas a partir dos modelos preditivos e significativos. O aumento da concentração da água de maceração de milho e do melaço de cana de açúcar incrementaram a produção volumétrica de carotenoides (Figura 9 (c)) e a biomassa (Figura 9 (a)). Porém, o aumento do carotenoide específico foi independente da concentração de melaço no meio (Figura 9 (b)).

Estes resultados estão de acordo com o ensaio 4 (70 g L^{-1} de melaço e 3,41 g L^{-1} de água de maceração de milho), que ocorreu nos níveis máximos das variáveis estudadas,

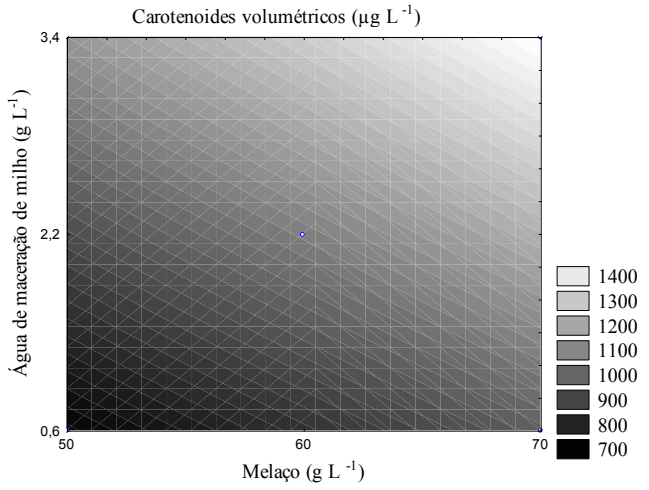
verificando as maiores produções de carotenoides volumétricos (1404 µg L^{-1}), carotenoides específicos (173 µg g^{-1}) e biomassa (8,1 g L^{-1}) deste DCC. O ART final deste ensaio foi de 12,69 g L^{-1}, razão C:N de 143,65, $Y_{p/s}$ de 36,34 µg g^{-1}, $Y_{x/s}$ de 0,19 g g^{-1}, $Y_{p/x}$ de 191,76 µg g^{-1}, P_x de 0,05 g L^{-1} h^{-1}, P_c de 8,36 µg L^{-1} h^{-1}, P_c de 1,03µg g^{-1} h^{-1}.

Figura 9- Curvas de contorno para biomassa (a), carotenoides específicos (b), carotenoides volumétricos (c) para *R. mucilaginosa* no delineamento composto central 2² no meio água de maceração de milho e melaço.



(a)

(b)



(c)

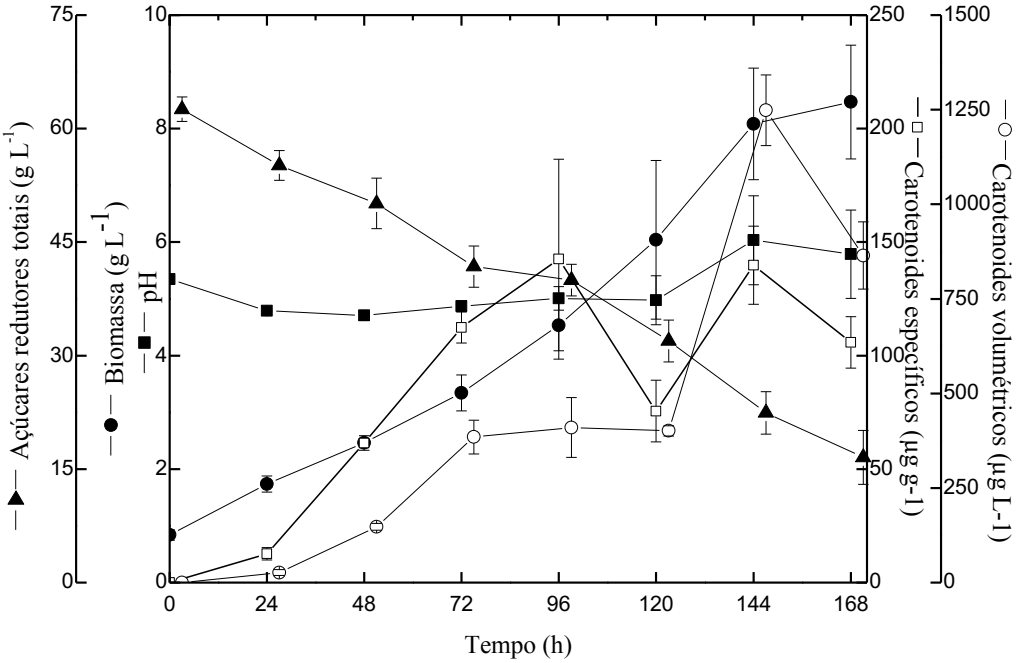
Assim, a partir da análise dos resultados do planejamento experimental é possível perceber que o aumento da concentração do melaço favoreceu um incremento na produção em carotenoides, e que a faixa de concentração empregada para a água de maceração de milho também influenciou significativamente.

5.5 VALIDAÇÃO DO MODELO PARA A BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES COM MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR 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: melaço 70 g L^{-1} e água de maceração de milho 3,41 g L^{-1}. 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.

A cinética (Figura 10) apresentou o comportamento esperado, sendo possível observar que o pH inicialmente em média de 5,8 apresentou um comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h, ao término chegando a uma média de 6,0. Os açúcares redutores totais decresceram, em média 50 % nas primeiras 96 h, sendo que ao fim do cultivo a levedura não foi capaz de consumir por completo o ART no meio, apresentando ao final média de 15 g L^{-1}, como já era esperado. A produção volumétrica de carotenoides alcançou uma concentração máxima de 1248,5 µg L^{-1} (152,5 µg g^{-1}). A biomassa inicial foi em torno de 0,8 g L^{-1} aumentando gradativamente e ao final do cultivo a biomassa máxima foi de 7,9 g L^{-1}.

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



A Tabela 15 mostra os resultados da validação para as respostas carotenoides volumétricos, carotenoides específicos e biomassa, onde todas obtiveram desvios inferiores a 20 %, se adequando bem ao modelo proposto (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Produções carotenogênicas superiores foram alcançadas neste trabalho comparativamente a Otero (2011) que utilizou a mesma levedura, no meio formulado com água de parboilização de arroz (39,91 g L^{-1}) e glicerol bruto (17,31 g L^{-1}) com razão C:N de 6,20, a 25°C, 180 rpm, atingindo 360 µg L^{-1} (18,76 µg g^{-1}), com 12,5 g L^{-1} de biomassa, em 168h de cultivo. Em continuidade Cipolatti (2012) ao cultivar a mesma cepa microbiana, no meio com água de maceração de milho (35,6 g L^{-1}) e glicerol bruto (4,8 g L^{-1}) tendo relação C:N de 6,20, alcançou uma produção de carotenoides de 150,6 µg L^{-1} (55,7 µg g^{-1}) em 120 h de cultivo.

Tabela 15: Respostas da validação do modelo empírico do DCC.

	Carotenoides volumétricos (µg L^{-1})	Carotenoides específicos (µg g^{-1})	Biomassa (g L^{-1})
Resposta prevista	1454,2	173,6	8,18
Resposta experimental	1248,5	152,5	7,99
Desvio do modelo (%)	-16,48	13,83	2,32

n=3

Aksu e Eren (2005) estudaram em seu trabalho a produção de carotenoides utilizando *R. mucilaginosa* NRRL-2502, em cultivo submerso em frascos agitados a 100 rpm, 30°C por 240 h, com resíduos agroindustriais. O meio agroindustrial contendo melaço (20 g L^{-1}) obteve uma produção de carotenoides de 89 mg L^{-1} e uma concentração de biomassa de 4,2 g L^{-1}.

Cheng e Yang (2016) também avaliaram em seu trabalho a produção de carotenoides utilizando *R. mucilaginosa* BCRC23454, em cultivo submerso em frascos agitados a 120 rpm, 25°C por 216 h, com resíduos agroindustriais. O meio agroindustrial contendo melaço (20 g L^{-1}) e extrato de levedura (3 g L^{-1}) resultou em uma produção de carotenoides de 2611 µg L^{-1} (268,6 µg g^{-1}), e no meio com resíduos de ketchup (20 g L^{-1}) e extrato de levedura (3 g L^{-1}) o valor encontrado foi de 2234,9 µg L^{-1} (376,3 µg g^{-1}).

Na literatura ainda são descritos outros trabalhos para produção de carotenoides com outras espécies de *Rhodotorula*, como Santos (2010), que utilizou dois tipos de glicerol

bruto e P.A (10, 20 e 30 g L^{-1}), a 30°C, 150 rpm, por 96h, com pH inicial de 7,0, para *R. glutinis*. A maior produção de biomassa (4,05 g L^{-1}) com 30 g L^{-1} foi verificada com o glicerol bruto, isso devido à presença de micronutrientes (K, Na e P), que contribuíram para o crescimento celular. Buzzini et al. (2005) realizaram uma otimização para produção de carotenoides por *R. graminis* DBVPG 7021, variando as concentrações de metais de 0 a 50 ppm (Fe^{3+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Al^{2+} e Zn^{2+}), em meio YNB adicionado de 2% de glicose. A produção máxima de 803,2 μg g^{-1} em meio YNB adicionado de 2% de glicose e com concentração de 25ppm de Fe^{3+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Al^{2+} e Zn^{2+}. As condições operacionais do processo foram 25°C, por 120h, com 150 rpm, sem ajuste do pH.

Banzatto, Freita e Mutton (2013) avaliaram a produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* utilizando meios de cultivo a base de caldo, melaço e xarope de cana de açúcar, em 40 g L^{-1} de açúcar redutor. A produção de carotenoides foi realizada em cultivos submersos em frascos agitados (200 rpm), 30ºC, pH 5,5 a 72 h. A concentração de carotenoides totais para o caldo, melaço e xarope de cana foi aproximadamente 2000, 2700 e 1700 μg L^{-1}, respectivamente.

