

URI – CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR UMA NOVA CEPA
DE *Sporidiobolus pararoseus***

MARIA MARINA SERRÃO CABRAL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Campus de Erechim, como requisito parcial a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS – BRASIL
JULHO, 2010**

Otimização da Bioprodução de Carotenoides por uma Nova Cepa de
Sporidiobolus pararoseus

Maria Marina Serrão Cabral

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários á obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D.Sc.
Orientadora

Prof. Geciane Toniazco D.Sc.
Orientadora

Prof. Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc.

Prof. Rogério Luis Cansian, D.Sc.

Erechim, 20 de Julho de 2010.

Dedico este trabalho e esta conquista as pessoas mais importantes na minha vida: minha querida família, por tanto amor e auxílio que sempre me destinam e porque:
“Minha família é minha vida”.
Com todo o meu amor, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e o dom da sabedoria. A quem nos momentos difíceis recorri e sempre me iluminou.

Aos meus pais Luis Fernando e Márcia Marina e meus irmãos Ana Rosa e João Fernando por terem me mantido, auxiliando e incentivando em tudo que precisei, por todo amor e carinho que sempre me dedicaram, por serem tão especiais e cuidarem tanto de mim. A vocês que sempre acreditaram em mim e fizeram o possível para me ver feliz. Em especial Papis e Mamis que me fizeram ter o idealismo no coração e os dois pés no chão da realidade, que sempre me ensinaram a ser uma pessoa leal e honesta e também por se preocuparem com meu futuro e mesmo depois de formada me darem a oportunidade de seguir estudando e sentir muito orgulho disso.”...Sem vocês eu nada seria...”

A minha Vóvis Su, por ter me proporcionado esta personalidade forte, personalidade guerreira de não desistir de nada nunca e por me proporcionar grandes exemplos de vida, pelas palavras de incentivo e conforto, pelo apoio emocional e financeiro. A você que em vários momentos difíceis me fez erguer a cabeça e seguir em frente.

A minha madrinha, tia e acima de tudo amiga Adriana, a pessoa que sempre me deu incentivos à leitura, escrita e aos estudos, você é a responsável pela minha paixão pela linha de pesquisa e a docência. Obrigada pelas horas no telefone escutando minhas queixas, reclamações e choros quando meus carotenoides estavam descomportados.

As minhas orientadoras e mestres: Eunice e Geci, por tantos momentos de imenso aprendizado, pela paciência, pelo rigor com meus erros e pela amizade, carinho e compreensão comigo.

Aos professores do curso pelas contribuições a este trabalho e á minha formação, pela atenção dispensada e pelo conhecimento transmitido.

A uma “anja” que Deus colocou no meu caminho: Nise e aos meus melhores amigos: Alan, Lili e Michel. E a todos os meus amigos que durante esses 2 anos eu me mantive afastada.

Aos amigos e colegas, ao pessoal do laboratório, as amizades conquistadas durante o curso e, em especial as amigas “Rose” e “Kah” pelo auxílio, pelos inúmeros encontros, experimentos, pelas tentativas frustradas, noites mal dormidas, pelos risos, pelas conquistas e vários bons momentos no laboratório, também, pela orientação e por terem dividido comigo conhecimento em momentos de dúvida, vocês foram o meu braço direito. A todas as pessoas que me auxiliaram direta ou indiretamente e em especial as que ajudaram na parte experimental. Pessoas sempre atenciosas, disponíveis e principalmente amigas.

As meninas do café: Tere e Valéria, pela companhia constante e palavras de conforto e é claro pelas inúmeras xícaras de café.

A banca examinadora pelo tempo dedicado á análise deste trabalho.

A URI, campus Erechim e Departamento de Engenharia de Alimentos pelo uso de suas instalações e ao laboratório CENA/USP que identificou a levedura e ambos por possibilitarem a minha formação.

A todos que, embora não citados nominalmente, foram importantes para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos, do fundo do meu coração.

Maria Marina Serrão Cabral.

“Nada é maior do que eu e meus sonhos”.

Maria Marina Serrão Cabral.

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

OTIMIZAÇÃO DA BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus pararoseus*

MARIA MARINA SERRÃO CABRAL

Julho/2010

Orientadoras: Eunice Valduga

Geciane Toniazzi

Os carotenoides são corantes naturais sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Estes são pigmentos de grande utilização industrial e têm despertado interesse devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos. A bioprodução de corantes é influenciada pelas condições de cultivo, tais como: temperatura, pH, composição do meio e agitação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a otimização da bioprodução de carotenoides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus*. A bioprodução foi realizada em frascos agitados, sem iluminação, durante 120 h, variando a composição do meio complexo (glicose, extrato de malte, extrato de levedura e peptona), mediante o emprego de metodologia de planejamento de experimentos. A recuperação dos carotenoides foi realizada empregando nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). A determinação dos carotenoides totais foi realizada espectrofotometricamente ($\lambda = 448$ nm). A concentração máxima de carotenoides totais obtida foi de 856 $\mu\text{g/L}$ nas condições de 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm, 60 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 15 g/L de extrato de malte. A partir dos dados da cinética de fermentação verificou-se que a concentração máxima de carotenoides totais (852 $\mu\text{g/L}$) foi atingida em 102 h do início do processo fermentativo.

Palavras-chave: Carotenoides; *Sporidiobolus pararoseus*; meio complexo.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

OPTIMIZATION OF CAROTENOID BIOPRODUCTION BY A NEW YEAST OF

Sporidiobolus pararoseus

MARIA MARINA SERRÃO CABRAL

July/2010

Advisors: Eunice Valduga

Geciane Toniazzi

Carotenoids are natural dyes biosynthesized by plants, algae and microorganisms. They are pigment highly used in industry and have drawn attention due to the concern with chemical additives used in food. The cultivation conditions such as temperature, pH, medium composition and agitation influence the dyes bioproduction. Moreover, the carotenoid amount and profile can be enhanced. Thus, the objective was the optimization of bio carotenoid by a new strain of *Sporidiobolus pararoseus*. The bioproduction was performed in flasks without illumination for 120 h, using complex medium and varying composition, using a methodology of experimental design. The recovery of carotenoids was performed using liquid nitrogen and dimethyl sulfoxide (DMSO) for cell disruption, and extraction with a mixture of acetone / methanol (7:3, v/v). The determination of carotenoids was performed spectrophotometrically ($\lambda = 448$ nm). The maximum concentration of carotenoids obtained was 856 $\mu\text{g/L}$ under the conditions of 25 °C, initial pH 4.0, 180 rpm, 60 g/L glucose, 15 g/L peptone and 15 g/L extract malt. From the data of fermentation kinetics was found that the maximum concentration of carotenoids (852 $\mu\text{g/L}$) was achieved in 102 h from the beginning of the fermentation process.

Key words: Carotenoids; *Sporidiobolus pararoseus*; complex medium.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Estrutura química, nomenclatura e biossíntese dos carotenoides	3
2.2 Propriedades e funções dos carotenoides	8
2.3 Micro-organismos produtores de carotenoides	9
2.4 Fatores que exercem influência na carotenogênese.....	11
2.4.1 Condições do meio de cultivo.....	11
2.4.2 Temperatura.....	12
2.4.3 pH.....	13
2.4.4 Outros fatores que influenciam a carotenogênese.....	14
2.5 Aplicação dos carotenoides na Indústria de Alimentos.....	16
2.6 Extração e recuperação de carotenoides	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Identificação do micro-organismo	20
3.2 Manutenção da cultura	20
3.3 Produção de carotenoides.....	21
3.4 Recuperação de carotenoides.....	22
3.5 Metodologia Analítica.....	23
3.5.1 Determinação de carotenoides totais	24

3.5.2 Determinação de carotenoides específicos	24
3.5.3 Determinação de biomassa	24
3.5.4 Determinação de pH	25
3.5.5. Determinação de glicose.....	25
3.6 Cinética do processo fermentativo	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Características macroscópicas e de crescimento da linhagem.....	26
4.2 Bioprodução de carotenoides.....	27
4.3 Cinética da Bioprodução	36
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	40
5.1 Conclusões.....	40
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
APÊNDICE	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura básica dos carotenoides.....	3
Figura 2 Estrutura química do β , β -Caroteno.....	4
Figura 3 Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenoides.....	5
Figura 4 Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides.....	6
Figura 5 Formação de Xantofilas a partir de α -Caroteno.....	7
Figura 6 Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides.....	7
Figura 7 Aspecto da maceração das células com Nitrogênio líquido.....	22
Figura 8 Fluxograma do processo de recuperação de extração de carotenoides totais.....	23
Figura 9 Características macroscópicas da linhagem <i>Sporidiobolus pararoseus</i> cultivada em meio YM agár com 48 horas de crescimento.....	26
Figura 10 Curva de crescimento (UA) da linhagem <i>Sporidiobolus pararoseus</i> , durante 70 horas de crescimento.....	27
Figura 11 Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento Plackett-Burman para a concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).....	29
Figura 12 Superfícies de resposta e curvas de contorno para os carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), glicose e peptona (c), respectivamente.....	32
Figura 13 Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a biomassa (g/L).....	34
Figura 14 Gráfico de pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g/L}$).....	35
Figura 15 Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> e evolução do pH para condições otimizadas (180 rpm, 25°C , pH inicial 4,0, 15g/L de extrato de malte, 15g/L de peptona e 60g/L de glicose).....	36

Figura 16 Cinética da bioprodução do consumo de substrato para condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 15g/L de extrato de malte, 15g/L de peptona e 60g/L de glicose).....	38
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Micro-organismos empregados na bioprodução de carotenoides.....	10
Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no Planejamento do tipo Plackett-Burman.....	21
Tabela 3 Variáveis e níveis utilizados no Planejamento Completo 2 ³	22
Tabela 4 Matriz do Planejamento tipo Plackett-Burman (valores reais e codificados) e resposta em carotenoides totais (µg/L).....	28
Tabela 5 Matriz do Planejamento completo 2 ³ (valores reais e codificados) com as respostas de carotenoides totais e específicos, biomassa e pH.....	30
Tabela 6 Resultados do coeficiente de regressão e desvio padrão provenientes do planejamento fatorial completo, para carotenoides totais.....	30
Tabela 7 Análise de variância para os carotenoides totais.....	31
Tabela 8 Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> , consumo de substrato e evolução do pH para as condições otimizadas.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são os pigmentos mais abundantes responsáveis por cores brilhantes (GIBNEY et al., 2006). São pigmentos responsáveis pela coloração amarela, vermelha e roxa de uma grande variedade de plantas, animais e micro-organismos (CHEN et al., 2006). São compostos notáveis por possuírem ampla distribuição na natureza, estruturas químicas diversas e funções variadas. Embora sejam micronutrientes, presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), os carotenoides estão entre os constituintes alimentícios mais importantes (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). Estes compostos são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. Além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitamina A (NIIZU, 2003; CHEN et al., 2006).

Nos últimos vinte anos as evidências científicas dão importância aos carotenoides não apenas pela ampla aplicação como corantes de alimentos e como precursores de vitamina A, mas também pelos efeitos benéficos para a saúde humana com atividades biológicas importantes destacando-se a inibição de doenças onde os radicais livres apresentam papel fundamental, como arteriosclerose, catarata, degeneração macular, esclerose múltipla, câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares e fortalecimento do sistema imunológico (BOTELLA-PAVÍA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; MALDONADE et al., 2007; AKSU & EREN, 2007).

A produção biotecnológica de carotenoides para a aplicação industrial, através de micro-organismos, tem sido assunto de destaque nos últimos anos, pois a grande maioria dos carotenóides utilizados industrialmente é obtida por via química ou extração de plantas ou algas. Devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos, houve um crescente interesse nos carotenóides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos. Além disso, a produção se dá em pequeno espaço, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo; existe a possibilidade de controlar as condições de cultivo para garantir a produção de carotenoides de maior importância e a utilização de substratos de baixo custo (JOHNSON & SCHROEDER, 1995; BOTELLA-PAVÍA & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; AKSU & EREN, 2007).

Há algumas décadas as condições ambientais e os estimulantes da carotenogênese vêm sendo examinados, a fim de melhorar a produção de carotenóides e avaliar os micro-organismos produtores de pigmento (microalgas, fungos e bactérias). A composição do meio de cultivo, tais como a fonte de carbono e nitrogênio (AKSU & EREN, 2005), presença de metais e sais (BUZZINI et al., 2005) e agentes químicos como a difenilamina, o dimetilsulfóxido, a estreptomicina e a β -

ionona (SILVA, 2004) são fatores que necessitam de investigação para um aumento na produção. Além disso, as condições ambientais também merecem atenção, como a luminosidade (GARBAYO et al., 2003), agitação, aeração e pH (LIU & WU, 2006).

Tendo isso em vista, o presente estudo tem como objetivo o estudo da bioprodução de carotenoides utilizando uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus*, selecionada de amostras de folha de laranjeira e eucalipto. Como forma de embasar cientificamente os resultados obtidos será apresentado um referencial teórico coerente ao assunto, seguido pela descrição detalhada do procedimento experimental adotado. A apresentação e discussão dos resultados e as conclusões e sugestões encerram este trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão apresentadas informações sobre a bioprodução de carotenóides, abordando definições, estrutura química, nomenclatura, biossíntese, propriedades e funções dos carotenóides na saúde humana, aspectos industriais da produção, microrganismos produtores, fatores que influenciam a bioprodução e processos de extração e recuperação destes compostos.

2.1 Estrutura química, nomenclatura e biossíntese dos carotenoides

O caminho biossintético tem sido constantemente revisado e de acordo com Silva (2004) pode ser dividido em 5 etapas: estágios iniciais, formação de fitoeno, desaturação, ciclização e formação de xantofilas, como descrito na Figura 1.



Figura 1: Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

As reações iniciais são comuns para a biossíntese de todas as classes de terpenoides e resultam na formação de um composto de vinte carbonos, o geranylgeranyl difosfato (GGPP) como descrito na Figura 2 (SILVA, 2004).

Inicialmente o ácido mevalônico é convertido em isopentil difosfato que sofre isomerização para formar o dimetilail difosfato que é a base para a enlongação da cadeia. Sucessivas adições de moléculas de isopentil difosfato levam a formação do geranil difosfato (dez carbonos), farnesil difosfato (quinze carbonos) e geranilgeranil difosfato (vinte carbonos) (SILVA, 2004).

