

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

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM MEIO
SINTÉTICO POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM
BIORREATOR

CÁTIA REGINA MARTIN SCHWARTZ

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à 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

MAIO DE 2010

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM MEIO
SINTÉTICO POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM
BIORREATOR**

Cátia Regina Martin Schwartz

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

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D.Sc.

Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.

Orientador

Prof. Telma Elita Bertolin, D.Sc.

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc.

Erechim, 13 de maio de 2010.

Ao meu marido Edson que me incentivou em todos os obstáculos e dificuldades encontradas, encorajando-me e dando-me força para vencer mais esta etapa de minha vida. À nossa filha Lohany, luz de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos acompanha, faz fortes e nos anima todos os dias.

A minha orientadora Eunice Valduga pela orientação, apoio e tranquilidade transmitidos em todos os momentos.

Ao meu orientador Marco Di Luccio pelo conhecimento transmitido, segurança e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha colega de trabalho Lúcia Tiggemann pela ajuda em todas as etapas de realização deste trabalho de pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Marcell, Alessandra, Rosicler, Jamile, Renata, Morgana, Karine, Mariele e Jociane pelo companheirismo, auxílio e pelos momentos de descontração.

A minha família, meu marido Edson pelos conselhos, incentivos, compreensão e ajuda nos momentos de fraqueza, à nossa filha Lohany que nos presenteou todas as manhãs com seu sorriso.

A todos os funcionários e professores do curso de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

“Eu louvo a Deus, pois ele é o meu conselheiro,
e durante a noite a minha consciência me avisa.
Tu me mostras o caminho que leva à vida. A tua
presença me enche de alegria e me traz
felicidade para sempre.”

Salmo 16, 7; 11

“Se sua vida é isenta de fracassos, então você
não está assumindo os riscos necessários.”

H. Jackson Brown

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES EM MEIO SINTÉTICO
POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM BIORREATOR

Cátia Regina Martin Schwartz

Maio/2010

Orientadores: Eunice Valduga

Marco Di Luccio

Os carotenoides são corantes naturais que podem ser 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, agitação e aeração. A quantidade e o perfil dos carotenoides produzidos podem ser estimulados. Objetivou-se otimizar as condições de cultivo para a bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). A bioprodução foi realizada em biorreator Biostat com 1 L de volume útil, sem iluminação, por um período de 100 h variando a composição do meio de cultivo (glicose, extrato de malte e peptona), e as condições operacionais (aeração e agitação) mediante planejamento experimental fatorial completo 2², para a otimização da bioprodução. A recuperação dos carotenóides foi realizada empregando N₂ líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). A

concentração máxima de carotenoides totais obtida no biorreator foi de 3425,9 $\mu\text{g} / \text{L}$ em aproximadamente 90 h de bioprodução nas condições otimizadas de 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm, 80 g / L de glicose, 15 g / L de peptona e 5 g / L de extrato de malte. A produção de carotenoides é associada ao crescimento celular durante a fase exponencial. A produção específica de carotenoides ($Y_{P/X}$) foi de 390 μg de carotenoides/g de células, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator foi de 0,0456 h^{-1} . A maior produtividade em células e carotenoides foi de 0,90 g/L.h e de 60,0 $\mu\text{g/L.h}$ em 50 horas de bioprodução, respectivamente.

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 PRODUCTION IN SYNTHETIC MEDIUM

BY *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 IN BIOREACTOR

Cátia Regina Martin Schwartz

Maio/2010

Advisors: Eunice Valduga

Marco Di Luccio

Carotenoids are natural dyes that can be synthesized by plants, algae and microorganisms. These pigments are of great industrial use and have attracted interest due to the concern on the use of chemical additives in foods. The bioproduction of pigments is influenced by the culture conditions such as temperature, pH, medium composition, stirring rate and aeration. The number and the profile of carotenoids produced can be stimulated. In this work we aimed to optimize the culture conditions for the bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). The production was performed in Biostat bioreactor with 1 L working volume, without light exposure, for 100 h. The composition of culture medium (glucose, malt extract and peptone), and operational conditions (aeration and agitation) were varied using a complete factorial design ²², for the optimization of bioproduction. The recovery of carotenoids was carried out using liquid nitrogen combined with dimethylsulfoxide (DMSO) for cell lysis and the carotenoids were extracted by a

mixture of acetone/methanol (7:3 v/v) The maximum concentration of total carotenoids obtained in the bioreactor was 3425.9 $\mu\text{g/L}$ in 90 h of bioproduction at the optimized conditions of 25 ° C, initial pH 4.0, 180 rpm, aeration rate 1.5 vvm, 80 g/L glucose, 15 g/L peptone and 5 g/L of malt extract. The production of carotenoids is associated with cell growth during the exponential phase. The specific production of carotenoids ($Y_{P/X}$) was 390 μg of carotenoids/ g of cells, The maximum specific growth rate (μ_{max}) was 0.0456 h^{-1} . The highest productivity for cells was 0.90 g/L.h and for carotenoids 60.0 $\mu\text{g/L.h}$ in 50 hours of bioproduction.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	16
1 INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Produção de carotenoides	19
2.2. Estrutura e Biossíntese dos carotenoides.....	20
2.3. Propriedades e funções dos carotenoides	24
2.3.1. Atividade de Provitamina A.....	24
2.3.2. Carotenoides e sinalização celular	25
2.3.3. Atividades antioxidantes	26
2.3.4. Carotenoides e degeneração macular relativa à idade	27
2.3.5. Proteção de pele.....	27
2.3.6. Corantes Alimentares	28
2.4. Micro-organismos produtores de carotenoides.....	29
2.5 Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides.....	32
2.5.1. Efeito da composição do substrato	32
2.5.2. Efeito do pH	41
2.5.3. Efeito da temperatura.....	42
2.5.4. Efeito da taxa de aeração e agitação	43
2.5.5. Efeito da luminosidade	44
2.6. Extração e recuperação de carotenoides.....	45
2.7. Considerações finais.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1 Micro-organismo e Meios de Cultura	48

3.2 Condições de Cultivo	48
3.3. Recuperação dos Carotenoides Totais.....	50
3.4. Delineamento Experimental – Otimização da Bioprodução de carotenoides	52
3.5 Determinações Analíticas	53
3.5.1 Carotenoides Totais	53
3.5.2 Carotenoides Específicos	54
3.5.3 Massa de Células	54
3.5.4 pH	54
3.5.5 Glicose	54
3.5.6 Carbono orgânico total (COT)	55
3.5.7 Macro e Microminerais.....	55
3.6 Cinética da bioprodução e parâmetros estequiométricos	56
3.6.1 Velocidades instantâneas e específicas.....	56
3.6.2 Fatores de conversão	57
3.6.3 Produtividade	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Otimização da bioprodução de carotenoides	59
4.2 Cinética da bioprodução e parâmetros estequiométricos	75
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	87
5.1 Conclusões.....	87
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química dos carotenoides	21
Figura 2 Caminho biossintético da formação dos carotenoides (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).	23
Figura 3 Estrutura química das moléculas de β -caroteno, trans- retinol (vitamina A) e ácido retinoico (trans).	25
Figura 4 Reações de carotenoides e radicais livres. Legenda: ROO• radical; CAR carotenóide. Fonte: YOUNG e LOWE, 2001.	27
Figura 5 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25 °C.	49
Figura 6 Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.	50
Figura 7 (a) Células de <i>S. Salmonicolor</i> CBS 2636, após descarte do sobrenadante;.....	51
Figura 8 Solvente evaporado em evaporador rotativo.	52
Figura 9 Aspecto visual da solução de carotenoides após extração e solubilização em metanol.	52
Figura 10 Superfície de resposta (a) para carotenoides totais e curva de contorno (b) para carotenoides totais.....	61
Figura 11 Aspecto visual dos corantes naturais obtidos na condição otimizada.....	62
Figura 12 Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para carotenoides específicos.	66
Figura 13 Gráfico de Pareto apresentando os efeitos estimados das variáveis estudadas sobre a concentração de células.....	68
Figura 14 Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para o consumo de nitrogênio.	71

Figura 15. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis aeração e glicose para o pH final.....	74
Figura 16 Cinética de crescimento da <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636), produção de carotenoides e pH para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).	75
Figura 17 Cinética do consumo de glicose e carbono orgânico total (COT), para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	76
Figura 18 Cinética do consumo de nitrogênio, ferro e magnésio, para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).....	76
Figura 19 Produtividade em carotenoides ao longo da bioprodução no ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2 ²	79
Figura 20 Produtividade em células ao longo da bioprodução no ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2 ²	80
Figura 21 Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em células (P_x) durante a bioprodução na condição otimizada.....	81
Figura 22 Conversão de glicose e COT em carotenoides ao longo da bioprodução na condição otimizada	82
Figura 23 Conversão de glicose e COT em células durante a bioprodução na condição otimizada	82
Figura 24 Velocidade instantânea de consumo de glicose e COT (μ_s) durante a bioprodução na condição otimizada	84
Figura 25 Velocidade instantânea de formação de carotenoides (μ_p) durante a bioprodução na condição otimizada.....	85

Figura 26 Linearização do crescimento celular da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no ponto otimizado do planejamento experimental fatorial completo 2^2	98
Figura 27 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicose para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2	99
Figura 28 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicose para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2	99
Figura 29 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2	100
Figura 30 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Micro-organismos produtores de carotenoides	31
Tabela 2. Fontes de substratos alternativos na produção de carotenoides	38
Tabela 3. Variáveis independentes e níveis testados no planejamento fatorial completo 2 ²	53
Tabela 4. Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2 ² (valores reais e codificados) e respostas carotenoides totais (µg/L), carotenoides específicos (µg/g) e células (g/L) em 100 h de bioprodução.....	59
Tabela 5. Coeficientes de regressão, erro puro e valores de p e t para carotenoides totais	60
Tabela 6. Análise de variância para carotenoides totais	61
Tabela 7. Resultados do coeficiente de regressão, erro padrão e valores de p e t para carotenoides específicos.....	65
Tabela 8. Análise de variância para carotenoides específicos.....	65
Tabela 9. Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2 ² (valores reais e codificados) com as respostas pH final, glicose e nitrogênio consumidos	70
Tabela 10. Coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p e t para glicose consumida.....	72
Tabela 11. Análise de Variância para a glicose consumida	73
Tabela 12 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em meio sintético para o ponto otimizado no planejamento fatorial completo 2 ²	83

1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e micro-organismos como hidrocarbonetos compostos somente de carbono e átomos de hidrogênio (β -caroteno, licopeno, α -caroteno), ou seus derivados oxigenados que carregam pelo menos um átomo de oxigênio (α e β -criptoxantina, zeaxantina, luteína, cataxantina e astaxantina (ARMSTRONG, 1994).

A maioria dos carotenoides são compostos de uma ligação central de carbono alternando ligações únicas ou duplas e com diferentes grupos cíclicos ou acíclicos na extremidade. Suas maiores funções bioquímicas são determinadas pelo sistema prolongado de duplas ligações conjugadas que é também responsável pela sua cor (BRITTON, 1995).

Devido às suas propriedades corantes, ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana e ao apelo pela substituição dos corantes sintéticos pelos naturais, os carotenoides têm recebido atenção especial, sendo que sua produção por micro-organismos pode tornar-se industrialmente praticável e o custo da produção pode ser minimizado com o uso de substratos industriais baratos como fontes de nutrientes (DAS *et al.*, 2007). E controlando as condições de cultivo como a temperatura, pH, aeração, iluminação, substâncias indutoras, e inibidoras. (NELIS e LEENHEER, 1991).

Na atualidade, o carotenoide de maior consumo é o β -caroteno, com 32 % do mercado, e na segunda posição está a astaxantina, com 28 %. Estima-se que os valores comercializados para a astaxantina atinjam 253 milhões de dólares em 2015, o que representa um crescimento de 1,8 % ao ano (BCC, 2008).

Mais de 90 % do mercado mundial dos carotenoides corresponde à síntese química, mas a demanda de crescimento de aditivos naturais faz da produção microbiológica um mercado promissor (VILA *et al.*, 2008).

Os tipos de carotenóides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), temperatura, pH, taxa de aeração e agitação (BUZZINI & MARTINI, 2005; LIU & HU, 2006). Em face ao exposto, tornam-se necessários o desenvolvimento de estudos da bioprodução de carotenóides que visem o aumento do rendimento e da produtividade. Cabe ressaltar, que a produção de pigmentos naturais por micro-organismos faz parte de um tema de pesquisa da linha de processos biotecnológicos do programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, sendo que neste tema foram desenvolvidas pesquisas com a bioprodução de carotenóides por *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados utilizando meio sintético e substratos alternativos (hidrolisado de soro de queijo, água de maceração de milho, melaço de cana-de-açúcar e hidrolisado de levedura); Avaliação dos efeitos da composição do meio sintético e de condições operacionais por *S. salmonicolor* CBS 2636 em biorreator; Screening de micro-organismos produtores de carotenóides selecionados de resíduos agroindustriais. Frente a isso e no sentido de dar continuidades aos estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, este trabalho teve como objetivo principal a otimização da bioprodução de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS (2636) em biorreator submerso, mediante o emprego de metodologia de planejamento de experimentos.

O presente trabalho apresenta, primeiramente, uma revisão bibliográfica (Capítulo 2) sobre os carotenóides, estrutura e fatores que exercem influência na biossíntese dos mesmos. O Capítulo 3 apresenta a descrição detalhada do procedimento experimental adotado, seguida pela apresentação e discussão dos resultados (Capítulo 4), e conclusões e sugestões (Capítulo 5).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os carotenoides, como os aspectos gerais da biossíntese, classificação e condições que controlam a bioprodução.

2.1. Produção de carotenoides

A produção total de carotenoides na natureza foi estimada em 100.000.000 toneladas/ano, tendo a procura de β -caroteno atingido um valor comercial de aproximadamente 40 milhões USD/ano (FALKOWSKI e RAVEN, 1997). Comercialmente os carotenoides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global estimado em US\$ 935 milhões/ ano (FRASER e BRAMLEY, 2004).

De acordo com os estudos de mercado publicados em 2008 pela Business Communications Company, em 2007 o comércio global de carotenoides chegou a 766 milhões de dólares e espera-se que a marca de 919 milhões de dólares seja superada até 2015, com taxa de crescimento anual de 2,3% (BCC, 2008).

A busca por consumidores cada vez mais conscientes e por alimentos funcionais, pode ocasionar um provável aumento na demanda por carotenoides na indústria alimentar. No mercado global a demanda para carotenoides tem crescido 2,9% ao ano, e espera-se alcançar \$1,02 bilhões nos próximos anos. Entretanto, a maioria dos carotenoides no mercado são derivados de síntese química (~ 90%) e não podem satisfazer o desejo dos consumidores por carotenoides naturais (VILA *et al.*, 2008).

2.2. Estrutura e Biossíntese dos carotenoides

Os carotenoides são tetraterpenoides sintetizados nas plantas, e outros organismos fotossintéticos, e também por algumas bactérias e leveduras não-fotossintéticas. A maioria dos carotenoides são compostos de uma ligação central de carbono alternando ligações simples e duplas e com diferentes grupos cíclicos ou acíclicos na extremidade. Suas maiores funções bioquímicas são determinadas pelo sistema prolongado de ligações duplas conjugadas que é também responsável pela sua cor (BRITTON, 1995). Os carotenoides selecionados são componentes dos cloroplastos e possuem um papel importante na proteção das plantas aos danos fotooxidativos (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 2002). A cor amarelo, alaranjada e vermelha de muitas frutas e flores são causadas por cromoplastos de contenção geralmente desprovidos de clorofila.

De acordo com sua composição química são classificados em carotenos ou xantofilas (OLSON e KRINSKY, 1995). O β -caroteno, o α -caroteno, e o licopeno são membros proeminentes do grupo do caroteno que inclui os carotenoides compostos somente de carbono e átomos de hidrogênio. As xantofilas, entretanto, carregam pelo menos um átomo de oxigênio. Zeaxantina, luteína, α e β criptoxantina, a cantaxantina e astaxantina são xantofilas importantes com grupos hidroxí- e ceto como elementos estruturais. A Figura 1 apresenta a estrutura dos principais carotenoides.

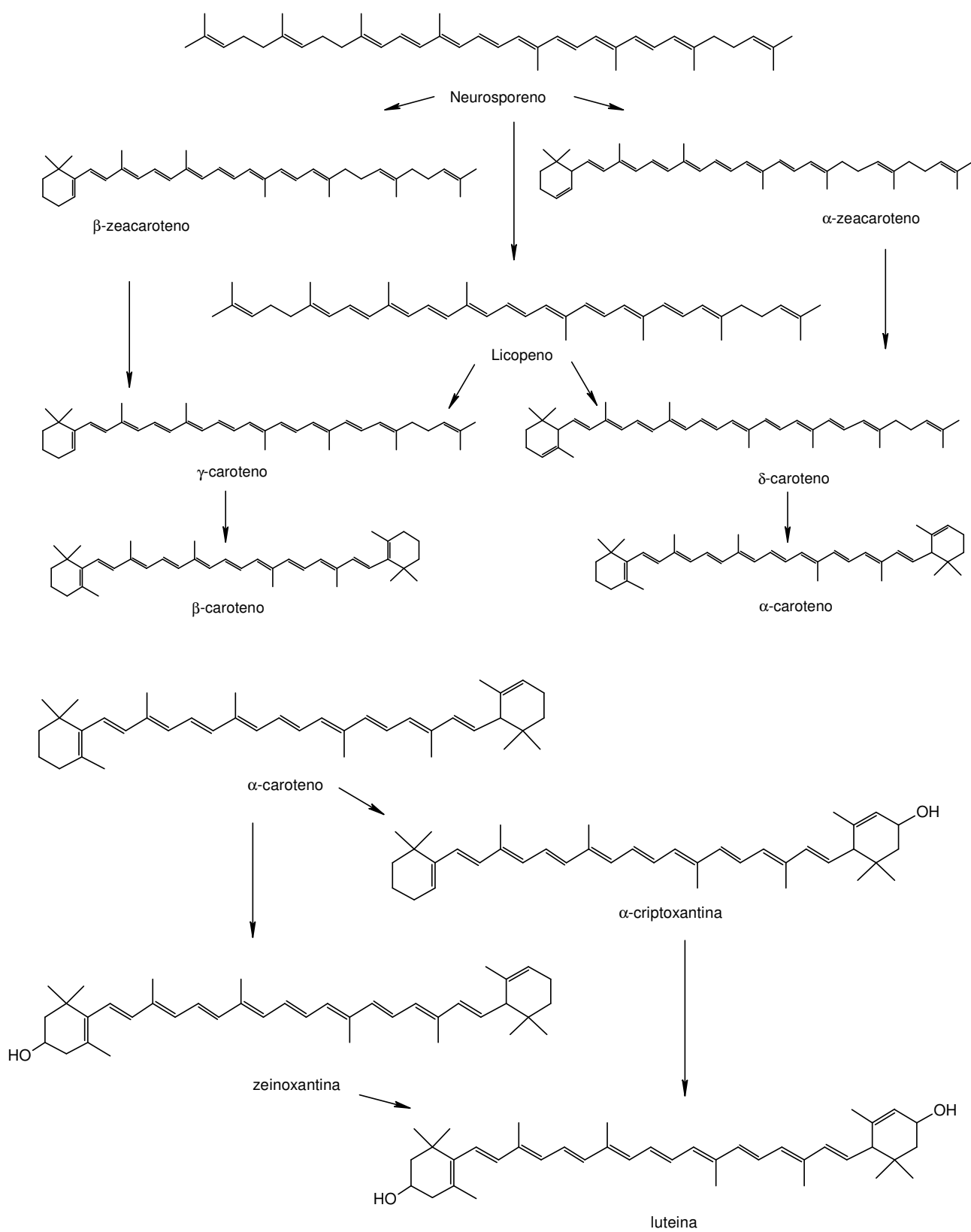


Figura 1 Estrutura química dos carotenoides

A biossíntese dos poliisoprenoides inicia com a conversão do beta-hidroxi-betametilglutaril-CoA em ácido mevalônico. Dois isoprenos C5 intermediários se condensam para formar sucessivamente C10, C15 e C20 (geranil geranil-pirofosfato). Dois destes últimos compostos condensam suas extremidades, formando o primeiro carotenoide C40, 15,15'-cis-fitoeno. Este é sucessivamente desidrogenado resultando no neurosporeno, um acíclico carotenoide de C40 com 12 duplas ligações (Figura 2). Dependendo da bactéria ou da planta, o neurosporeno pode posteriormente ser desidrogenado para licopeno, o qual formará β -caroteno ou α -caroteno ou é metoxilado e oxidado para resultar no cetocarotenoide, esferoidenona, um importante complemento pigmentar na fotossíntese bacteriana. A molécula de oxigênio é introduzida no carotenoide para formar mono e dihidroxicarotenoides, os xantófilos α e β -criptoxantina, zeaxantina, e luteína e, subsequentemente, resultando em derivados epóxi, como anteroxantina, violaxantina, e neoxantina (ARMSTRONG, 1996). Oxocarotenoides, como a cantaxantina, são formados a partir de β -caroteno pela ação de uma oxigenase. Os carotenoides são oxidados em uma variedade de compostos com poucos átomos de carbono em plantas e micro-organismos, incluindo β -apocarotenoides, ácido abscísico, ácido trispórico, bixina e crocetina (OLSON, 1993; DEMMING-ADAMS *et al.*, 1996). Alguns destes produtos apresentam importantes funções biológicas.