Rios et al. (2015), utilizando água de parboilização de arroz como substrato alternativo para a produção de carotenoides por *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 alcançaram 5,3 μg mL^{-1} (628,8 μg g^{-1}). Machado e Burkert (2015), utilizando o meio agroindustrial com 40 g L^{-1} de melaço e 6,5 g L^{-1} água de maceração de milho, nas mesmas condições de processo deste trabalho, porém com *Sporidiobolus pararoseus* alcançaram 520,9 μg L^{-1} (73,1 μg g^{-1}), resultados inferiores comparados a este trabalho com a *R. mucilaginosa*, demonstrando o potencial desta levedura.

Portanto a utilização do meio agroindustrial, com substratos alternativos de menor valor agregado, pode viabilizar esta produção e minimizar os custos do processo.

5.6 PROCESSOS EM BATELADA ALIMENTADA

Para o estudo do processo em batelada alimentada foram considerados os resultados dos ensaios anteriores apresentados na Tabela 16. Inicialmente a produção de carotenoides no meio agroindustrial (M1) atingiu cerca de 40 % em relação ao meio padrão (YM) e no meio M3 62 %. Após a maximização da produção e validação dos modelos empíricos foi possível alcançar, com 70 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho (M2), 1248,5 μg L^{-1} (152,5 μg g^{-1}), uma produção similar ao YM e um incremento aproximadamente de 370 % na produção volumétrica, comparado ao meio

contendo 6 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar e 36,5 g L^{-1} água de maceração de milho (AMM+M), que atingiu 336,3 μg L^{-1} (96,4 μg g^{-1}). Sendo assim a cada etapa do trabalho foi possível observar um incremento na produção de carotenoides e biomassa.

Um outro aspecto muito importante para ressaltar é a minimização dos custos com o meio de produção, uma vez que o custo estimado do meio agroindustrial (M2), em relação ao meio padrão YM, é aproximadamente 80 % inferior.

Além desses resultados o meio com 6,5 g L^{-1}AMM +1,8 g L^{-1} M (M1) foi selecionado pela elevada síntese de carotenoides (467,8 μg g^{-1}), em relação aos demais meios testados, e o esgotamento do ART que ocorreu em 24 h (Figura 6 (e)), sendo a estratégia da batelada alimentada conduzida a cada 24 h. O meio com 3,4 g L^{-1}AMM +70 g L^{-1} M (M2) foi selecionado na maximização de carotenoides, sendo a alimentação na batelada alimentada realizada em 168 h. O meio de cultivo contendo 6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M (M3) também foi escolhido, pois obteve bons resultados de carotenoides volumétricos (740,3 μg L^{-1}) e específicos (122,8 μg g^{-1}) juntamente sendo levado em consideração o consumo de açúcares redutores totais do processo em batelada, onde nessa concentração de melaço ocorreu o esgotamento do açúcar redutor total em 96 h de cultivo.

Os tempos de alimentação foram escolhidos para cada meio devido principalmente ao consumo de açúcares redutores analisados no processo em batelada. Para o meio M1 foi visto que ao longo de 24 h a concentração de açúcares redutores totais eram completamente consumidos, logo, foi escolhido a estratégia de alimentação a cada 24 h. O volume de alimentação para o meio M1 foi escolhido devido a retirada de 10 mL diariamente para acompanhamento da cinética de produção, sendo assim o volume da alimentação foi de 10 mL. Para o meio M2 a alimentação foi realizada em 168 h devido a quantidade de açúcares redutores totais presentes no cultivo no processo em batelada alimentada, cerca de 30% do valor inicial do cultivo. O volume de alimentação de 50 mL para o meio M2 foi escolhido devido ao tempo de cultivo ser mais extenso e ser necessário para o acompanhamento a retirada de amostra diariamente. Para o meio M3 foi escolhida a alimentação em 96 h também em relação a concentração de açúcares redutores finais nesse tempo de cultivo e o volume de alimentação foi fixado em 20 % do volume inicial do meio, segundo Chang et al. (2013).

As Figuras 11, 12 e 13 apresentam as cinéticas de crescimento celular, produção de carotenoides específicos e volumétricos, pH e consumo de açúcares redutores totais em processo de batelada alimentada, para os três meios inicialmente testados com diferentes estratégias de alimentação (M1, M2 e M3) segundo a Tabela 4 (ensaios 1, 2 e 5).

Tabela 16 – Resultados obtidos nas etapas de seleção e otimização do meio agroindustrial

	Composição do meio	CV ($\mu g\ L^{-1}$)	C.E ($\mu g\ g^{-1}$)	BIO ($g\ L^{-1}$)	
Meio Padrão	**YM** (extrato de malte e levedura)	1200	176	7,1	Tabela 6
	AMM+G: 36,5 g L^{-1}AMM +6 g L^{-1} G	296,8	78,7	4,2	Tabela 6
Seleção meio agroindustrial	**AMM+M**: 35,6 g L^{-1}AMM +6,6 g L^{-1} M	336,3	96,4	4,5	Tabela 6
	M1: 6,5 g L^{-1}AMM +1,8 g L^{-1} M	484	467,8	1,0	Tabela 9 Ensaio 5
	M2: 3,4 g L^{-1}AMM +70 g L^{-1} M	1248,5	152,5	7,99	Tabela 15 Ensaio 4
Otimização	**M3:** 6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M	740,3	122,8	6,0	Tabela 9 Ensaio 9 a 11

M: melaço; AMM: água de maceração de milho; G: glicerol; CV: carotenoides volumétricos; CE: carotenoides específicos; BIO: biomassa.

Figura 11 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* no meio M1 (6,5 g L^{-1}AMM + 1,8 g L^{-1} M) por 168 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação a cada 24 h.

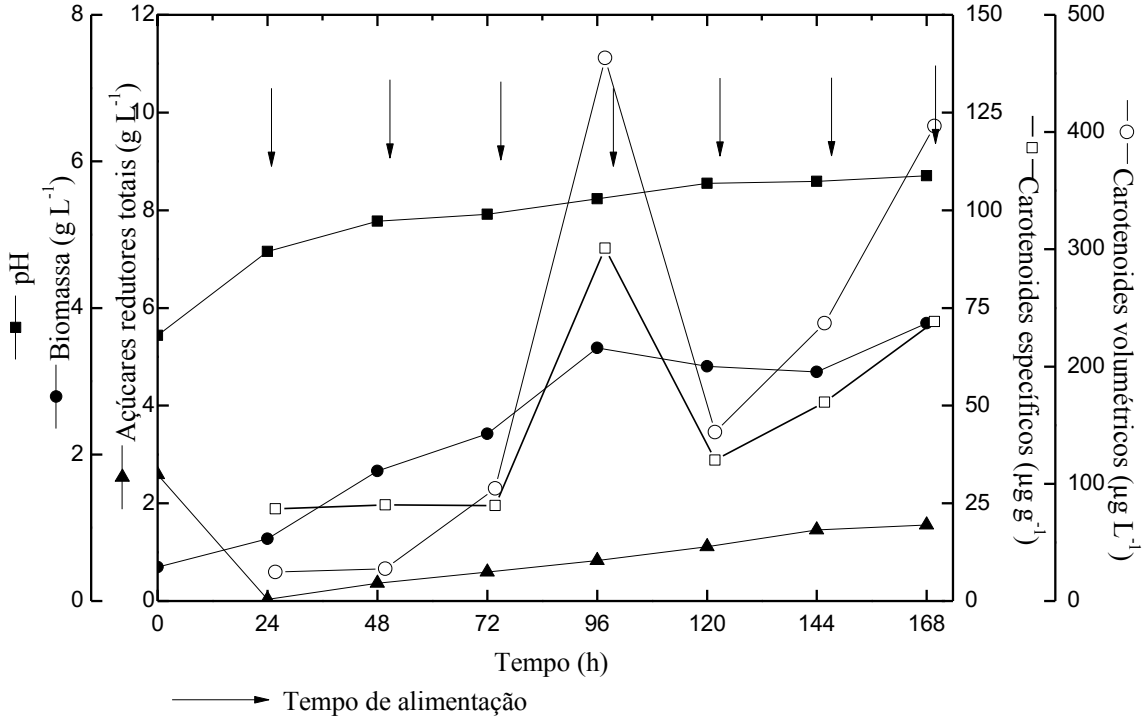


Figura 12 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* no meio M2 (3,4 g L^{-1}AMM + 70 g L^{-1} M) por 264 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 168 h.