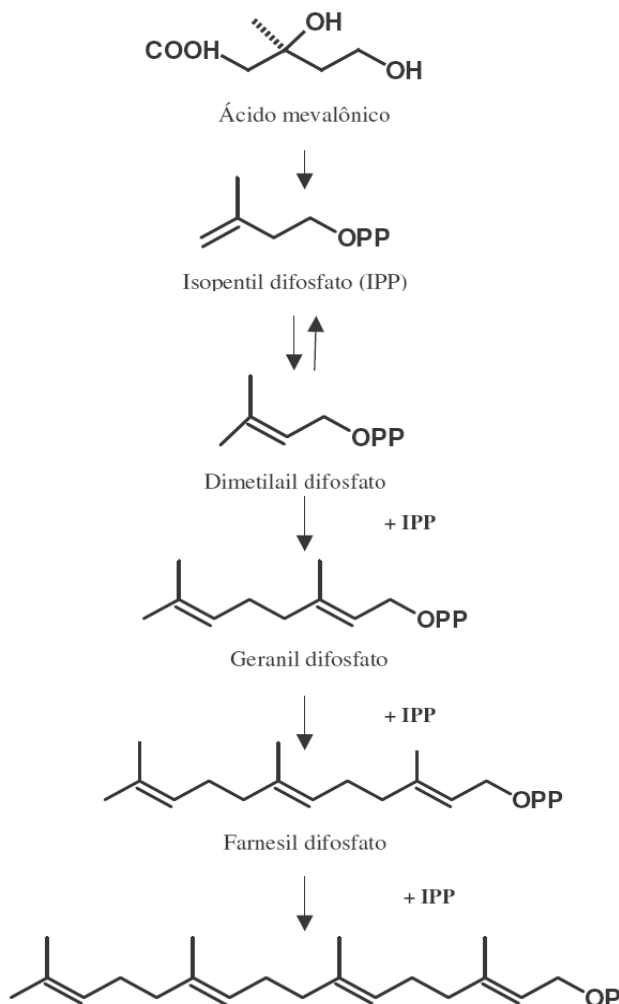


Figura 2: Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

A reação chave para a carotenogênese é a dimerização de duas moléculas de geranilgeranildifosfato para formar o fitoeno, que é o primeiro carotenóide com quarenta carbonos. Segue uma série de desaturações a partir do Fitoeno para formar Fitoflueno, Zetacaroteno, Neurosporeno e, finalmente, Licopeno (Figura 3).

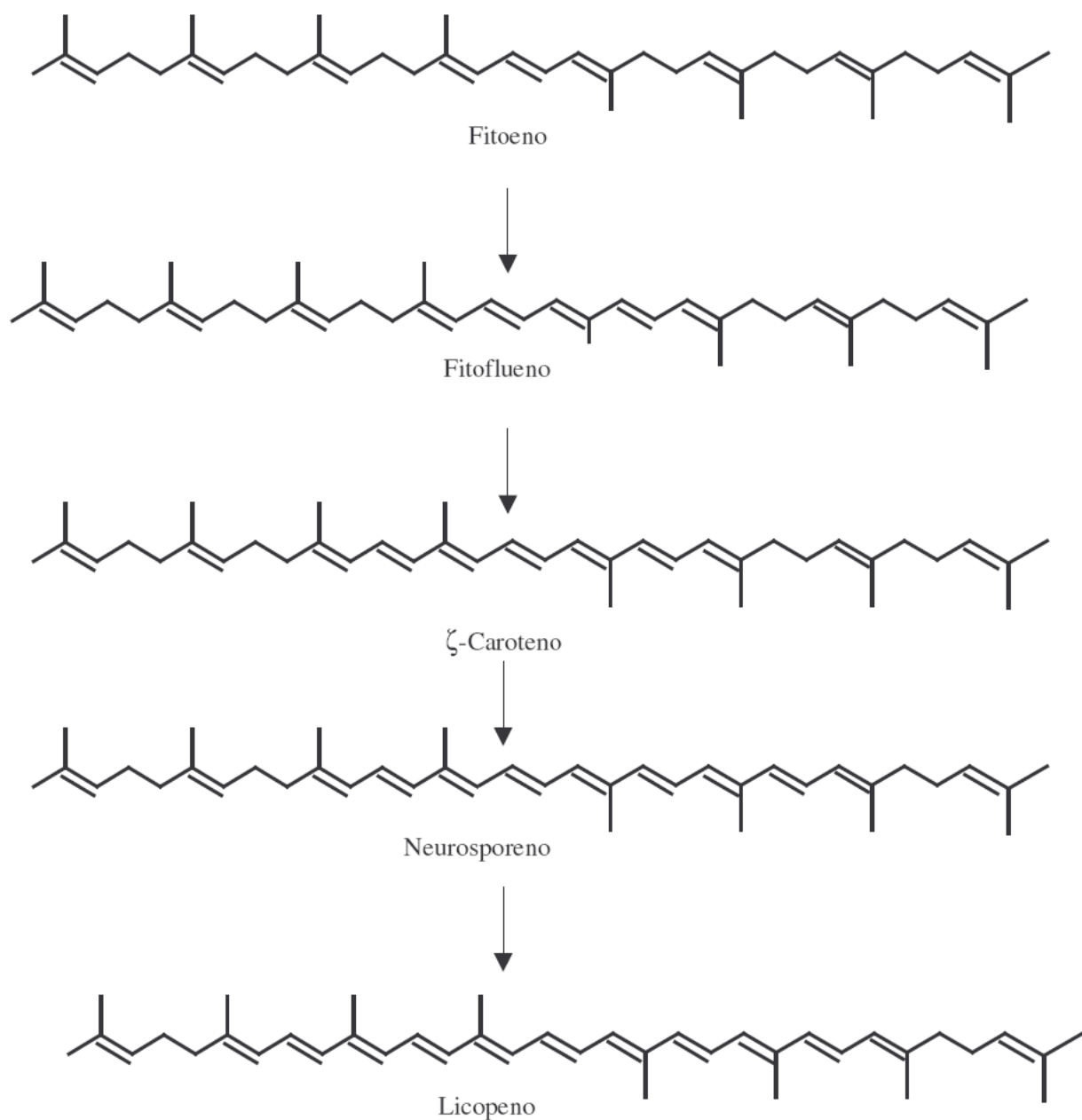


Figura 3: Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

A ciclização pode acontecer a partir de Neurosporeno ou de licopeno (Figura 4). O Neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β -Zeacaroteno ou o anel ϵ de α -Zeacaroteno. Estes dois carotenoides são transformados em γ -Caroteno e δ -Caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de duplas ligações conjugadas. O Licopeno pode ser também ciclicizado em uma das extremidades, gerando γ -Caroteno ou δ -Caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -Caroteno e α -Caroteno (bicíclicos), respectivamente (SILVA, 2004).

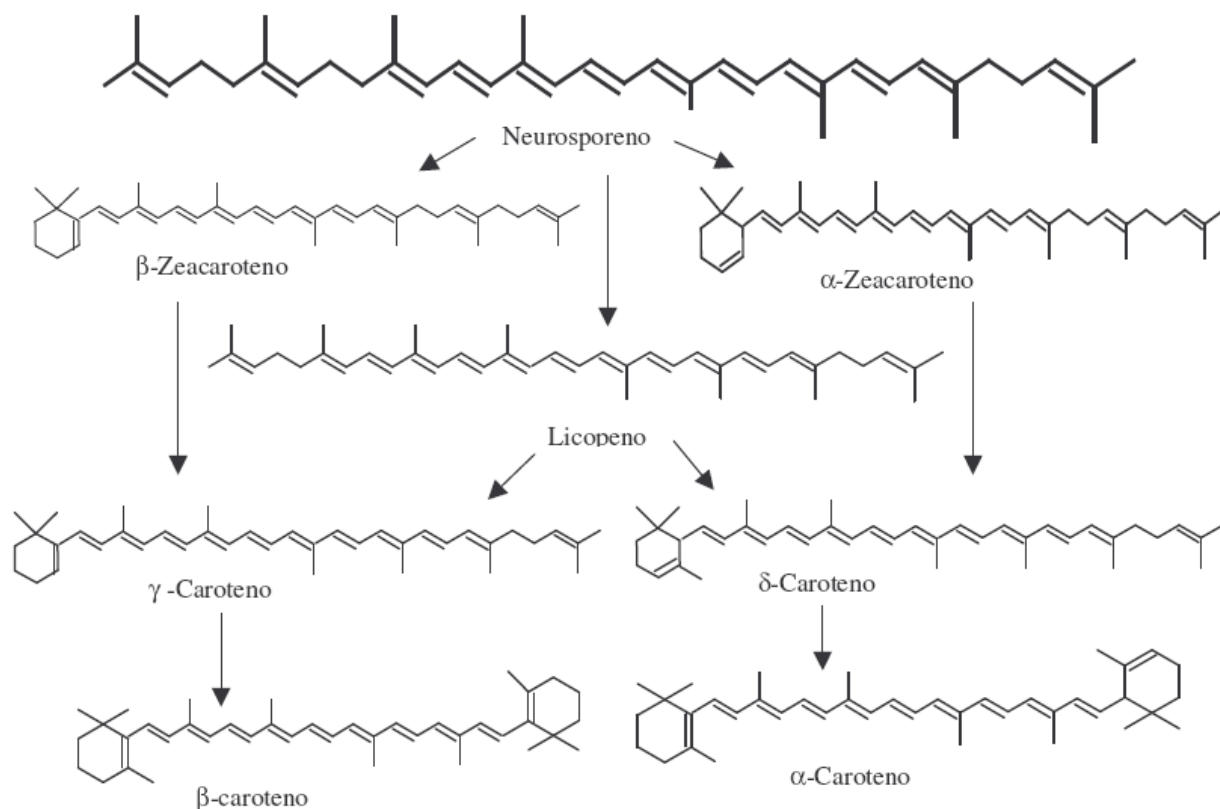


Figura 4: Formação de carotenoides cíclicos (SILVA, 2004).

Nos passos finais da biossíntese ocorre a introdução de substituintes como hidroxila, gerando as xantofilas (Figuras 5 e 6). Zeinoxantina, α -Criptoxantina (monohidroxiladas) e Luteína (dihidroxilada) são formadas por hidroxilação de α -Caroteno. β -Criptoxantina e Zeaxantina são derivados hidroxilados de β -Caroteno enquanto que a Violaxantina é formada pela epoxidação da Zeaxantina (SILVA, 2004).

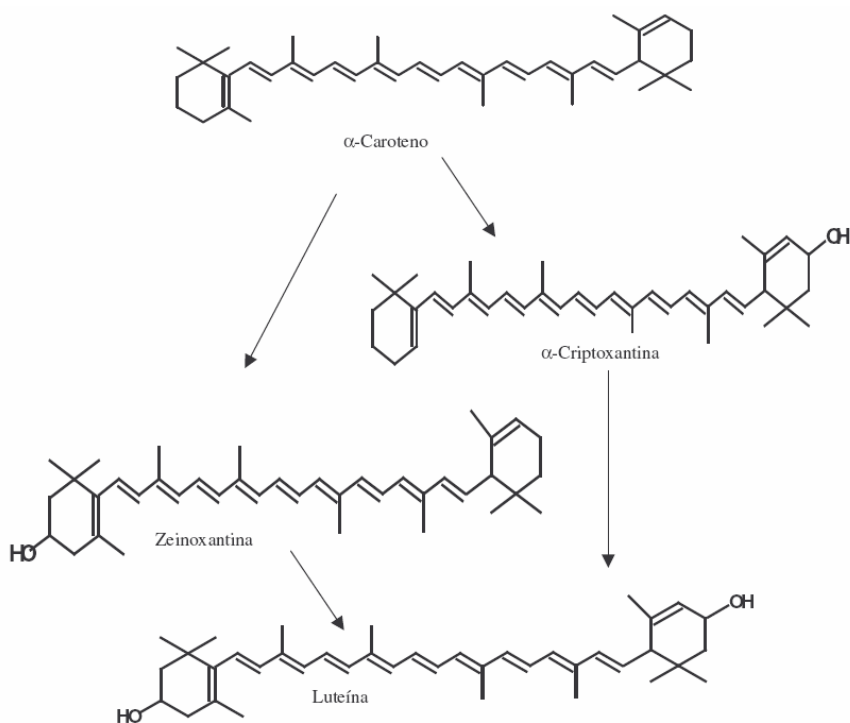


Figura 5: Formação de Xantofilas a partir de α -Caroteno (SILVA, 2004).

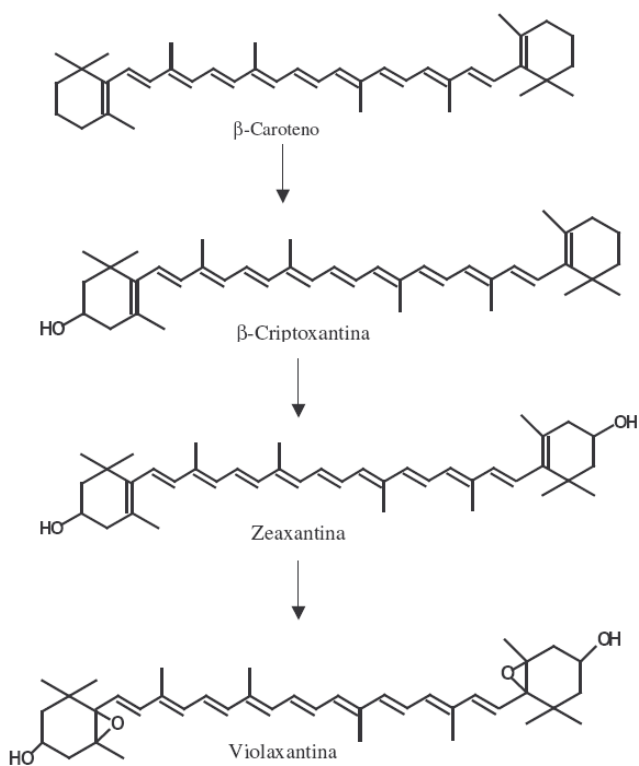


Figura 6: Formação de Xantofilas a partir de β -Caroteno (SILVA, 2004).