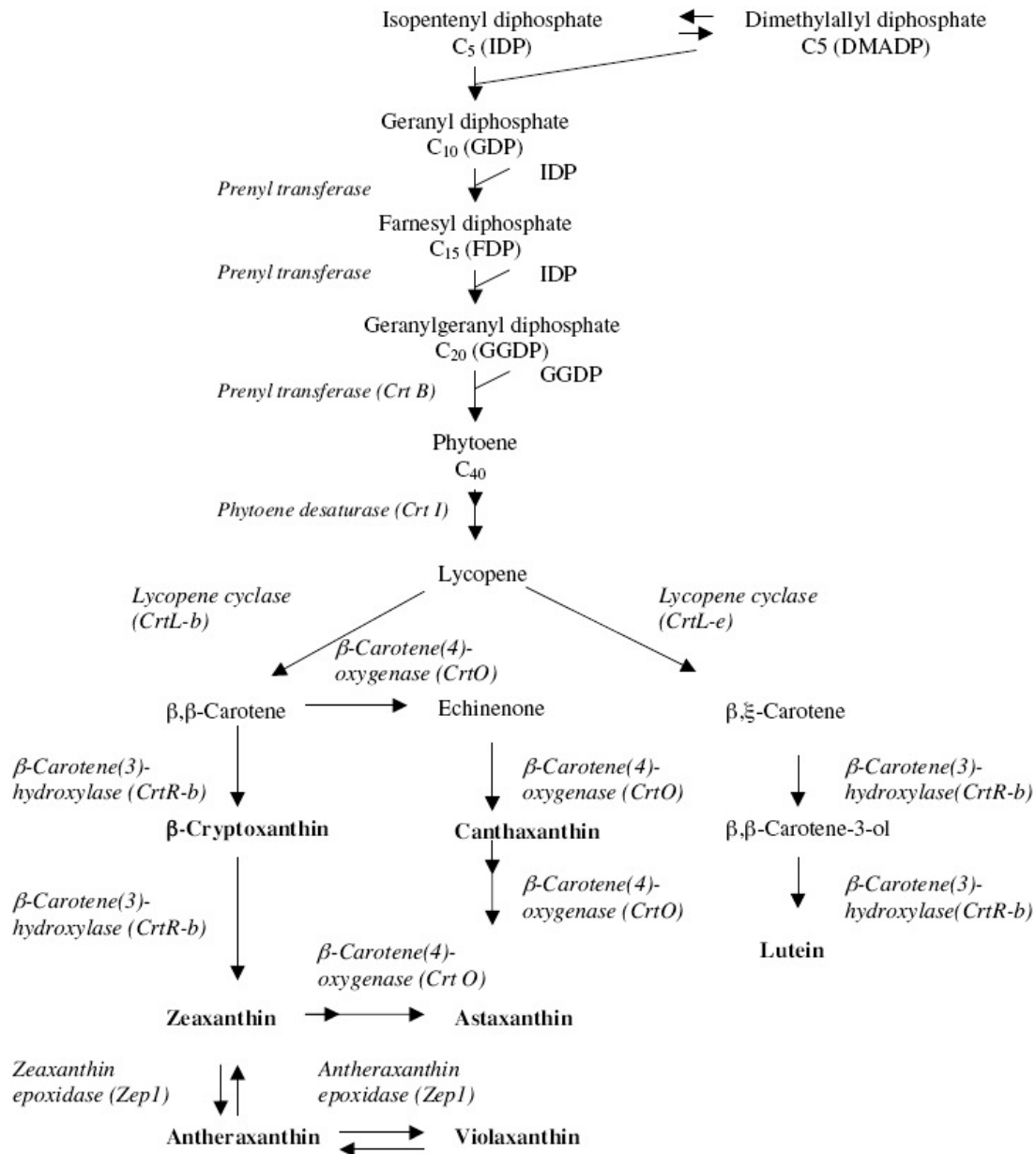


Figura 2 Caminho biossintético da formação dos carotenoides (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).

2.3. Propriedades e funções dos carotenoides

2.3.1. Atividade de Provitamina A

Os carotenoides podem ser divididos em provitamina A e compostos não-provitamina A (OLSON e KRINSKY, 1995; CHAMPAIGN e ILINOIS, 2004). A provitamina A principal de um carotenoide na dieta ocidental é o β -caroteno, mas igualmente o α -caroteno, e a β -criptoxantina contribuem à fonte de vitamina A e podem impedir a deficiência desta vitamina. A Vitamina A é essencial para a promoção do crescimento, desenvolvimento embrional e função visual. A contribuição de carotenoides para provitamina A depende dos hábitos dietéticos e das fontes disponíveis do alimento. Estima-se que carotenoides das frutas e verduras fornecem mais de 70% da vitamina A nos países do terceiro mundo; em sociedades ocidentais a contribuição é muito menor. (HOF *et al.*, 2000).

A eficácia de segmentação, especificidade do substrato para vários compostos de provitamina A, assim como variações e fatores genéticos com impacto na expressão do metabolismo do carotenoide e as enzimas são variações individuais que determinam a vitamina A através da fonte dos carotenoides (STAHL e SIES, 2005).

No organismo humano, o retinol, o retinal e o ácido retinoico são as formas ativas de vitamina A (MORAIS, 2006). O retinol (vitamina A) é convertido em retinal por ação da enzima retinol dioxigenase e o retinal pode ser convertido em ácido retinoico ou retinol pelas enzimas retinal oxigenase e retinol dioxigenase, respectivamente. O ácido retinoico sofre apenas degradação oxidativa, ou seja, não sofre conversão (Figura 1) (BRODY, 1994).

O β -caroteno é um dos compostos carotenoides mais bem estudados. Na última década adquiriu um papel relevante no contexto da nutrição e medicina. Este carotenoide,

que confere a muitos frutos e vegetais a sua pigmentação amarelada, desempenha um importante papel fisiológico, sendo convertido em vitamina A (retinol) e ácido retinoico no corpo humano conforme apresentado na Figura 3 (YAMANO *et al.*, 1994; ARMSTRONG e HEARST, 1996; ARMSTRONG, 1997).

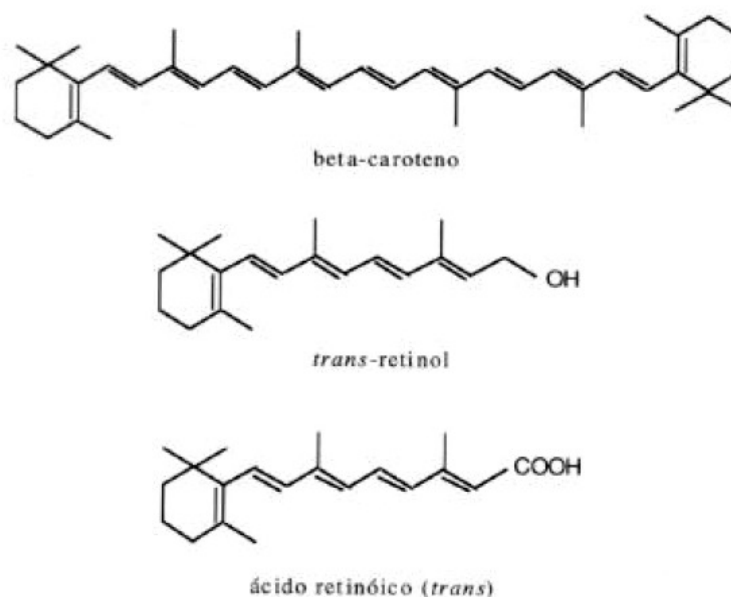


Figura 3 Estrutura química das moléculas de β -caroteno, *trans*- retinol (vitamina A) e ácido retinoico (*trans*).

2.3.2. Carotenoides e sinalização celular

A sinalização intercelular é uma condição prévia para coordenar funções bioquímicas em organismos multicelulares, e vem sendo demonstrado que os carotenoides dietéticos exibem atividades biológicas com impacto nos caminhos da sinalização (STAHL *et al.*, 2002). Os carotenoides e/ou seus metabolitos influenciam a expressão de

determinados genes ou podem atuar como inibidores de reguladores enzimáticos. (AMIR *et al.*, 1999). A inibição de proliferação de células pelo licopeno é associada com um atraso no ciclo de progressão celular e aparente diminuição de IGF-I receptor de sinalização (KARAS *et al.*, 2000). Os carotenoides induzem a fase I e a fase II de enzimas metabólicas com função na desintoxicação carcinogênica (STAHL *et al.*, 2002).

2.3.3. Atividades antioxidantes

A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas; por exemplo, o licopeno é mais eficaz que o β -caroteno, pois o licopeno possui onze duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica, enquanto o β -caroteno possui nove duplas ligações conjugadas e cadeia cíclica nas extremidades (MCBRIDE, 1996). Esses carotenoides são capazes de sequestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil ($\text{ROO}\bullet$) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância. Os carotenoides são, por conseguinte, capazes de retirar do meio espécies altamente reativas (MORAIS, 2006).

Por serem apolares, os carotenoides ficam imersos nas membranas sequestrando radicais gerados neste ambiente (TRUSCOTT, 1996), ao combaterem as espécies reativas de oxigênio, podem interagir de três maneiras diferentes: transferência de elétrons; remoção de íons de hidrogênio ou adição de espécies radicalares, respectivamente, reações 1, 2 e 3 da Figura 4:

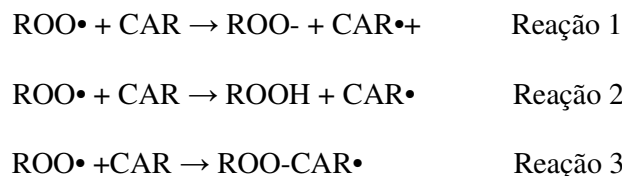


Figura 4 Reações de carotenoides e radicais livres. Legenda: ROO• radical; CAR carotenóide (YOUNG e LOWE, 2001).

2.3.4. Carotenoides e degeneração macular relativa à idade

Um foco da pesquisa atual do carotenoide considera possível papel deste grupo de compostos na proteção contra degeneração macular relativa à idade (AMD). AMD é a causa principal para a cegueira irreversível entre as pessoas idosas e no mundo ocidental afeta aproximadamente 20% da população acima da idade de 65 anos (KRINSKY *et al.*, 2003). O lutea do macula são partes da retina, e a área da acuidade visual máxima. A luteína e a zeaxantina são os pigmentos responsáveis pela coloração deste tecido; outros carotenoides tais como o licopeno, o α -caroteno ou o β -caroteno não são encontrados no lutea do macula. A luteína e a zeaxantina dominam igualmente o teste padrão do carotenoide da retina, mas a concentração no lutea do macula é consideravelmente mais elevada do que na retina (KHACHIK *et al.*, 2002).

Os dados epidemiológicos suportam o conceito que os pigmentos maculares têm um papel protetor; uma associação forte foi encontrada para a luteína. Há evidência em um pequeno estudo de intervenção que a função visual seja melhorada nos pacientes que sofrem de AMD atrófico quando luteína sozinha ou luteína junto com outros nutrientes é suplementado (RICHER *et al.*, 2004).

2.3.5. Proteção de pele

Os suplementos de β -caroteno são amplamente utilizados como protetores orais do sol (SIES e STAHL, 2004). Entretanto, estudos que demonstram a proteção do tratamento

oral com β -caroteno às respostas da pele à exposição do sol são escassos. Os efeitos protetores provavelmente são relacionados às propriedades antioxidantes do carotenoide. Na irradiação UV, a pele é exposta a dano fotooxidativo pela formação de espécie reativa do oxigênio. Influências de dano fotooxidativo nos lipídios celulares, nas proteínas e no DNA é considerado envolvido no processo bioquímico da formação do eritema, envelhecimento precoce da pele, desenvolvimento de fotodermatoses, e câncer de pele (KRUTMANN, 2000). Diversos estudos nos seres humanos mostraram que o nível de carotenoide no plasma e na pele diminui a irradiação UV (KRUTMANN, 1995).

2.3.6. Corantes Alimentares

Os pigmentos naturais, incluindo os carotenoides, são amplamente usados como aditivos em alimentos industrializados para dar cores atrativas. Extratos naturais têm sido usados com esta finalidade por séculos, especialmente anato (bixina), açafrão (crocina), tomate (licopeno, e páprica (capsantina)). Derivados carotenoides sintéticos, idênticos aos naturais, são produzidos em larga escala para a coloração de alimentos, e o interesse na produção industrial de carotenoides por biotecnologia tem vindo a aumentar.

Os carotenoides como corantes, juntos com as propriedades benéficas de serem precursores de vitamina A e antioxidantes, tem uma ampla aplicação na indústria alimentar: preparações oleosas e aquosas têm sido preparadas para produzir emulsões, suspensões coloidais e complexos com proteínas. Essas preparações têm encontrado aplicações nas margarinas, manteigas, sucos de frutas e bebidas, sopas, laticínios e produtos relativos, sobremesas e misturas, xaropes e medicamentos, açúcar, molhos para saladas, carnes, massas, ovos, maioneses, entre outros (GOUVEIA, 2006).

Além disso, os carotenoides são também usados como aditivos para a ração animal, com o propósito de conceder a cor adequada ao tecido animal ou aos produtos derivados

(por exemplo, astaxantina, para salmão; luteína, e zeaxantina, para gema de ovos e pele de galinhas β,β -caroteno, para rebanho bovino, na coloração de nata ou gordura) ou para prover apropriado suprimento de vitamina A (BRITTON *et al.*, 1995).

Os pigmentos produzidos por métodos biológicos têm surgido como um crescente segmento do mercado industrial. Eles são aplicados em alimentos, como suplemento nutricional, e em indústrias cosmética e farmacêutica. Desde o início dos anos 80, várias companhias biotecnológicas têm desenvolvido métodos para produzir pigmentos em culturas bacterianas, de algas e fungos. Os biopigmentos normalmente entram em mercados existentes para pigmentos obtidos por síntese química. Para sobreviver, os materiais produzidos biologicamente devem oferecer vantagens em seu emprego, custo e/ou conformidade com as normas. As três principais categorias emergentes de biopigmentos deste mercado são os carotenoides, xantofilas e melanina (IB MARKET FORECAST, 1992).

2.4. Micro-organismos produtores de carotenoides

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 e SCHROEDER, 1995).

Dentre os vários micro-organismos, os que têm demonstrado serem os mais promissores na produção de carotenoides são: *Dunaliella salina* (AGUILAR *et al.*, 2004), *Xanthophyllomyces dendrorhous* (HU *et al.*, 2006), *Haematococcus pluvialis* (OROSA *et al.*, 2005; DOMINGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2007), *Blakeslea trispora*

(MANTZOURIDOU *et al.*, 2008), *Sporobolomyces ruberrimus* H110 (RAZAVI e MARCH, 2006), *Rhodotorula mucilaginosa* (AKSU e EREN, 2005), *Phafia rhodozyma* (LIU *et al.*, 2006; PARAJO *et al.*, 1998; DOMINGUEZ-BOCANEGRA *et al.*, 2007), *Rhodotorula glutinis* (BUZZINI e MARTINI, 2000; BUZZINI, 2000; KIM *et al.*, 2004; BHOSALE e GRADE, 2001, a e b), *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636 (VALDUGA *et al.*, 2008; 2009 a e b), sendo seus principais produtos carotenoides o β -caroteno, a astaxantina, toruleno e licopeno.

Os trabalhos que relatam sobre a produção de carotenoides são, na grande maioria, realizados em frascos agitados, poucos apresentam dados referentes à produção em biorreator. Dentre os micro-organismos investigados na produção em fermentador, destacam-se: *Haematococcus pluvialis* (CAÑIZARES-VILLANUEVA *et al.*, 2005), *Phaeodactylum tricornutum* (MIRÓN *et al.*, 2002), *Dunaliella salina* (HEJAZI *et al.*, 2004), *Blakeslea trispora* (MANTZOURIDOU *et al.*, 2002) e *Phaffia rhodozyma* (RAMÍREZ *et al.*, 2006).

A produção de β -caroteno pela microalga *Dunaliella salina* em escala industrial está sendo realizada na Austrália, Israel e Estados Unidos (DUFOSSE *et al.*, 2005), e recentemente a produção de astaxantina por outra microalga *Haematococcus pluvialis* foi iniciada nos Estados Unidos, Japão e Índia. O Brasil tem um ecossistema único com diversos micro-organismos com potencial biotecnológico que acumulam carotenoides.

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

Tabela 1. Micro-organismos produtores de carotenoides

Espécies	Carotenoides principais	Referências
Cianobactérias		
<i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Aphanizomenon flos-aqua</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
Algas		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Luteína	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno	Aguilar <i>et al.</i> (2004)
<i>Dunaliella bardawil</i>	β -caroteno	Mogedas <i>et al.</i> (2009)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	β -caroteno	Fazeli <i>et al.</i> (2006)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	Orosa <i>et al.</i> (2005); Dominguez-Bocanegra <i>et al.</i> (2007)
<i>Spongiococcum excetricum</i>	Luteína	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina	Po-fung e Feng, (2005)
Fungos e leveduras		
<i>Blakeslea trispora</i>	β -caroteno e Licopeno	Mantzouridou <i>et al.</i> (2008)
<i>Dacrymyces deliquescens</i>	Luteína	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Pichia pastoris</i>	Licopeno	Bhataya <i>et al.</i> (2009)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina e β -caroteno	Liu <i>et al.</i> (2006); Dominguez-Bocanegra <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Torularodina, β -caroteno, Toruleno	Buzzini e Martini (1999); Aksu e Eren (2005)
<i>Rhodotorula rubra</i>	β -caroteno	Shih e Hang (1996)
<i>Rhodotorula spp</i>	Torularodina, β -caroteno, Toruleno	Bhosale e Grade (2001)
<i>Sporodiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno	Valduga <i>et al.</i> (2009)
<i>Sporodiobolus sp</i>	Torularodina, β -caroteno, Toruleno	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Torularodina, β -caroteno, Toruleno	Davoli <i>et al.</i> (2004)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Torularodina, β -caroteno	Razavi e March (2006)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Hu <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhodospiridium sp</i>	Toruleno e β -caroteno	Johnson e Schroeder (1995)
Bactérias		
<i>Mycobacterium brevicale</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Rhodococcus maris</i>	Cantaxantina	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i>	Xantofilas	Johnson e Schroeder (1995)
<i>Pediococcus acidolactici</i>	Carotenos	Bhaskar <i>et al.</i> (2007)
<i>Brevibacterium linens</i>	Luteína, β -caroteno, criptoxantina	Guyomarc'h <i>et al.</i> (2000)
<i>Halomonas elongata</i>	β -caroteno	Rodríguez-Sáiz <i>et al.</i> (2007)
<i>Flavobacterium multivorum</i>	β -caroteno	Bhosale e Bernstein (2004)
<i>Escherichia coli</i>	Licopeno	Kim <i>et al.</i> (2009)

2.5 Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides

As condições de bioprodução como a temperatura de cultivo, aeração, pH, iluminação, substâncias indutoras e inibidoras tem importantes papéis na atividade de formação dos micro-organismos e da composição dos carotenoides.

2.5.1. Efeito da composição do substrato

A glicose e a sacarose são as formas de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides. De acordo com Buzzini e Martini (1999), com o uso de glicose ocorreu maiores rendimentos na produção específica de carotenoides (1000µg/g) por *Rhodotorula sp.* Valduga et al. (2009a) obteve teor máximo de carotenoides (1019µg/L) com o cultivo de *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados com o aumento das concentrações de glicose (40 g/L), extrato de malte (10 g/L) e peptona (14 g/L).

Razavi e Marc (2006) avaliaram o crescimento e a produção do carotenoide por *Sporobolomyces ruberrimus* H110 usando diferentes fontes de carbono tais como glicose, glicerol puro e glicerol técnico, em frascos agitados por 50 h. O crescimento celular foi aproximadamente duas vezes superior usando o glicerol técnico (4,16 g/L). A taxa de crescimento foi mais elevada quando a glicose foi usada como substrato e a concentração de carotenoide mais elevada foi observada quando o glicerol técnico era a fonte de carbono (1,15 mg/g).

Com a intenção de produzir o pigmento astaxantina, uma nova cepa de *Phaffia rhodozyma* sp. ZJB 00010 foi isolada e caracterizada. Na tentativa de obter uma cepa com maior capacidade de gerar o pigmento visando à aplicação industrial, foram realizadas mutações por feixe de íons de baixa energia e a melhor cepa mutante, E5042, foi obtida

após cinco mutações sequenciais. Os resultados de cultivos em biorreator de 50 litros com meio contendo glicose a 80 g/L demonstraram que a cepa mutante gerou 2512 µg de astaxantina por grama de célula seca, em 136 horas de cultivo, enquanto a cepa selvagem atingiu um valor máximo de 1108 µg de astaxantina por grama de célula seca em 142 horas de cultivo (LIU, *et al.*, 2008).