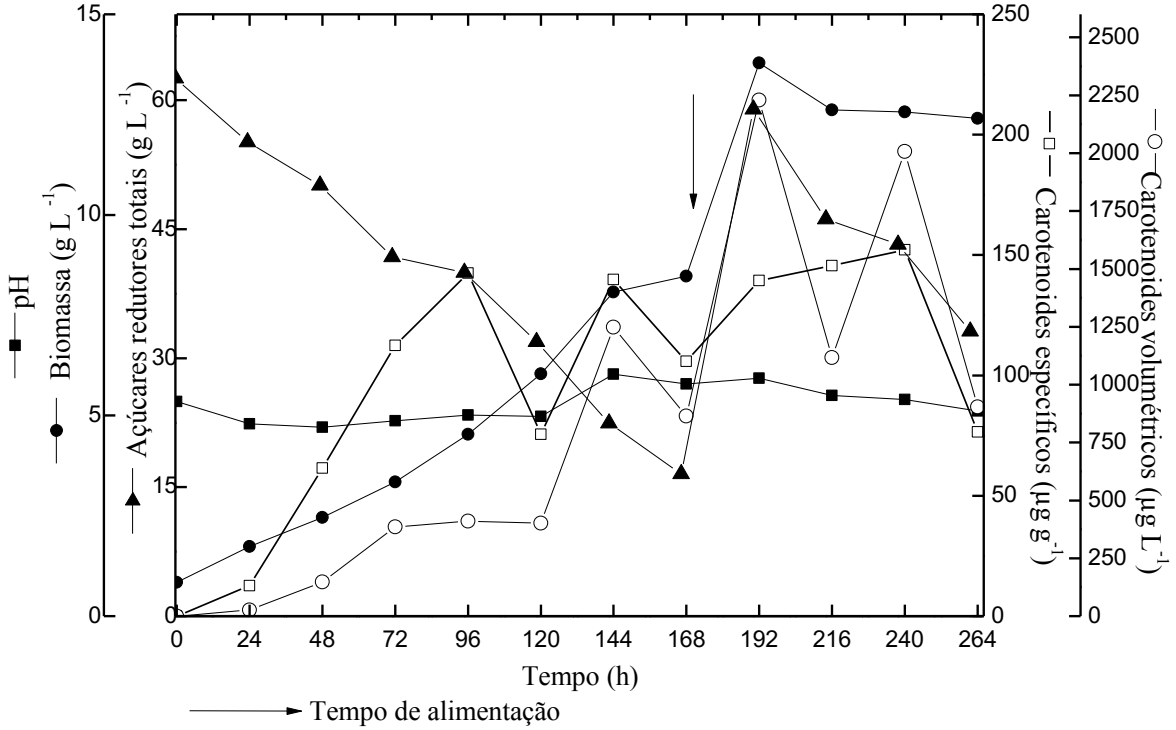
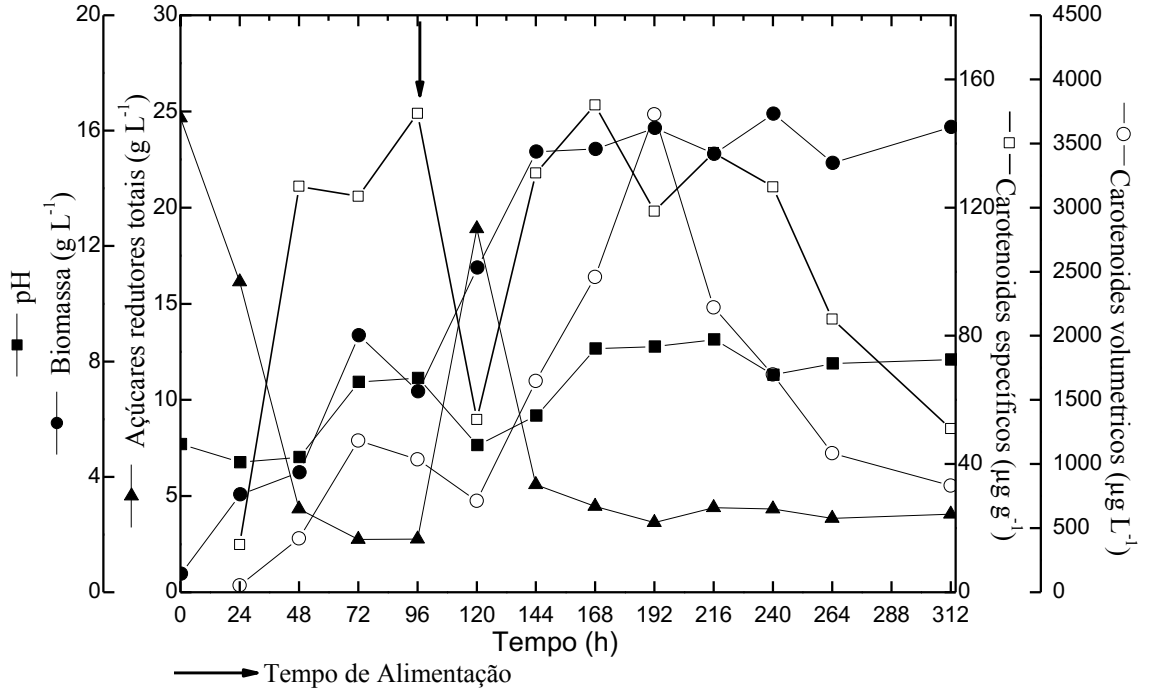


Figura 13 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* no meio M3 (3,4 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 312 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96 h.



Durante o acompanhamento do processo de produção de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa* para os três meios testados M1 (Figura 11), M2 (Figura 12) e M3 (Figura 13), respectivamente, foi possível observar que o pH para o meio M2 apresentou comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h de cultivo, após ocorreu um aumento gradativo a pH 7 em 168 h de cultivo, com a realização da alimentação o pH caiu novamente e ao final do cultivo chegou a uma média de pH 5,5. Esse comportamento de declínio do pH quando realizada a alimentação da batelada também foi observado no meio M3. Para o meio M1 que no início do cultivo mostrou pH 5,5 e nas primeiras 24 h o pH alcançou 7,0 aumentando gradativamente, chegando a pH 8,5 em 168 h de cultivo, não sendo observado um declínio no pH quando realizada a batelada diariamente. Um dos fatores que pode ter levado a esse comportamento foi à concentração de melaço inferior aos demais meios.

O meio M3 foi o que obteve maior produção de biomassa de 16,1 g L^{-1}, seguido do meio M2 (13,7 g L^{-1}) e do meio M1 (5,1 g L^{-1}), havendo um aumento de 18,75 % do meio M2 para o meio M3 e de 68,75 % do meio M1 para o meio M3. Pode-se perceber que o tempo de cultivo variou de 168, 264 e 312 h, para os meios M1, M2 e M3, respectivamente. Tendo como critério para o término dos cultivos a concentração celular permanecer constante em pelo menos três dias de amostragem. O teor de carotenoides volumétricos também variou nos diferentes meios em batelada alimentada alcançando 467,2 µg L^{-1} (90,3 µg g^{-1}), 2228,7 µg L^{-1} (139,4 µg g^{-1}) e 3726,7 µg L^{-1} (118,9 µg g^{-1}) para os meios M1, M2 e M3, respectivamente.

A Tabela 17 mostra a comparação dos resultados obtidos em batelada e em batelada alimentada para os três diferentes meios testados.

Tabela 17 - Comparação dos resultados em batelada e batelada alimentada para os três meios testados (M1, M2 e M3).

Meio	Batelada			Batelada alimentada		
	Biomassa (g L^{-1})	CV (µg L^{-1})	CE (µg g^{-1})	Biomassa (g L^{-1})	CV (µg L^{-1})	CE (µg g^{-1})
M1	1,0	484,8(144h*)	467,8	5,1±1,1^{b}	467,2±31,2^{c} (96h*)	90,3±10,4^{b}
M2	7,99	1248,5(144h*)	152,5	13,7±1,2^{a}	2228,7±153,9^{b} (192h*)	139,4±21,9^{a}
M3	6,0	740,3(144h*)	122,8	16,1±4,5 ^{a}	3726,7±357,8^{a} (192h*)	118,8± 13,7^{ab}

M1: 6,5 g L^{-1}AMM +1,8 g L^{-1} M; M2: 3,4 g L^{-1}AMM +70 g L^{-1} M; M3: 3,4 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M. *Horas de cultivo. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$), pelo teste Tukey.

Como pode ser visualizado (Tabela 17) houve um incremento na biomassa microbiana nos três meios testados, como era esperado através do processo em batelada alimentada. A concentração de biomassa foi cinco vezes superior no meio M1, ocorrendo no meio M2 um aumento de cerca de 70 % e no M3 o aumento foi de 168 %, quando comparados ao mesmo meio sem alimentação. A produção de carotenoides volumétricos aumentou 78 % e 400 %, nos meios M2 e M3, respectivamente. Na síntese de carotenoides e na concentração de biomassa a estratégia da batelada alimentada com o meio M1 foi significativamente ($p<0,05$) inferior aos demais. Também houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) na produção de carotenoides volumétricos no meio M3, que se destacou dos demais meios. Portanto, os melhores resultados para as diferentes estratégias de alimentação foram obtidos no meio M3 sendo o mesmo selecionado para continuidade dos estudos.

As Figuras 14 a 19 apresentam as cinéticas de crescimento celular, produção de carotenoides específicos e totais, pH e consumo de açúcares redutores totais em processo de batelada alimentada para o meio M3 em diferentes estratégias de alimentação, segundo a Tabela 4 (ensaios 3, 4, 6, 7, 8 e 9).

Figura 14 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 48 h.

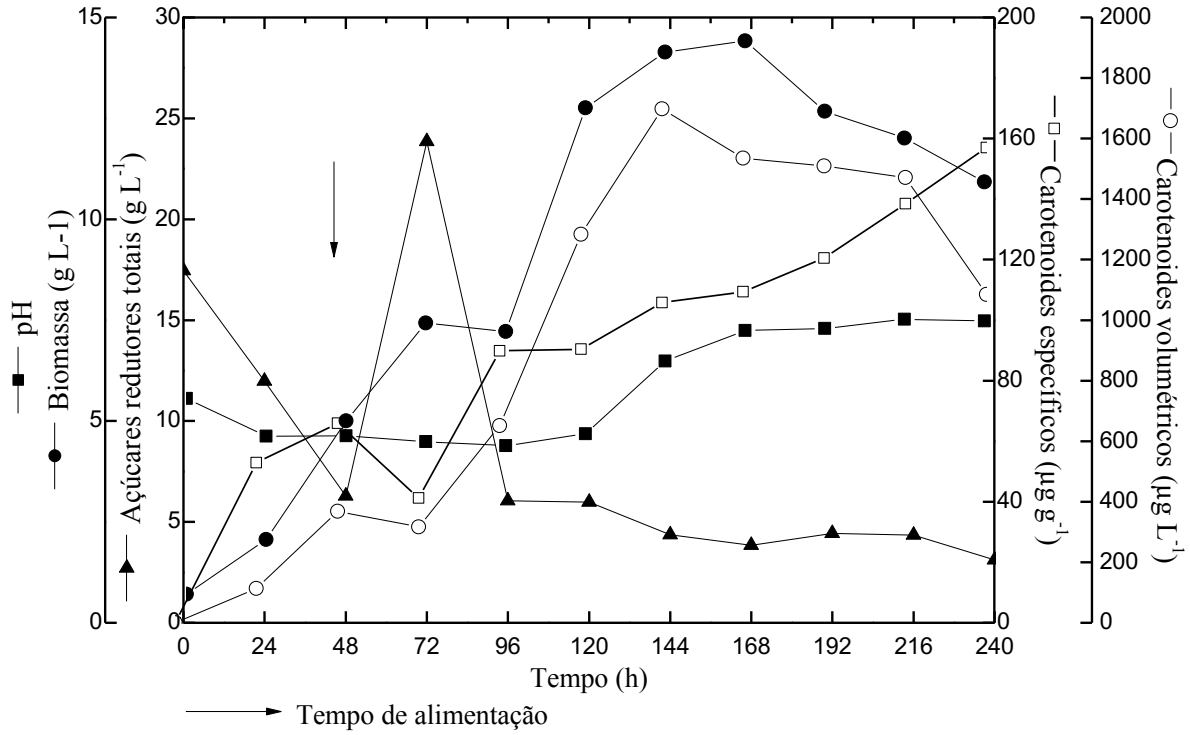


Figura 15 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 72 h.