2.2 Propriedade e funções dos carotenoides

Os carotenóides mais pesquisados por seu envolvimento na saúde humana são o β -Caroteno (β,β -Caroteno), α -Caroteno (β,ϵ -Caroteno), β -Criptoxantina (β,β -Caroten-3-ol), Licopeno (ψ, ψ -caroteno), Luteína (β,ϵ -caroteno-3-3'-diol) e Zeaxantina (β, β -caroteno-3-3'-diol) (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

É consistente a hipótese dos benefícios associados ao consumo de vegetais e a redução dos riscos de enfermidades crônicas relacionadas a ingestão de uma dieta de carotenoides, reportam Qing et al. (2002), após examinarem diversas pesquisas.

Além da importância dos β -Carotenos como pró-vitamina A, nas últimas décadas foram descobertas inúmeras funções. Portanto, pode-se considerá-los essenciais aos seres humanos. Na absorção, podem ser divididos em retinal; caso contrário podem ser absorvidos na forma em que se encontram. Neste último caso, apresentam funções “antioxidantes” na célula (BIESALSKI & GRIMM, 2007). Em anos mais recentes, outros efeitos promotores da saúde têm sido atribuídos aos carotenoides: imunomodulação e redução do risco de contrair doenças crônicas degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular relacionada à idade. Tais atividades fisiológicas não possuem relação com a atividade vitamínica A e têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, especificamente, a capacidade de seqüestrar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Entretanto, outros mecanismos de ação dos carotenoides contra as doenças crônicas foram relatados. Tais como a inibição da proliferação celular, realce da diferenciação celular, estimulação da comunicação intercelular e filtragem da luz azul (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

No ser humano é reportado existir uma relação inversa ao risco de câncer associado a presença na dieta, de determinados carotenos como o Licopeno e o β -Caroteno, identificados com frequência em tecidos e órgãos como: tireóide, rins, coração, testículos, tecido adiposo e pâncreas, e que a Luteína e a Zeaxantina acumuladas na retina atuam fundamentalmente como fotoprotetores das células contra radicais originados do oxigênio pela ação da luz (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Uenojo et al. (2007), os carotenoides possuem um efeito destacável na resposta imune e na comunicação intracelular e apresentam efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao envelhecimento. Além disso, há indícios de que os carotenoides em associação com outros componentes de frutas e vegetais apresentam efeito protetor contra algumas doenças crônicas. Por exemplo, o efeito sinérgico entre β -Caroteno e vitaminas C e E foi observado na

proteção celular, provavelmente decorrente da capacidade do β -Caroteno em destruir os radicais livres e reparar os radicais de tocoferol produzidos pela ação do α -Tocoferol.

O Licopeno, caroteno presente em produtos de tomate, previne a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Low Density Protein-LDL) e reduz o risco do desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronárias, além disso, outras pesquisas sugerem que este carotenoide pode reduzir o câncer de próstata, pulmão, pele e bexiga. O efeito antioxidante da Bixina e Norbixina tem importância na prevenção de aterosclerose. Uma vez que as lesões ateroscleróticas iniciam-se após algum tipo de lesão no endotélio cujo dano é causado principalmente pela lipoproteína LDL oxidada, a inibição da oxidação resulta na proteção do edotélio (LIMA et al., 2003).

2.3 Micro-organismos produtores de carotenoides

A produção comercial de carotenoides a partir de micro-organismos concorre principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos. Atualmente, os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos (ZENI, 2009).

Os carotenoides podem ser biossintetizados por micro-Organismos fotossintetizantes, como por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes), e por micro-organismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

A produção de carotenóides pelo processo biotecnológico tem sido investigada, destacando-se a produção comercial de β -Caroteno pelo fungo *Blakeslea trispora* (FEOFILOVA, 1994), pelas microalgas marinhas *Dunaliella* (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1989), e a produção de Astaxantina pela microalga de água doce *Haematococcus* sp. e pela levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

Na Tabela. 1 estão apresentados os micro-organismos tecnologicamente interessantes com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenoides.

Tabela 1: Micro-organismos empregados na bioprodução de carotenoides.

Espécies	Carotenóides produzidos	Referências
Cianobactérias		
<i>Synechococcus sp.</i>	β –Caroteno, β – Criptoxantina, Zeaxantina, Mixoxantofila	MONTERO et al., 2005.
Algas		
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	β –Caroteno, Luteína, Zeaxantina, Violaxantina	GARBAYO et al., 2008.
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Anteraxantina, β - Caroteno, Clorofila, Neoxantina, Violaxantina, Zeaxantina	BHOSALE &BERNSTEIN, 2005; VILA et al., 2008.
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina, Luteína	BHOSALE &BERNSTEIN, 2005.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Violaxantina	BHOSALE &BERNSTEIN, 2005.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Violaxantina	BHOSALE &BERNSTEIN, 2005.
<i>Dunaliella bardawill</i>	α -Caroteno, β -Caroteno	MONTERO et al.,2005.
<i>Dunaliella bardawill</i>	Luteína, Zeaxantina	BHOSALE &BERNSTEIN, 2005.
<i>Dunaliella tertiolecta</i> DCCBC26	β –Caroteno (trans e 9-cis)	FAZELI et al., 2006.
<i>Haematococcus sp.</i>	Astaxantina, β -Caroteno.	VILA et al., 2008.
<i>Haematococcus pluvialis</i> NIES-144	Astaxantina	KANG et al.,2006.
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	BHOSALE, 2004, BHOSALE & BERNSTEIN, 2005 ; MONTERO et al.,2005 ; DOMÍNGUEZ- BOCANEGRA et al., 2007. BHOSALE, 2004.
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Fucoxantina	
Bactérias		
<i>Brevibacterium linens</i>	β -Criptoxantina	BHOSALE & BERNSTEIN, 2005.
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Γ -Caroteno, Hidroxi- γ - Caroteno	BHOSALE, 2004.
<i>Ervinia sp.</i>	β –Caroteno, Licopeno, Zeaxantina	MISAWA & SHIMADA, 1998.
<i>Escherichia coli</i>	Licopeno	MIURA et al.,1998.
<i>Halobacillus halophilus</i>	Carotenoides.	KÖCHER et al., 2009
<i>Halomonas elongata</i>	B-Caroteno	RODRÍGUEZ-SAÍZ et al., 2007.
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	Saproxantina, Mixol, Zeaxantina.	SHINDO et al., 2007.
<i>Flavobacterium sp.</i>	β –Caroteno, Xantofila.	SHINDO et al., 2007.

<i>Flavobacterium multivorum</i>	Zeaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN, 2005.
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN, 2005.
<i>Phormidium laminosum</i>	Zeaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN, 2005.
<i>Thermus thermophilus</i>	β -Criptoxantina, Zeaxantina.	KÖCHER et al., 2009
Fungos e leveduras		
<i>Candida utilis</i>	Licopeno	MIURA et al.,1998.
<i>Coriolus versicolor</i> as 5.48	Astaxantina	WANG et al.,2005.
<i>Mortieralla alpina</i> M-23	Astaxantina	WANG et al.,2005.
<i>Mucor mucedo</i> AS3.2531	Astaxantina	WANG et al.,2005.
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS 2.1557	Astaxantina	WANG et al., 2005.
<i>Panus conchatus</i> as 5.154	Astaxantina	WANG et al.,2005.
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	β –Caroteno, Licopeno	BHOSALE, 2004.
<i>Podospora anserina</i>	β –Caroteno, γ –Caroteno, β –Zeacaroteno, Fitoeno, Licopeno, Neurospeno, Neurosporaxantina, Toruleno	STROBEL et al., 2009.
<i>Rhodotorula glutinis</i> 2.703	Astaxantina	WANG et al.,2005 ; MONTERO et al.,2005.
<i>Rhodotorula graminis</i>	Caroteno	BUZZINI et al., 2005.
<i>Rhodotorula minuta</i>	β –Caroteno	MONTERO et al., 2005.
<i>Rhodotorula rubra</i> AS2.670	Astaxantina	WANG et al.,2005.
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Caroteno	CHEN et.al.,2006.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Licopeno	MIURA et al., 1998, MISAWA & SHIMADA, 1998.
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	HU et. al.,2006; WANG et.al.,2005.

2.4 Fatores que exercem influência na carotenogênese

Alguns fatores que podem influenciar a carotenogênese são levados em conta, tais como a adição de agentes químicos ao meio de cultivo, a incidência de luz, a temperatura, a composição do meio de cultura, dentre outros que serão descritos a seguir.

2.4.1 Condição do meio de cultivo

A sacarose e a glicose são as fontes de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides (TATSCH, 2008).

De acordo com Buzzini et al., (2005), o uso de glicose leva a maiores rendimentos na produção específica de carotenoides (1000 µg/g) por *Rhodotorula* sp. Sutherland et al. (1996) verificaram que concentrações altas de glicose inibem a carotenogênese, enquanto que a sacarose, maltose e celobiose foram os dissacarídeos que produziram melhores resultados na produção de Astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. Yamane et al. (1997) observaram que houve um aumento de até 12 vezes na produção de β-Caroteno quando *P. rhodozyma* cresceu em meio com 5 % (m/v) de açúcar.

A produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* utilizando substratos de baixo custo (glicose, sacarose de melaço e lactose do soro de queijo) também foi estudada por Aksu & Eren (2007). A maior concentração de carotenóides totais (125 µg/ml) foi obtida com 20 g/L de sacarose de melaço, enquanto que, o maior rendimento de produto baseado na máxima concentração celular (35,5 mg/g) foi alcançado com a lactose do soro na concentração de 13,2 g/L. Os resultados comprovaram que a *R. glutinis* é um micro-organismo promissor para a utilização industrial.

A levedura *Sporobolomyces ruberrimus* H110 foi cultivada por Razavi & March (2006) em diferentes fontes de carbono: glicerol puro, glicerol comercial e glicose. O glicerol comercial propiciou a concentração máxima de carotenoides de 3840 µg/g, onde se observou a Torularrodina (3,7 mg/g) como carotenoide majoritário, seguida de β-Caroteno (0,14 mg/g).

Em estudo realizado por Davoli et al. (2004) com a levedura *Sporobolomyces roseus* cultivada em meio YED (30 g/L de glicose, 4 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH₂PO₄ e 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O), tendo glicose como fonte de carbono, obteve-se uma concentração máxima de carotenoides de 412 µg/g, sendo que os carotenóides majoritários foram o Toruleno e β-Caroteno.

2.4.2 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos micro-organismos, causando alterações em muitas vias biossintéticas, inclusive na carotenogênese (ZENI, 2009). Segundo Bhosale (2004), a temperatura exerce controle na concentração de enzimas envolvidas na produção de carotenoides, e mudanças na concentração enzimática definitivamente controlam o nível de carotenoides nos micro-organismos.

Para a otimização da produção de carotenóides por *Phaffia rhodozyma*, a temperatura foi o fator que mais influenciou na produção de Astaxantina. Ramírez et al. (2001), testando diferentes temperaturas, observou que para cepas selvagens a temperatura ótima apresenta-se entre 20 °C e 22 °C, enquanto que na cepa mutante foi observada uma temperatura ótima de 19,7 °C.

De acordo com Garbayo, et al. (2008), a temperatura é considerada o fator de controle tanto na taxa de crescimento como na produção de carotenoides. Em estudos da viabilidade de *Chlamydomonas acidophila* em taxas de temperatura de 25°C a 50°C, os melhores resultados obtidos tanto para crescimento como para produção de carotenoides foi em 40°C enquanto que a temperatura de 50°C foi letal para a alga. A produção de Luteína e β -Caroteno foi otimizada em 40°C em *C. acidophila*.

O estudo da influência da temperatura sobre o crescimento celular e produção de carotenoides da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foi analisado por Razavi & March (2006), sendo observado o crescimento na produção celular enquanto manteve-se a temperatura entre 19 °C e 27 °C. Em temperatura superior a 27 °C ocorreu crescimento celular, porém as células não apresentaram coloração. A produção dos carotenoides ocorreu rapidamente durante a fase exponencial na maioria das temperaturas, com exceção a 31 °C. A temperatura ótima de bioprodução foi de 19 °C, onde a torularrodina foi sintetizada em quantidade superior ao β -Caroteno, 120 μ g/ml e 5 μ g/ml, respectivamente.

Frengova et al. (1995) verificaram que a concentração relativa de cada carotenoide foi alterada pela temperatura de fermentação. Quando *Rhodotorula glutinis* foi cultivada em 5 °C, ocorreu a produção predominante de β -Caroteno, enquanto que o cultivo a 25 °C levou à síntese de Toruleno e Torularrodina. O crescimento celular ótimo foi obtido a 30 °C. Nesta mesma temperatura, a máxima produção de carotenoides foi de 8388 μ g/L e 31,9 g/L de biomassa.

A levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou-se sensível ao fator temperatura em relação ao crescimento celular. Em condições otimizadas, obteve-se concentração de carotenoides totais de 3,5 μ g/ml e 10,3 g/L de células. Das temperaturas testadas (9 níveis), a faixa ótima de crescimento foi de 28 °C a 30 °C, comportamento este típico do gênero (TINOI et al., 2005).

2.4.3 pH

A biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo (FRENGOVA et al., 1994).

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial é objeto de estudo na produção de carotenóides. Para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* o pH inicial foi avaliado por Razavi &

March (2006), apresentando um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e biomassa. O conteúdo mínimo de carotenóides e células foi observado com cultivo a pH 3,5 (biomassa: 6,8 g/L; carotenóides específicos: 2,0 mg/g). A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 a 6,0, sendo pH 6,0 ótimo para o crescimento celular (11,3 g/L) e formação de pigmento (38,7 mg/L).

O efeito do pH inicial na concentração de carotenoides e biomassa de *Sporidiobolus salmonicolor* em frascos agitados foi avaliado por Valduga et al. (2009a). Verificou-se que o melhor pH de crescimento encontra-se entre 4,0 e 5,0, enquanto que a máxima produção de carotenoides dá-se em pH 4,0.