De acordo com Liu e Wu (2007) na produção de carotenoides em frascos agitados por *X. dendrorhous* a glicose apresentou efeito significativo não somente no crescimento celular, como também na biossíntese de carotenoides. No entanto, o crescimento celular requer concentrações mais altas destes nutrientes, enquanto que na biossíntese é necessária uma concentração mais baixa. Podendo ser explicado devido aos carotenoides serem produtos do metabolismo secundário neste micro-organismo, sendo sintetizados principalmente em condições de estresse, como carência de nutrientes.

Para Aksu e Eren (2005) a máxima concentração de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* de 63,0 mg/L e a máxima concentração de biomassa seca 4,9 g/L com rendimento do produto de 12,9 mg/g ocorreu quando a concentração inicial de sulfato de amônio foi de 2 g/L.

Alguns agentes, tais como aditivos detergentes, óleos, surfactantes foram sugeridos como ativadores para a produtividade crescente do carotenoide (KIM *et al.*, 1997). O óleo de semente de algodão aumentou a concentração dos carotenoides significativamente, comparado com o meio sem o ativador. O micro-organismo *R. mucilaginosa* produziu 57,6 mg/L de carotenoides em frascos agitados, com óleo de semente de algodão e 39,5 mg/L de carotenoides sem o ativador. Quando a concentração da glicose foi aumentada para 15 g/L, o crescimento específico e taxas da formação do carotenoide diminuíram consideravelmente com Tween 80 e com óleo de semente de algodão. Somente o rendimento da produção do carotenoide aumentou com a adição do Tween 80. Concluiu-

se que somente o suplemento do óleo de semente de algodão no meio de cultura conduziu a produção aumentada de carotenoides totais em mais baixas concentrações da glicose (AKSU e EREN, 2005).

Palágyi, Ferenczy e Vagvolgyi (2001) testaram assimilação de 99 diferentes fontes de carbono em onze cepas da levedura *Phaffia rhodozyma*, sendo as cepas selvagens ATCC 24203, ATCC 24228, ATCC 24229, ATCC 24230, ATCC 24261, CBS 5905 (também denominada ATCC 24202), CBS 5908, CBS 6938, CCY 77-1-1, e as cepas mutantes W/IMP-UB e Z/IMP-UB. O estudo mostrou que as fontes de carbono D-xilose, D-glucose, D-manose, D-frutose, L-arabinose, L-xilose, sacarose, D-maltose, D-celobiose, D-rafinose, D-melezitose, amido, citidina, ácido 2-ceto-D-glucônico, ácido L-málico, etanol, β -metil-D-glucosídeo, arbutina, salicina, ácido oxalacético, ácido D-glucônico, lactona, ácido acético e trealose são assimiladas por todas as cepas. Concluíram, ainda, que algumas fontes de carbono não são assimiladas por nenhuma das cepas, como: D-ribose, D-galactose, L-ramnose, lactose, D-melibiose, xilana, dextrana, inulina, glicerol, i-eritritol, galactitol, ribitol, mio-inositol, xilitol, glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-serina, L-treonina, L-asparagina, L-cisteína, L-tirosina, L-lisina, L-arginina, L-histidina, β -alanina, L-ornitina, L-citrulina, uracila, citosina, tiamina, adenosina, dihidroxiacetona, γ -butirolactona, vanilina, ácido gálico, ácido L-hidroxibutírico, β -metil-D-galactosídeo, metil-D-xilosídeo, metil- α -D-manopiranosídeo, ácido cetoisovalérico, ácido protocatecoico, ácido ascórbico, D-glucosamina, ácido fumárico, ácido gentísico, ácido DL-isocítrico, metanol, ácido orótico, pectina, ácido tartárico e α -cetoglutarato. O estudo também demonstrou que a cepa selvagem ATCC 24202 assimila normalmente D-arabinose, glicerol-1-monoacetato, ácido glucônico, inosina, D-manitol, L-prolina, ácido pirúvico, D-sorbitol e L-sorbose e assimila

fracamente o ácido L-glutâmico, ácido 5-ceto-D-glucônico, ácido L-lático e 27 uridina. O trabalho não citou a formação de astaxantina pelas cepas.

Moriel *et al.* (2005) cultivaram a cepa selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma* ATCC 24202 em meio contendo caldo de cana suplementado com ureia em processos contínuo e descontínuo alimentado em biorreator. Os pesquisadores obtiveram no processo descontínuo alimentado a concentração celular de 303,34 µg de astaxantina por grama de célula seca e 18,75 g/L de biomassa seca, e observaram que, apesar de um aumento na produtividade em biomassa em relação ao processo contínuo, houve redução na concentração celular em astaxantina, a qual foi de 364,59 µg de astaxantina por grama de célula seca para o segundo processo.

Kim *et al.* (2007) obtiveram a cepa mutante *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 por mutagênese química com *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina e relataram que a mesma foi capaz de gerar a concentração volumétrica de astaxantina de aproximadamente 8,0 mg/L, enquanto a cepa selvagem obteve 4,5 mg/L quando cultivada em meio YM, em cinco dias de cultivo. Os autores testaram a resposta da cepa mutante G276 na presença de extrato de plantas aos meios de cultivo, sendo que as adições de extratos de *Perilla frutescens* (Perila) a 5% ou *Allium fistulosum* (Cebolinha verde) a 1% foram capazes de gerar concentração volumétrica de astaxantina de cerca de 32,0 mg/L. Em cultivos em biorreator o extrato de *Perilla frutescens* reduziu em dois dias o tempo de cultivo em relação ao meio controle (sem adição de extrato).

Rhodotorula glutinis em meio de crescimento preparado com água do mar, o índice do carotenoide e a massa de células secas foram de 86 mg/L e 16 g/L, respectivamente, em comparação a 70 mg/L e a 12 g/L obtidos com um meio preparado com água destilada. (BHOSALE e GADRE, 2001).

Papaioannou e Liakopoulou-Kyriakides (2009) observaram em seu estudo as mudanças específicas nos três principais carotenoides (licopeno, β -caroteno e γ -caroteno) em culturas de *Blakeslea trispora*, quanto à composição do meio. Várias fontes de carbono natural e óleos vegetais refinados foram utilizados como co-substratos. O meio com lactose acumulou preferencialmente o all-trans- β -caroteno, a utilização de lactose e amido como fontes de carbono, indicou que o *B. trispora* é capaz de metabolizar vários homo e heterossacarídeos, levando a diferentes porcentagens de carotenoides. A presença de óleos como co-substratos aumentou o crescimento do fungo e a produção de carotenoides. Substratos contendo ácido linoleico ou outros óleos levou à menor acúmulo de licopeno. Esses dados mostraram que a biossíntese de licopeno, β -caroteno e α -caroteno começa na maioria dos casos, simultaneamente, na fase inicial de crescimento, mesmo em pequenas quantidades e, portanto, podem desempenhar um papel também como antioxidantes para as células da *B. trispora*.

A produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultivada com *Lactobacillus bulgaricus* 2-11 e *Streptococcus thermophilus* 15HA, em meio de bioprodução composto de ultrafiltrado de soro de leite (45 g/L de lactose), suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6,0 g/L), KH_2PO_4 (5,5 g/L), Na_2HPO_4 (3,0 g/L), Mg SO_4 (0,5 g/L) e extrato de levedura (5,0 g/L) foi estudada por Simova *et al.* (2004), obtendo a máxima produção de carotenoides totais de 4,7 mg/L.

Mantzouridou *et al.* (2006) para *Blakeslea trispora* estudaram a utilização de óleo de oliva bruto e óleo de soja como fonte de carbono nas quantidades de 10 a 30 g/L adicionados ao meio de cultura, e compararam com um meio contendo somente glicose como fonte de carbono. O crescimento microbiano na presença dos óleos conduziu a um aumento na produção total do carotenoide. O desempenho dos óleos brutos foi melhor do que os refinados. A produção do carotenoide dependeu do tipo e da quantidade adicionada

de óleo, sendo que a maior quantidade adicionada de óleo não favoreceu o aumento do acúmulo de carotenoide. A adição de 10 g de óleo/L no substrato estimulou a síntese de carotenoides, principalmente do β -caroteno mais de 14 vezes com óleo de oliva e 40 vezes mais com óleo de soja comparadas ao meio com somente glicose como fonte de carbono. O índice máximo de carotenoides totais foi de 75 mg/g de células secas para óleo de oliva e de 235 mg/g de células secas para óleo de soja. O crescimento, a assimilação do substrato e a acumulação-degradação de lipídios dependeram da presença de óleo no substrato.

Jirasripongpun *et al.* (2008) avaliaram a produção de biomassa e astaxantina pelas cepas mutantes da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* GM 807, obtida por irradiação gama, e n78, irradiação por nêutrons, em meio contendo suco de abacaxi diluído e suplementado com peróxido de hidrogênio. Foram testadas várias diluições do meio e concentrações do peróxido de hidrogênio, e os resultados obtidos demonstraram que, na diluição de 10 % e sem suplementação, o suco de abacaxi é um meio de cultivo capaz de promover o aumento da produção de carotenoides em 65,8 % para a cepa mutante GM 807 em relação ao meio YM, alcançando 493 μ g por grama de célula seca.

Estudos sobre a influência de elementos traços no crescimento de leveduras e biossíntese de carotenoides reportam que esses elementos podem aumentar a carotenogênese em *R. gracilis* (GOODWIN, 1980). Komemushi *et al.* (1994) avaliaram o crescimento de *R. glutinis* em lactato como única fonte de carbono e observaram uma inibição no crescimento da levedura na presença de íons Na^+ ou K^+ , e um efeito estimulador foi exercido por Ba^{2+} e Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} , que promoveram a produção de células. Apesar desses resultados, elementos traços não foram assumidos como importantes na carotenogênese, e nenhuma informação detalhada foi reportada sobre suas concentrações ótimas para assegurar uma maior produção de pigmentos (BUZZINI *et al.*, 2005).

Dominguez- Bocanegra *et al.* (2007) avaliaram o crescimento de *P. rhodozyma* utilizando soro de leite de coco como substrato, e obtiveram as taxas de crescimento máximas da levedura que foram de 9,2 g/L (cepa selvagem) e 6,2 g/L (cepa R1). Em outros meios, foram observadas mais baixas taxas de crescimento: em YM 5,6 g/L (cepa selvagem) e 4,7 g/L (cepa R1), e em YPG 4,9 g/L (cepa selvagem) e 3,9 g/L (cepa R1).

Alguns estudos têm investigado a produção de carotenoides por fontes alternativas de substratos tais como grãos (aveia, trigo, cevada, milho, arroz, centeio), lipídios e substâncias relacionadas, glicerol, celobiose, melão de cana de açúcar, mosto de uvas e soro de queijo (Tabela 2) por diferentes cepas em bioprodução com frascos agitados (BUZZINI e MARTINI, 2000; BHOSALE e GRADE, 2001b).

Tabela 2. Fontes de substratos alternativos na produção de carotenoides

Subprodutos	Referências
Soro de leite ultrafiltrado	Frengova <i>et al.</i> (1994)
Melaço de sacarose	Aksu e Eren (2005)
Soro de leite	Aksu e Eren (2005)
Glicerol técnico	Razavi e Marc (2006)
Fenol	Kim <i>et al.</i> (2004)
Água do mar	Bhosale e Gadre (2001)
Glicerol indústria de sabão	Mantzouridou <i>et al.</i> (2008)
Glicerol resíduo biodiesel	Mantzouridou <i>et al.</i> (2008)
Óleo de bagaço de oliva cru	Mantzouridou <i>et al.</i> (2006)
Óleo de soja	Mantzouridou <i>et al.</i> (2006)
Mosto de uvas	Buzzini (2000)
Leite de côco	Dominguez-Bocanegra <i>et al.</i> (2007)
Melaço de cana de açúcar	Valduga <i>et al.</i> (2007); Bhosale e Gadre (2001)
Água de maceração de milho	Valduga <i>et al.</i> (2007)
Hemicelulose hidrolisada de eucalipto	Parajó <i>et al.</i> (1998b)
Salmoura de rabanete	Malisorn e Suntornsuk (2009)

Mantzouridou *et al.* (2008) utilizando *Blakeslea trispora* observou que nas culturas suplementadas com glicerol puro até 90 g/L, nível total de biomassa foi mais elevado em todas as fases, com dependência do crescimento celular com o nível de glicerol que variou de 20 a 60 g/L com 10 a 180g/L de glicerol puro adicionado respectivamente. A biomassa permaneceu constante nos meios com glicose como única fonte de carbono ou glicose enriquecida com até 30 g/L de glicerol, aumentou nos meios c/ 60 a 90g/L de glicerol e com 180g/L de glicerol a biomassa foi mais baixa do que no meio controle até 36h, indicando período de adaptação. Neste mesmo estudo em todos os meios de cultura a síntese de lipídios celulares foi estimulada quando o índice do nitrogênio alcançou 0,2g/L, demonstrando ser dependente do nível de glicerol, quanto maior a quantidade de glicerol mais a síntese de lipídio foi favorecida. A produção aumentada de acetil-coA para a biossíntese de ácidos graxos e dos ácidos graxos a outros lipídios resulta no catabolismo de quantidades elevadas de glicose através do glicerol, tendo como resultado o índice de lipídio celular aumentado.

Nos meios com glicose como única fonte de carbono ou glicose mais o glicerol a utilização de lipídios foi provocada durante a fase estacionária (60 a 288h), quando a maioria do carbono extracelular foi consumido. Nos meios com 180g/L de glicerol, nenhuma degradação de lipídios armazenados foi observado devido a disponibilidade da fonte de carbono. O carotenoide foi acumulado em quantidades mais elevadas quando a glicose era única fonte de carbono, os valores de biomassa final foram 33 g/L e de lipídios celulares foi de 0,26 g/g de biomassa seca. A produção do carotenoide (15,0 mg/g de biomassa seca) foi conseguida com concentração inicial de glicerol de 60 g/L, com β -caroteno constituindo 80 % do total de carotenoides (MANTZOURIDOU *et al.*, 2008).

Utilizando glicerol não purificado na bioprodução de carotenoides com *Blakeslea trispora* Mantzouridou *et al.* (2008) obtiveram biomassa (25 g/L) e quantidade celular de

lipídios (0,16 g/g de biomassa seca) em níveis mais baixos do que na cultura com glicerol puro, observou também inibição da fase lag seguida por baixas taxas de utilização de fontes de carbono e nitrogênio, com término adiantado da fase de crescimento (132 h) e extensão do processo de bioprodução (336 h). Produção lenta dentro das primeiras 120 h aumentando após o último estágio de crescimento quando o índice de nitrogênio residual foi mais baixo e produção de carotenoides de 10 mg/g de biomassa seca.

O efeito do glicerol da indústria de biodiesel parcialmente purificado na cinética da bioprodução de carotenoides pela *Blakeslea trispora* demonstrou atraso na estimulação do crescimento, e quantidades mais baixas de biomassa (20 g/L) e lipídios celulares (0,15 g/g de biomassa seca) detectadas com relação ao uso do glicerol puro, e rendimento do carotenoide (8,0 mg/g de biomassa seca) foi obtido no fim do processo de bioprodução (MANTZOURIDOU *et al.*, 2008).

A cepa mutante PR-18 de *Phaffia rhodozyma* apresentou o melhor desempenho na formação de biomassa e astaxantina nos meios com glicose, sacarose e caldo de cana comparada à cepa selvagem nos cultivos em frascos. Os valores de concentração celular máxima (X_{max}) e concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{max}) obtidos no cultivo com caldo de cana foram de 7,21 g/L e 2,18 mg/L para a cepa mutante PR-18 e 6,53 g/L e 1,86 mg/L para a cepa selvagem, respectivamente (SILVA, 2008).

Silva (2008) em seu estudo com *Phaffia rhodozyma* cultivada em biorreator por processo descontínuo alimentado utilizando meio de cultivo de baixo custo contendo caldo de cana e uréia, obteve valores de concentração celular máxima (X_{max}) e concentração volumétrica máxima de astaxantina (P_{max}), de 5,01 g/L e 22,29 mg/L para a cepa mutante PR-18 e 5,41 g/L e 27,75 mg/L para a cepa selvagem, respectivamente, concluindo que a cepa selvagem apresentou melhor desempenho tanto no que se refere ao crescimento celular quanto à formação de astaxantina em relação à cepa mutante PR-18.

2.5.2. Efeito do pH

Para avaliar o efeito do pH na pigmentação e crescimento da cepa, a *S. ruberrimus* foi cultivada a 28°C por 72 h em biorreator. O pH foi ajustado a 3,5; 4; 4,4; 5; 5,5; 6,0; 6,6; 7; 7,6 e 8,2 respectivamente. O pH teve um efeito pronunciado no pigmento e na biomassa. O carotenoide e a biomassa mínimos foram observados quando as células cresceram em pH 3,5 (biomassa: 6,81 g/L, carotenoide específico: 2,02 mg/g). A carotenogênese e o crescimento foram induzidos com aumento do pH (pH > 6). Os resultados mostraram que o melhor pH para o crescimento da célula e formação total da pigmentação por esta cepa foi 6,0 (RAZAVI e MARC, 2006).

Segundo Silva (2008) nos ensaios contendo os substratos limitantes glicose e sacarose, suplementados com extrato de levedura e peptona, o pH se manteve em torno de 4,5 durante o crescimento exponencial, tanto para a cepa mutante PR-18 quanto para a cepa selvagem de *Phaffia rhodozyma*, alcançando valores próximos a 6,0 no final dos cultivos. Contudo, quando as mesmas cepas foram cultivadas em meio contendo caldo de cana suplementado com ureia, a variação do pH foi de 5,0 a 7,0 durante o crescimento exponencial, atingindo valores em torno de 8,0 no tempo final dos cultivos. A menor variação do pH durante as 96 horas foi verificada nos cultivos suplementados com extrato de levedura e peptona, entretanto no cultivo com caldo de cana o pH aumentou provavelmente pela hidrólise da ureia em amônia.

Meyer e Du Preez (1993) relatam que quando são comparados os efeitos de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de micro-organismos, a principal alteração é a mudança de pH durante o processo.

Para *X. dendrorhous* o pH exerceu influência significativa no crescimento celular, onde a concentração de células variou de 11,6 a 17,3 g/L (HU *et al.*, 2006). Liu e Wu (2007) em estudo sobre os tipos de cultivo de *X. dendrorhous* obtiveram para o processo

em batelada uma densidade celular de 9,1 g/L, em outros 2 estágios controlados 15,2 g/L e nos estágios otimizados 16,7 g/L.

Segundo Aksu e Eren (2005) o crescimento celular e as taxas de produção de carotenoide de *R. mucilaginosa* aumentaram em pH 7,0 (5,1 g/L de células secas) e das concentrações do carotenoide (69,8 mg/L).

Valduga *et al.* (2009) verificaram que o melhor pH para o crescimento de *S. salmonicolor* em frascos agitados estava entre 4,0 e 5,0, e para a máxima produção de carotenoides foi em pH 4,0.

2.5.3. Efeito da temperatura

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 é a temperatura.

Para estudar o efeito da temperatura no crescimento da levedura e na produção do carotenoide, o *Sporobolomyces ruberrimus* foi crescido no glicerol técnico sob o pH controlado em quatro temperaturas diferentes 19, 23, 27 e 31 °C em biorreator. As concentrações iniciais de glicerol e sulfato de amônio foram de 67 g/L e 20 g/L, respectivamente. A produção de carotenoides ocorreu sempre que a temperatura foi mantida entre 19 e 27 °C, mas a 31 °C as células permaneceram incolores e nenhuma produção do pigmento foi considerada. O rendimento total e o crescimento da levedura foi sempre o mesmo e, quando o glicerol foi esgotado, a biomassa e a produção do pigmento cessaram. A produção mais rápida dos carotenoides ocorreu durante a fase de crescimento exponencial sob todos os valores de temperatura, exceto a 31 °C. A produção de carotenoides foi aproximadamente paralela ao crescimento da levedura em cada experimento. Determinou-se que a produção máxima do pigmento foi observado no fim da

fase de crescimento exponencial. A produção máxima de torularodina ocorreu em 19°C e a mínima em 27°C (RAZAVI e MARC, 2006).

Aksu e Eren (2005) estudaram o efeito da temperatura para *R. mucilaginosa* em três níveis de crescimento e produção dos carotenoides. As taxas específicas de crescimento e produção do carotenoide aumentaram com temperatura crescente até 30 °C. Isto ocorreu devido à desnaturação do sistema enzimático do micro-organismo. As taxas de produção máxima do crescimento e produção do carotenoide foram de 0,249 h⁻¹ e 0,72 mg/g/h, respectivamente.