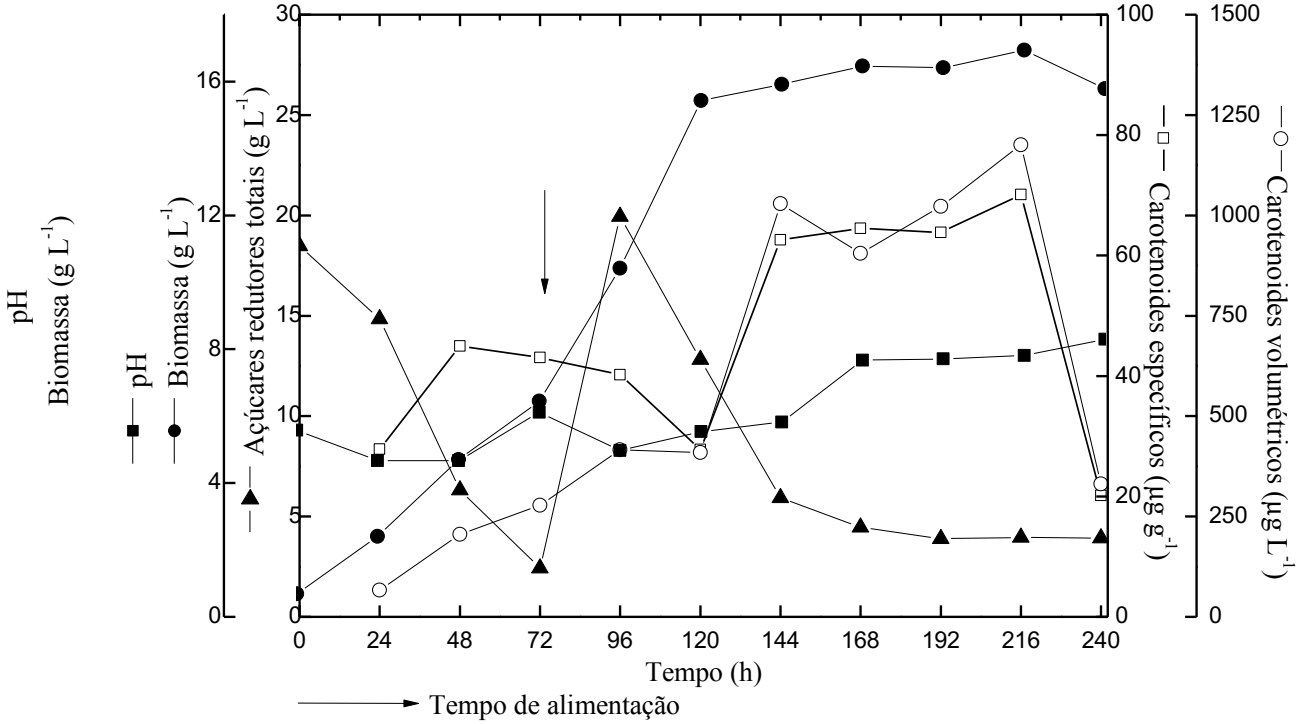


Figura 16 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 48h e 96 h

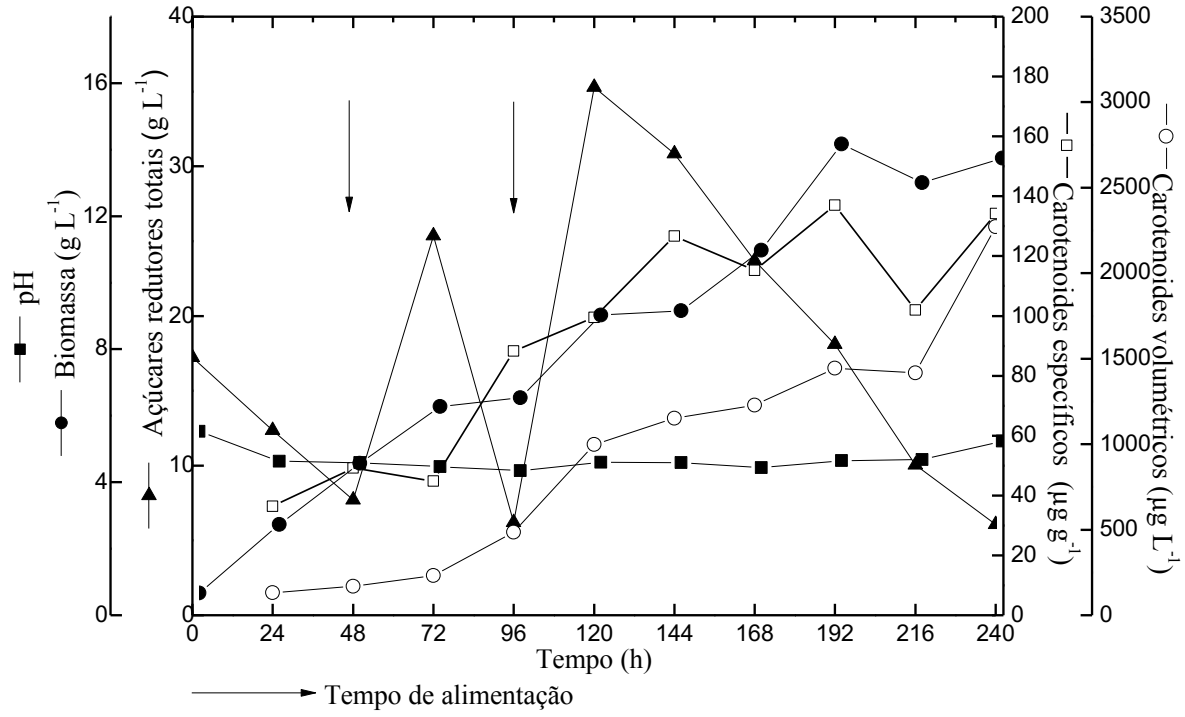


Figura 17- Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 72 h e 120 h

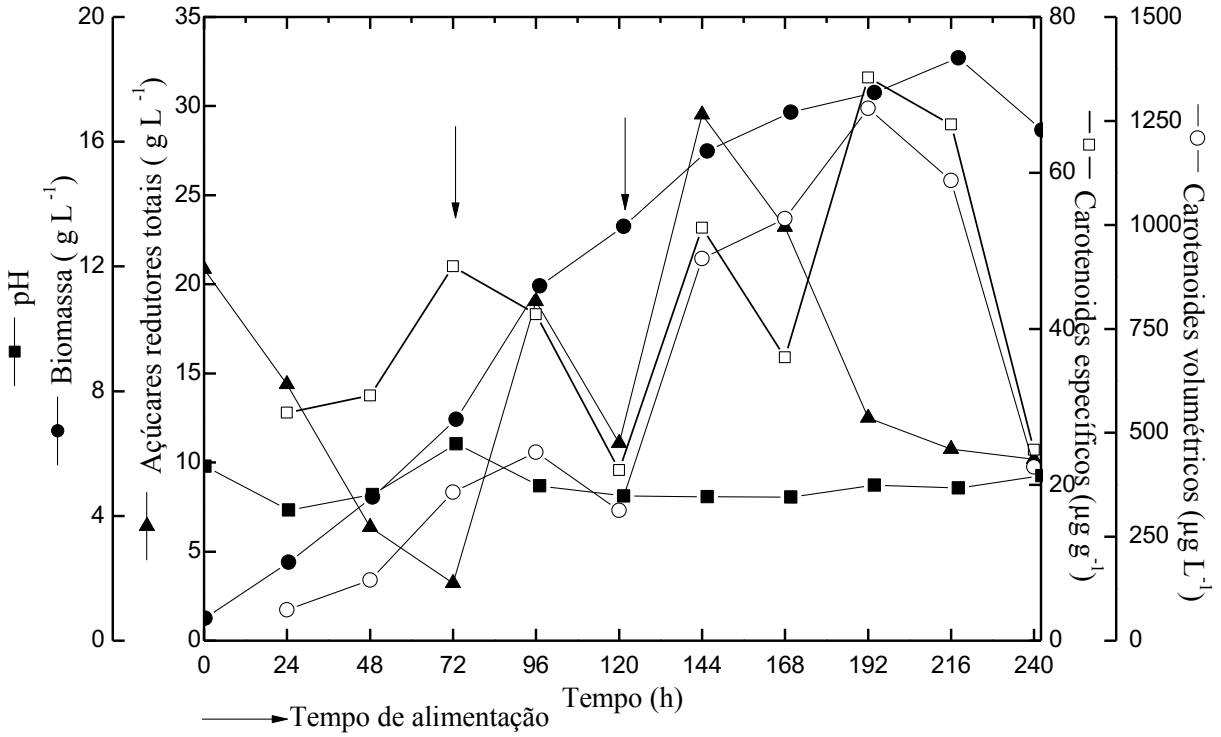


Figura 18 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96 h e 144 h

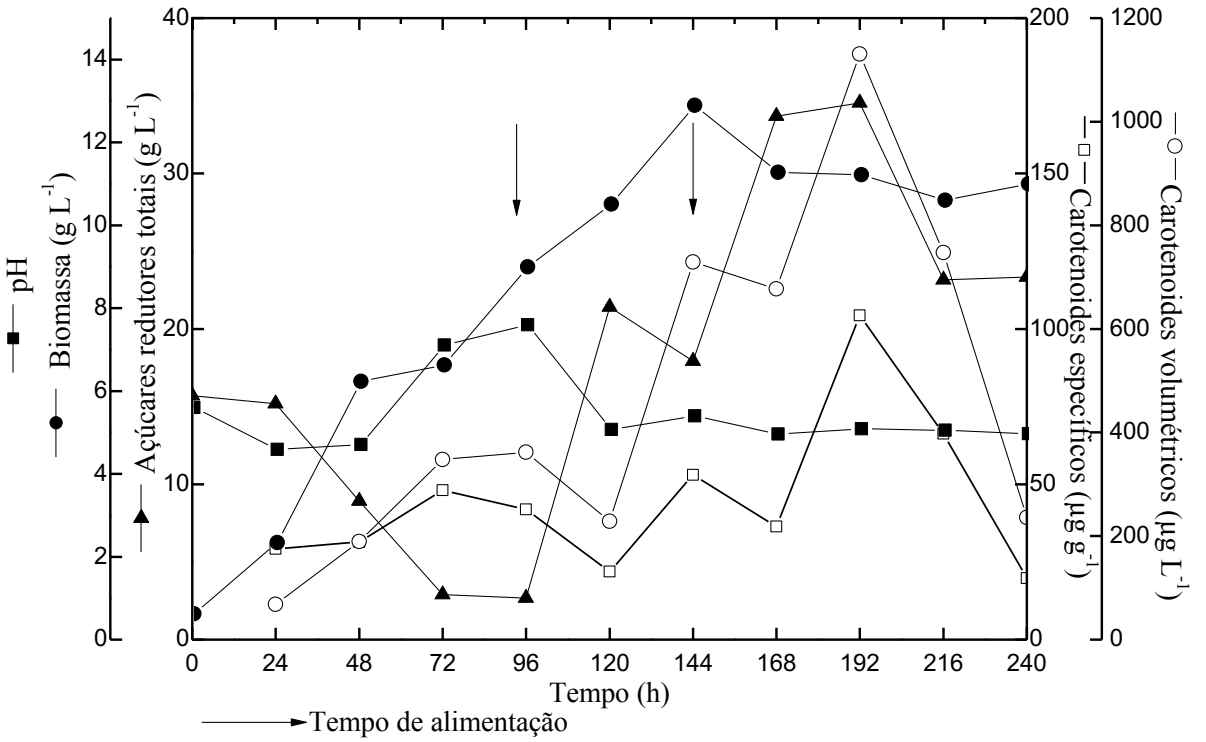
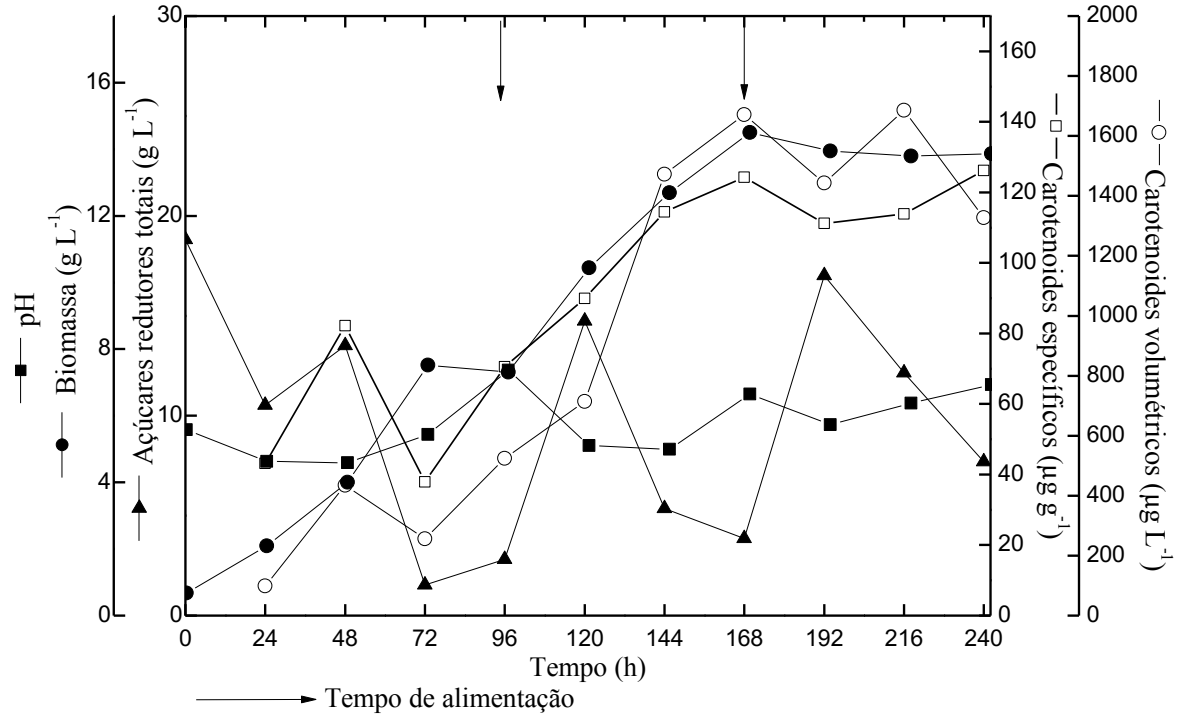


Figura 19 - Cinética de acompanhamento do pH, biomassa, carotenoides específicos, carotenoides volumétricos e açúcares para *R. mucilaginosa* meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM + 30 g L^{-1} M) por 240 h, a 25°C e 180 rpm, alimentação em 96 h e 168 h



Durante o acompanhamento do processo de produção de carotenoides nas diferentes estratégias de alimentação adotadas utilizando o meio M3, foi possível observar que o pH de uma forma geral apresentou comportamento de decréscimo nas primeiras 24 h de cultivo, após ocorreu um aumento gradativo. Com a realização da alimentação o pH tornou a cair novamente nas primeiras horas após a alimentação, e após aumentou gradativamente ao longo do cultivo.

Os pulsos de alimentação foram realizados quando o substrato (ART) presente no meio estava por se esgotar. O ART final dos cultivos no processo em batelada alimentada foram de 3,1, 3,9, 4,0 g L^{-1} para os ensaios onde o pulso de alimentação ocorreu um 48, 72 e 96h. Já nos ensaios com mais de um pulso de alimentação o ART ao término de cultivo permaneceu em 6,0, 7,7, 10 e 23 g L^{-1} nos ensaios 48 e 96h ,96 e 168h, 72 e 120h, 96 e 144h, respectivamente, não ocorrendo o consumo total do ART. Na biomassa ocorreu um incremento em todas as estratégias de alimentação quando comparado com o mesmo meio em batelada simples.

Colet, Luccio e Valduga (2015) avaliaram a produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em batelada alimentada. A composição do meio utilizado foi 15 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de extrato de malte e 80 g L^{-1} de glicerol. Em seus estudos, a