Os efeitos do pH inicial e do pH controlado durante a fermentação no cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* para produção de Astaxantina foram estudados por Hu et al. (2006). Na fermentação em frascos agitados foram observados pHs iniciais ótimos de 6,0 para crescimento celular (17,2 g/L) e 5,0 para produção de Astaxantina (20,4 mg/L). Em relação ao pH controlado no fermentador, obtiveram-se as seguintes respostas para concentração de Astaxantina: pH 4,0 – 17,7 mg/L, pH 5,0 – 21,8 mg/L e pH 6,0 – 18,8 mg/L. Para crescimento celular, a maior concentração de biomassa foi obtida a pH 6,0 (17,2 g/L). Assim, devido à variabilidade dos resultados, desenvolveu-se uma estratégia de controle de pH com a finalidade de aumentar a produção de Astaxantina. Como o fator $Y_{P/X}$ (1,5 mg/g) mais elevado foi em pH 4,0 e o maior crescimento celular foi em pH 6,0, realizou-se uma fermentação onde nas primeiras 80 h manteve-se pH 6,0 e no restante da fermentação pH 4,0. Com essa estratégia de cultivo, obteve-se uma concentração de Astaxantina de 27,0 mg/L, um aumento de 24,1 % em comparação com a fermentação em pH constante.

O valor de pH do meio de cultivo não influenciou somente a atividade biossintética da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em estudo realizado por Aksu & Eren (2005), mas também a taxa de crescimento da cultura. Com a elevação do pH de 3,0 a 7,0 observou-se aumento nas taxas de crescimento e produção de carotenoides, com decréscimo em maiores valores de pH.

2.4.4 Outros fatores que influenciam a carotenogênese

Componentes químicos:

Muitos agentes químicos afetam a carotenogênese em um grande número de sistemas microbióticos. Estes componentes que incluem terpenos, ionenos, aminas, alcalóides e antibióticos (BHOSALE, 2004), ácido acético, β -ionona, ácido mevalônico, difenilamina e outros aminoácidos

(SILVA, 2004), piridina, imidazol, e metilptenone estimulam a formação de Licopeno em *Blaskea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus* (FEOVILA et al., 1994).

Metais, íons e sais:

Íons metálicos estão envolvidos em todos os aspectos da vida microbológica. Cátions como o Potássio e o Magnésio são a maior parte das espécies intracelulares, enquanto o Sódio, Cálcio, Zinco e outros numerosos elementos de transição são íons metálicos essenciais. As taxas biológicas destes cátions em micro-organismos são difíceis de explorar em parte porque eles interagem fracamente com ligantes carregados. Além do mais, poucos estudos sobre taxa de cátions na produção de carotenóides tem sido investigados (BHOSALE, 2004).

O Magnésio desempenha um papel importante no processo de fotossíntese e no metabolismo de carboidratos como co-fator de muitas enzimas. Além disso, Mg^{2+} é essencial para o crescimento e produção de carotenoides. Estudos apontaram que Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} promovem a produção de biomassa (CHEN & HAN, 2006).

A salinidade também é um fator que provoca alterações na produção de carotenoides. Fazeli et al. (2006), examinaram o efeito de diferentes concentrações salinas (0,05 a 3 M NaCl) sobre a cinética de crescimento, carotenoides totais e β -Caroteno acumulados na microalga *Dunaliella tertiolecta*. A maior quantidade de carotenoides detectada (11,7 mg/L) foi em salinidade de 0,5 M NaCl, porém nas maiores concentrações salinas (3 M NaCl) obteve-se maior produção de carotenoides específicos (2,0 pg/cel).

Luz/Luminosidade:

A produção e o acúmulo de carotenoides são positivamente afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o micro-organismo. A teoria da foto indução pode ser descrita em dois aspectos, no primeiro o efeito da luz sobre o crescimento do micro-organismo exerce papel fundamental, como estimulante da produção; o segundo aspecto considera que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (BHOSALE, 2004).

Alguns trabalhos demonstram que determinadas leveduras biossintetizam carotenoides contra os danos causados pela luz. Os efeitos da luz branca sobre o crescimento e produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* foi investigado por Sakaki et al. (2001). Para a levedura não pigmentada *Saccharomyces cerevisiae* uma fraca irradiação de luz branca não apresentou efeito

sobre o crescimento das células, no entanto na levedura selvagem *R. glutinis*, a luz inibiu o crescimento celular, onde simultaneamente, a produção de Torularrodina aumentou (7,9 para 14,2 mg/100g células), principalmente durante a fase exponencial.

Taxa de agitação e aeração:

Os micro-organismos aeróbicos assim como *Phaffia rhodozyma*, cujo crescimento (metabolismo primário) é dependente do fornecimento de Oxigênio, necessitam de definição das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento (TATSCH, 2008).

A influência da aeração sobre o conteúdo de carotenoides da levedura *Sporobolomyces roseus* e foi estudada por Davoli et al. (2004), onde o aumento na aeração proporcionou o incremento na concentração de carotenoides de 109 µg/g para 412 µg/g. Tinoi et al. (2005), na bioprodução em frascos agitados, verificaram que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes na superfície das células. Ao contrário, em altas taxas de agitação (>250 rpm), ocorreu ruptura celular evidenciado com o aparecimento de uma fina camada oleosa.

A possibilidade da produção de corantes naturais em escala industrial, e o elevado valor dos produtos tornam a produção biotecnológica de carotenóides uma área de intenso estudo. A produtividade de um bioprocessos em um dado sistema depende das condições nutricionais e físicas da cultura, afetando não somente o crescimento celular como a produção de pigmento (Liu & Wu, 2007). Sendo assim, os microrganismos acumulam vários tipos de carotenóides como resposta ao estresse das condições ambientais (BHOSALE, 2004).

Melhorar a eficiência da biossíntese de carotenóides pode aumentar a produção. Juntamente com as condições de cultivo, a biossíntese de carotenóides é conduzida pelo nível e atividade das enzimas biossintéticas e o fluxo total de carbono do sistema sintetizante. Assim, uma alta produção pode ser alcançada alterando-se o nível e a atividade destas enzimas ou a via biossintética, pela utilização de uma abordagem molecular (BHOSALE, 2004).

Segundo Bhosale (2004), pode-se alcançar uma melhor produção de carotenóides com um custo efetivo, utilizando estimulantes no meio e ajustando as condições externas do cultivo.

2.5 Extração e recuperação de carotenóides

A bioprodução industrial de carotenoides está bem estabelecida e vem se expandindo comercialmente, porém as operações de extração e recuperação do produto contribuem para aumento dos custos da produção. Assim, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados visando estudar

a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares (VALDUGA et al., 2009c; SARADA et al., 2006; PARK et al., 2007) e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custo com as operações de *downstream*.

Park et al.,(2007) testaram cinco solventes para a ruptura das células de *Rhodotorula glutinis*, encontrando β -Caroteno, Toruleno e Torularrodina no extrato. A mistura dos solventes dimetilsufóxido (DMSO), éter de petróleo e acetona mostrou-se eficiente, gerando máxima extração quando comparada aos solventes individuais.

Um método melhorado de extração de Astaxantina de *Haematococcus pluvialis* sem homogeneização foi desenvolvido por Sarada et al. (2006), a extração do solvente foi facilitada pelo tratamento das células com HCl 4 N a 70 °C, onde se obteve uma extração de 90 % dos pigmentos sem homogeneização.

Em função da forte associação dos carotenóides com as células e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, Valduga et al. (2009c) testaram 11 métodos diferentes de rompimento celular e extração com solventes. Foi constatado que quando utilizada a combinação Nitrogênio líquido e DMSO para ruptura celular e extração com mistura de acetona e metanol (7:3), obteve-se a maior recuperação de carotenóides da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* cultivada em meio composto por 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptonas.

2.6 Aplicação de carotenoides na indústria de alimentos

Comercialmente, os carotenoides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global de aproximadamente US\$ 935 milhões/ano, sendo que somente a Astaxantina representou cerca de US\$ 150 milhões no ano de 2000 e, com um valor expressivo de US\$ 2000/kg (FRASER & BRAMLEY, 2004).

Um grande mercado de pigmentos está satisfazendo o meio sintético. No entanto, na indústria alimentícia e de cosméticos, a aplicação de carotenóides quimicamente sintetizados é restrita devido a sua toxicidade. Devido isso, a produção comercial de carotenóides usando carotenóides produzidos por micro-organismos tem sido levada em consideração por ser altamente eficiente e de processo com fácil manipulação. Numerosos estudos têm sido apresentados nos últimos anos a respeito da síntese de carotenóides por micro-organismos, incluindo *Flavobacterium* e *Micrococcus*, as algas *Dunaliella* e *Haematococcus*, os fungos *Blakeslea trispora*, e as leveduras do gênero *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (CHEN et al., 2006).

Segundo Silva (2004), a produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como: possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e controle das condições de cultivo.

A grande demanda gerada pelas indústrias e a crescente procura por produtos naturais, têm resultado em um aumento nas pesquisas referentes à produção de carotenóides via fermentativa. Além da conotação “natural”, os produtos obtidos por produção microbiana podem ser obtidos em curto prazo, em qualquer época do ano (TATSCH, 2008).

O uso de carotenóides naturais como corantes alimentícios apresentam vantagens porque são de origem natural, são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos, não são corrosivos e nem são afetados por substâncias redutoras. As desvantagens estão relacionadas com o alto custo comparado aos corantes sintéticos, a limitada faixa de coloração, a susceptibilidade à degradação oxidativa, a limitada solubilidade em óleo e insolubilidade em água (SILVA, 2004).

Há um grande número de preparações industrializadas de carotenoides obtidos de extratos naturais ou formuladas a partir de carotenóides sintéticos, que são usadas como corantes em alimentos como margarinas e queijos, devido à sua inocuidade, facilidade de metabolização e reprodutibilidade da cor (DUTRA-DE-OLIVEIRA & MARCHINI, 1998).

Os carotenoides em formulações comerciais são de dois tipos: extratos naturais e carotenoides sintéticos idênticos aos naturais. Os extratos naturais vegetais estão sujeitos a flutuações na composição qualitativa e quantitativa devido ao clima ou a região de cultivo, ao estado de maturação na colheita e perdas devidas às condições pós-colheita. Além disso, as fontes vegetais também produzem baixas concentrações de pigmentos, dificultando a extração (SILVA, 2004).

A produção e comercialização de carotenoides sintéticos idênticos aos naturais estão sob o domínio de países desenvolvidos e sua tecnologia é complexa e cara. A conotação sintética vai contra a presente ênfase dada aos produtos naturais (SILVA, 2004).

A importância de carotenóides em alimentos vai além de seu papel como corante. Em se tratando de nutrição humana, a vitamina A é proveniente de alimentos de origem animal e as pró-vitaminas A de alimentos de origem vegetal, que possuem carotenóides passíveis de serem biologicamente transformados em vitamina A. Estruturalmente, a vitamina A é a metade da molécula de β -caroteno com uma molécula adicional de água. Para um carotenóide apresentar atividade pró-vitáminica A é necessário que a molécula seja constituída de um anel β não

substituído e de uma cadeia poliênica de onze carbonos. Das mais de 600 estruturas de carotenóides conhecidas, pouco mais de 10% são pró-vitaminas A. Em países menos desenvolvidos, a deficiência de vitamina A é um dos problemas mais sérios de saúde pública. Em nível mundial, cerca de 60% da vitamina A alimentar vêm das pró-vitaminas A; esta porcentagem aumenta para 80% nos países em desenvolvimento. Esses precursores têm a vantagem adicional de não serem convertidos em vitamina A quando o corpo humano não necessita, evitando assim, potencial toxicidade causada por vitamina A em excesso (Silva, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação do micro-organismo

A identificação do micro-organismo foi realizada em parceria com o Laboratório CENA - USP/SP. Para identificação foi utilizado a técnica de biologia molecular, sequenciando as regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA fúngico, conforme metodologia descrita por Stirling (2003). O produto foi purificado com o Kit GFXTM PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante e sequenciados em um sequenciador automático (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). Para a construção da sequência, os programas Phred/Phrap e Consed foram utilizados e a sequência foi comparada com dados do *Gen Bank National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast). O alinhamento global das sequências e análise filogenética foram realizadas com o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007).

A fim de verificar as características macroscópicas das colônias, foi realizado plaqueamento da cultura em ágar YM (*Yeast Malt Extract Agar*), com 48 h de crescimento. Além disso, o comportamento do micro-organismo em frascos agitados foi avaliado através da construção da curva de crescimento durante 70 h de fermentação sem iluminação, nas condições 180 rpm, pH 4,0, 25 °C, 40 g/L de glicose, 10 g/L extrato de malte, 14 g/L peptona. Inicialmente coletou-se uma alíquota de 1 mL de meio de cultura a cada 1 h de fermentação, em seguida centrifugou-se o meio a 5600 rpm, durante 10 min em centrífuga (Hettich), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se a célula em água destilada e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro (Agilent 8553, $\lambda = 600$ nm).

3.2 Manutenção da cultura

Para preservar a cultura e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento da linhagem (levedura isolada de amostras de folhas de laranjeira e eucalipto) em freezer a -80°C (MDF – U3086S - Sanyo). O procedimento de congelamento constou das seguintes etapas: repique da cepa, incubação da cultura em meio sólido (para verificação das características morfológicas) e líquido e temperatura adequada para o crescimento, ou seja, 25°C por 24 h para as leveduras; adição de um agente crioprotetor estéril (glicerol 13 %, p/v); homogeneização da

mistura, sendo a suspensão (alíquota de 1,5 mL) transferida para microtubos estéreis, devidamente identificados; e congelamento imediato em freezer a -80°C . Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica. A levedura também foi mantida em frascos contendo meio YMA (Yeast Malt Agar) e uma camada superficial de óleo mineral, conservados em geladeira a aproximadamente 5°C . A cada dois meses foi realizado um novo repique do micro-organismo.

3.3. Produção de carotenóides

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio YM (*Yeast Malt Extract*) apresentando na composição 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L peptona (Himedia), 10 g/L de glicose (Nuclear). Após preparo do meio, o mesmo foi esterilizado em autoclave (Phoenix, modelo AV75) durante 15 minutos a 121°C (VALDUGA et al., 2009a).

Após esterilização, estes frascos foram inoculados com suspensão de células, provenientes de uma alçada e incubados a 25°C , 180 rpm por 35 h (D.O $\sim 1,0$).