Kim *et al.* (2009) produziram licopeno utilizando engenharia metabólica em *Escherichia coli* com rendimentos dependentes do estado dos inóculos. Os rendimentos foram baixos no caso das culturas com altas cópias de plasmídeos que foram estabelecidas com inóculos na fase de crescimento e estacionária. Por outro lado, culturas derivadas utilizando plasmídeo de baixa cópia, renderam grandes quantidades de licopeno, independentemente do estado dos inóculos. Para aumentar ainda mais a produtividade licopeno, foi aplicada uma mudança de temperatura (37 – 25 °C), aumentando-se a produtividade licopeno em cerca de 20% comparada com outra cultura, alcançando um rendimento final de licopeno de até 260 mg/L em 60 h, sendo o maior resultado em *E. coli*.

Valduga *et al.* (2009) em seus estudos com *S. salmonicolor* observou efeito negativo na produção de carotenoides com o aumento da temperatura, sendo a temperatura ótima 25 a 28 °C.

2.5.4. Efeito da taxa de aeração e agitação

Micro-organismos aeróbios necessitam das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento. Para *Rhodotorula mucilaginosa* a produção de carotenoides totais foi significativamente maior com taxa de aeração de 2,4 vvm, obtendo

biomassa de 5,7 g/L, carotenoides totais 112,8 mg/L e rendimento do produto de 19,8 mg/g. A aeração mostrou-se benéfica para o crescimento celular, devido à melhora nas características de transferência de massa com respeito a substrato, produto e oxigênio (AKSU e EREN, 2005). Em outro estudo feito por Aksu e Eren (2007) com *R. glutinis* foi observado o mesmo comportamento, obtendo-se biomassa de 5,4 g/L, carotenoides totais 105,8 mg/L e rendimento do produto de 19,6 mg/g.

Tinoi *et al.* (2005) demonstraram que em taxas de agitação baixas (100 a 150 rpm) tem-se menor crescimento celular de *Rhodotorula glutinis* devido à redução da disponibilidade de nutrientes na superfície das células, em taxas elevadas de agitação (> 250 rpm), ocorreu ruptura celular evidenciado com o aparecimento de uma fina camada oleosa.

2.5.5. Efeito da luminosidade

Em estudo realizado por Dominguez-Bocanegra *et al.* (2007) com *H. pluvialis*, verificou-se que um aumento na intensidade de luz, conduziu a um aumento na produtividade do pigmento, 767 µg/g células por dia com iluminação contínua e 535 µg/g células por dia sob um fotoperíodo. A indução para aumento na acumulação de astaxantina em função da média irradiação é uma característica típica dos metabólitos secundários que são ligados parcialmente ao crescimento. Geralmente, o aumento na intensidade de luz conduz a um aumento na síntese de astaxantina, além disso, limitar o índice de nitrato junto com um nível elevado da irradiação aumenta a síntese do carotenoide.

Zhang *et al.* (2009) utilizando *H. pluvialis* WZ em fotobiorreator (tanques 100 m²) obtiveram teor de astaxantina de 1,61 a 2,48 g/ 100 g peso seco, e um teor médio de astaxantina de 2,10 g/ 100 g de peso seco.

Determinadas leveduras biossintetizam carotenoides contra os danos causados pela luz. Os efeitos da luz branca sobre o crescimento e produção de carotenoides por *R. glutinis* foi pesquisado 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, porém na levedura *R. glutinis* a luz inibiu o crescimento celular, onde simultaneamente a produção de torularodina aumentou de 7,9 para 14,2 mg/100g células, principalmente durante a fase exponencial, demonstrando a habilidade do torularodina sequestrar o oxigênio singlete.

2.6. Extração e recuperação de carotenoides

O processo de *dowstream* é um contribuinte significativo para o aumento no custo da produção. Devido a este fator, a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares tem recebido atenção especial recentemente. Tradicionalmente, o rompimento das células microbianas para obtenção dos produtos intracelulares é baseado em técnicas mecânicas tais como a homogeneização a alta pressão e trituração de grânulo (MIDDELBERG, 1995). Entretanto, essas técnicas sofrem inconvenientes, incluindo a produção de restos de células, alto custo e longo tempo de processamento. A extração química é um substituto possível para o rompimento mecânico das células devido à sua simplicidade, velocidade relativa e baixo custo (CHOE e MIDDELBERG, 2001).

Devido à forte associação dos carotenoides com as células e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos Valduga *et al.* (2009) avaliaram 11 métodos diferentes de rompimento celular e extração com solventes, constatando que quando utilizada a combinação de nitrogênio líquido mais dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura

celular e, extração com mistura de acetona e etanol (7:3), obteve-se maior recuperação de carotenoides da levedura *S. salmonicolor* cultivada em meio YM.

Segundo Park *et al.* (2007), cinco solventes foram testados para a ruptura das células de *R. glutinis*, sendo os mais eficientes a mistura de solventes dimetilsulfóxido (DMSO), éter de petróleo e acetona, gerando máxima extração.

Jaime *et al.* (2010) estudaram a extração de carotenoides antioxidantes da microalga *Haematococcus pluvialis*, combinando extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando hexano e etanol como solventes, e técnicas analíticas como cromatografia em camada fina (TLC) e HPLC. Os resultados demonstraram que a temperatura de extração tem influência positiva no rendimento, que pode ser devido a um aumento na transferência de massa da amostra para o solvente pressurizado com a temperatura, porém o seu efeito na atividade antioxidante foi negativo, ocorrendo redução na concentração do pigmento com o aumento da temperatura de 50 a 150°C, sendo mais pronunciada em 200°C. Os melhores rendimentos foram obtidos com etanol à temperatura superior à extração, enquanto que a atividade antioxidante foi melhor utilizando etanol, porém em temperaturas mais baixas.

2.7. Considerações finais

Como pôde ser observado através da revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, há um grande interesse na bioprodução de carotenoides devido ao seu amplo potencial de aplicação nas indústrias de alimentos (corantes e em suplementos nutricionais), farmacêutica, cosmética e de ração. Também a procura por compostos com conotação natural tem resultado num aumento de pesquisas referentes à produção de carotenoides através da bioprodução.

As pesquisas de produção de corantes naturais utilizando micro-organismos vêm enfocando não somente a seleção de linhagens produtoras de uma variedade de carotenoides, mas também a otimização das metodologias de cultivo para um aumento na produção de corante, redução de custos com a bioprodução e posterior aplicação em escala industrial. Além disso, inúmeros trabalhos são realizados aplicando engenharia genética visando a obtenção de carotenoides de maior interesse e em maiores quantidades.

A tendência é o aumento nas pesquisas em relação à produção de corantes através de micro-organismos, pois se tem a necessidade de redução de custos de produção e aumento no rendimento, tornando assim a bioprodução competitiva com a síntese química.

A otimização dos processos biotecnológicos de produção é um tema de grande importância. Na bioprodução, qualquer melhoria alcançada na produtividade do metabolismo microbiano, em geral, através da manipulação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais pode alterar significativamente o rendimento do produto de interesse. Portanto, é de grande valia estudos de otimização da bioprodução de carotenoides em biorreator, a fim de aproveitar melhor os componentes do meio de bioprodução, no sentido de maximizar o rendimento e reduzir custos de substratos, para que, com o aumento de escala se tenha um incremento da bioprodução.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e Meios de Cultura

Para a produção de carotenoides em biorreator foi utilizada a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). Para manutenção da cultura utilizou-se meio YMA e, para o preparo do inóculo, meio YM.

O meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) foi composto de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona de carne, 10 g/L de glicose (Nuclear) e 20 g/L de Agar (Vetec). Após o preparo o meio foi colocado em tubos de ensaio com tampa de rosca e esterilizado a 121°C durante 15 min em autoclave (Phoenix, modelo AV75), e resfriados.

O meio para o inóculo YM (*Yeast Malt Extract*) era constituído de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose, que após seu preparo foi esterilizado em autoclave (Phoenix, modelo AV75) a 121°C por 15 min.

3.2 Condições de Cultivo

A cultura liofilizada de *S. salmonicolor* (CBS 2636) foi hidratada em meio YM em estufa (Tecnal, modelo TE 393/2), a 25°C por 72 h. Posteriormente, a cultura foi transferida para placas de petri contendo meio YMA, e incubada por 48 h a 25°C. Após o crescimento, as placas foram mantidas a 4°C. A cada mês foram realizadas repicagens do micro-organismo.

Para o preparo do inóculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM, e incubado a 25°C, 180 rpm por aproximadamente 48 h em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB), conforme mostra a Figura 5. A densidade óptica desta suspensão era aproximadamente 0,7.



Figura 5 Inóculo após 48 h de cultivo, a 180 rpm mantido a 25 °C.

Os ensaios da bioprodução de carotenoides foram realizados em Biorreator Biostat B (Braun Biotech International) com volume útil de 1 L, por 100 h, sem iluminação, conforme mostra a Figura 6. Os parâmetros monitorados foram temperatura, agitação e aeração. O antiespumante FG 10 Dow Corning foi esterilizado em UV durante 40 min.



Figura 6 Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.

A composição do meio de cultivo e as condições experimentais da bioprodução foram determinadas conforme descrito no item 3.4.

3.3. Recuperação dos Carotenoides Totais

A extração e recuperação dos carotenoides totais foi realizada segundo metodologia descrita por Valduga *et al.* (2009b).

Após a bioprodução, o meio fermentado foi centrifugado a 5°C e 6500 rpm por 10 min em centrífuga refrigerada (Nova Ética, modelo MT-815). Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células (5 g) (Figura 7 a) foram maceradas por sucessivas vezes em Graal com nitrogênio líquido (Figura 7 b).

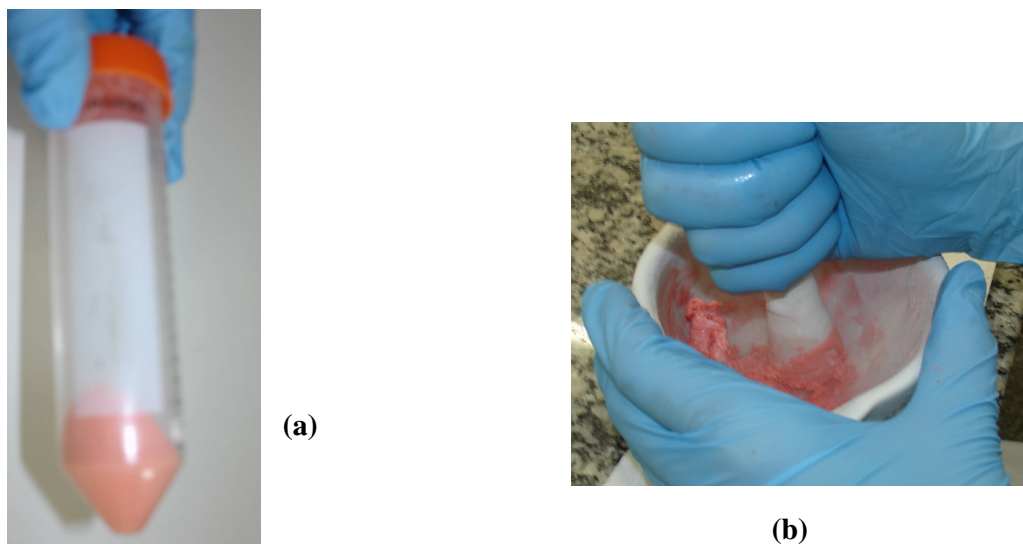


Figura 7 (a) Células de *S. Salmonicolor* CBS 2636, após descarte do sobrenadante;

(b) Maceração das células com nitrogênio líquido.

Ao “pellet” macerado foram adicionados 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec). Em seguida os tubos foram aquecidos em banho-maria a 55 °C durante 30 min, homogeneizando-os periodicamente. Posteriormente foram adicionados 10 mL de solução de acetona/metanol (7:3) (Vetec e Quimex) e os tubos foram centrifugados novamente a 5 °C, 6500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e foram realizadas sucessivas extrações com acetona/metanol, até que as células e o solvente permanecessem sem coloração.

Posteriormente o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Fisatom) a 35°C conforme Figura 8. O pigmento foi solubilizado em metanol (Quimex) para ajuste do volume em balão volumétrico (Figura 9).

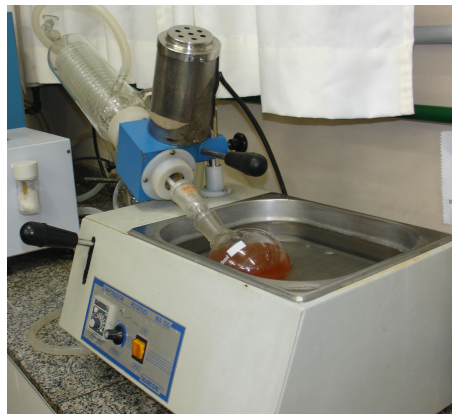


Figura 8 Solvente evaporado em evaporador rotativo.



Figura 9 Aspecto visual da solução de carotenoides após extração e solubilização em metanol.

3.4. Delineamento Experimental – Otimização da Bioprodução de carotenoides

Os efeitos da composição do meio de cultura e das condições operacionais foram estudados através de planejamento fatorial completo 2^2 , composto por 11 ensaios, com três pontos centrais e quatro pontos axiais. As variáveis independentes estudadas foram a glicose e a aeração e de acordo com estudos anteriores do grupo de pesquisa (Valduga *et al.*, 2009), as variáveis fixadas foram o extrato de malte (5 g/L), peptona (15 g/L), temperatura (25 °C), pH (4,0) e agitação (180 rpm).. As variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^2 e seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis independentes e níveis testados no planejamento fatorial completo 2²

<i>Variáveis*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Aeração (vvm)	X1	0,8	1,0	1,5	2,0	2,2
Glicose (g/L)	X2	51,8	60	80	100	108,2

*Variáveis independentes fixas: extrato de malte (5 g/L), peptona (15 g/L), temperatura (25°C), agitação (180 rpm), pH inicial (4,0).

O planejamento experimental fatorial completo 2² foi analisado através do Software *Statistica* 6.0, a um nível de confiança de 90 % e 95 %.

As respostas ou variáveis dependentes avaliadas foram: carotenoides totais (µg/L), produção específica de carotenoides (µg/g), biomassa (g/L), glicose consumida (g/L), nitrogênio consumido (g/L) e pH final.

3.5 Determinações Analíticas

3.5.1 Carotenoides Totais

A absorbância dos pigmentos solubilizados foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553). A concentração total de carotenoides foi estimada através do valor medido da absorbância a 448 nm, conforme equação descrita por Davies (1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi referente ao β-caroteno para o metanol: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2550$ (SILVA, 2004).

3.5.2 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.

3.5.3 Massa de Células

Após extração dos carotenoides, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas (6500 rpm, 5 °C por 10 min) e a massa celular foi quantificada por gravimetria em estufa (Nevoni NV- 13) a 105 °C até massa constante.

3.5.4 pH

O pH inicial e final dos meios de cultivo foram determinados utilizando potenciômetro digital (Digimed DMPH- 2). Inicialmente, realizou-se a calibração do eletrodo em pH 7,0 e 4,0, e posteriormente realizou-se a leitura.

Como o pH inicial foi fixado em pH 4,0 o ajuste foi realizado com solução de HCl 2 M.

3.5.5 Glicose

O teor de glicose foi determinado no início e término da bioprodução, no sobrenadante, e na avaliação cinética as amostras foram retiradas periodicamente para análise. 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.

3.5.6 Carbono orgânico total (COT)

O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680 °C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH. As amostras foram diluídas 100 vezes em água ultrapura (Sistema Mili-Q®, Millipore), antes da leitura no equipamento.

3.5.7 Macro e Microminerais

Macronutriente (Mg) e micronutriente (Fe) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama - FAAS (Varian Spectra AA-55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Mg e Fe como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/ acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Mg e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Mg, foi adicionado cloreto de lantânio (Merck) nas amostras e nas soluções padrões na proporção de 1 % (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrão.

O teor de nitrogênio total no sobrenadante foi determinado no início, final e durante a bioprodução, pelo método de Kjeldahl (VELP DK-20 e UDK-126D) e, segundo metodologia da AOAC (1995).

3.6 Cinética da bioprodução e parâmetros estequiométricos

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato (carbono, glicose, nitrogênio, ferro e magnésio), produção celular e produção de carotenoides realizou-se coleta de amostras do caldo de bioprodução a cada 12 h, para uma biorreação conduzida nas condições de cultivo referentes ao ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2².

3.6.1 Velocidades instantâneas e específicas

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto, consumo de substrato com o tempo, é possível determinar, por um balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_s) descritas nas equações 1 a 3.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (3)$$

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular naquele instante, obtém-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s), que foram calculadas por:

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (4)$$

$$\mu_p = \frac{r_p}{X} \quad (5)$$

$$\mu_s = \frac{r_s}{X} \quad (6)$$

Para velocidades constantes (fase exponencial), estas foram determinadas através do coeficiente angular da melhor reta ajustada nas curvas que representam as cinéticas de crescimento, consumo de glicose e produção de carotenoides.

3.6.2 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em carotenoides baseado no teor de glicose consumida e no carbono orgânico total (COT) $Y_{P/S}$ (μg de carotenoides/g de glicose ou μg de carotenoides/g de COT), foi calculado por:

$$Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s} = -\frac{dP}{dS} \quad (7)$$

O fator de conversão de glicose e COT em células, $Y_{X/S}$ (g de células/g de glicose e g de células/g de COT), foi calculado por:

$$Y_{X/S} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{dX}{dS} \quad (8)$$

A relação entre a produção de carotenoides e a produção de células, $Y_{P/X}$ (μg de carotenoides/g de células), foi calculada por:

$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = \frac{dP}{dX} \quad (9)$$

Onde:

r_x = velocidade de crescimento das células (g/L.h)

r_s = velocidade de consumo de glicose ou COT (g/L.h)

r_p = velocidade de produção de carotenoides (μ g/L.h)

3.6.3 Produtividade

A produtividade instantânea tanto em células como em carotenoides é definida, para o sistema em batelada a volume constante, como as velocidades r_x e r_p .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão apresentados neste item todos os resultados referentes à bioprodução de carotenoides por *S. salmonicolor* CBS 2636 em biorreator submerso, e aos parâmetros cinéticos e estequiométricos, obtidos na condição otimizada pelo planejamento experimental..

4.1 Otimização da bioprodução de carotenoides

A matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com os valores reais e codificados das variáveis independentes estudadas, e as respostas em termos de carotenoides totais e específicos e células estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^2 (valores reais e codificados) e respostas carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$), carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$) e células (g/L) em 100 h de bioprodução

Ensaio	Variáveis Independentes*		Respostas		
	Aeração (vvm)	Glicose (g/L)	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)	Carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$)	Células (g/L)
1	1,0 (-1)	60 (-1)	1409,22	155,37	9,07
2	2,0 (1)	60 (-1)	2509,00	263,27	9,53
3	1,0 (-1)	100 (1)	111,37	54,59	2,04
4	2,0 (1)	100 (1)	85,50	67,32	1,27
5	0,8 (-1,41)	80 (0)	104,93	59,62	1,76
6	2,2 (1,41)	80 (0)	162,15	88,13	1,84
7	1,5 (0)	51,8 (-1,41)	124,18	58,85	2,11
8	1,5 (0)	108,2 (1,41)	208,60	64,98	3,21
9	1,5 (0)	80 (0)	3070,00	312,63	9,82
10	1,5 (0)	80 (0)	3074,28	308,97	9,95
11	1,5 (0)	80 (0)	3131,33	313,76	9,98

*Variáveis independentes fixas: extrato de malte (5g/L), extrato de peptona (15g/L), temperatura (25°C), aeração (180 rpm), pH (4,0).

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p e t, para o teor de carotenoides totais.

Tabela 5. Coeficientes de regressão, erro puro e valores de p e t para carotenoides totais

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p
Média	3088,31	487,26	6,34	0,0014
Aeração (vvm) (L)	144,75	298,83	0,484	0,6486
Aeração (vvm) (Q)*	-1260,79	356,58	-3,56	0,0166
Glicose (g/L) (L)	-451,63	298,83	-1,51	0,1911
Glicose (g/L) (Q)*	-1244,27	356,58	-3,49	0,0175
Aeração L X Glicose L	-281,41	421,98	-0,667	0,5344

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

A Equação 10 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a resposta da concentração de carotenoides totais em função das variáveis independentes analisadas (aeração e glicose), dentro da faixa estudada. Verifica-se que a produção de carotenoides totais foi influenciada significativamente pelos efeitos quadráticos da aeração e da glicose.

$$C_{\text{totais}} = 3088,31 - 1260,79 (\text{aeração})^2 - 1244,27 (\text{glicose})^2 \quad (10)$$

Onde:

C_{totais} = carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$)

O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 6), com coeficiente de correlação de 0,84 e F calculado de 2,15 vezes maior que o valor tabelado. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 6. Análise de variância para carotenoides totais

Causa de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Quadrados Médios (QM)	F calc
Regressão	13611851,0	2	6805926,0	9,60
Resíduos	5672246,0	8	709031,0	
Falta de ajuste	5669901,2	6		
Erro puro	2344,8	2		
Total SS	19284097,4	10		

Resíduos = falta de ajuste mais erro puro; $F_{tab} (0,95; 8 \text{ versus } 2) = 4,46$; Coeficiente de correlação $R = 0,84$.