concentração de carotenoides totais máxima obtido foi 4400 μg L^{-1}, em 96 h com alimentação de 112,5 mL a cada 12 h.

Dias et al. (2015) estudaram a produção de lipídios e carotenoides por *Rhodosporidium toruloides* com utilização de batelada e batelada alimentada em biorreator de bancada. A produção máxima obtida foi de 33,4 mg L^{-1} em condições de pH inicial 5, temperatura 30ºC com estratégia de alimentação de um pulso ao final do cultivo em batelada, em meio contendo e 9 g L^{-1} $MgSO_4$-$7H_2O$, 20 g L^{-1} de extrato e levedura e 60 g L^{-1} de glicose.

A Tabela 18 apresenta os valores máximos de carotenoides volumétricos e os respectivos valores de carotenoides específicos e biomassa para cada ensaio na batelada alimentada utilizando o meio M3. A maior produção de carotenoides volumétricos foi o ensaio onde o pulso de alimentação ocorreu em 96h de cultivo (3726,7 μg L^{-1}) sendo diferente estatisticamente dos demais ensaios de batelada alimentada para o meio M3.

Tabela 18 – Resultados obtidos no processo em batelada alimentada nos diferentes tempos de alimentação para o meio M3 (6,5 g L^{-1}AMM +30 g L^{-1} M)

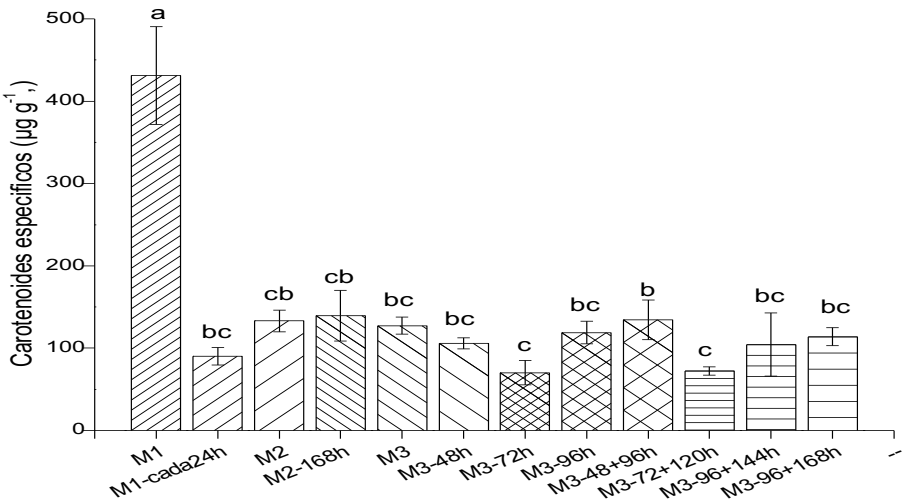
AL (h)	Biomassa (g L^{-1})	CE (μg g^{-1})	CV (μg L^{-1})	P_{ce} (μg L h^{-1})	P_{cv} (μg L h^{-1})	P_{bio} (g L h^{-1})
48	14,2±0,4^{ab}	105,8±6,5^{ab}	1698,1±278,4^{bc} (144*)	0,73	11,79	0,1
72	16,8±0,4^{ab}	70,1±14,7^{b}	1175,3±242,0^{c} (216*)	0,32	5,44	0,07
96	16,1±4,5^{ab}	118,8±13,7^{ab}	3726,7±506,0^{a} (192*)	0,61	19,40	0,07
48 e 96	13,7±0,8^{ab}	134,2±24,1^{a}	2271,4±545,1^{b} (240*)	0,69	9,46	0,05
72 e 120	17,7±0,5^{a}	72,2±5,11^{b}	1279,9±65,3^{c} (192*)	0,37	6,66	0,09
96 e 144	11,4±2,6^{b}	104,3±30,4^{ab}	1130,8±172,4^{c} (192*)	0,55	5,88	0,06
96 e 168	14,1±1,2^{ab}	113,8±10,9^{ab}	1685,4±81,8^{bc} (216*)	0,54	7,80	0,06

AL: Alimentação; CE: Carotenoides específicos; CV: Carotenoides volumétricos; $P_{ce;}$ produtividade carotenoides específicos; P_{cv}: produtividade carotenoides volumétricos; P_{bio}: produtividade biomassa. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$), pelo teste Tukey. *Horas de cultivo.