Em seguida, transferiu-se 10 mL do inóculo em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de meio de cultura definidos pelos planejamentos experimentais (Tabelas 1 e 2) e incubados a 25°C , 180 rpm por 120 h.

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura e das condições de fermentação, foi utilizado um planejamento do tipo Plackett-Burman (*Screening Design*) de 12 ensaios com 3 pontos centrais (HAALAND, 1989). As variáveis estudadas e seus respectivos níveis encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo Plackett-Burman.

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
pH inicial	X ₁	4,0	6,0	8,0
Extrato de levedura (g/L)	X ₂	0	5,0	10,0
Extrato de malte (g/L)	X ₃	0	5,0	10,0
Peptona (g/L)	X ₄	0	5,0	10,0
Glicose (g/L)	X ₅	2,0	21,0	40,0

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm e 25°C .

A partir dos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett-Burman realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 (1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes

e pontos axiais), onde as variáveis independentes estudadas e os níveis encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no planejamento completo 2^3 .

Variáveis Independentes	Códigos	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Extrato de malte (g/L)	X ₃	6,6	10,0	15,0	20,0	23,4
Peptona (g/L)	X ₄	6,6	10,0	15,0	20,0	23,4
Glicose (g/L)	X ₅	26,4	40,0	60,0	80,0	93,6

Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C e pH inicial = 4,0

As respostas ou variáveis dependentes avaliadas foram: carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) e específicos ($\mu\text{g/g}$), biomassa (g/L) e pH.

3.4 Recuperação de Carotenoides

A metodologia de extração e recuperação de carotenoides foi realizada segundo metodologia descrita por VALDUGA et al., (2009c). As células foram centrifugadas a $6.500 \times g$, 5 °C por 10 minutos (Eppendorf 5403) e submetidas a sucessivas macerações em almofariz, após congelamento com N₂ líquido (Figura 7). Posteriormente, adicionou-se dimetilsulfóxido - DMSO (Nuclear) na relação 2:1(v/v), seguindo de aquecimento a 55 °C durante 30 min (Fanem 102) e homogeneizações periódicas em vortex (Phoenix AP-56). Em seguida, adicionou-se mistura de acetona (Quimex): metanol (7:3, v/v), seguindo de centrifugações ($6.500 \times g$, 5 °C, 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até que o solvente e as células apresentaram-se sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 35 °C e os pigmentos foram solubilizados em metanol (Merck).



Figura 7 - Aspecto da maceração das células com nitrogênio líquido.

A Figura 8 mostra o esquema do processo de recuperação e extração dos carotenoides totais.

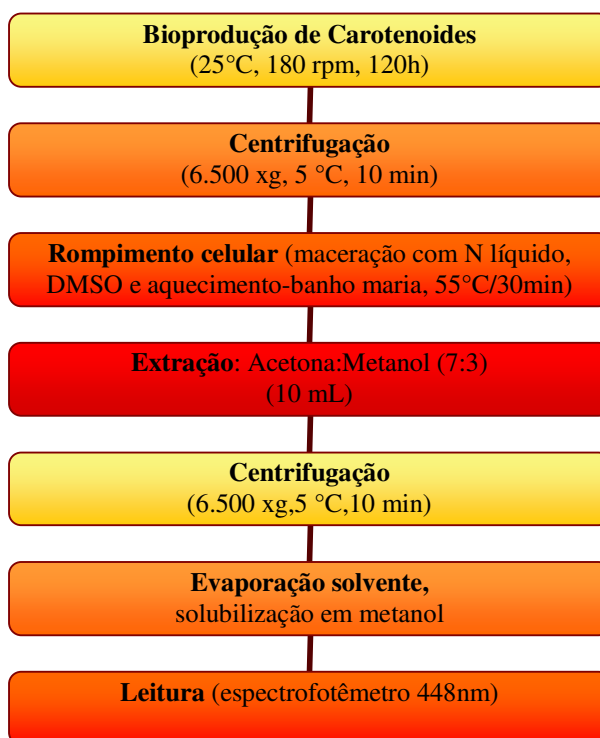


Figura 8: Fluxograma do processo de recuperação e extração de carotenoides totais.

3. 5 Metodologia analítica

3.5.1 Determinação de carotenoides totais

A absorbância da amostra após extração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553). A concentração total de carotenoides foi estimada através do valor medido da máxima absorbância a 448 nm, utilizando a equação (1) descrita por Davies (1976):

$$x = \frac{Ey}{E_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (1)$$

Onde:

x = carotenóides (g).

y = solução(mL).

E = absorbância.

$E_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de extinção específico, coeficiente de absorbância utilizado foi o referente ao β -Caroteno: $E_{1cm}^{1\%} = 2550$, para o solvente metanol (SILVA et al., 2004).

3.5.2 Determinação de carotenoides específicos

Após a obtenção dos carotenoides totais e a massa de células, realizou-se a determinação dos carotenoides específicos através da relação entre a quantidade de carotenoides totais produzidos e a massa celular obtida de acordo com a Equação 2.

$$C_{esp} = \frac{C_{totais}}{Biomassa} \quad (2)$$

Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) e em produção específica de carotenoides ($\mu\text{g/g}$). A produção específica de carotenóides representa a concentração total de carotenoides (μg) em relação à biomassa seca (g) de levedura obtida em 1 litro de meio fermentado (DAVIES, 1976).

3.5.3 Determinação da biomassa

As células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ e 5°C por 10 min. Após extração dos carotenóides, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas e a massa celular foi quantificada através de secagem em estufa (Fanem SE-320) a 105°C até peso constante.

3.5.4 Determinação do pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed).

3.5.5 Determinação de glicose

A concentração de glicose foi determinada no término da cinética da bioprodução no sobrenadante. O procedimento utilizado foi o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) conforme metodologia descrita por MILLER (1959) e, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553) no comprimento de onda de 505 nm.

3.6 Cinética do processo fermentativo

Com o objetivo de verificar a cinética de consumo de substrato (glicose), produção celular, evolução de pH e produção de carotenoides, realizou-se coleta de amostras do caldo de fermentação a cada 6 h, para uma biorreação conduzida nas condições de cultivo referentes ao ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2^3 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características macroscópicas e de crescimento da linhagem

A Figura 9 apresenta as características macroscópicas das colônias da linhagem identificada como sendo a levedura *Sporidiobolus pararoseus*. A coloração das colônias em meio YM ágar foi laranja. As colônias da levedura apresentaram característica arredondada, possuindo superfície lisa e brilhante. A textura das colônias era gomosa, apresentando dificuldade na remoção do meio sólido.



Figura 9. Características macroscópicas da linhagem de *Sporidiobolus pararoseus* cultivadas em meio de cultura YM ágar, com 48 h de crescimento.

A Figura 10 mostra o crescimento celular (D.O) em função do tempo (horas) da cultura, incubada a 25 °C a 180 rpm em um agitador recíprocante (shaker). A levedura apresentou uma fase de adaptação (lag) nas primeiras 9 h de crescimento, nas 26 h seguintes uma fase exponencial de crescimento. O crescimento celular apresentou seu ponto máximo em 40 h (1,334 UA) e após 52 h de crescimento observou-se uma fase de declínio de crescimento celular.

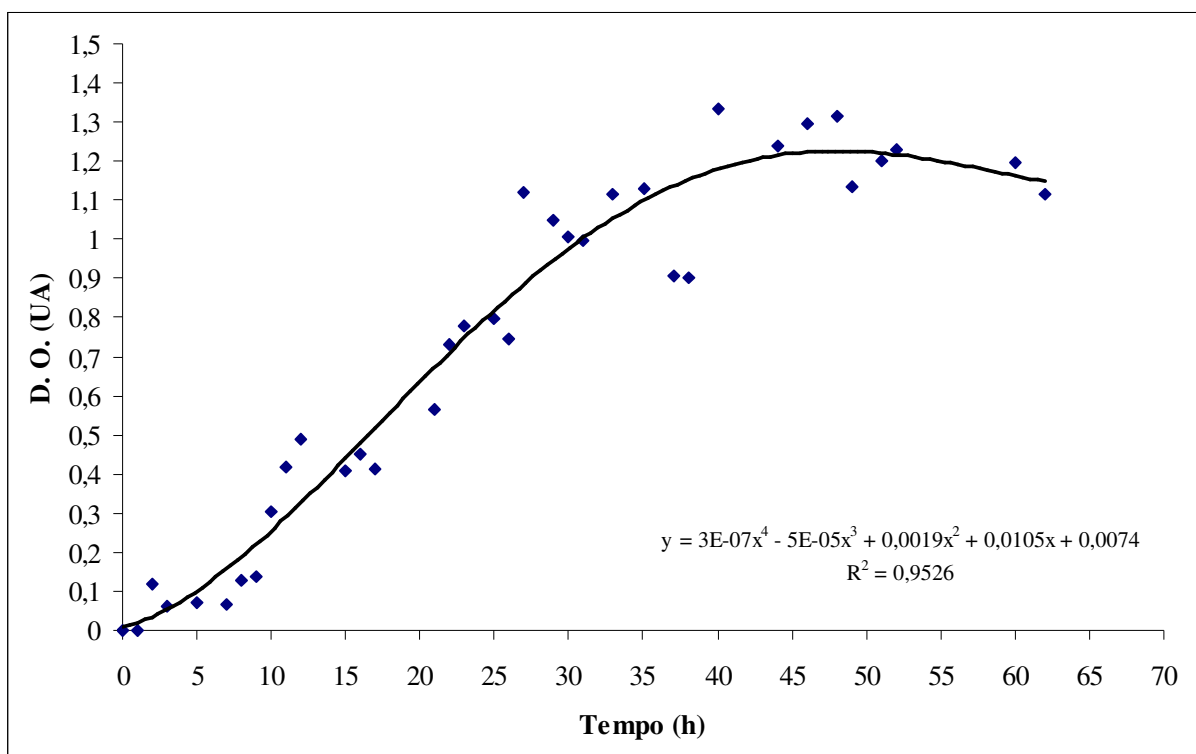


Figura 10. Curva de crescimento celular (UA) da linhagem de *Sporidiobolus pararoseus*, durante 70 h de crescimento.

4.2 Bioprodução de carotenoides

A matriz e os resultados do planejamento experimental Plackett-Burman estão apresentados na Tabela 4. A maior concentração de carotenoides totais observada foi de 475,29 µg/L no ensaio 8, onde os parâmetros concentração de glicose, de extrato de malte e peptona, apresentavam os maiores níveis da faixa investigada. Este fato pode ser melhor observado na Figura 14 (Gráfico de Pareto), onde os efeitos das variáveis estão representados.

Tabela 4. Matriz do planejamento do tipo Plackett-Burman (valores reais e codificados) e respostas em carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis Independentes</i>					<i>Resposta</i>
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)
1	1 (8,0)	-1 (0)	1 (10,0)	-1 (0)	-1 (2,0)	57,06
2	1 (8,0)	1 (10,0)	-1 (0)	1 (10,0)	-1 (2,0)	70,69
3	-1 (4,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	-1 (0)	1 (40,0)	150,01
4	1 (8,0)	-1 (0)	1 (10,0)	1 (10,0)	-1 (2,0)	70,88
5	1 (8,0)	1 (10,0)	-1 (0)	1 (10,0)	1 (40,0)	65,98
6	1 (8,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	-1 (0)	1 (40,0)	168,43
7	-1 (4,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	-1 (2,0)	190,60
8	-1 (4,0)	-1 (0)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (40,0)	475,29
9	-1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (10,0)	1 (40,0)	225,39
10	1 (8,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (40,0)	238,53
11	-1 (4,0)	1 (10,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (2,0)	315,30
12	-1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (2,0)	29,71
13	0 (6,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (21,0)	74,61
14	0 (6,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (21,0)	74,80
15	0 (6,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (5,0)	0 (21,0)	73,53

X_1 = pH; X_2 = Extrato de levedura (g/L); X_3 = Extrato de malte (g/L); X_4 = Peptona (g/L); X_5 = Glicose (g/L); Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C

Observa-se que a glicose foi a variável de maior influência na produção de carotenoides, seguida da concentração de extrato de malte e peptona. Estas três variáveis tiveram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95 %, o que significa que quando a concentração e/ou faixa destas variáveis aumentaram do nível -1 para o +1, houve aumento na concentração de carotenoides totais. Portanto, para maximizar a bioprodução de carotenoides totais, deve-se deslocar os níveis de estudo para valores superiores para a concentração de glicose, extrato de malte e peptona. Entretanto, o extrato de levedura e o pH, apresentaram efeitos negativos significativos ($p < 0,05$). Assim, os níveis de estudo para o extrato de levedura e pH devem ser deslocados para valores inferiores, a fim de melhorar a produção de carotenóides. Portanto, como o extrato de levedura no nível -1, a concentração foi nula, esta variável foi excluída do processo fermentativo e o pH foi fixado no nível -1 (4,0).

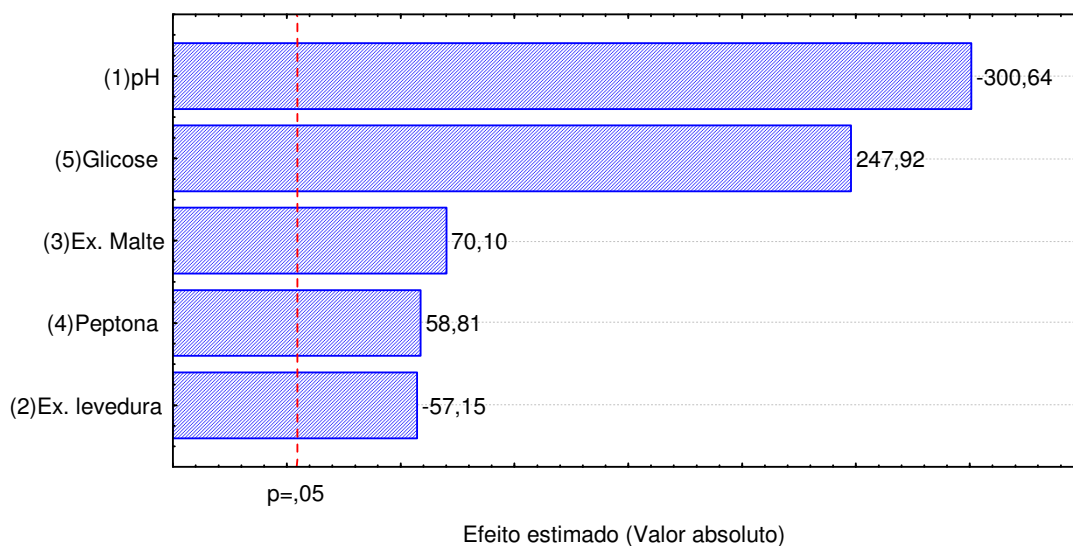


Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental Plackett–Burman, para a concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).