A máxima concentração de carotenoides totais encontra-se nos ensaios correspondendo ao ponto central (Tabela 4) com concentração de glicose 80 g/L e aeração 1,5 vvm, e com as variáveis fixas: agitação 180 rpm, temperatura 25°C, pH inicial 4,0, extrato de malte 5 g/L e peptona 15 g/L, caracterizando a otimização da produção de carotenoides em meio sintético em biorreator, o qual pode ser visualizado pela superfície de resposta (a) e pela curva de contorno (b) (Figura 10).

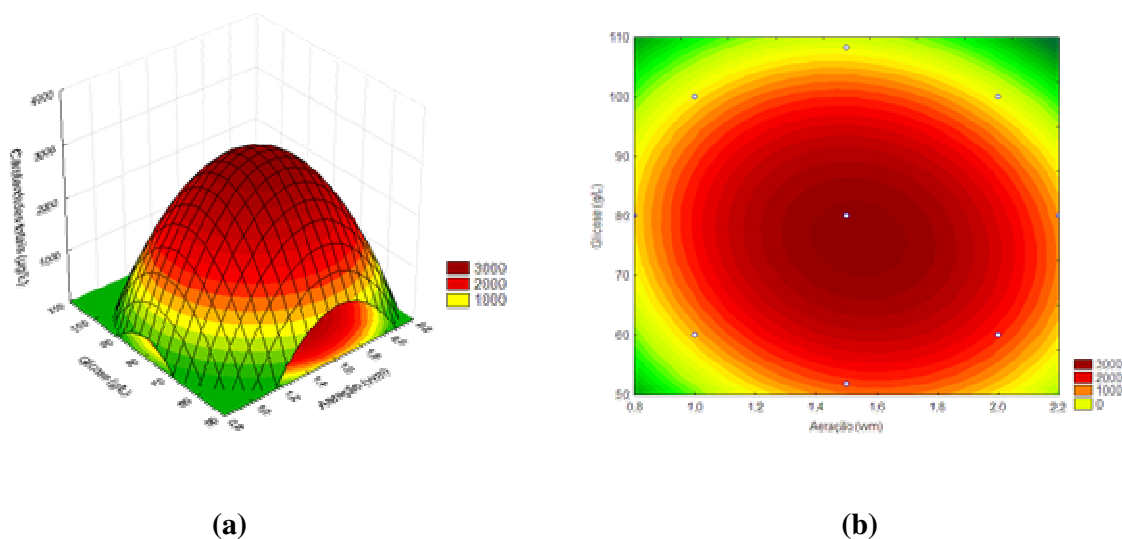


Figura 10 Superfície de resposta (a) para carotenoides totais e curva de contorno (b) para carotenoides totais.

A Figura 11 apresenta os aspecto visual da solução de carotenoides obtida na condição otimizada.



Figura 11 Aspecto visual dos corantes naturais obtidos na condição otimizada.

De acordo com a Figura 10 verifica-se que a melhor condição de aeração com maior produção de carotenoides totais (3091,87 $\mu\text{g/L}$), carotenoides específicos (311,79 $\mu\text{g/g}$) e maior rendimento celular (9,92 g/L) encontra-se no intervalo próximo da região de 1,5 vvm e na região próxima da concentração de glicose 80 g/L.

A levedura *S. salmonicolor* é um micro-organismo dependente do fornecimento de oxigênio, necessitando de definição das melhores condições de aeração e agitação para maior rendimento, no ensaio 5 (Tabela 4) a taxa de aeração de 0,8 vvm contribuiu para uma menor utilização do substrato principal a glicose (80g/L) e menor acumulação de carotenoides específicos (59,62 $\mu\text{g/g}$). No ensaio 6 a taxa de aeração de 2,2 vvm pode ter provocado um estresse celular causando maior acúmulo de carotenoides específicos (88,13 $\mu\text{g/g}$) se comparado ao ensaio 5.

Os efeitos da transferência de oxigênio/ aeração estudados por Liu *et al.* (2006) em frascos agitados com *P. rhodozyma* em relação à taxa de consumo de oxigênio mostrou

que em 30 h de bioprodução a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida era próxima de zero, enquanto que na fase gasosa, a concentração de oxigênio diminuiu fracamente nas primeiras 30 h e permaneceu em altas concentrações. Devido a isto foi definido que esta é a etapa limitante do transporte de oxigênio.

Para Mantzouridou *et al.* (2002) o estudo em biorreator da *Blakeslea trispora* com agitação de 150 e 325 rpm, o aumento da aeração de 0,5 para 1,5 vvm, ocasionou maior produção de β -caroteno, devido à melhora da mistura do meio fermentativo pela aeração, mantendo o gradiente de concentração entre o exterior e o interior das células. Com agitação superior a 325 rpm, ocorreu decréscimo na concentração de β -caroteno com o aumento da aeração que foi atribuído à oxidação do pigmento por altas taxas de aeração e agitação.

Nos ensaios 3 e 4 (Tabela 4) foram utilizadas concentrações de glicose de 100 g/L que pode ter inibido a produção de carotenoides por excesso deste substrato. Com menor quantidade de glicose (51,8 g/L, ensaio 7) obteve-se um baixo acúmulo de carotenoides totais (124,18 μ g/L).

Em trabalho anterior Valduga *et al.* (2008) obtiveram teor máximo de carotenoides (1019 μ g/L) com o cultivo de *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados com concentrações de glicose (40 g/l), extrato de malte (10 g/L) e peptona (14 g/L), agitação 180 rpm, pH inicial 4,0 e temperatura a 25°C. Com água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar pré tratados com ácidos a produção foi de 541,5 μ g/L, com substratos pré-tratados com carvão ativo. A máxima concentração de carotenoides totais obtida foi de 208,6 μ g/L, com 10 g/L de melaço de cana-de-açúcar, 10 g/L de água de maceração de milho e 10 g/L de hidrolisado de levedura.

Relato da bibliografia mostram que para *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 490, Buzzini *et al.* (2007) obtiveram uma produção de carotenoides totais de 613,3 μ g/L, e

carotenoides específicos de 34,7 µg/g. No trabalho realizado por Tatsch (2008) em biorreator, com a maximização da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 obteve-se uma concentração de carotenoides totais de 3318,6 µg/L e de carotenoides específicos de 326,6 µg/g, uma concentração 9,5 vezes maior que no trabalho de Buzzini *et al.* (2007).

Choudhari e Singhal (2008) mostraram que a concentração de glicose é uma das variáveis mais importantes nas fermentações com *Blakeslea trispora*, devido à glicose ser facilmente assimilada na via metabólica da biossíntese do β-caroteno. Quando a glicose foi utilizada obteve-se uma concentração máxima de β-caroteno de 99 mg/L. O mesmo teor de β-caroteno foi observado ao utilizar extrato de levedura e com peptona de carne levou a um menor crescimento celular e baixa produção de pigmento.

Aksu e Eren (2007) mostraram que o aumento da concentração de glicose de 2,5 g/L até 20 g/L elevou as taxas de formação de produto de *R. glutinis*, elevando a produção de carotenoides de 14,2 mg/L a 69 mg/L.

A Tabela 7 apresenta os coeficientes de regressão, erro puro e limites de confiança para o teor de carotenoides específicos a um nível de confiança de 95 %. As variáveis independentes glicose e aeração quadráticas apresentaram efeito significativo negativo ($p < 0,05$) na concentração de carotenoides específicos. Os parâmetros que não foram significativos a um nível de 95 % de confiança foram adicionados à falta de ajuste na análise de variância.

Tabela 7. Resultados do coeficiente de regressão, erro padrão e valores de p e t para carotenoides específicos

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p
Média	311,51	38,143	8,17	0,0004
Aeração (vvm) (L)	20,16	23,393	0,862	0,4281
Aeração (vvm) (Q)*	-102,25	27,914	-3,66	0,0145
Glicose (g/L) (L)	-36,12	23,393	-1,54	0,1832
Glicose (g/L) (Q)*	-108,27	27,914	-3,88	0,0116
Aeração L X Glicose L	-23,79	33,0333	-0,720	0,5036

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

A Equação 11 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve o teor de carotenoides específicos em função das variáveis independentes (concentração de glicose e taxa de aeração), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância, apresentada na Tabela 8. Verifica-se que o coeficiente de correlação $r = 0,85$ e o F calculado 2,29 vezes maior que o valor tabelado, permitiram a construção da superfície de resposta (Figura 12).

Tabela 8. Análise de variância para carotenoides específicos

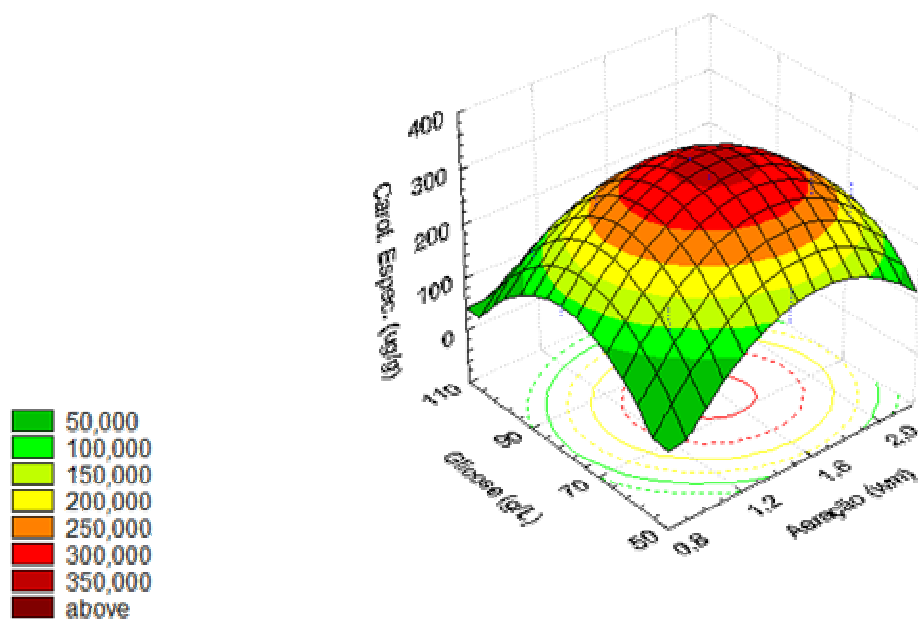
Causa de variação	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	96267,0	2	48134,0	10,2
Resíduo	37736,0	8	4717,0	
Falta de ajuste	37723,8	6		
Erro puro	12,5	2		
Total SS	134003,6	10		

Resíduos = Falta de ajuste mais erro puro, $F_{tab}(0,95; 8 \text{ versus } 2) = 4,46$; Coeficiente de correlação : $R = 0,84$.

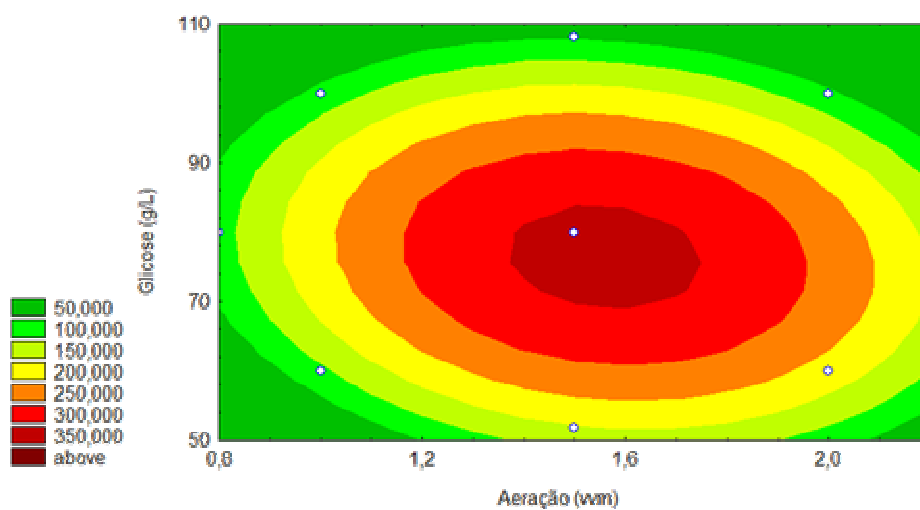
$$\text{Cespc} = 311,51 - 102,25 (\text{aeração})^2 - 108,27 (\text{glicose})^2 \quad (11)$$

Onde:

Cespc = Carotenoides específicos ($\mu\text{g/g}$)



(a)



(b)

Figura 12 Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para carotenoides específicos.

A máxima produção de carotenoides específicos (313,76 µg/g) encontra-se nos ensaios correspondendo ao ponto central da concentração de glicose (80 g/L) e aeração (1,5 vvm), caracterizando a otimização da produção de carotenoides específicos e indicando que a aeração fornecida no biorreator provavelmente melhorou a distribuição de oxigênio e glicose no meio de cultivo, causando um incremento na concentração de carotenoides específicos.

Valduga (2007) obteve influência significativa ($p < 0,05$) do extrato de malte para a produção específica de carotenoides por *S. salmonicolor* CBS 2636 e obteve produção específica de carotenoides de 287,71 µg/g em frascos agitados, já em estudo em biorreator Tatsch (2008) em seu trabalho de maximização da bioprodução de carotenoides obteve para *S. salmonicolor* CBS2636 um teor de 326,63 µg/g de carotenoides específicos nas condições de pH 4,0, 25°C, 180 rpm, extrato de malte 5 g/L, glicose 80 g/L, peptona 15 g/L e aeração 1,5 vvm. Avaliando leveduras brasileiras pigmentadas Maldonado *et al.* (2008) obtiveram conteúdo de carotenoides específicos máximo de 132 µg/g para *R. glutinis*, 33 µg/g para *R. minuta* e 72 µg/g para *S. roseus*, o que mostra o grande potencial da cepa *S. salmonicolor* na produção do pigmento.

A Figura 13 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados (valor absoluto) para a concentração celular. Observa-se que a aeração foi a única variável que exerceu efeito significativo negativo a 90 % de confiança. A máxima produção de células (9,98 g/L) situa-se nos ensaios 9, 10 e 11 (1,5 vvm aeração, 80 g/L glicose, 5 g/L de extrato de malte, 15 g/L de peptona, 180 rpm, 25°C).

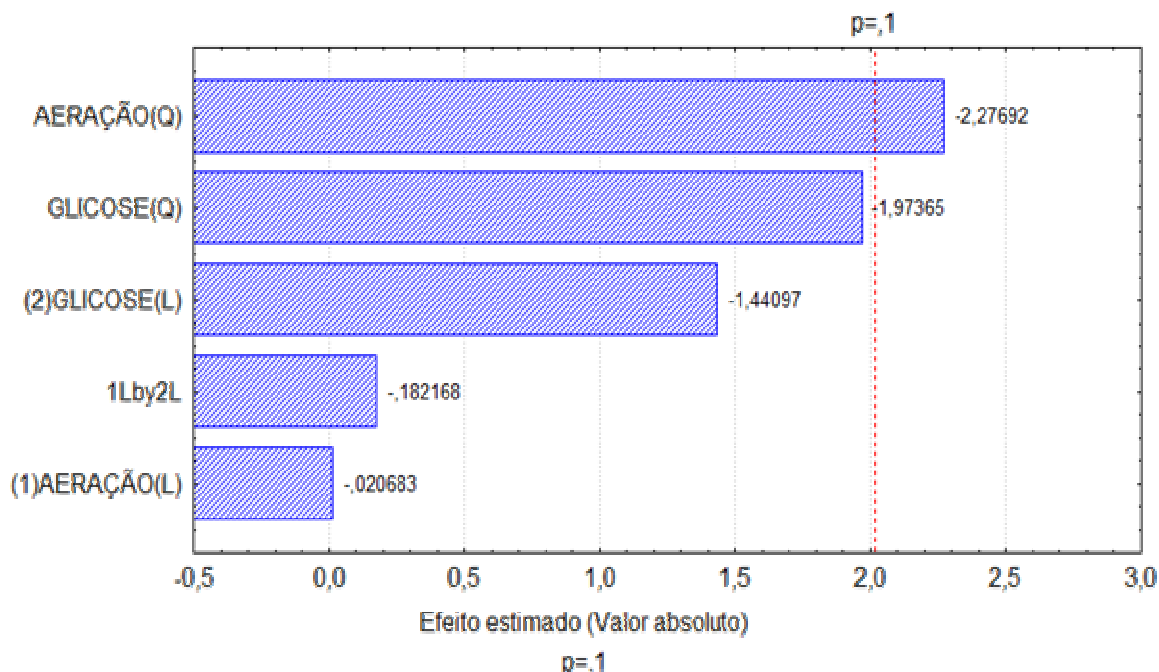


Figura 13 Gráfico de Pareto apresentando os efeitos estimados das variáveis estudadas sobre a concentração de células.

Ao comparar o crescimento celular em biorreator (9,98 g/L) verifica-se que a concentração de células é duas vezes superior aos obtidos em frascos agitados, onde a concentração máxima de células foi de 5,95 g/L (VALDUGA *et al.*, 2007).

Em estudo semelhante em biorreator para a maximização da produção de carotenoides com *S. salmonicolor* CBS 2636, Tatsch (2008) obteve concentração máxima de células de 10,97 g/L, com aeração de 1,0 vvm, peptona 25 g/L e glicose 60 g/L.

Razavi e Marc (2006) obtiveram um aumento no crescimento de *S. ruberrimus* H110 de 6,81 g/L em pH 3,5 para 11,3 g/L com aumento do pH para pH 6.

Em outros estudos, a aeração exerceu influência no crescimento celular. Aksu e Eren (2005) observaram um aumento nas taxas específicas de crescimento e de formação de carotenoides com a elevação das taxas de aeração (0 a 2,4 vvm) para *R. mucilaginosa*, obtendo biomassa de 5,7 g/L, carotenoides totais 112,8 mg/L e rendimento de produto de

19,8 mg/g. Assim, a aeração mostrou-se benéfica para o crescimento celular, devido a melhoras nas características de transferência de massa com respeito a substrato, produto e oxigênio.

No entanto Malisorn e Suntornsuk (2009) em seu estudo com a levedura *R. glutinis* DM 28, obtiveram valores de crescimento celular em frascos agitados (2,2 g/L) foram semelhantes aos obtidos em biorreator (2,6 g/L).

Em estudo realizado por Domínguez-Bocanegra *et al.* (2007) o crescimento de *P. rhodozyma* quando soro de leite de coco foi usado como o meio de cultura, as taxa de crescimento máximas da levedura foram 9,2 g/L (cepa selvagem) e 6,2 g/L (cepa R1). Em outros meios, mais baixas taxas de crescimento foram obtidas: em YM 5,6 g/L (cepa selvagem) e 4,7 g/L (cepa R1), e em YPG 4,9 g/L (cepa selvagem) e 3,9 g/L (cepa R1). Quanto a síntese de carotenoide deste mesmo estudo, os valores máximos foram: cepa selvagem 378 µg/g, em YPG, 450 µg/g em YM, e 850 µg/g no soro de leite de coco; cepa R1, 884 µg/g em YPG, 1060 µg/g em YM, e 1850 µg/g no soro de leite de coco. O leite de coco aumentou a produção de astaxantina em 75 %. Os resultados obtidos suportam a hipótese de que as vitaminas, aminoácidos, mas principalmente a fonte de carbono inerente no soro de leite de coco, possuem fatores nutritivos que influenciam o metabolismo celular de modo que a síntese do pigmento ocorra mesmo quando o crescimento das células e a glicose foram esgotados.

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2² e as respostas em termos de pH final, nitrogênio consumido (g/L), glicose consumida (g/L).

Tabela 9. Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2² (valores reais e codificados) com as respostas pH final, glicose e nitrogênio consumidos

Variáveis Independentes			Respostas		
Ensaio	Aeração (vvm)	Glicose (g/L)	Nitrogênio consumido (g/L)	Glicose consumida (g/L)	pH final
1	1,0 (-1)	60 (-1)	0,86	29,87	3,38
2	2,0 (1)	60 (-1)	0,93	38,50	3,2
3	1,0 (-1)	100 (1)	0,77	79,46	3,88
4	2,0 (1)	100 (1)	0,78	80,76	3,84
5	0,8 (-1,41)	80 (0)	0,68	61,70	3,75
6	2,2 (1,41)	80 (0)	0,99	59,77	3,6
7	1,5 (0)	51,8 (-1,41)	0,73	33,52	3,45
8	1,5 (0)	108,2 (1,41)	0,89	86,45	3,6
9	1,5 (0)	80 (0)	0,75	42,28	3,55
10	1,5 (0)	80 (0)	0,71	42,38	3,57
11	1,5 (0)	80 (0)	0,80	43,63	3,63

* Variáveis independentes fixas: pH inicial 4,0, temperatura 25°C, 180 rpm, concentração de extrato de malte 5 g/L e concentração de peptona 15 g/L).