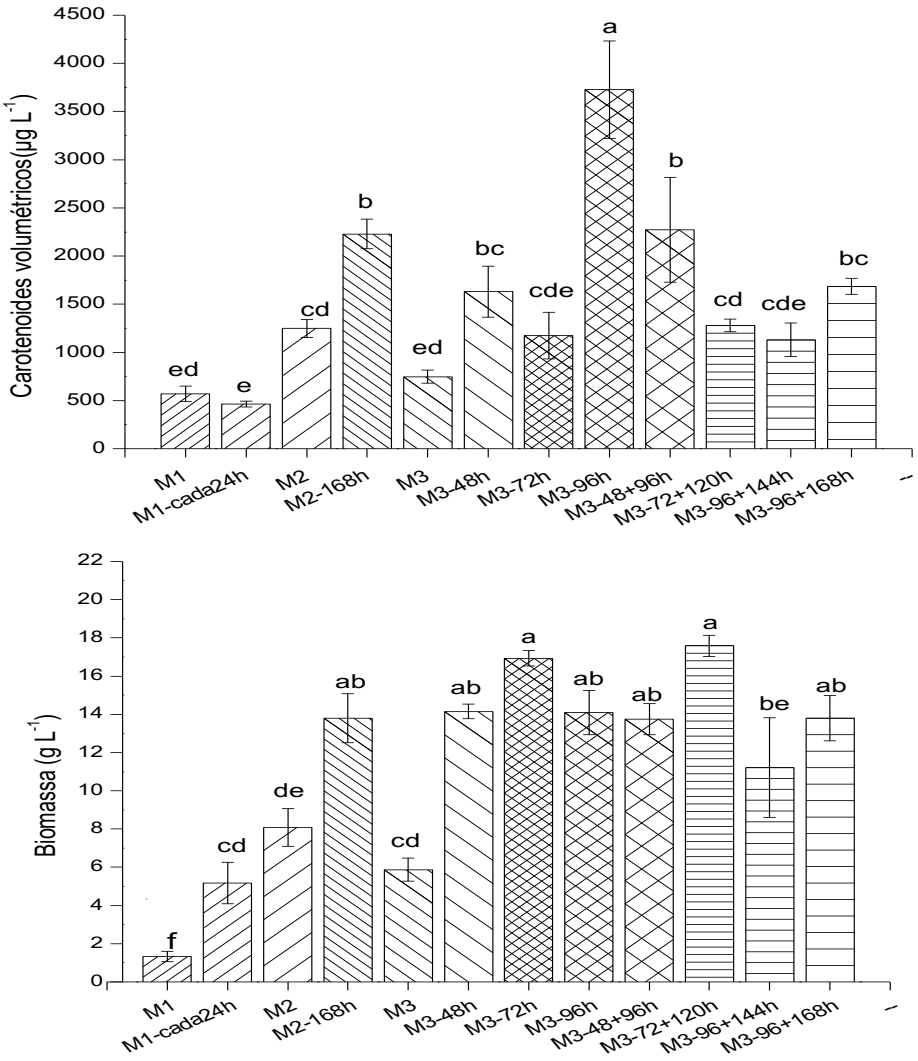
As estratégias de alimentação no processo de batelada alimentada neste trabalho não influenciaram estatisticamente (p>0,05) o acúmulo de biomassa microbiana da levedura, exceto para a estratégia em que ocorreram dois pulsos de alimentação (96 e 144 h) produzindo uma concentração de biomassa inferior as demais (11,4 g L^{-1}). A produção específica variou de 70,1 a 134,2 µg g^{-1}, havendo diferença estatística entre os valores. A produtividade em carotenoides volumétricos alcançou 19,40 µg L h^{-1} na alimentação em 96 h resultado coerente já que este ensaio obteve a maior produção de carotenoides volumétricos, os ensaios onde a produção foi menor assim também foi menor a produtividade.

Como pode ser visualizado na Figura 20, que apresenta os valores máximos obtidos para todos os ensaios de batelada e batelada alimentada nos três meios testados, houve diferença significativa (p<0,05) superior na produção específica de carotenoides no meio M1. Os ensaios M3-72 h e M3-96 h e 120 h foram significativamente (p<0,05) inferiores aos demais ensaios. Não havendo diferença na produção de carotenoides específicos quando comparado os ensaios em batelada e batelada alimentada para o mesmo meio, exceto o meio M1-cada 24 h em que a produção específica diminuiu quando comparada com a batelada simples. Para produção volumétrica de carotenoides, o meio M3-96 h foi significativamente superior aos demais, havendo um incremento de aproximadamente 700 % quando comparado ao ensaio que obteve menor resultado (M1-cada24 h).

Figura 20 – Produção de carotenoides específicos, volumétricos e biomassa nos ensaios em batelada e batelada alimentada para os meios M1 (6,5 g L^{-1} água de maceração de milho +1,8 g L^{-1} melaço;), M2 (3,4 g L^{-1}água de maceração de milho +70 g L^{-1} melaço) e M3 (3,4 g L^{-1} água de maceração de milho +30 g L^{-1} melaço), médias ± desvio padrão (n=3); letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste Tukey.



Cont. Figura 20 – Produção de carotenoides específicos, volumétricos e biomassa nos ensaios em batelada e batelada alimentada para os meios M1 (6,5 g L^{-1} água de maceração de milho +1,8 g L^{-1} melaço;), M2 (3,4 g L^{-1}água de maceração de milho +70 g L^{-1} melaço) e M3 (3,4 g L^{-1} água de maceração de milho +30 g L^{-1} melaço), médias ± desvio padrão (n=3); letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$) pelo teste Tukey.



A biomassa mostrou maiores resultados nos ensaios M3-72 h e M3-72 h e 120 h, 16,8 e 17,7 g L^{-1} respectivamente, ocorrendo um incremento de aproximadamente quinze vezes quando comparado ao meio M1 que apresentou a menor biomassa, e quando comparado ao meio (M3) em batelada simples o incremento foi 180 % aproximadamente.

6. CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível o aproveitamento dos coprodutos agroindustriais (melaço, água de maceração de milho e glicerol bruto) para a produção de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa.* Os meios avaliados com 36,5 g L^{-1} de água de maceração de milho e 6,0 g L^{-1} de melaço (AMM+M) e 35,6 g L^{-1} de água de maceração de milho e 6,6 g L^{-1} de glicerol bruto (AMM+G), obtiveram uma produção carotenogênica de 336,3 μg L^{-1} (96,4 μg g^{-1}) e 296,8 μg L^{-1} (78,7 μg g^{-1}), respectivamente, a 25º C, 180 rpm, com pH inicial de 6,0.

A maximização da produção de carotenoides em processo batelada e a validação dos modelos empíricos foram alcançadas para o meio agroindustrial composto por 70 g L^{-1} de melaço e 3,4 g L^{-1} de água de maceração de milho, alcançando um máximo de 1248,5 μg L^{-1} (152,5 μg g^{-1}) de carotenoides e 7,9 g L^{-1} de biomassa. Esta condição promoveu uma produção similar ao meio padrão YM (1200 μg L^{-1}), além de proporcionar um incremento de 370 % na produção dos biocompostos de interesse e 75 % na biomassa quando comparado ao meio contendo 36,5 g L^{-1} de água de maceração de milho e 6,0 g L^{-1} de melaço.

Para o processo em batelada alimentada a estratégia utilizando o meio de cultivo M3 (6,5 g L^{-1}de água de maceração de milho +30 g L^{-1} de melaço de cana de açúcar) com alimentação em 96 h promoveu resultados promissores de produção carotenogênica alcançando 3726,7 μg L^{-1} (118,8 μg g^{-1}), havendo um incremento na produção de aproximadamente 400 % em relação ao mesmo meio em processo de batelada simples.

Portanto, através da maximização da produção no meio agroindustrial foi possível obter resultados semelhantes ao meio padrão (YM) e o processo em batelada alimentada foi aproximadamente 200 % superior ao valor obtido no meio YM. Sendo assim, o presente trabalho pode demostrar o potencial do uso de coprodutos agroindustriais no meio de cultivo em frascos agitados para produção de carotenoides por esta cepa de *Rhodotorula mucilaginosa,* através da utilização dos processos em batelada e batelada alimentada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Caracterizar a biomassa após a recuperação dos carotenoides;

Avaliar a produção de carotenoides no meio agroindustrial em processo de batelada e batelada alimentada em biorreator utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa;*

Avaliar a produção de carotenoides por outras leveduras, em processo de batelada alimentada em frascos agitados e biorreator.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoid production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as carbon source. **Process Biochemistry,** v. 40, p. 2985-2991, 2005.

ALBUQUERQUE, C. D. **Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de tecnicas de extração de pigmentos**. 2015, 177f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

AMBRÓSIO, C. L.; CAMPOS, F. de A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 2, p. 233-243, 2006.