A Tabela 5 apresenta os valores reais e codificados do planejamento fatorial completo 2^3 e a resposta em concentração de carotenoides totais e específicos, biomassa e pH. Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que os ensaios 9, 10 e 11 (ponto central) e o ensaio 17 foram os que apresentaram maior concentração de carotenoides totais.

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental completo 2^3 (valores codificados e reais) com as respostas de carotenoides totais e específicos, biomassa e pH.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis independentes*</i>			<i>Respostas</i>			
	X_3	X_4	X_5	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Biomassa (g/L)	pH final
1	-1 (10)	-1 (10)	-1 (40)	384,90	128,30	3,00	3,76
2	-1 (10)	-1 (10)	1 (80)	770,34	255,08	3,02	3,65
3	1 (20)	-1 (10)	-1 (40)	748,53	349,78	2,14	3,80
4	1 (20)	-1 (10)	1 (80)	340,49	161,37	2,11	3,83
5	-1 (10)	1 (20)	-1 (40)	456,54	198,49	2,30	3,63
6	-1 (10)	1 (20)	1 (80)	294,22	133,13	2,21	3,70
7	1 (20)	1 (20)	-1 (40)	595,07	235,20	2,53	3,67
8	1 (20)	1 (20)	1 (80)	516,52	188,51	2,74	3,67
9	0 (15)	0 (15)	0 (60)	865,76	237,85	3,64	3,60
10	0 (15)	0 (15)	0 (60)	836,18	216,63	3,86	3,67
11	0 (15)	0 (15)	0 (60)	847,55	229,69	3,69	3,64
12	15 (0)	15 (0)	26,4 (-1,68)	329,07	190,21	1,73	3,39
13	15 (0)	15 (0)	93,6 (1,68)	424,85	245,58	1,73	3,39
14	15 (0)	6,6 (-1,68)	60 (0)	483,48	302,18	1,60	3,12
15	15 (0)	23,4 (1,68)	60 (0)	783,30	281,76	2,78	3,45
16	6,6 (-1,68)	15 (0)	60 (0)	813,58	228,53	3,56	3,37
17	23,4 (1,68)	15 (0)	60 (0)	916,08	259,51	3,53	3,41

* X_3 = Extrato de malte (g/L); X_4 = Peptona (g/L); X_5 = Glicose (g/L); Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C, pH inicial = 4,0.

A Tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p e t, para o teor de carotenoides totais. Observa-se que todas as variáveis independentes estudadas exercem influência sobre a produção de carotenoides. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 6. Resultados do coeficiente de regressão e erro padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2^3 , para os carotenoides totais.

	Coef. de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	856,335	8,598	99,595	0,00010
(1)Ex. malte(L)*	34,211	4,040	8,468	0,01366
Ex. malte(Q)	-16,460	4,450	-3,698	0,06597
(2)Peptona (L)	8,924	4,040	2,209	0,15782
Peptona (Q)*	-98,461	4,451	-22,121	0,00204
(3)Glicose (L)	-7,515	4,040	-1,860	0,20393
Glicose (Q)*	-189,316	4,451	-42,534	0,00055
1L by 2L*	53,382	5,276	10,117	0,00963
1L by 3L*	-88,713	5,276	-16,813	0,00352
2L by 3L*	-27,283	5,276	-5,171	0,03542

*fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de carotenoides totais em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 7. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido de 0,86 e o F calculado de 1,41 vezes maior que o valor tabelado, permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 12.

Tabela 7. Análise de variância para os carotenoides totais.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	561193	6	93532,23	4,53
Resíduos	206536	10	20653,57	
Falta de ajuste	206090,3	8		
Erro puro	445,4	2		
Total	767729,2	16		

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}, 95\%} = 3,21$; Coeficiente de correlação: $R=0,86$

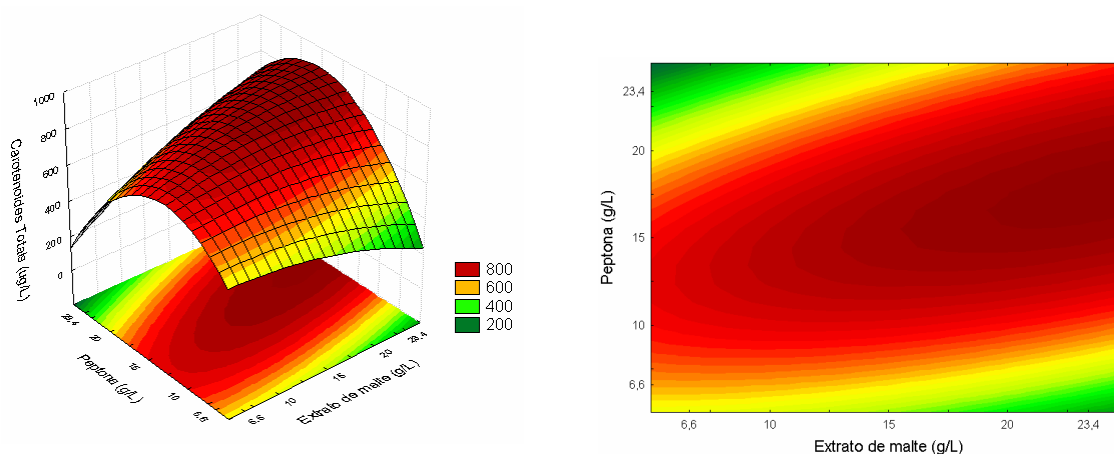
Equação 3:

$$C_{\text{tot}} = 856,33 + 34,21 \cdot X_3 - 98,46 \cdot (X_4)^2 - 189,32 \cdot (X_5)^2 + 53,38 \cdot X_3 \cdot X_4 - 88,71 \cdot X_3 \cdot X_5 - 27,28 \cdot X_4 \cdot X_5 \quad (3)$$

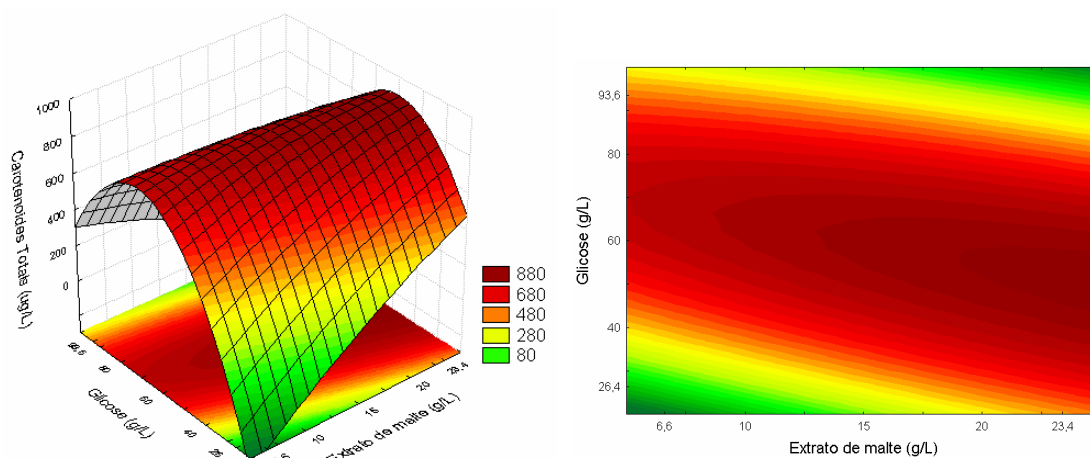
Onde:

C_{tot} = Carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$); X_3 = extrato de malte; X_4 = peptona; X_5 = glicose

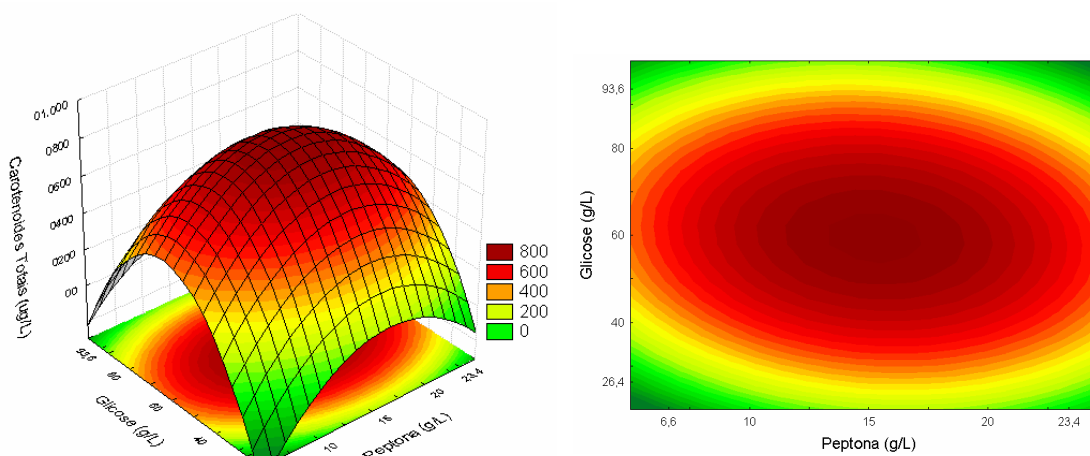
Na Figura 12, observa-se que a tendência da máxima produção média de carotenoides totais ($860 \mu\text{g/L}$) situa-se na faixa próxima ao ponto central de concentração (15 g/L de extrato de malte, 15 g/L de peptona e 60 g/L de glicose, o que caracteriza a otimização da produção de carotenoides totais, nas faixas estudadas.



(a)



(b)



(c)

Figura 12. Superfícies de resposta e curvas de contorno para os carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de peptona e extrato de malte (a), glicose e extrato de malte (b), glicose e peptona (c), respectivamente.

A produção de carotenoides totais após a otimização foi aumentada em 45 % em relação ao planejamento Plackett Burmann (Tabela 4, ensaio 8): onde ocorreu um aumento da concentração de glicose, extrato de malte e peptona. Aksu & Eren (2007), verificaram que a elevação da concentração de glicose de 2,5 g/L para 20 g/L, proporcionou o aumento nas taxas de formação de produto por *Rhodotorula glutinis*, de 14,2 mg/L para 69 mg/L.

Segundo Garbayo et al. (2003), em muitos micro-organismos a carotenogênese é regulada por fatores ambientais, tais como a disponibilidade de Nitrogênio. Além disso, a taxa de Carbono:Nitrogênio tem papel importante na síntese de metabólitos secundários, determinando o tipo dos metabólitos sintetizados e extensão da produção.

Na literatura alguns trabalhos relatam a otimização da bioprodução de carotenóides com diferentes micro-organismos e condições de cultivo tais como, agitação, temperatura, pH e meio de cultivo. Buzzini et al. (2005) avaliaram a produção de pigmentos pelo microrganismo *Rhodotorula graminis*, relacionando traços de metais (Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Al^{2+} e Zn^{2+}) no meio de cultivo, obtendo nas condições otimizadas 803,2 $\mu\text{g/g}$, um aumento de cerca de 370 % em relação ao planejamento anterior aplicado. A produção de Astaxantina após a otimização, foi aumentada em 92 % no cultivo de *Phaffia rhodozyma* por Ramírez et al. (2001). Wang et al. (2007) submetendo a levedura *Rhodotorula glutinis* a alta pressão (300 MPa durante 15 min) e otimizando o meio de cultivo (4,23 g/L de extrato de levedura, 12,11 g/L de levedura, 30 ml/L de inóculo, 2,5 mL/L de extrato de tomate, 0,5 mL/L de óleo de amendoim e 5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), obteve um aumento de 34,2 % na produção de carotenoides (13,4 mg/L).

Valduga et al. (2009a) obtiveram para *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, um teor máximo de carotenoides totais de 1019 $\mu\text{g/L}$ nas condições pH 4,0, 25 °C, 180 rpm em meio otimizado (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona). Em outro estudo em biorreator, Valduga et al. (2009d) obtiveram um aumento na concentração de carotenoides totais de aproximadamente 3,3 vezes, utilizando-se pH 4,0, temperatura de 25 °C, agitação de 180 rpm, aeração 1,5 vvm, concentração de glicose de 80 g/L, concentração de peptona de 15 g/L e concentração de extrato de malte de 5 g/L.

Buzzini et al. (2007) avaliaram a produção de carotenóides de 4 cepas de *Sporobolomyces* e 3 cepas de *Sporidiobolus*. O cultivo foi realizado durante 5 dias em frascos agitados a 150 rpm, 25 °C, pH 5,5 em 100 mL de meio, sendo este composto de 40 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 0,8 g/L de KH_2PO_4 e 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Dentre as leveduras *Sporobolomyces* testadas, *S. roseus* apresentou maior produção de carotenóides totais (632 $\mu\text{g/L}$), e para as leveduras *Sporidiobolus* destacaram-se *Sporidiobolus longiusculus* (1993,4 $\mu\text{g/L}$) e *S. salmonicolor* (613,3 $\mu\text{g/L}$).

Em estudo realizado por Choudhari & Singhal (2008) a concentração de glicose foi uma das variáveis de maior importância nas fermentações microbianas com *Blakeslea trispora*, isso devido a glicose ser facilmente assimilada na via metabólica da biossíntese de β -Caroteno, sendo que onde a glicose foi empregada obteve-se uma concentração máxima de β -Caroteno de 99 mg/L. O mesmo teor de β -Caroteno foi observado ao utilizar do extrato de levedura, enquanto que a concentração de peptona de carne levou a um menor crescimento celular e baixa produção de pigmento. A otimização das condições de cultivo (com efeito de diferentes componentes do meio como: Carbono, Nitrogênio e Sulfatos, também variações no pH e inoculo) aumentou em 42 % a produção de β -Caroteno.