Os ensaios 2 e 6 apresentaram maior consumo de nitrogênio, porém verifica-se pela Figura 14 que nenhuma das variáveis investigadas exerceram efeito significativo a nível de 95 % de confiança.

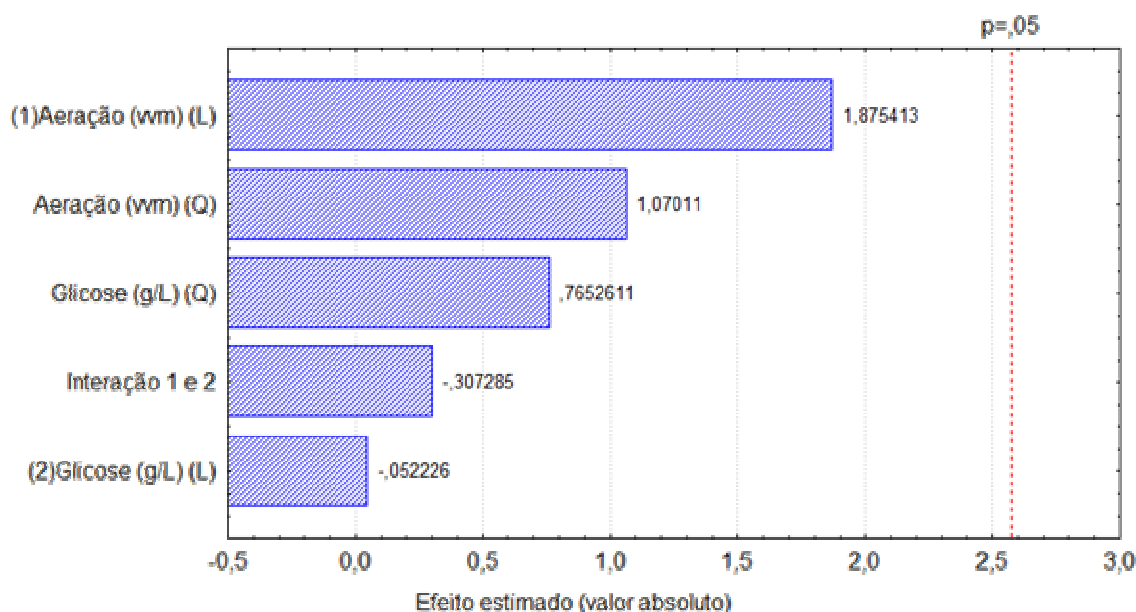


Figura 14 Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas para o consumo de nitrogênio.

Em muitos micro-organismos a carotenogênese é regulada por fatores nutricionais, tais como a disponibilidade de nitrogênio. A taxa de carbono e nitrogênio tem importante função na síntese de metabólitos secundários, determinando o tipo de metabólitos sintetizados e extensão da produção (GARBAYO *et al.*, 2003).

Verifica-se pela Tabela 9 que o máximo consumo de glicose foi verificado nos ensaios que apresentavam maior concentração de glicose no meio. Nos ensaios (9, 10 e 11) onde foram obtidas as maiores produções de carotenoides totais, (Tabelas 4 e 9), o consumo foi de aproximadamente 42 % de glicose. Este comportamento pode ser devido ao fato do micro-organismo estar consumindo outra fonte de carbono, uma vez que o teor de carbono orgânico total (COT) decresceu continuamente, como será apresentado no item 4.2.

No entanto, o mesmo não foi verificado por outros micro-organismos, onde a glicose adicionada ao meio, no estudo de Liu e Wu (2007) foi completamente consumida

durante as primeiras 48 horas de bioprodução, e sendo novamente adicionada foi consumida em 72 horas de bioprodução por *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Silva (2008) em seu estudo utilizou 20 g/L de substrato no tempo zero em todos os meios de cultivo utilizados para as cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *P. rhodozyma*. Em relação ao consumo de açúcares totais pela cepa selvagem da levedura *P. rhodozyma* observou-se que a glicose foi consumida rapidamente ao longo do processo em relação aos demais substratos. As concentrações de açúcares residuais para ambas as cepas foram em média de 0,47 g/L para os substratos glicose e sacarose e 0,65 g/L para o caldo de cana em 96 h de cultivo em frascos agitados.

Em biorreator em 72 e 96 h de cultivo das cepas mutante PR-18 e selvagem, as concentrações de açúcares residuais nos meios foram em torno de 0,8 g/L e 0,7 g/L, respectivamente (SILVA, 2008).

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de t e p para glicose consumida. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância.

Tabela 10. Coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p e t para glicose consumida

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(5)	p
Média	42,7765	2,2814	18,7503	0,000008
Aeração (vvm) (L)	0,9038	1,3991	0,6459	0,546786
Aeração (vvm) (Q)*	8,1986	1,6695	4,9107	0,004433
Glicose (g/L) (L)*	20,8723	1,3991	14,9178	0,000024
Glicose (g/L) (Q)*	7,8214	1,6695	4,6847	0,005411
Aeração L X Glicose L	-1,8325	1,9758	-0,9275	0,396236

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

Exerceram influência significativa positiva a 95 % de confiança as variáveis independentes glicose linear e quadrática e aeração quadrática.

Através da análise de variância (Tabela 11) foram obtidos o coeficiente de correlação $R = 0,99$ e o F calculado 98,3 sendo 22 vezes maior que o valor tabelado, permitindo assim a validação do modelo apresentado na Equação 12.

Tabela 11. Análise de Variância para a glicose consumida

Causa de variação	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	4034	3	1345	98,3
Resíduo	96	7	14	
Falta de ajuste	96,8875	5		
Erro puro	1,13177	2		
Total SS	4130,055	10		

Resíduos = Falta de ajuste mais erro puro, $F_{tab} (0,95; 7; 3) = 4,35$; Coeficiente de correlação : $R = 0,99$.

A Equação 12 apresenta o modelo codificado para as variáveis estudadas (aeração e concentração de glicose) do planejamento experimental fatorial completo 2^2 para a resposta glicose consumida.

$$\text{Glicose consumida} = 42,7765 + 8,1986 (\text{aeração})^2 + 20,8723 (\text{glicose}) + 7,8214 (\text{glicose})^2 \quad (12)$$

Em relação ao pH final do meio de bioprodução verifica-se pela Figura 15 que a glicose foi a única variável independente que exerceu efeito significativo positivo ($p < 0,05$). Porém, em todos os ensaios foi verificada uma ligeira redução do pH, quando comparado com o pH inicial (4,0). Não foi observado aumento do pH no final da bioprodução o que pode ser devido ao fato de não ter ocorrido carência de nutrientes no meio de cultivo.

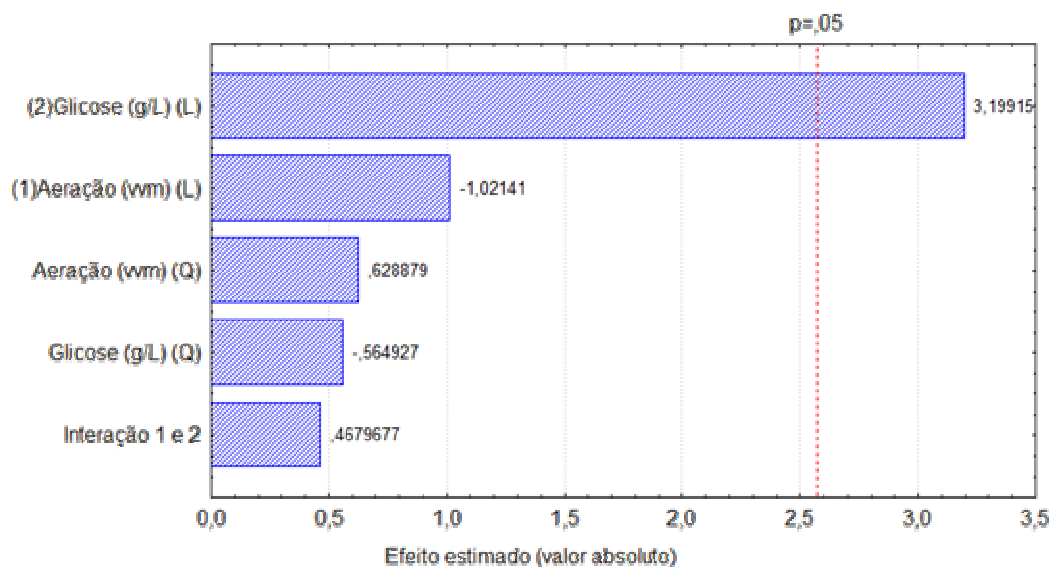


Figura 15. Gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis aeração e glicose para o pH final.

Através da técnica de planejamento de experimentos otimizou-se a a bioprodução de carotenoides, sendo que a máxima concentração carotenoides em biorreator submerso por *S. salmonicolor* CBS 2636 foi de 3131,3 $\mu\text{g/L}$ (311,51 $\mu\text{g/g}$) e a concentração de células de 9,98 g/L, em meio sintético composto por 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte, aeração de 1,5 vvm, agitação de 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0.

4.2 Cinética da biorprodução e parâmetros estequiométricos

As Figuras 16, 17 e 18 apresentam as cinéticas de crescimento, produção de carotenoides e variação do pH, consumo de carbono orgânico total, glicose, nitrogênio, ferro e magnésio em meio sintético no biorreator para o ponto otimizado (ponto central) do planejamento fatorial completo 2².

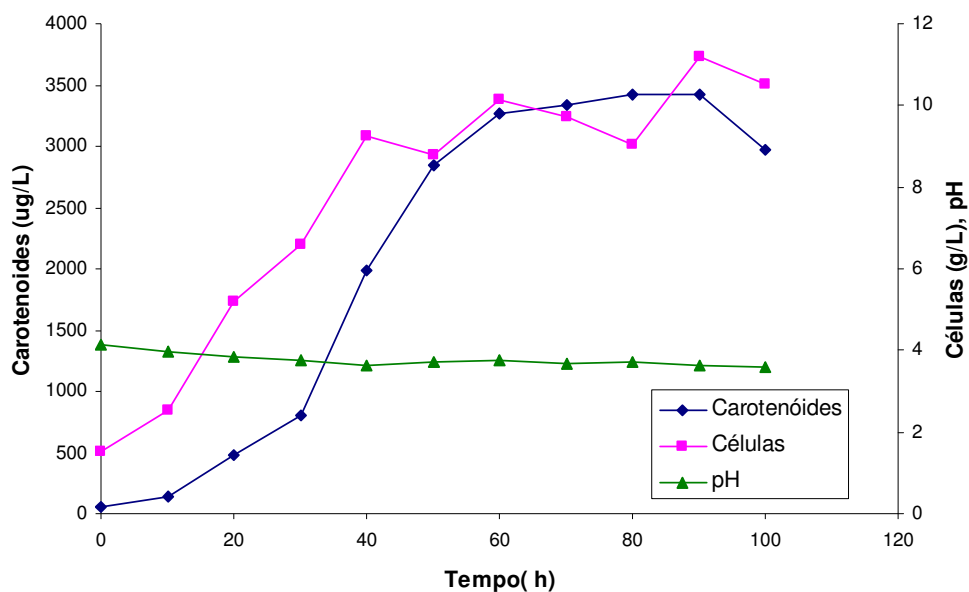


Figura 16 Cinética de crescimento da *S. salmonicolor* (CBS 2636), produção de carotenoides e pH para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).

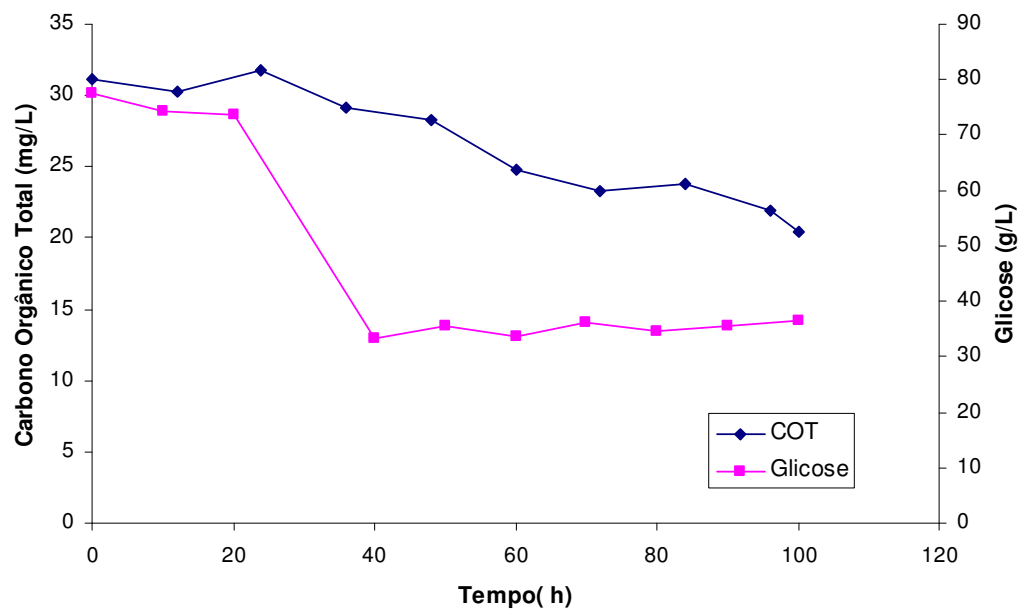


Figura 17 Cinética do consumo de glicose e carbono orgânico total (COT), para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).

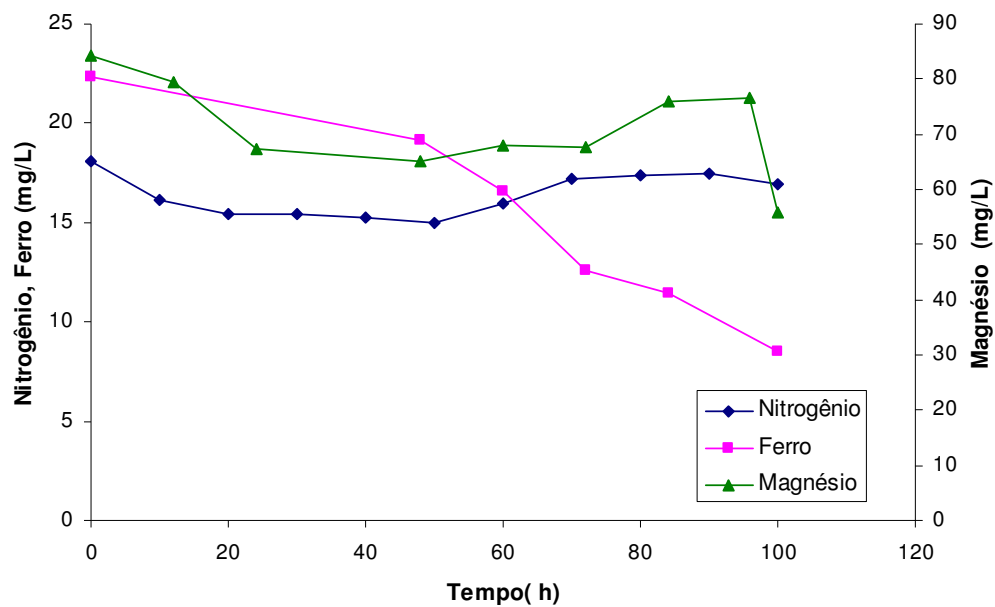


Figura 18 Cinética do consumo de nitrogênio, ferro e magnésio, para a condição otimizada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte).

Na Figura 16 pode-se observar que a concentração máxima de carotenoides totais foi obtida em aproximadamente 90 h do início da bioprodução (3426,0 µg/L), sendo que a partir de 60 h a concentração de carotenoides é desacelerada.

A fase estacionária de crescimento celular teve início com aproximadamente 40 h da bioprodução, e o consumo de glicose (Figura 17) permaneceu constante até o final da produção. A concentração de carbono orgânico total, no entanto apresentou um declínio durante toda a bioprodução. Este comportamento sugere que as células provavelmente consomem outra fonte de carbono (peptona ou extrato de malte) que não a glicose, após a fase de crescimento exponencial. Após 50 h de bioprodução, ocorreu a desaceleração da produção de carotenoides totais e a concentração de nitrogênio (Figura 18) apresentou um acréscimo, que pode ter ocorrido devido à lise celular e proteólise sob condições de estresse. Pode-se verificar ainda que houve menor consumo de nitrogênio (7 %) quando comparado ao consumo de glicose (53 %). O consumo de magnésio (Figura 18) ocorreu até 50 h da bioprodução onde observa-se já a fase estacionária enquanto o ferro (Figura 18) foi consumido continuamente até o término da bioprodução. Ressalta-se que o ferro e magnésio atuam como cofatores de enzimas que regulam a síntese de carotenoides.

Buzzini *et al.* (2005) avaliaram a produção de pigmentos pela levedura *R. graminis*, obtendo nas condições otimizadas 803,2 µg/g de carotenoides totais, onde o efeito observado de elementos traços na biossíntese de carotenoides específicos nas leveduras vermelhas pode ser explicado por um possível mecanismo de ativação ou inibição por íons metálicos selecionados em enzimas carotenogênicas específicas, em particular, em desaturases específicas envolvidas na biossíntese de carotenoides.

Ao final da bioprodução, ainda havia elevadas concentrações de glicose e nitrogênio no meio de cultivo, aproximadamente 35 g/L e 17 g/L, respectivamente, sugerindo que não ocorreu carência de carbono e nitrogênio no meio. No entanto, o fato de

não haver o consumo total de glicose apesar de ainda haver um lento crescimento celular, sugere que o micro-organismo esteja consumindo outra fonte de carbono para suprir a síntese de carotenoides conforme pode ser observado na Figura 17, que mostra uma queda contínua no carbono orgânico total do meio, embora o teor residual de glicose tenha continuado constante.

Valduga *et al.* (2009) observaram que a concentração máxima de carotenoides totais (913 µg/L) em frascos agitados em meio convencional (40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona) e agroindustrial (502 µg/L) (água de maceração de milho, melaço de cana-deaçúcar e Prodex Lac®) foi atingida após aproximadamente 100 h do início do processo fermentativo. Neste ponto a concentração de glicose observada foi de cerca de 20 g/L em meio convencional e 0,2 g/L em meio agroindustrial. Na fase exponencial de crescimento, o consumo de glicose está relacionado ao crescimento celular, onde foi observado maior consumo da fonte de carbono. No entanto, na fase de desaceleração e estacionária a concentração de glicose permaneceu inalterada, assim não houve consumo da fonte de carbono (glicose). Estes resultados são semelhantes aos apresentados por Ramírez *et al.* (2006), onde entre 6 e 48 h ocorreu o consumo máximo de açúcares.

A Figura 16 mostra que a bioprodução de carotenoides apresentou formação de produto associada ao crescimento celular na fase exponencial, sendo que as máximas concentrações de células (11,2 g/L) e carotenoides totais (3426 µg/L) foram observadas em 90 h de bioprodução (fase estacionária), simultaneamente. Após 40 h de biorreação, iniciou-se a fase estacionária de crescimento celular, enquanto que ainda era observado um aumento na formação de carotenoides. Somente após 60 h de bioprodução foi evidenciada fase estacionária de formação de produto.

A forte influência do pH nos rendimentos específicos de produto e células foi apresentada por Hu *et al.* (2006). Em pH inicial 5,0 e não controlado, obtiveram-se os menores rendimentos $Y_{X/S}$ (0,18 g/g), $Y_{P/S}$ (0,24 mg/g), porém o menor rendimento em $Y_{P/X}$ (1,10 mg/g) foi encontrado para pH controlado 6,0. Os maiores rendimentos em produto ($Y_{P/X} = 1,74$ mg/g e $Y_{P/S} = 0,36$ mg/g) foram encontrados no ensaio com pH controlado em 6,0 de 0 h até 80 h de bioprodução, e controlado em 4,0 até o final do processo.

Papaioannou e Liakopoulou-Kyriakides (2009) em seu estudo sobre as influências do substrato na bioprodução de carotenoides com *Blakeslea trispora* observaram que o esgotamento da glicose e máxima concentração de células (21 g/L) ocorreu em 120 h de bioprodução, enquanto a maior produção de carotenoides (45 mg/g de biomassa seca) foi conseguida depois de 192 h.

