

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

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS
2636 EM BIORREATOR EM BATELADA ALIMENTADA

ROSICLER COLET

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

MARÇO DE 2012

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636
EM BIORREATOR EM BATELADA ALIMENTADA**

Rosicler Colet

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. Luciane Maria Colla, D.Sc.

Prof. Elisandra Rigo, D.Sc.

Erechim, 01 de março de 2012.

À minha família que me incentivou nesta minha maior decisão, que desencadeou neste importante resultado, e em todas as dificuldades encontradas, encorajando-me e dando-me força para vencer mais esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais, principalmente a minha mãe, e meus irmãos que, com muito amor, carinho, apoio, confiança e superação, foram os maiores incentivadores dessa conquista.

Aos meus orientadores Eunice Valduga e Marco Di Luccio pela orientação, apoio, conhecimento transmitido, segurança, ajuda, compreensão, amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha colega de trabalho e acima de tudo amiga Karine Cence (Kah) pela ajuda em todos os momentos, tornando o trabalho de pesquisa mais agradável e divertido.

Aos meus colegas do mestrado da Turma 2010/2012 pelo companheirismo, auxílio e pelos momentos de descontração. Em especial a Juliana Soares por ter me proporcionado o melhor presente de 2010 a sua amizade.

A minha eterna amiga, colega e “comadre” Naiane S. Marcon (Nai), por não medir esforços, sempre estava disponível a me ajudar mesmo quando estava na correria. Obrigada pela sua verdadeira amizade.

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia e da Termodinâmica pelos momentos de ajuda e descontração, em especial Lídia Tiggeman, Luciana Monks, Juliana Silva, Jamile Zeni, Jonaina Soares, Marceli Fernandes, Ilizandra Fernandes, Deise Sartori, Aline Rigo e Cláudia Trentin.

A todos os funcionários e professores do Curso de Engenharia de Alimentos da URI– Campus de Erechim, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

A todas as outras pessoas que fizeram parte de minha vida até o fim desta jornada.

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente
de qualquer jeito.”

Martin Luther King. Jr.

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.

**PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 EM
BIORREATOR EM BATELADA ALIMENTADA**

Rosicler Colet

Março/2012

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. Objetivou-se estudar a capacidade de produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em batelada alimentada, empregando substratos à base de resíduos agroindustriais (glicerol, glicerol bruto, água de maceração de milho e de parboilização de arroz). A bioprodução foi realizada em biorreator Biostat com 1 L de volume útil, sem iluminação, 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0, por um período de 96 h variando-se a taxa de alimentação (37,5; 75; 112,5 e 150 mL a cada 12 h) após 24 h de bioprodução, com meio à base de glicerol (bruto e glicerina bidestilada 85%), peptona e extrato de malte. A recuperação dos carotenoides foi realizada inicialmente empregando nitrogênio líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular e para extração uma mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). A concentração máxima de carotenoides totais obtida no biorreator foi de 4400 µg/L em 96 h de bioprodução nas condições: 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte e uma alimentação de 112,5 mL

a cada 12 h. A utilização de glicerol bruto apresentou concentração máxima de carotenoides de 3009 $\mu\text{g/L}$, valor este interessante devido a grande quantidade de glicerol bruto residual da produção de biodiesel. Considerando que a produção de carotenoides esta possivelmente associada ao crescimento celular na fase exponencial, tem-se como a produção específica de carotenoides ($Y_{P/X}$) o valor de 859,1 μg de carotenoides/g de células, sendo a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator de 0,05 h^{-1} . A maior produtividade em células obtida durante a pesquisa, sendo este valor obtido no ensaio 2 foi de 0,085 g/L.h .

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

**PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 IN
BIOREACTOR IN FED BATCH**

Rosicler Colet

Março/2012

Advisors: Eunice Valduga

Marco Di Luccio

Carotenoids are natural colorants that can be synthesized by plants, algae and microorganisms. These pigments are of great industrial use and have attracted interest due to concern about the use of chemical additives in foods. The objective was to study the capacity of carotenoids by the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 in fed batch, using substrates of agro-industrial residues (glycerol, crude glycerol, corn steep liquor and parboiled rice). The bioproduction Biostat was performed in a bioreactor with 1 L working volume without lighting, 1.5 vvm, 180 rpm, 25 °C and an initial pH 4.0, for a period of 96 h by varying the feed rate (37.5, 75, 112.5 and 150 mL each 12 h) after 24 h of bioproduction with glycerol-based media (crude and distilled glycerin 85%), peptone and malt extract, 1.5 vvm, 180 rpm, 25 ° C and initial pH 4.0. The recovery of carotenoids was carried out using liquid nitrogen combined in dimethylsulfoxide (DMSO) to rupture cellular and extraction with acetone/methanol (7:3, v/v). The maximum concentration of total carotenoids in the bioreactor was obtained 4.400 µg/L at 96 h bioproduction conditions: 25 ° C, initial pH 4.0, 180 rpm, aeration rate 1.5 vvm, 80 g/L glycerol, 15 g/L peptone, and 5 g/L malt extract and a