Em relação a produção de carotenoides específicos verifica-se que a máxima concentração observada foi de 349,7 $\mu\text{g/g}$, correspondendo ao ensaio 3 (Tabela 5). Observa-se que nenhuma das variáveis estudadas (glicose, extrato de malte e peptona) exerceram efeito significativo ($P < 0,05$), na faixa de estudo conforme demonstrado no gráfico de pareto (Figura 13). O mesmo foi verificado para o crescimento celular (Figura 14), onde a máxima concentração celular obtida foi 3,86 g/L, correspondente ao ensaio do ponto central de concentração (Tabela 5).

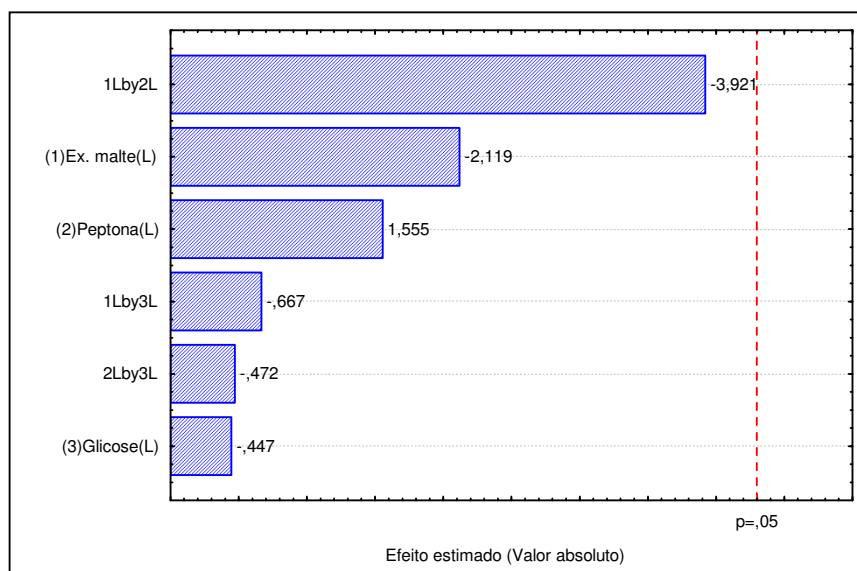


Figura 13 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g/L}$).

Valduga et al. (2009a) para os ensaios de otimização (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona) da bioprodução com *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados obtiveram uma concentração específica de carotenoides variando de 65,2 $\mu\text{g/g}$ a 338,9 $\mu\text{g/g}$. Porém em biorreator Valduga et. al. (2009d) em meio composto por 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de aeração de 1,5 vvm, a máxima produção específica de

carotenoides foi de 238 µg/g. Buzzini et al. (2007) obtiveram uma concentração máxima de carotenoides específicos para as leveduras *Sporidiobolus* testadas de 184 µg/g para *S. longiusculus*, das *Sporobolomyces*, 82,3 µg/g para *S. roseus*.

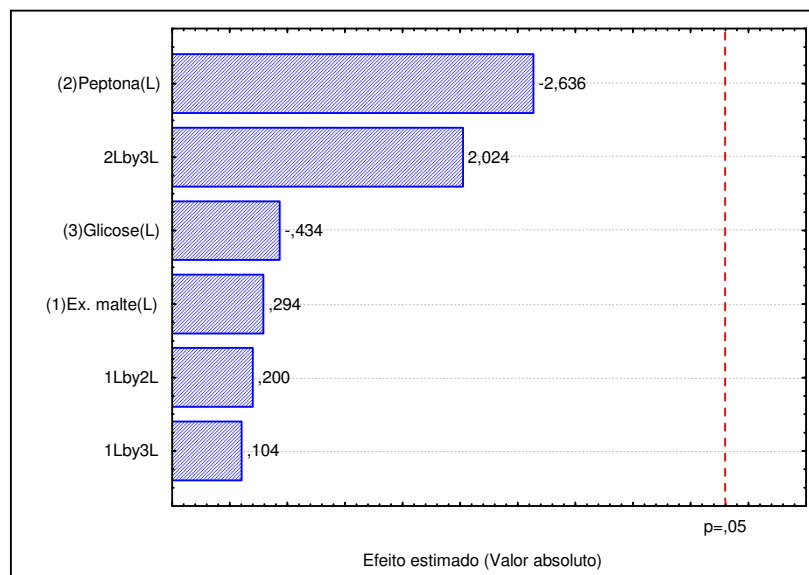


Figura 14 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^3 , para a biomassa (g/L).

A maior concentração de células obtida neste estudo foi observada no ponto central (3,86 g/L), ao comparar o crescimento celular com os obtidos na literatura com micro-organismos do mesmo gênero, verifica-se resultados semelhantes. Em trabalho com *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, Valduga et al. (2009a) obtiveram uma concentração que variou de 1,2 g/L a 5,9 g/L, dependendo das condições de cultivo. Maldonade et al. (2008) avaliaram o crescimento celular de *Sporobolomyces* em meio YM, obtendo 3,3 g/L após 5 dias de fermentação.

As leveduras *Sporobolomyces roseus* e *Rhodotorula glutinis* (DAVOLI et al., 2004) cultivadas em frascos padrão e frascos com entalhes apresentaram aumento na concentração de células nos frascos com modificação nas laterais. A concentração de células para *R. glutinis* aumentou de 6,3 para 9,0 g/L, e para *S. roseus* houve aumento de 4,8 para 9,3 g/L.

4.3. Cinética da bioprodução

A Figura 15 e Tabela I (Apêndice 1) apresentam as cinéticas de crescimento, consumo de substrato (glicose), evolução do pH e produção de carotenoides em meio sintético em frascos agitados para o ponto otimizado (ensaios 9, 10 e 11) do planejamento experimental completo 2³.

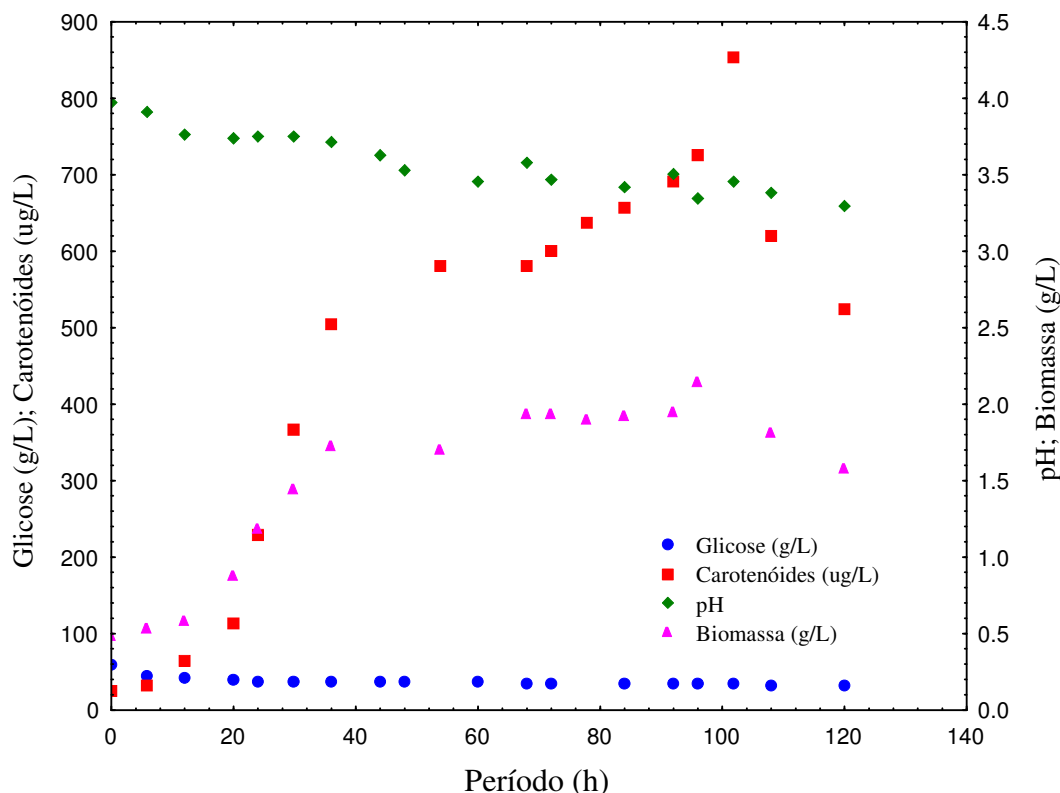


Figura 15. Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus pararoseus* e consumo de substrato e evolução do pH para as condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 15 g/L de extrato de malte, 15 g/L de peptona e 60 g/L de glicose).

De acordo com a Figura 15, a concentração máxima de carotenoides totais (852 $\mu\text{g/L}$) foi obtida em 102 h do início da bioprodução. Com aproximadamente 110 h a concentração de carotenoides entra em declínio.

Semelhante a este trabalho, os resultados encontrados por Valduga et al. (2009b), a concentração máxima de carotenoides (913 $\mu\text{g/L}$) em meio sintético por *S. salmonicolor* CBS 2636 foi atingida aproximadamente 100 horas do início da bioprodução. Já no trabalho de Tatsch (2008), em biorreator por *S. salmonicolor* a concentração máxima de carotenoides (3426,0 $\mu\text{g/L}$) foi obtida em aproximadamente 90 h do início da biorreação, sendo que a partir de 60 h o aumento da concentração de carotenoides é baixo.

Com aproximadamente 60 horas de crescimento iniciou-se a fase estacionária de crescimento celular.

O pH apresentou uma redução nas primeiras 12 h de bioprodução, de 3,97 a 3,76. Após este período permaneceu praticamente constante até 36 h. A partir daí houve um decréscimo progressivo de pH, sendo que ao final do processo (120 h) obteve-se o valor de 3,3. Valduga et al. (2009b) que o pH do meio de bioprodução por *S. salmonicolor*, em substratos convencionais (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de extrato de peptona), apresentou apenas uma pequena variação no decorrer do processo fermentativo (120 horas), diminuindo de 4,0 para 3,7.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial é objeto de estudo na produção de carotenóides. O efeito do pH na levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foi avaliado por Razavi & March (2006), apresentado um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e células. A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH (pH 3,5 a 6,0), sendo pH 6,0, ótimo para o crescimento celular e formação de pigmento. Porém, no presente estudo a máxima carotenogênese (860 µg/L) foi induzida em pH de 3,6.

O valor de pH do meio de cultivo não influenciou somente a atividade biossintética da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em estudo realizado por Aksu & Eren (2005), mas também a taxa de crescimento da cultura. Com a elevação do pH de 3,0 a 7,0 observou-se aumento nas taxas de crescimento e produção de carotenoides, com decréscimo em maiores valores de pH. Em outro caso, a levedura *Rhodotorula glutinis* estudada por Tinoi et al. (2005) apresentou um pH ótimo para o crescimento de 5,91, confirmando a preferência geral das leveduras por pH levemente ácido.

Em estudo de Tatsch (2008), o pH inicial ótimo para o crescimento celular e concentração de carotenoides totais em biorreator por *S. salmonicolor* CBS 2636 variou de 4,0 a 5,0, enquanto que para a produção específica de carotenóides os valores foram próximos a 3,0.

Maldonade et al. (2008) observaram que a máxima concentração de carotenoides totais (1269 µg/L) por *R. glutinis* com pH inicial de 4,0; sendo que a variação do pH inicial de 3,0 a 4,5 exerceu pequena influência na produção de carotenóides. Entretanto, Shih & Hang (1996) observaram que o pH inicial do meio de fermentação afetou significativamente ($p < 0,05$) a produção de carotenóides totais por *Rhodotorula rubra*, onde na faixa de pH de 3,4 a 4,3, houve inibição de crescimento celular e de produção de carotenoides. A máxima concentração celular e de pigmentos ocorreu em pH inicial 5,0.

O comportamento da levedura *Sporidiobolus pararoseus* foi fortemente associado ao crescimento celular, onde a máxima concentração celular (2,7 g/L) correspondeu à máxima produção de carotenoides (852 µg/L). Comportamento semelhante foi verificado por Tinoi et al.

(2005) onde a concentração de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em meio agroindustrial foi paralela ao crescimento celular. O crescimento da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU & EREN, 2005) em meio com 15 g/L de glicose foi fortemente associado ao crescimento celular. Em meio com 15 g/L da sacarose, a produção de carotenoides foi quase que paralela ao crescimento celular. No entanto em meio contendo 13,2 g/L de lactose não foi observada nenhuma relação de crescimento paralelo entre células e pigmentos. Em estudo de Razavi & March (2006), a produção de carotenoides foi aproximadamente paralela ao crescimento celular da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, onde a produção máxima de pigmentos foi geralmente observada no final da fase exponencial de crescimento. No entanto, FRENGOVA et al. (1995) verificaram que a produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* co-cultivada com *Lactobacillus helveticus*, também foi paralela ao crescimento celular. A máxima concentração de carotenoides ocorreu quando o crescimento já havia cessado.

Na Figura 16 pode ser melhor observado o consumo de substrato (glicose) em meio sintético em frascos agitados para o ponto otimizado (ensaios 9, 10 e 11) do planejamento experimental completo 2³.