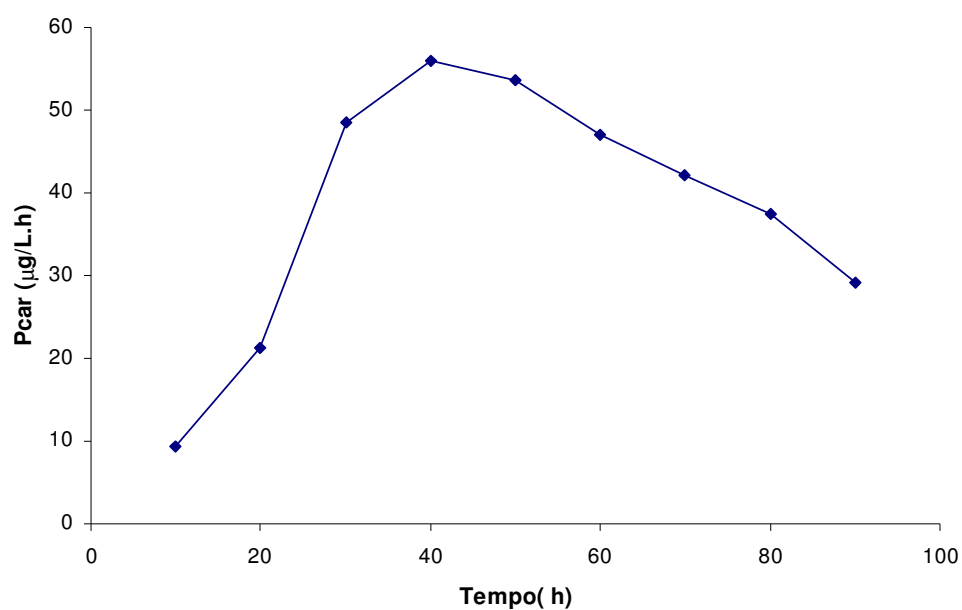


Figura 19 Produtividade em carotenoides ao longo da bioprodução no ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2^2

A Figura 19 mostra que até 40 h ocorreu aumento da produtividade em carotenoides, obtendo-se um máximo de 56,0 $\mu\text{g/L.h}$. A partir deste ponto ocorreu decréscimo da produtividade até o final da biorreação. Valduga *et al.* (2009) obtiveram somente em 50 h um máximo de 56,9 $\mu\text{g/L.h}$ em frascos agitados com meio sintético.

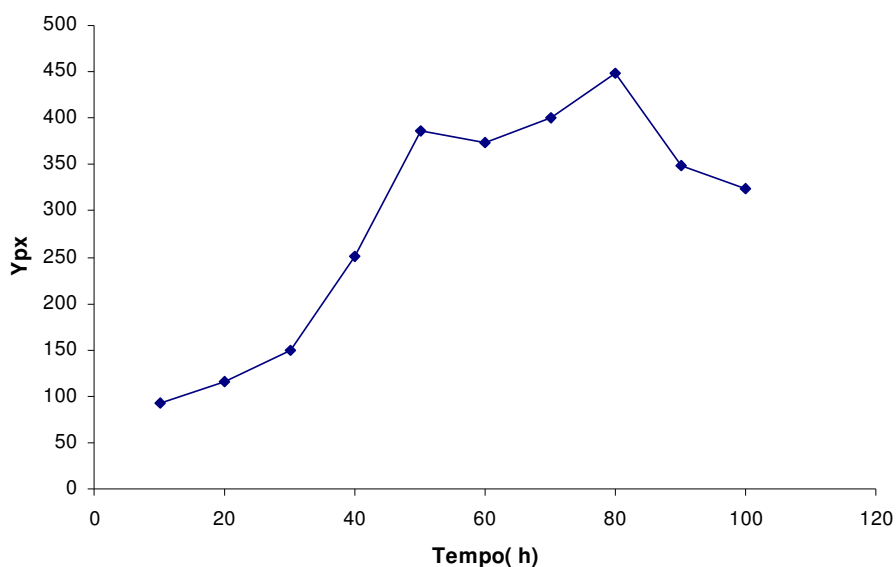


Figura 20 Produtividade em células ao longo da bioprodução no ponto otimizado do planejamento fatorial completo 2^2

De acordo com a Figura 20 o fator $Y_{P/X}$ de 390 $\mu\text{g/g}$ obtido para o biorreator foi inferior ao observado por Valduga *et al.*, (2009) em frascos agitados, onde foi obtida uma conversão 572,2 $\mu\text{g/g}$ na segunda fase de cultivo (desaceleração), e superior ao obtido em biorreator 238 $\mu\text{g/g}$ (Valduga *et al.*, 2009). Segundo Liu *et al.* (2006) o aumento no rendimento específico de carotenoides é indicativo de uma ampliação na biossíntese de carotenoides nas células de levedura. Possivelmente este comportamento esteja relacionado a mudanças no metabolismo e estresse celular.

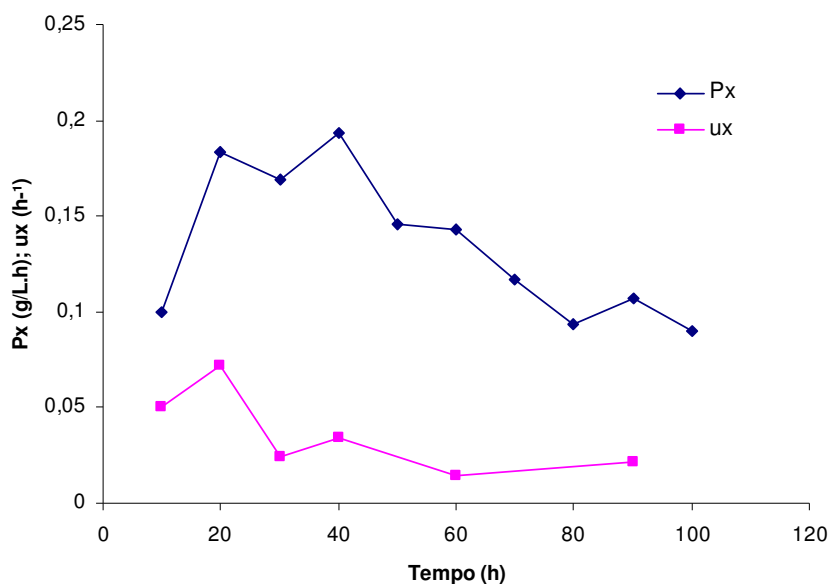


Figura 21 Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em células (P_x) durante a bioprodução na condição otimizada

No ponto otimizado, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi $0,0456 \text{ h}^{-1}$ (Figura 21). A produtividade em células máxima (P_x) é de $0,90 \text{ g/L.h}$ (Figura 21), e a produtividade em carotenoides totais máxima é de $56,0 \text{ } \mu\text{g/L.h}$ (Figura 20).

Valduga *et al.* (2009) em frascos agitados obtiveram para o meio sintético a obtenção das maiores produtividades em relação ao meio agroindustrial, sendo que a produtividade em células (P_x) máxima foi de $0,08 \text{ g/L.h}$ e de $0,06 \text{ g/L.h}$ para o meio sintético e agroindustrial e a produtividade em carotenoides totais foi de $14,2$ e $10,4 \text{ } \mu\text{g/L.h}$, respectivamente.

As Figuras 22, 23, 24 e 25 apresentam os fatores de conversão de glicose e carbono orgânico total (COT) em carotenoides, glicose e COT em células, velocidade de consumo de glicose e COT e velocidade de produção de carotenoides, respectivamente.

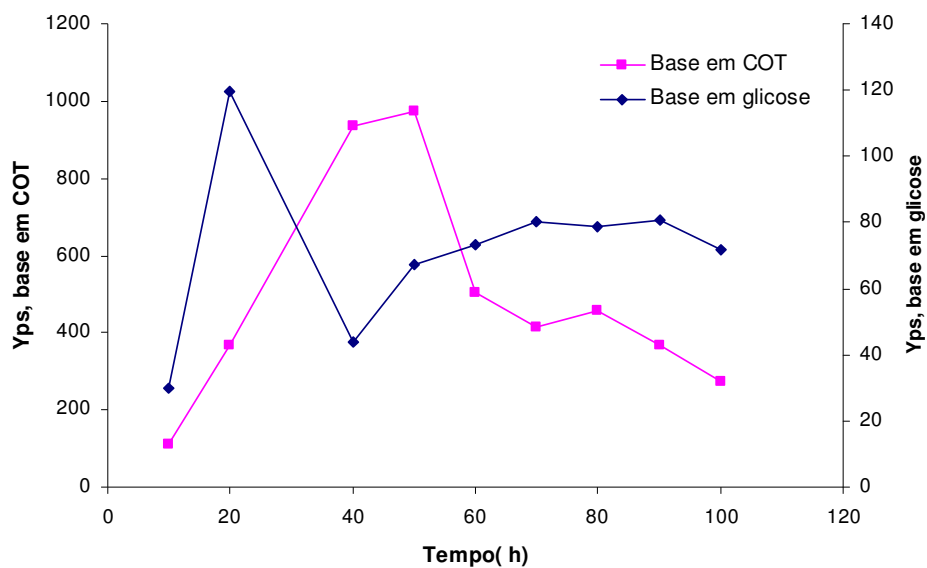


Figura 22 Conversão de glicose e COT em carotenoides ao longo da bioprodução na condição otimizada

Conforme mostra a Figura 22, enquanto o $Y_{P/S}$ baseado em glicose cai após 20 h, o $Y_{P/S}$ baseado em COT continua aumentando até 50 h de bioprodução, reforçando a hipótese de que o micro-organismo consome outras fontes de carbono do meio após esse período.

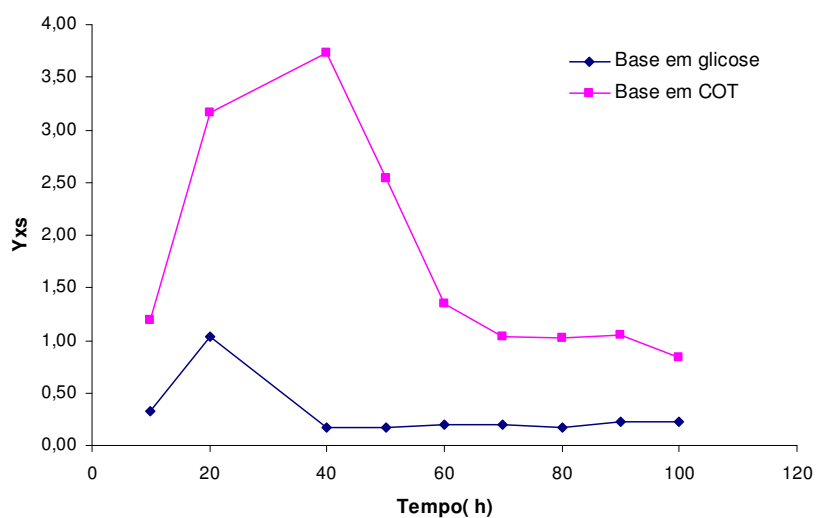


Figura 23 Conversão de glicose e COT em células durante a bioprodução na condição otimizada

Na Figura 23 observa-se comportamento semelhante ao ocorrido para o $Y_{P/S}$ em que o rendimento de células baseado em glicose decresce após 20 h e o COT após 40 h sugerindo que o micro-organismo consome outras fontes de carbono do meio após esse período.

A Tabela 12 apresenta os principais parâmetros cinéticos para a *S. salmonicolor* calculados para a fase linear de bioprodução observada.

Tabela 12 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em meio sintético para o ponto otimizado no planejamento fatorial completo 2^2

Parâmetros	Fases do processo fermentativo		
	0 – 100 h	0 – 50 h	50 – 100 h
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicose)	69,59	-	-
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em glicose)	0,168	-	-
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	-	107,8	34,4
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em COT)	-	2,97	0,254
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	390	-	-
P_x (g/L.h)	0,90	-	-
μ_x (h^{-1}) (0 – 40 h)	0,0456	-	-

Comparando-se os valores de $Y_{X/S}$ obtidos em biorreator (Tabela 12) com os obtidos em frascos agitados com meio sintético (Valduga *et al.*, 2009), não se observou a presença de três fases (linear, desaceleração, estacionária), onde de acordo com o Apêndice (Figuras 29 e 30) observa-se a presença de duas fases para o rendimento de COT em carotenoides e em células, uma até 50 h e fase de desaceleração após 50 h. Em frascos agitados, Valduga *et al.* (2009) obtiveram fator $Y_{X/S}$ na primeira fase de 1,2 g/g, na

segunda fase 0,03 g/g e na terceira fase 0,03 g/g. A diferenciação dos fatores de conversão evidencia o comportamento distinto do crescimento celular e consumo de substratos em frascos agitados e no biorreator.

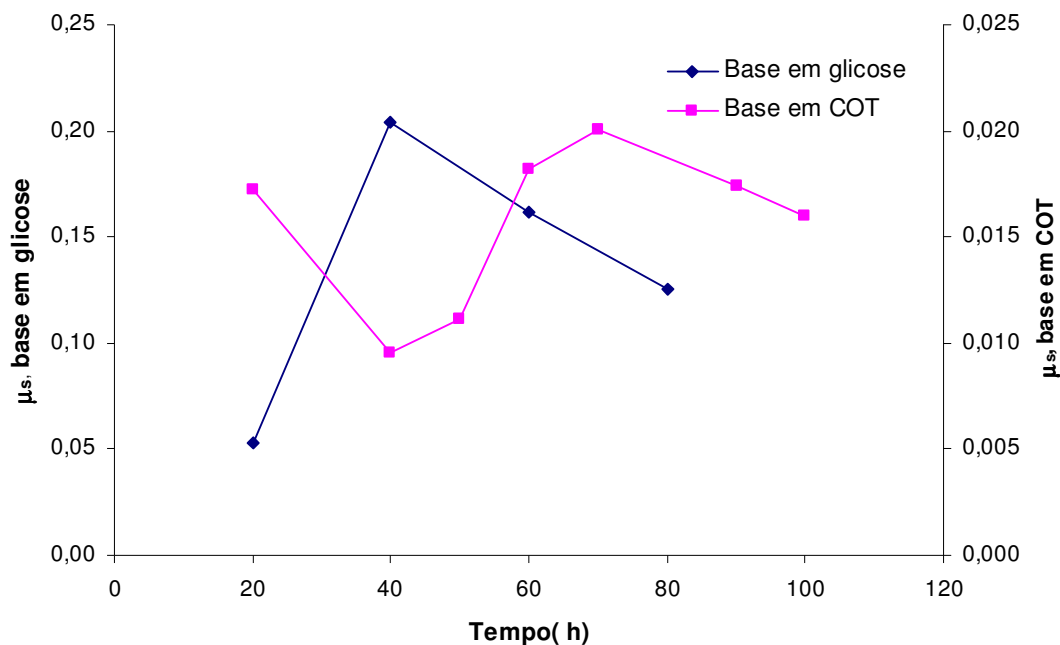


Figura 24 Velocidade específica (acumulada) de consumo de glicose e COT (μ_s) durante a bioprodução na condição otimizada

Na Figura 24 observa-se comportamentos distintos em relação à taxa de consumo de glicose e de carbono orgânico total. A velocidade específica de consumo de substrato global (μ_s global) com base em glicose foi de 0,07 $\text{g}_{\text{gli}}/\text{g}_{\text{cél}}\cdot\text{h}$. De acordo com a Tabela 12 com base em COT pode-se observar duas fases distintas na bioprodução, uma até 50h e outra após 50 h. Até 50 h há um rendimento maior de carbono em carotenoides (107,8 $\mu\text{g/g}$) e após 50 h há um baixo rendimento de COT em carotenoides (34,4 $\mu\text{g/g}$),

caracterizando uma fase estacionária com pouca bioprodução. O mesmo comportamento é observado para o rendimento de COT em células. A velocidade específica média do consumo de carbono orgânico total (μ_s médio) foi de 0,02 gCOT/g_{cél}.h e a velocidade específica global (μ_s global) foi de 0,02 gCOT/g_{cél}.h.

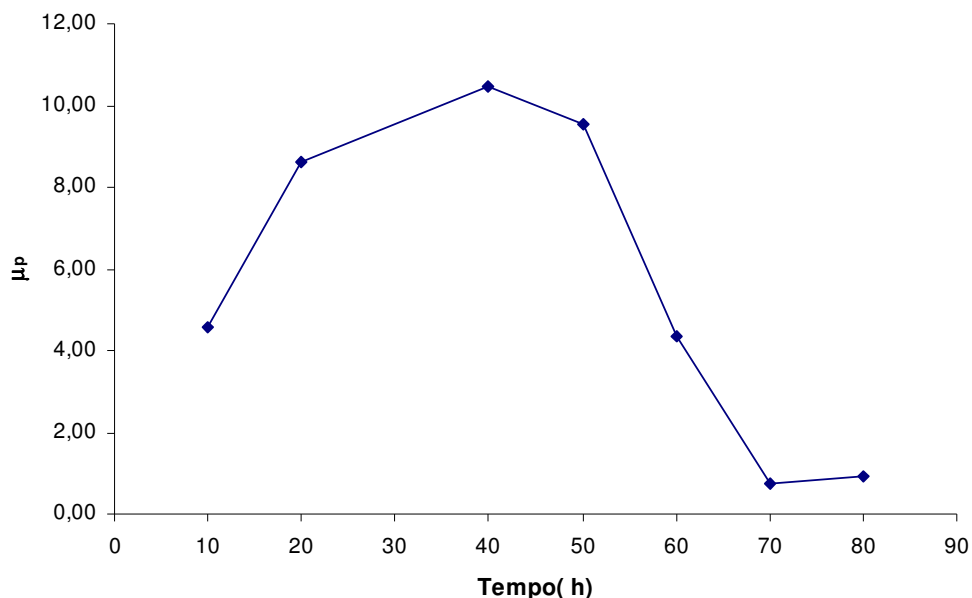


Figura 25 Velocidade específica de formação de carotenoides (μ_p) durante a bioprodução na condição otimizada

De acordo com a Figura 25 a maior taxa de formação de carotenoides ocorreu em 40 h da bioprodução com valor de 10,47 g_{carot}/ g_{cél}.h, sendo o μ_p global 4,84 g_{carot}/ g_{cél}.h.

A otimização da composição do meio de cultivo para obter-se máximo rendimento em produto não é uma tarefa fácil. Ressalta-se que este procedimento envolve um elevado número de experimentos e demanda um determinado tempo para se definir a composição otimizada do meio. Os parâmetros cinéticos e estequiométricos permitem avaliar o comportamento dos micro-organismos durante a bioprodução. Conforme apresentado a

máxima concentração de carotenoides totais (3425,9 µg/L) foi obtida em 90 h de bioprodução e através da cinética do consumo de substratos foi possível verificar que o micro-organismo consome outra fonte de carbono que não a glicose para suprir a síntese de carotenoides.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

1. O teor máximo de carotenoides totais no planejamento fatorial completo 2^2 , foi de 3131,3 $\mu\text{g/L}$ em meio sintético, com 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte, aeração de 1,5 vvm, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C e pH inicial 4,0;
2. Na cinética da bioprodução, do ponto otimizado do planejamento completo 2^2 , obteve-se a máxima concentração de carotenoides totais (3425,9 $\mu\text{g/L}$) com aproximadamente 90 h de bioprodução, ressaltando-se que a partir de 60 h o aumento da concentração de carotenoides foi desacelerando;
3. A bioprodução de carotenoides pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 apresenta formação de carotenoides associada ao crescimento celular na fase exponencial;
4. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator é de 0,0456 h^{-1} com uma produtividade máxima em células de 0,90 g/L.h;
5. A produtividade máxima em carotenoides (60,0 $\mu\text{g/L.h}$) é observada com 50 h de bioprodução;
6. O fator de conversão de carbono orgânico total (COT) em células ($Y_{\text{X/SCOT}}$) foi de 2,97 g/g (0-50 h) e de 0,254 g/g (50-100 h), o fator de conversão de glicose em células ($Y_{\text{X/Sglicose}}$) foi de 0,168 g/g (0-100 h). A produção específica de carotenoides ($Y_{\text{P/X}}$) foi de 390 μg de carotenoides/g de células, o fator de conversão de carbono em produto ($Y_{\text{P/SCOT}}$) foi de 107,8 $\mu\text{g/g}$ (0-50 h) e de 34,4 $\mu\text{g/g}$ (50-100 h), enquanto que o fator $Y_{\text{P/Sglicose}}$ foi de 69,59 $\mu\text{g/g}$.
7. A agitação e a aeração proporcionaram melhor homogeneidade no meio de cultura, e consequentemente maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio, conduzindo à maior produção de carotenoides.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1. Investigar a possibilidade de utilização de substratos agroindustriais na bioprodução em biorreator tais como, melaço de cana-de-açúcar, soro de leite, água de maceração de milho, hidrolisado de levedura, e outros;
2. Avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico) na bioprodução de carotenoides em frascos agitados e posteriormente em biorreator;
3. 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;
4. Avaliar a suplementação com minerais com um possível efeito estimulador ou inibidor da carotenogênese;
5. Realizar bioprodução com pH controlado e obter parâmetros estequiométricos verificando a possibilidade de alterações no pH durante a bioprodução;
6. Caracterizar as condições de transferência de oxigênio e seus efeitos sobre o crescimento de *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenoides em biorreator;
7. Avaliar os efeitos da luminosidade sobre o crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenoides;
8. Cultivar *S. salmonicolor* (CBS 2636) em batelada alimentada e/ou cultivo contínuo, e avaliar a possibilidade de reciclo de células, a fim de aumentar o rendimento de carotenoides totais;
9. Caracterização dos carotenoides;
10. Avaliar novas metodologias para extração de carotenoides;
11. Modelagem matemática do processo otimizado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, C. P. *et al.* Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyceae) from the northern and central coast of Perú. **Journal of the Chilean Chemical Society** v. 49, p. 1, 2004.

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.