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

BANZATTO, D.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. J. R. Carotenoid production by *Rhodotorula rubra* cultivated in sugarcane juice, molasses, and syrup. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p.14-18, 2013.

BCC RESEARCH MARKET FORECASTING – **The Global Market for Carotenoids.** Disponível em: http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html. Acesso: 11 de Setembro de 2016.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** 2 ed. São Paulo: Varela, 1992. 223 p.

BORBA, C. M. **Produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus* utilizando meio agroindustrial em diferentes condiçoes de cultivo.** 2015. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2015.

BRAGA, L. T. **Microencapsulação de extratos carotenogênicos produzidos por *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strain of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresourse Technology**, v.71, p.41-44, 1999.

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

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p.

CHANG, Y. H.; CHANG, K.; HSU, C. L.; CHUANG, L.; CHEN, C.; HUANG, F.; JANG H. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, v.105, p.711-717, 2013.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p.13–27, 2012.

CHENG, Y.; YANG, C. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.61, p.270-275, 2016.

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

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

CIPOLATTI, E. P.; BULSING, B. A.; SÁ, C. S.; BURKERT, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F.M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: antioxidants activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology,** v.14, p.1982-1988, 2015.

COLET, R.; LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Fed-batch production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636): kinetic and stoichiometric parameters. **European Food Research and Technology**, v. 240, p.173-182, 2015.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileiras**.Disponivel em:. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_boletim_graos_janeiro_2016.pdf. Acesso em: 4 de maio. 2017.

COSTA, I. **Produção de β-caroteno por uma espécie do gênero *Rhodotorula***.1992, 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.

DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema.** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAVIES, B. H. **Chemical biochemistry plant pigments.** GOODWIN, T. W., Academic Press: New York, 1976. 38 p.

DIAS, C.; SOUSA, S.; CALDEIRA, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodosporidium toruloides* NCYC921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.

DILLIS, S. S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M. R.; SAIER, M. H. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 44, p. 385-418, 1980.

EMBRAPA. Processamento da cana-de-açúcar. Brasília, DF. Agência Embrapa de informação tecnológica. Disponível

em:http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadacucar/arvore/CONTAG01_108_221220061548 41.html. Acesso em: 15 novembro, 2016a.

EMBRAPA. Glicerol. Brasília, DF. Agência Embrapa de informação tecnológica. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1mqgo602wyiv802hvm3j818huet.html. Acesso em: 15 novembro, 2016b.

FERREIRA, M. M.; ZAMITH, H. P. S.; ABRANTES, S. M. P. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, p. 1-8, 2014.

FELTRIN, V. P.;SANTANNA, E.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brasilian Archives of Biology and Technology,** v. 43, p. 119-124, 1999.

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

FREITAS, C.; PARREIRA, T. M.; ROSEIRO, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. Selecting low cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 355–359, 2014.

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

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, M. Carotenoid production from hydrolyzed molasses by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using batch, fed-batch and continuous culture. **Annals of Microbiology,** v. 64, p. 945–953, 2014.

GOODWIN, T. W. **The compative biochemistry of carotenoids**. 1 ed. London: Chapmn & Hall LTD, 1952. 356 p.

GOODWIN, T. W. (1972). Carotenoids in fungi and non-photosynthetic bacteria. **Prog Ind Microbiol** 11:29–88 Darko Matovic (Ed.), p. 345 - 383, 2011. Apud Fregnova.

GOUVEIA, L.; RAYMUNDO, A.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 362–367, 2006.

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

HO, K. P.; TAM, C. Y.; ZHOU, B. Growth and carotenoid production of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch cultures with different feeding methods. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 175–178, 1999.

KAUR, D.; WANI, A. A.; SINGH, D. P.; SOGI, D. S. Shelf life enhancement of butter, ice-cream, and mayonnaise by addition of lycopene. **International Journal of Food Properties,** v. 14, p.1217-1231, 2016.

KLEMAN, G. L.; CHALMERS, J. J.; LULI, G. W.; STROHL, W. R., A predictive and feedback control algorithm maintains a constant glucose concentration in fed-batch fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 910-917, 1991.

KIM, M.; AHN, S.; LEE-KIM, Y. Relationship of serum α-tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 797-809, 2001.

KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; KUMAR, A. M.; JYOTI, S. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

HOF, H. K. H.; WEST, C. E.;WESTSTRATE, J. A.; HAUTVAST, J. G. Dietaryfactors that affect the bioavailability of carotenoids, **Journal of Nutritional,** v. 130, p. 503– 506, 2000.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p. 102–10, 2013.

LADEIRA, B. L. **Cultivo de *Meyerozyma guilliermondi*i em batelada e batelada alimentada para produção de lipídios a partir de glicerol bruto**. 2016. f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciencia de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2016.

LOPES, N. A. **Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular.** 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Ciencia de Alimentos)- Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2014.

LOPES, N. A.; REMEDI, R. D.; SA, C. S.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F.M. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v.26, p. 759-766, 2017.

LUNA-FLORES, C. H.; CORDOVA, R. J. J.; ORTIZ, C. P.; FEMAT, R.; LOPES, E. J. H. Batch and fed-batch modeling of carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using *Yucca fillifera* date juice as substrate. **Biochemical Engineering Journal,** v. 53, p. 131-136, 2010.

MACHADO, W. R. C. **Otimização da produção de carotenoides por *Sporodiobolus pararoseus* e influência de pré tratamentos nos meios de cultivos agroindustriais.** 2013, 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

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

MACHADO, F. R. S.; TREVISOL, T. C.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, A. C. V. Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 108-114, 2016.

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

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Improved β-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 27-32, 2008.

MAROVA, I.; CERTIK, M.; BREIEROVA, E. Production of Enriched Biomass by Carotenogenic Yeasts - Application of Whole-Cell Yeast Biomass to Production of Pigments and Other Lipid Compounds. **Biomass - Detection, Production and Usage** p. 345 – 384, 2015.

MCBRIDE, J. It plants pigments paint an antioxidants substance rainbow. **Agricultural Research**, v. 44, p. 4-8, 1996.

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

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

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, 2016.

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

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n.2, p. 165–169, 2013.

MULLER, M. C.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; LOURENÇO, S. O. Carotenoides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, p. 415-423, 2003.

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

PAPAIOANNOU, E. H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Agro-food wastes utilization by *Blakeslea trispora* for carotenoids production. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, p. 151-153, 2012.

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

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura**, 2007, 91f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PETRIK, S.; OBRUCA, S.; BENESOVÁ, P.; MÁROVA, I. Bioconversion of spent coffee grouns into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. **Biochemical Engineering Journal,** v. 90, p. 307-315, 2014.

RAMBLA, M. A. O.; PRADA, A. R.; COOPAT, T. S.; CARRACEDO, G. B. **Méis. Manual dos derivados da cana-de-açúcar**. Instituto Cubano de Pesquisas dos Derivados da Cana-de-açúcar. Cap. 2.4, p. 49-55, 1999.

RAZAVI, S. H.; MARC, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. **Iranian Journal of Chemistry e Chemical Engineering,** v. 25, p. 59-64, 2006.

REIS, D. F. **Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis.*** 2012, 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2004. 196 p.

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2015.

RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Rice parboiling wastewater in maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma***. Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, p. 401-410, 2015.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Development of culture media contining spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Jounal of Food Microbiology**, v. 97, p. 93-98, 2004.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. Experimental Design Process Optimization. 1. ed. New York: CRC Press, 2014. 336 p.

RODRIGUEZ-AMAYAZ, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. 1. ed. Washington D. C: ILSI Press, 2001. 63 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2008.

ROMERO, F.J.; GARCIA, L. A.; SALAS, J. A.; DIAZ, M.; QUIROS, L. M. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 507-515, 2001.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; ROSA, C. G.; SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for application in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

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

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

SCOTT, K. J.; RODRIQUEZ-AMAYA, D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents –fact or fiction? **Food Chemistry**, v. 69, p. 125-127, 2000.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial.** 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. 544 p.

SCHNEIDER, T.; GRAEFF-HONNINGER, S.; FRENCH, W.T.; HERNANDEZ, R.; MERKT, N. Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. **Energy**, v. 61, p.34-43, 2013.

SENSIENT. A nova tendencia no mercado de corantes . **Food Ingredients Brasil**, v.18, 2011.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, p. 489-496, 2016.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, p. 18-15, 2012.

SOBRINHO, H. B. de S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica.*** 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). Universidade Catolica de Pernambuco, Recife, 2007.

SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. **World Journal of Microbiology e Biotechnology,** v. 16, p. 491-493, 2000.

SOUTHON, S. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. **Food Research International,** v. 33, p. 211-227, 2000.

STAJĈIĆ, S.; ĆETKOVIĆ, G.; ĆANADANOVIĆ-BRUNET, J.; DJILAS, S.; MANDIĆ, A.; ĈETOJEVIĆ-SIMIN, D. Tomato waste: carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. **Food Chemistry,** v. 172, p. 225-232, 2015.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345–351, 2003.

STRINGHETA, P. C.; NACHTIGALL, A. M.; OLIVEIRA, T. T.; RAMOS, A. M.; SANT'ANA, H. M. P.; GONÇALVEZ, M. P. J.C. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v.17, p. 229-238, 2006.

TAKSIMA, T.; LIMPAWATTANA, M.; KLAYPRADIT, W. Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 431-437, 2015.

ÚNICA-**União da Industria de Cana de acucar** .Disponivel em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e moagem.php?idMn=31 &tipo Historico=2>. Acesso: 11 de agosto, 2016.

VALCAREGGIS, A. A.; MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. S.; HENSE, H. Aplicação de extrato carotenoídico natural na formulação de massa alimentícia fresca. **Tecnologias para Competitividade Industrial**, v. 9, p. 163-177, 2016.