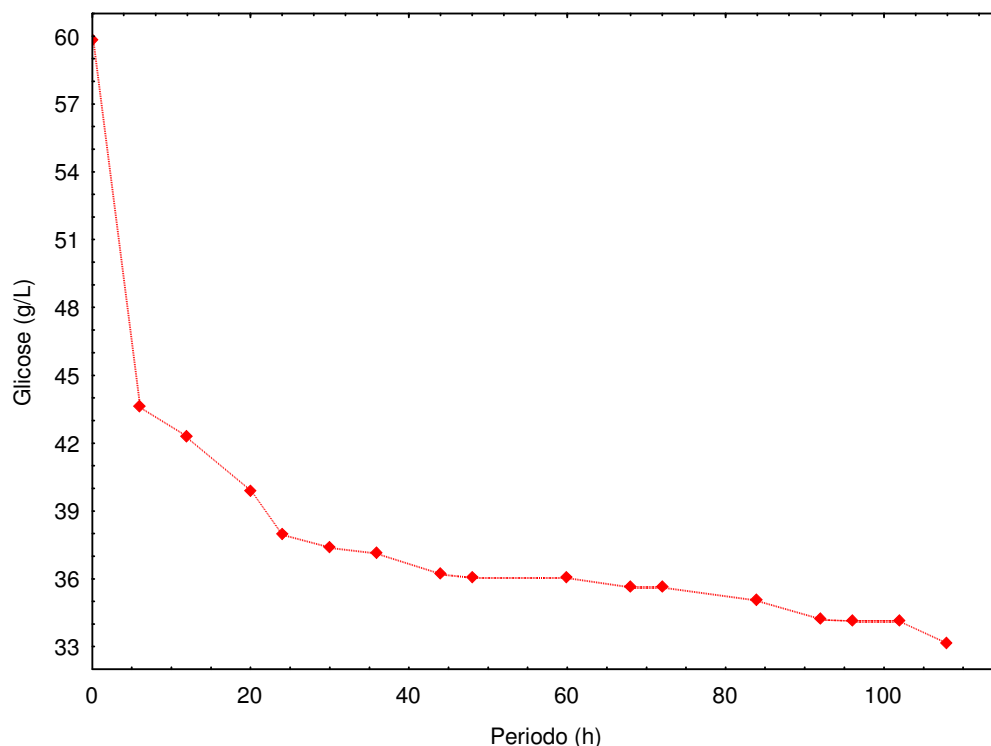


Figura 16 - Cinética do consumo de glicose da cepa *Sporidiobolus pararoseus* nas condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 15g/L de extrato de malte, 15g/L de peptona e 60g/L de glicose).

O consumo de glicose (19,95 g/L) foi mais intenso nas primeiras 20 h e a partir deste período observou-se um pequeno consumo até o final da bioprodução atingindo um consumo máximo de 46 % durante 120 h. Em outros trabalhos foi relatado que a concentração de glicose foi quase que completamente consumida durante a bioprodução (FANG & WANG, 2002; LIU & WU, 2007).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, obtendo-se um teor de máximo de carotenoides totais de 856 µg/L (228 µg/g) com concentração de glicose 60 g/L, extrato de malte 15 g/L, peptona 15 g/L, 180 rpm, e pH inicial 4,0 e temperatura de 25 °C.

A bioprodução apresenta associação com o crescimento celular, sendo que a máxima produção de carotenoides e célula é atingida em 102 h.

O consumo de glicose (19,95 g/L) foi mais intenso nas primeiras 20 h e a partir deste período observou-se um pequeno consumo até o final da bioprodução, atingindo um consumo máximo de 46 %.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1. Otimizar a bioprodução de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus pararoseus* em biorreator, sugerindo estudo de outras variáveis independentes tais como velocidade de agitação e aeração com intuito de aumentar a concentração e reduzir custos
2. Avaliar os efeitos da luminosidade e agentes indutores da bioprodução de carotenoides;
3. Estudar a bioprodução de carotenoides com a levedura *Sporidiobolus pararoseus* em biorreator;
4. Identificar e caracterizar os carotenoides produzidos por *Sporidiobolus pararoseus*, por cromatografia líquida (CLAE), com o objetivo de verificar o caminho biossintético da levedura e confirmação da estrutura por técnica de ressonância magnética (RMN), para utilização como padrão cromatográfico;
5. Investigar a possibilidade de utilização de outros substratos agroindustriais tais como, extrato de bagaço de uva, melaço de cana-de-açúcar, soro de leite, água de maceração de milho, óleo de mamona, hidrolisado de levedura, e linhagens na bioprodução de carotenóides;
6. Avaliar a potencialidade de agentes químicos estimulantes da carotenogênese (ácido mevalônico, difenilamina, ácido acético, β -ionona e alguns aminoácidos) em frascos agitados e posteriormente em biorreator;
7. Cultivar *Sporidiobolus pararoseus* em batelada alimentada e/ou cultivo contínuo, e avaliar a possibilidade de reciclo de células, a fim de aumentar o rendimento de carotenoides totais;
8. Avaliação de parâmetros cinética e estequiométricos;
9. Modelagem matemática do processo otimizado;
10. Encapsular carotenoides utilizando tecnologias Supercrítica e/ou Spray Drier, utilizando diferentes materiais encapsulantes (maltodextrina, goma arábica, capsul, etc), avaliando a distribuição de tamanho de partículas, estabilidade dos pigmentos e aplicações industriais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BIESALSKI, H. K & GRIMM, P. Nutrição: Texto e Atlas, Porto Alegre, Artmed, 2007.

BHOSALE, P & BERNSTEIN, P. Microbial xanthophylls. *Applied Microbial. Biotechnology*, v.68, p. 445-455, 2005.

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

BOROWITZKA, L. J & BOROWITZKA, M. A. *β -carotene production with algae*. In: Vandamme, J. E. (ed). *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*, Elsevier Applied Science: New York, p. 15 – 26, 1989.

BOTELLA-PAÍVA, P. & RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, v. 126, p. 369 – 381, 2006.

BUZZINI, P; INNOCENTI, M; TURCHETTI, B; LIBKIND, D; VAN BROOCK, M & MULINACCI, N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, p. 1024 – 1031, 2007.

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.

CHEN, D; HAN, Y & GU, Z. Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Process Biochemistry*, v.41, p. 1773-1778, 2006.

- CHOUDARI, S. M & SINGHAL, R. Media optimization for the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 722 – 730, 2008.
- DAVIES, B. H; Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plants and Pigments*, p.38-165. Academic Press, New York, 1976.
- DAVOLI, P; MIERAU, V. & WEBER, R. W. S. Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 40, n. 4, p 392 – 397, 2004.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R; PONCE-NOYOLA, T & TORREZ-MUNÖZ, J. A Asthaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, p. 783-791, 2007.
- DUTRA-DE-OLIVEIRA J. E. & MARCHINI, J. S. *Ciências Nutricionais*, São Paulo, Sarvier, 1998.
- FANG, T. J. & WANG, J.M. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrourhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1235 – 1245, 2002.
- FANG, T. J. & CHIOU, T. Y. Batch cultivation and astaxanthin production by a mutant of red yeast. *Journal of Industrial Microbiology*, v.16, p. 175-181, 1996.
- FAZELI, M. R ; TOFIGHI, H, SAMADI, N. & JAMALIFAR, H. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2453 – 2456, 2006.
- FEOVILA, G. I. Fungal carotenoids: their biological functions and practical use. *Applied Biochemical Bioengineering*, v. 30, p. 143 – 153, 1994.
- FRASER, P. D & BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, v. 43, p. 228-265, 2004.
- FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D. & BESHKOVA, D. M. Effect of temperature ranges on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. *Biotechnology Letters*, v. 17, p. 1001 – 1006, 1995.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA & GRINGOVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 888 – 894, 1994.

GARBAYO, I; CUARESMA, M; VÍLCHEZ, C. & VEGA, J.M. Effect of abiotic stress on the production of lutein and β -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochemistry*, 2008, doi: 10.1016/j.procbio.2008.06.012

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E. & BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 629 – 634, 2003.

GIBNEY, M. J; MACDONALD, I. A. & ROCHE, H. M. *Nutrição & Metabolismo*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 2006.

HAALAND, P. D; *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, v. 105, p. 259, 1989.

HU, Z-H; ZHENG, Y-G; WANG, Z. & SHEN, Y-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 586-590, 2006.

JOHNSON & SCHROEDER, Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.

KANG, D.K.; AN, J.Y; PARK, T.H & SIM, S.J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v.31, p. 234-238, 2006.

KÖCHER, S; JÜRGEN, B; MÜLLER, V. & SANDMANN, G. Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Arch Microbiol*, v. 191, p. 95-104, 2009.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, A. S., LIMA, E. Q. & SILVA, J. F. Toxicidade aguda de Rutina e de *Bixa orellana*., *Acta Farm. Bonaerense*, 22 (1), 21-26, 2003.

LIU, Y.-S & WU, J. Y. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p. 331 – 335, 2006.

- LIU, Y. S & WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal*, v. 36, p. 182 – 189, 2007.
- MANTZOURIDOU, F; NAZIRI, E. & TSIMIDOU, M. Z. Industrial glycerol as Supplementary Carbon Source in the Production of β -carotene by *Blaskea trispora*. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, v. 56, p. 2668-2675, 2008
- MANTZOURIDOU, F; TSIMIDOU, M. Z. & ROUKAS, T. Performance of Crude Olive Pomace Oil during Carotenoid Production by *Blaskea trispora* in Submerged Fermentation, v. 54, p. 2575-2581, 2006.
- MALDONADE, I. R; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, v. 107, p. 145 – 150, 2008.
- MALDONADE, I. R; ROUKAST, T. & KOUTZERIDOU, P. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 65 – 70, 2007.
- MILLER, G. L. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.
- MIURA, Y; KONDO, K; SHIMADA, H; SAITO, T; NAKAMURA, K. & MISAWA, N. Production of Lycopene by the Food Yeast, *Candida utilis* That Does Not Naturally Synthesize Carotenoid, v. 58, nos 2 e 3, 20/Abril, 5/Maio, 1998.
- MISAWA, N & SHIMADA, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*, v. 59, p. 169-181, 1998.
- MONTERO, O; MACÍAS-SÁNCHEZ, MD; LAMA, CM; LUBIÁN, LM; MANTELL, C; RODRÍGUEZ, M. & OSSA, EM. Supercritical CO₂ Extraction of β -Carotene from a Marine Strain of the Cyanobacterium *Synechococcus* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 9701-9707, 2005.
- NIIZU, P. Y. Fontes de Carotenóides Importantes para a Saúde Humana. Campinas, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

OLIVEIRA, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L). Florianópolis, 2005. Tese de Doutorado em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

PARK E. K; SEO M. W & LEE C. G. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*, v. 53, p. 148 – 152, 2007.

QING S. U; ROWLEY, K. G. & BALAZS, N. D. H. Carotenoids: Separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781, 393-418, 2002.

RAMÍREZ, J.; GUTIERREZ, H. & GZCHAEDLER, A. Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, v. 88, p. 259 – 268, 2001.

RAZAVI, S.H & MARCH, 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 & Chemical Engineering*, v. 23, n. 3, p. 59 – 64, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; KIMURA, M & AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2008.

SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; TADA, A.; MIKI, W. & KOMEMUSHI, S. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 3, p. 294 – 297, 2001.

SARADA, R. R .VIDHYAVATHI, D. USHA, AND G. A. RAVISHANKAR, An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7585 – 7588, 2006.

SHINDO, K; KIKUTA, K; SUZUKI, A; KATSUTA, A; KASAI, H; HIASUMOTO-HIROSE, M; MATSUO, Y; MISAWA, N. & TAKAICHI, S. Rare carotenoid (3R)-saproxanthin and (3R, 2'S)-myxol, isolated from novel marine (*Flavobacteriaceae*) and their antioxidative activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 1350-1357, 2007.

SHIH, C. T & HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, v. 29, p. 570-572, 1996.

SILVA, C; CABRAL, J. M. S & KEULEN, F. V. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. *Biotechnology Letters*, v.26, p. 257-262, 2004.

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

BARTLETT, J. M. S. & STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria sp. In: [Eds]. PCR Protocols. 2nd ed. Humana Press, V.226, 2003.

STROBEL, I; BREITENBACH, J; SCHECKHUBER, C. Q; OSIEWACZ, H. D & SANDMANN, G. Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserine*: engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium, v.55, p. 175-184, 2009.

SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G. & PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. Biotechnology Letters, v.18, p. 975-980, 1996.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 1596-1599, 2007. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

TATSCH, P. T. Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Erechim, 2008. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim).

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

UENOJO, M; JUNIOR M. R. M & PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para formação de Compostos de Aroma. *Química nova*, v. 30, n. 3, p.616, 622, 2007.

VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LICCIO M. Optimozation of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, v. 2, p. 415-421, 2009 a.

VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LUCCIO M. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS

2636) in Synthetic and Agroindustrial Media. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 157, p.61-69, 2009 b.

VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TATSCH, P. O.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LUCCIO M. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), Food and Bioprocess Technology, v.2, p. 234-238, 2009 c.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; COLET, R.; CANSIAN, J. M.; TREICHEL, H. & DI LUCCIO, M. Evaluation of the conditions of carotenoids production in a synthetic medium by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in a bioreactor. International Journal of Food Science & Technology. , v.44, p.2445 - 2451, 2009 d.

VILA, M; COUSO, I & LÉON, R. Carotenoid content in mutants of the Chlorophite *Clamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. Process Biochemistry, 2008.

WANG, S. L; SUN, J. S; HAN, B. Z & WU, X. Z. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. Journal of Food Science, v. 72, n. 8, p. 325 – 329, 2007.

WANG, W; YU, L & ZHOU, P. Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Bioresource Technology, v.97, p. 26-31, 2005.

YAMANE Y; HIGASHIDA K; NAKASHIMADA Y; KAKIZONO T & NISHIO N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: Kinetic and stoichiometric analysis. Applied and Environmental Microbiology, v. 63, p. 4471 - 4478, 1997.

ZENI, J. Screening de microrganismos produtores de carotenóides Erechim, 2009. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos*. Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim).

APÊNDICE

Tabela 8: Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, consumo de substrato e evolução do pH para as condições otimizadas.

Período (h)	Glicose (g/L)	pH	Carotenóides totais (µg/L)	Biomassa (g/L)
0	59,84	3,97	23,8	0,48
6	43,64	3,91	33,04	0,53
12	42,27	3,76	63,26	0,58
20	39,89	3,74	112,42	0,87
24	37,99	3,75	227,66	1,18
30	37,40	3,75	366,68	1,44
36	37,11	3,71	503,14	1,72
44	36,25	3,63	-	-
48	36,08	3,53	-	-
54	-	-	580,5	1,70
60	36,05	3,45	-	-
68	35,64	3,58	581,51	1,93
72	35,62	3,47	600,92	1,93
78	-	-	637,81	1,89
84	35,11	3,42	657,6	1,92
92	34,21	3,51	691,78	1,94
96	34,18	3,35	726,23	2,14
102	34,15	3,45	852,35	-
108	33,19	3,38	619,72	1,81
120	32,42	3,3	524,63	1,58