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

AMIR, H. *et al.* Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. **Nutrition and Câncer-an International Journal** v. 33, p. 105– 112, 1999.

ARMSTRONG, G. A. Eubactéria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. **Journal of Bacteriology** v. 176, p. 4795- 4802, 1994.

ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annual Review of Microbiology** v. 51, p. 629-659, 1997.

ARMSTRONG, G.A.; HEARST, J.E. Genetics and molecular biology of carotenoids pigment biosynthesis. **Faseb Journal** v. 10, p. 228-237, 1996.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis of the association of the analytical chemists**, 16 ed. Washington, 1995.

BCC. **Global market for carotenoids worth \$919 million by 2015**, 2008. Disponível em: <www.bccresearch.com/pressroom/RFOD025C.htm>. Acesso em: 11 Abr. 2008.

BHASKAR, N. *et al.* Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery. **Enzyme and Microbial Technology** v. 40, p. 1427–1434, 2007.

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

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. β -Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 31, p. 565–571, 2004.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial xanthophylls. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 68, p. 445-455, 2005.

BHOSALE, P; GADRE R. V. β -Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 26, p. 327–32, 2001.

BHOSALE, P.; GADRE, R. V. Production of b-carotene by a *Rhodotorula glutinis* mutant in sea water medium. **Bioresource Technology** v. 76, p. 53-55, 2001.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Faseb Journal** v. 9, p. 1551- 1558, 1995.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: Carotenoids. Berlin: Birkhäuser Verlag, p. 13-26, 1995.

BRODY, T.. Nutritional Biochemistry. **Academic Press**, San Diego, cap.08, p.400-409, 1994.

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

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technology** v. 71, p. 41-44, 2000.

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

BUZZINI, P. *et al.* 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.

BUZZINI, P. *et al.* Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1024- 1031, 2007.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. *et al.* *Haematococcus pluvialis* cultivation in splitcylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 31 – 35, 2005.

CHAMPAIGN; ILINOIS. Carotenoids and Retinoids—Molecular Aspects and Health Issues, **AOCS Press**, 2004.

CHOE, W.S.; MIDDELBERG, A.P.J. Direct chemical extraction of a recombinant viral coat protein from *Escherichia coli* at high cell density. **Biotechnology and Bioengineering** v.75, p. 451–455, 2001.

- CHOUDARI, S. M.; SINGHAL, R. Media optimization for the production of b-carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. **Bioresource Technology**, v.99, p. 722- 730, 2008.
- DAS, A.; YOON, S.; LEE, S.; KIM, J.; OH, D.; KIM, S. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 77, p. 505–512, 2007.
- DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**, p. 38 – 165. Academic Press, New York, 1976.
- DAVOLI, P. *et al.* Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 40, p. 392-397, 2004.
- DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. III. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science** v. 298, p. 2149– 2153, 2002.
- DEMMING-ADAMS, B.; GILMORE, A. M.; ADAMS, W. W. III. In vivo functions of carotenoids in higher plants. **Faseb Journal** v. 10, p. 403- 412, 1996.
- DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; PONCE-NOYOLA, T.; TORRES-MUÑOZ, J. A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 75, p. 83–791, 2007.
- DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; *et al.* Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology** v. 16, p. 389–406, 2005.
- FALKOWSKI, P.G.; RAVEN, J.A. Aquatic photosynthesis. Blackwell Sci., Malden, Mass. USA, 1997.
- FAZELI, M. R. *et al.* Effects of salinity on b-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC 26 isolated from Urmia salt lake, North of Iran. **Bioresource Technology** v. 97, p. 2453- 2456, 2006.
- 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.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, B.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering** v. 44, p. 888–94, 1994.
- GARBAYO, I. *et al.* 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.
- GOODWIN, T. W. Fungi. In: Goodwin TW, editor. **The biochemistry of the carotenoids**, vol. 1: Plants. London: Chapman & Hall; p. 257–90, 1980.

GOUVEIA, L., RAYMUNDO, A., BATISTA, AP., SOUSA, I., EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **Eur Food Res Technol** 222: 362–367, 2006.

GUYOMARC'H, F.; BINET, A.; DUFOSSÉ, L. Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 24, p. 64–70, 2000.

HEJAZI, M. A. *et al.* Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in twophase bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 475 – 481, 2004.

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

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

HU, Z-C. *et al.* PH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology** v. 39, p. 586-590, 2006.

JAIME, L. *et al.* Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology** v. 43, p. 105–112, 2010.

JIRASRIPONGPUN, K.; *et al.* Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. **Letters in Applied Microbiology** v.47, p.112-116, 2008.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p. 18374-18379, 1995.

KARAS, M.; AMIR, H.; FISHMAN, D.; DANILENKO, M.; SEGAL, S.; NAHUM, A.; KOIFMANN, A.; GIAT, Y.; LEVY, J.; SHARONI, Y. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells, **Nutrition and Cancer- An International Journal** v. 36, p. 101– 111, 2000.

KHACHIK, F.; MOURA, F.F. de; ZHAO, D.Y.; AEBISCHER, C.P.; BERNSTEIN, P.S. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 43, p. 3383– 3392, 2002.

KIM, B. K.; PARK, P. K.; CHAE, H. J.; KIM, E. Y. Effect of Phenol on β -Carotene Content in Total Carotenoids Production in Cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Korean Journal of Chemical Engineering**. v. 21, p. 689-692, 2004

KIM, S. K.; *et al.* Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts. **The Journal of Microbiology**, v.45, p.128-132, 2007.

KIM, S. *et al.* High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*. **Process Biochemistry** v. 44, p. 899–905, 2009.

KIM, S-W.; SEO, W-T.; PARK, Y-H. Enhanced synthesis of trisporic acid and β -carotene production in *Blakeslea trispora* by addition of a nonionic surfactant, Span 20. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 330–2, 1997.

KOMEMUSHI, S. *et al.* Effect of barium and other metals on the growth of a d-lactic assimilating yeast *Rhodotorula glutinis*. **J Antibact Antifung Agents** v. 22, n. 21, p. 583–587, 1994.

KRINSKY, N.I.; LANDRUM, J.T.; BONE, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition** v. 23, p. 171– 201, 2003.

KRUTMANN, J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. **Journal of Dermatological Science** v. 23, p. S22– S26, 2000.

KRUTMANN, J.; GARMYN, M.; GILCHREST, B.A.; RUSSELL, R.M. Skin lycopene is destroyed preferentially over h-carotene during ultraviolet irradiation in humans. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1854– 1859, 1995.

LIU, Y. S. *et al.* 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.

LIU, Z. Q.; *et al.* Improvement of astaxanthin production by a newly isolated *Phaffia rhodozyma* mutant with low-energy ion beam implantation. **Journal of Applied Microbiology** v.104, n.3, p.861-872, 2008.

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.

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

MANTZOURIDOU, F. *et al.* Effect of the aeration rate and agitation speed on B-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123- 135, 2002.

MANTZOURIDOU, F.; TSIMIDOU, M. Z.; ROUKAS, riantafilhos. Performance of Crude Olive Pomace Oil and Soybean Oil during Carotenoid Production by *lakeslea trispora* in

Submerged Fermentation **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 54, p. 2575-2581, 2006.

MANTZOURIDOU, Fani; TSIMIDOU, Maria Z.; NAZIRI, Eleni. Industrial Glycerol as a Supplementary Carbon Source in the Production of β -Carotene by *Blakeslea Trispora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 56, p. 2668–2675, 2008.

MARKET FORECAST. Biopigments: biotech pigments poised to challenge synthetic colors; biopigment market could reach \$350 million by 2000. **Industrial Bioprocessing**, may, 1992.

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

MEYER, P. S.; DU PREEZ, J. C. Effect of acetic acid on astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnology Letters**, v.15, n.9, p.919-924, Sept.1993. 1993.

MIDDELBERG, A.P.J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances** v. 13, p. 491–551, 1995.

MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

MIRÓN, A. S. *et al.* Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1015 – 1023, 2002.

MOGEDAS, B. *et al.* β -Carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 108, n. 1, p. 47–51, 2009.

MORAIS, F. L. Carotenoides: Características Biológicas e Químicas. Brasília, 2006. Monografia – Curso de Qualidade em Alimentos IV – Universidade de Brasília CET – Centro de Excelência em Turismo.

MORIEL, D. G.; *et al.* Effect of feeding methods on the Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n. 3, p. 397-401, 2005.

NELIS, H. J.; LEENHEER, A. P. de. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. A review. **Journal of Applied Bacteriology** v. 60, p. 181–191, 1991.

OLSON, J.A. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 691, p. 156-166, 1993.

OLSON, J.A.; KRINSKY, N. I. Introduction: the colorful fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **Faseb Journal** v. 9, p. 1547– 1550, 1995.

OROSA, M. *et al.* Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology** v. 96, p. 373-378, 2005.

PAPAIOANNOU, E.H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Substrate contribution on carotenoids production in *Blakeslea trispora* cultivations. **Food and Bioproducts Processing** Article in Press, 2009.

PARAJÓ, J. C. et al. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry** v. 33, n. 2, p. 181-187, 1998a.

PARAJÓ, Juan C.; SANTOS, Valenti'n; VA'ZQUEZ, Manuel. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of eucalyptus globulus wood. **Biotechnology and Bioengineering** v. 59, n. 4, p. 501-506, 1998b.

PARK, P.K.; KIM, E.Y.; CHU, K.H. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. **Separation and Purification Technology** v. 53, p. 148–152, 2007.

PO-FUNG, I.; FENG, C. Production of astaxanthin by the microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. **Process Biochemistry** v. 40, p. 733–738, 2005.

RAMÍREZ, J. *et al.* Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fedbatch culture using a low cost medium feeding. **Revista Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis**, v. 4, art. 5, p. 1 – 9, 2006.

RAZAVI, S. H.; MARC, I. Effect of Temperature and pH on the Growth Kinetics and Carotenoid Production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 Using Technical Glycerol as Carbon Source. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering** v.25, n. 3, p. 59-64, 2006.

RICHER, S.; STILES, W.; STATKUTE, L.; PULIDO, J.; FRANKOWSKI, J.; RUDY, D.; PEI, K.; TSIPURSKY, M.; NYLAND, J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). **Optometry** v. 75, p. 216–230, 2004.

RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; SÁNCHEZ-PORRO, C.; FUENTE, J. L. D. L.; MELLADO, E.; BARREDO, J. L. Engineering the halophilic bacterium *Halomonas elongate* to produce β -carotene. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.77, p. 637–643, 2007.

SAKAKI, H.*et al.* Activation of torularhdin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 92, n. 3, p. 294-297, 2001.

SHIH, C. T.; HANG, Y. D. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from sauerkraut brine. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologi** v. 29, p. 570–2, 1996.

SIES, H.; STAHL, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. **Annual Review of Nutrition** v. 24, p. 173– 200, 2004.

SILVA, P. L. L. **Avaliação comparativa da formação de biomassa, astaxantina e parede celular das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*.**

Curitiba, 2008. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná (UFPR).

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

STAHL, Wilhelm; SIES, Helmut. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1740, p. 101– 107, 2005.

STAHL, W.; ALE-AGHA, N.; POLIDORI, M.C. Non-antioxidant properties of carotenoids. **Biological Chemistry** v. 383, p. 553–558, 2002.

TATSCH, P. O. Produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Erechim, 2008. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada Campus Erechim (URI).

TINOI, J. *et al.* Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2551 – 2557, 2005.

TRUSCOTT, T. G.. β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and antioxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. **J.Photochem Photobiol B.**, v.35, p.233-235, 1996.

VILA, M.; COUSO, I.; LEO'N, R. Carotenoid content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. **Process Biochemistry** v. 43, p. 1147–1152, 2008.

VALDUGA, Eunice; VALÉRIO, Alessandra; TREICHEL, Helen; DI LUCCIO, Marco Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenoides. **Química. Nova** 30: No. 8, 1860-1866, 2007.

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

VALDUGA, E., VALERIO, A., TREICHEL, H., FURIGO JÚNIOR, A., LUCCIO, M. D. 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 a.

VALDUGA, E., VALERIO, A., TATSCH, P. O., TREICHEL, H., FURIGO JÚNIOR, A., LUCCIO, M. D. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food and Bioprocess Technology**, v.2, p.234 - 238, 2009 b.

YAMANO, S.; ISHII, T.; NAKAGAWA, M.; IKENAGA, H.; MISAWA, N. Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58: 1112-1114, 1994.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M.. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol.385, n°1, p. 20-27, 2001.

ZHANG, B. Y.; GENG, Y. H.; LI, Z. K.; HU, H. J.; LI, Y. G. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. **Aquaculture** 295 (2009) 275–281.

ANEXO

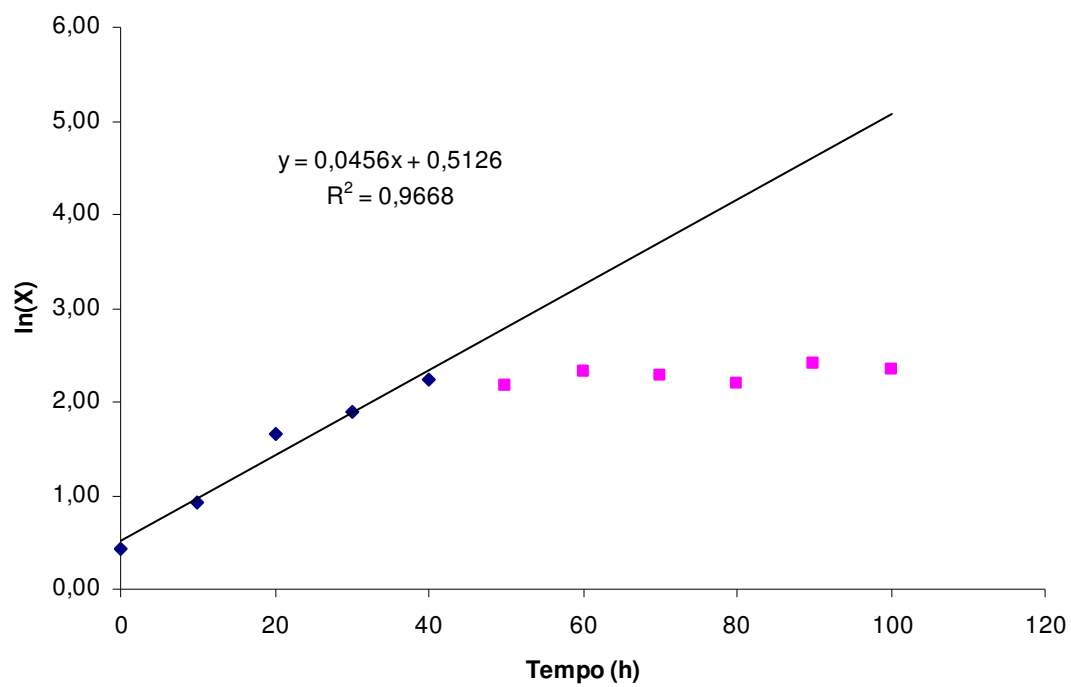


Figura 26 Linearização do crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no ponto otimizado do planejamento experimental fatorial completo 2^2

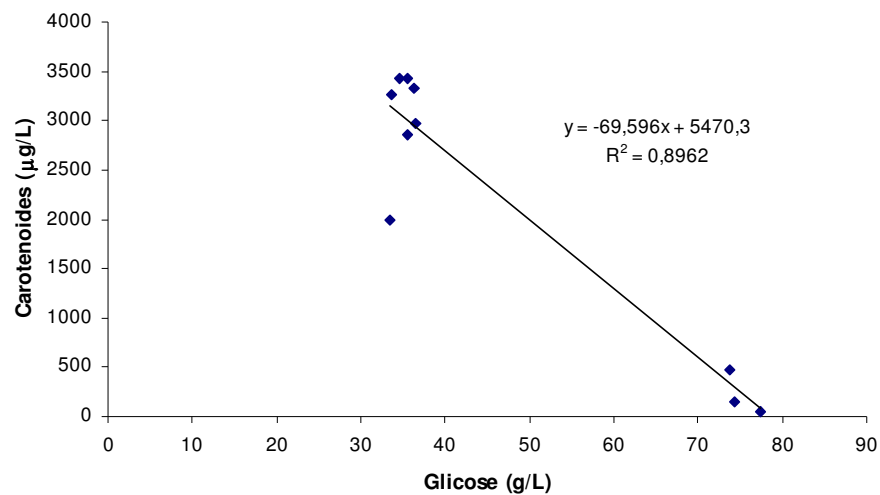


Figura 27 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicose para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2

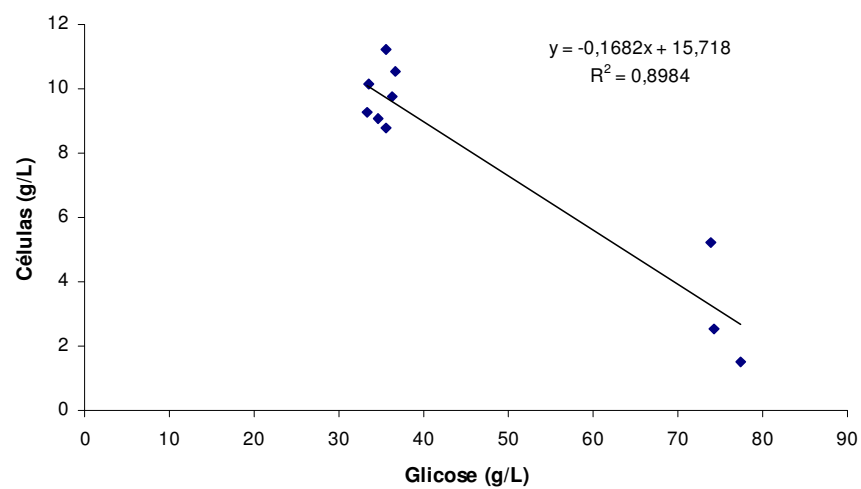


Figura 28 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicose para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2

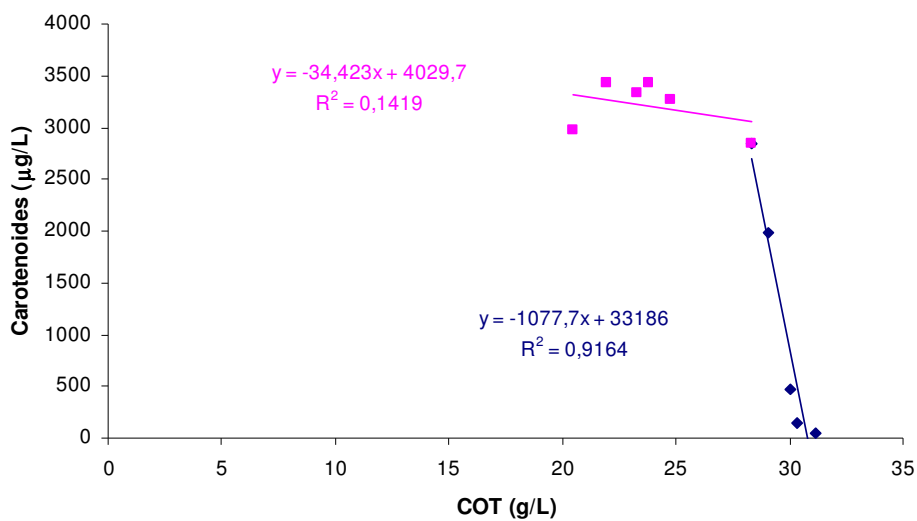


Figura 29 Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2

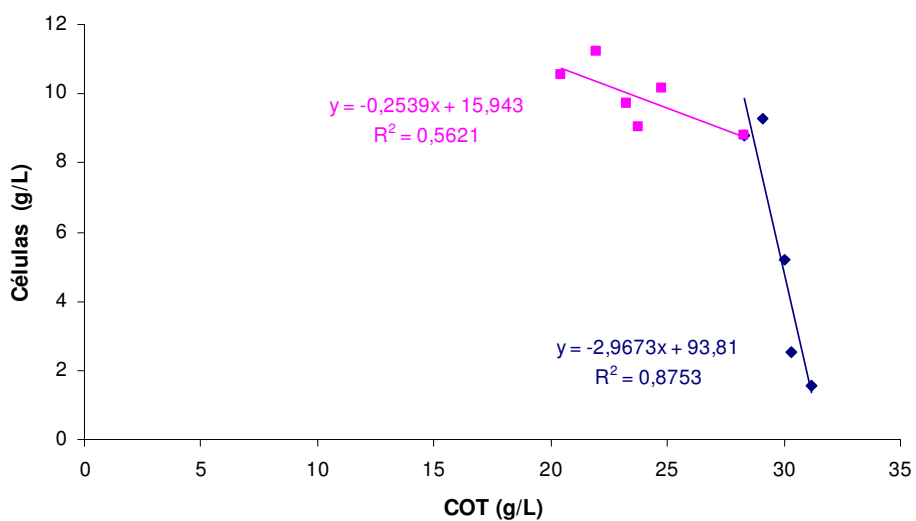


Figura 30 Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para a condição otimizada do planejamento fatorial completo 2^2