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

VALDUGA, E.; SCHWARTZ, C. R. M.; TATSH, P. O.; TIGGEMANN, L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **European Food Research Journal**, v. 232, p. 453-462, 2010.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporodiobolus salmonicolor* CBS2636**. 2005, 200 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VUSTIN, M. M.; BELYKH, E. N.; KISHILOVA, S. A. Relationship between astaxanthin production and intensity of anabolic processes in the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Microbiology**, v. 73, p. 751-757, 2004.

USDA (United States Department of Agriculture) - World Agricultural Production. **Foreign Agricultural Service**, 2017.

WALLNER-KERSANACH, M. RIBEIRO, A. R. L.; MACHADO, E. C. Análise Instrumental - Analisador Elementar CHNS/O. In: Baumgarten, M. G. Z.; Wallner Kersanach, M; Niencheski, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química.** Editora da FURG, p. 145-166, 2010

WOLAK, T.; PARAN, E. Can carotenoids attenuate vascular aging? **Vascular Pharmacology**, v. 6, p. 59-63, 2013.

ZARAGOZA, M. F. **Bioavailability of carotenoids incorporated into processed foods: bread and mayonnaise**. 2015, 39f. Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Medicina) Universidade de Lleida Faculdade de Medicina, 2015.

ANEXO 1

Laudo do Melaço de cana de açúcar.

Brasileiros

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Unidade:	MELACOS BRASILEIROS LTDA	Nº do Laudo:	5327/2014	Data de Emissão:	08/01/2014
Produto:	MELAÇO LÍQUIDO DE CANA	Lote:	2014		
Cliente:	CARINA MOLINS BORBA			NOTA FISCAL	5327

CARACTERÍSTICAS	UNIDADE	RESULTADO
Acidez total (acido acetico)	g/Kg	5,6
ART	%	59,68
Água - karl fischer	% m/m	20,48
Amido	mg/kg	1709
Brix refratometro 20°C	%	82,62
Cálcio	mg/kg	11455
Cinzas	% m/v	8,7
Cobalto	mg/kg	1
Cobre	mg/kg	4,2
Cor	UI	63573
Dextrana	mg/kg	6073
Ferro	mg/kg	71
Fósforo Total	mg/L	863
Frutose	% m/m	7,9
Glusose	% m/m	6,98
Magnesio	mg/kg	3991
Manganês	mg/kg	29,1
PH	-	5,92
Potássio	mg/kg	25572
Pureza	%	42,1
Residuos Insoluveis gravimetrico	mg/kg	952
Sacarose	% m/m	39,9
Sódio	mg/kg	119
Sulfito	mg/kg	2114
Zinco	mg/kg	6,2

OBSERVAÇÕES

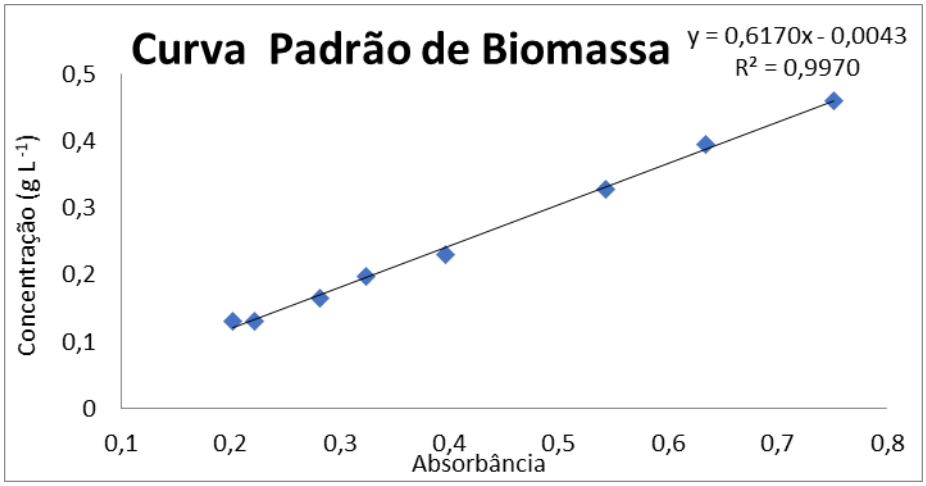
VALIDADE — PRODUTO NÃO TEM PRAZO DE VALIDADE. DESDE QUE NÃO SEJA MISTURADO A OUTROS PRODUTOS E SEJA MANTIDO FECHADO EM LOCAL SECO E FRESCO

METODOLOGIA: Reichert AR200 - Digital Refratometer Catalog Nº 13950000

Laboratório CTC

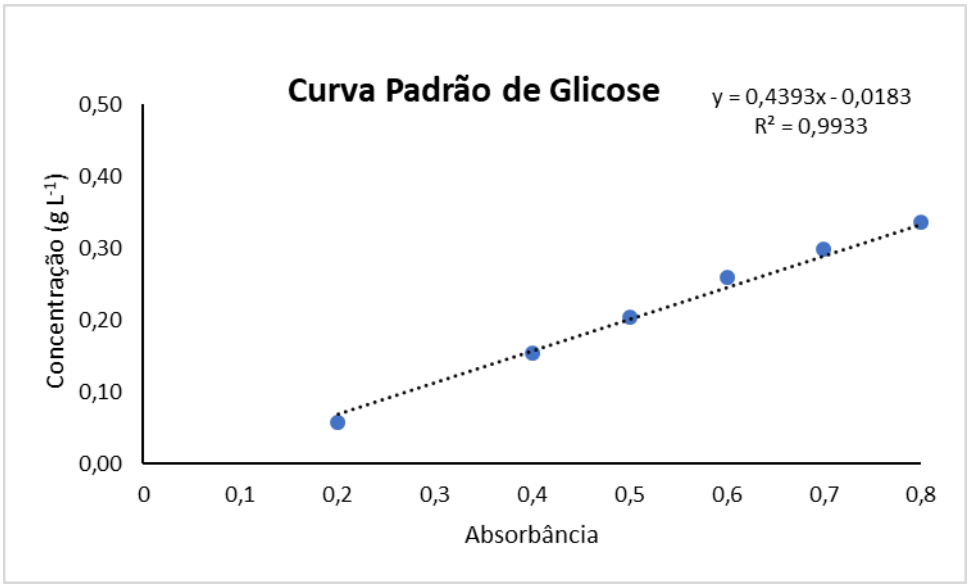
APÊNDICE 1

Curva padrão de biomassa



APÊNDICE 2

Curva padrão de glicose



APÊNDICE 3

Efeito das variáveis sobre as respostas estudadas para o DCCR formulado com melaço e água de maceração de milho.

Efeitos, desvio padrão para produção volumétrica e especifica de carotenoides, biomassa e açúcares redutores totais.

	Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	*P*
Carotenoides volumétricos ($\mu g\ L^{-1}$)	Média	740,50	55,34	13,37	<0,01
	(1) Melaço (L)	487,91	67,88	7,18	<0,01
	Melaço (Q)	-25,20	81,00	-0,31	0,76
	(2) AMM (L)	-3,47	67,88	-0,05	0,96
	AMM (Q)	89,49	81,00	1,10	0,31
	Melaço x AMM	54,50	95,86	0,56	0,59
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	*p*
Carotenoides específicos ($\mu g\ g^{-1}$)	Média	123,10	48,00	2,56	0,05
	(1) Melaço (L)	-130,04	58,88	-2,20	0,07
	Melaço (Q)	140,42	70,26	1,99	0,10
	(2) AMM (L)	-5,67	58,88	-0,09	0,92
	AMM (Q)	-30,94	70,26	-0,44	0,67
	Melaço x AMM	40,0	83,14	0,48	0,65
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	*P*
Biomassa ($g\ L^{-1}$)	Média	6,09	0,41	14,63	<0,01
	(1) Melaço (L)	4,93	0,51	9,66	<0,01
	Melaço (Q)	-1,72	0,60	-2,82	<0,01
	(2) AMM (L)	-0,17	0,51	-0,34	0,74
	AMM (Q)	0,56	0,60	0,93	0,39
	Melaço x AMM	-1,00	0,72	-1,38	0,22
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(5)	*P*
Açúcares ($g\ L^{-1}$)	Média	1,58	0,21	7,29	<0,01
	(1) Melaço (L)	4,48	0,26	16,85	<0,01
	Melaço (Q)	1,57	0,31	4,95	<0,01
	(2) AMM (L)	-0,36	0,26	-1,37	0,22
	AMM (Q)	-0,14	0,31	-0,45	0,66
	Melaço x AMM	-0,80	0,37	-2,12	0,08

APÊNDICE 4

Efeito das variáveis sobre as respostas estudadas para o DCC formulado com melaço e água de maceração de milho.

Efeitos, desvio padrão para produção volumétrica e específica de carotenoides, biomassa e açúcares redutores totais.

	Fator	Efeito	Erro padrão	t(3)	*P*
Carotenoides volumétricos ($\mu g\ L^{-1}$)	Média	1067,71	44,92	23,76	<0,01
	(1) Melaço (L)	303,00	118,85	2,54	<0,01
	(2) AMM (L)	471,00	118,85	3,96	<0,01
	Melaço x AMM	24,00	118,85	0,20	0,85
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(3)	*P*
Carotenoides específicos ($\mu g\ g^{-1}$)	Média	154,85	4,10	37,71	<0,01
	(1) Melaço (L)	8,50	10,86	0,78	0,49
	(2) AMM (L)	37,50	10,86	3,45	<0,01
	Melaço x AMM	1,50	10,86	0,13	0,89
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(3)	*P*
Biomassa ($g\ L^{-1}$)	Média	6,88	0,12	57,17	<0,01
	(1) Melaço (L)	1,39	1,39	4,37	<0,01
	(2) AMM (L)	1,82	1,82	5,72	<0,01
	Melaço x AMM	-0,46	0,46	-1,45	0,24
	Fator	Efeito	Erro padrão	t(3)	*P*
Açúcares ($g\ L^{-1}$)	Média	6,87	1,48	4,63	0,018
	(1) Melaço (L)	10,17	3,92	2,59	0,08
	(2) AMM (L)	-2,34	3,92	-0,59	0,59
	Melaço x AMM	-0,62	3,92	0,15	0,88