supply of 112.5 mL each 12 h. The use of crude glycerol had a maximum concentration of carotenoids of 3009 $\mu\text{g/L}$, a value interesting because of the large amount of residual crude glycerol production of biodiesel. Whereas the production of carotenoids is possibly associated with cell growth during the exponential phase. Specific production of carotenoids ($Y_{P/X}$) was 859.1 mg of carotenoids/g cells, the maximum specific growth (μ_{max}) for *S. salmonicolor* bioreactor of 0.05 h^{-1} . The highest yield in cells obtained during the search, and this value was obtained in test 2 was 0.085 g/Lh.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Pigmentos naturais	19
2.2 Legislação nacional e internacional para corantes	21
2.3 Estrutura, Classificação e Nomenclatura dos Carotenoides	22
2.4 Propriedades Físico-Químicas dos Carotenoides.....	31
2.5 Funções e Aplicações de Carotenoides	32
2.6 Produção de Carotenoides por Via Microbiana	35
2.7 Fatores que Influenciam a Produção de Carotenoides	39
2.7.1 Composição do meio de cultivo	40
2.7.2 Temperatura	42
2.7.3 Valor de pH	43
2.7.4 Luz/Luminosidade	45
2.7.5 Taxa de agitação e aeração	46
2.8 Produção de Carotenoides em Sistema Batelada Alimentada	46
2.9 Recuperação dos Carotenoides	49
2. 10 Considerações Finais.....	51
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Micro-organismo e Meios de Cultura	52
3.1.1 Micro-organismo	52
3.1.2 Inóculo	52
3.1.3 Meio de bioprodução	52
3.2 Condições de Cultivo	54
3.2.1 Micro-organismo	54
3.2.2 Inóculo	54
3.2.3 Produção em frascos agitados	55
3.2.4 Bioprodução em reator com batelada alimentada	55
3.3 Recuperação dos Carotenoides Totais.....	57
3.4 Determinações Analíticas	59
3.4.1 Carotenoides Totais	59
3.4.2 Carotenoides Específicos	60
3.4.3 Determinação da concentração de células	60
3.4.4 pH	61
3.4.5 Determinação da concentração de glicerol residual	61
3.4.6 Carbono orgânico total (COT) e Nitrogênio total (NT)	62
3.5 Cinética da bioprodução e avaliação dos parâmetros estequiométricos.....	62
3.5.1 Velocidades instantâneas e específicas globais	62
3.5.2 Fatores de conversão global	63
3.5.3 Produtividade global	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

4.1. Caracterização de substratos agroindustriais	66
4.2 Bioprodução de carotenoides	67
4.3 Comportamento Cinético	69
4.4 Parâmetros estequiométricos	78
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	93
5.1 Conclusões	93
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	95
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96
APENDICE	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica de um carotenoide acíclico.	23
Figura 2 - Estrutura química dos principais carotenoides.	25
Figura 3 - Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenoides.	26
Figura 4 - Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides.	27
Figura 5 - Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).	28
Figura 6 - Formação de carotenoides cíclicos.	29
Figura 7 - Formação de xantofilas a partir de α -caroteno.	30
Figura 8 - Formação de xantofilas a partir de β -caroteno.	31
Figura 9 - Aspecto do inóculo após 48 h de cultivo da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636).	54
Figura 10 - Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.	56
Figura 11 - Curva de crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636), durante 100 h de produção 57	57
Figura 12 - 58	58
Maceração das células com nitrogênio líquido..... 58	58
Figura 13 – Aparato para evaporação do solvente..... 59	59
Figura 14 - Aspecto visual das soluções de carotenoides após extração e solubilização em metanol. 59	59
Figura 15 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 1 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 37,5 mL a cada 12h)..... 69	69
Figura 16 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 2 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12h)..... 69	69
Figura 17 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 3 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 75 mL a cada 12h)..... 70	70
Figura 18 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 4 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 150 mL a cada 12h)..... 70	70
Figura 19 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 5 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol bruto, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12h). 71	71
Figura 20 - Produtividade em carotenoides global (P _{car}) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos ensaios 1 (37,5 mL), ensaio 2 e ensaio 5(112,5 mL), ensaio 3 (75 mL) e no ensaio 4 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH _{inicial} 4,0 e de 96 a 120 h..... 78	78
Figura 21 – Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células (Y _{p/x}) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos ensaios 1 (37,5 mL), ensaio 2 e ensaio 5(112,5 mL), ensaio 3 (75 mL) e no ensaio 4 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH _{inicial} 4,0 e de 96 a 120 h. 80	80
As Figuras 22-26 apresentam a evolução da velocidade específica de crescimento global (μ_x) e da produtividade em célula global (P _x) durante a bioprodução nos ensaios realizados. 81	81
Figura 22 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P _x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH _{inicial} 4,0 e 96 h)..... 81	81

Figura 23 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).....	82
Figura 24 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).....	82
Figura 25 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 120 h).....	83
Figura 26 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).....	83
Figura 27 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	85
Figura 28 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	85
Figura 29 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	86
Figura 30 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 120 h).	86
Figura 31 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	87
Figura 32 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	88
Figura 33 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	89
Figura 34 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	89
Figura 35 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 120 h).	90
Figura 36 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).	90
Figura 37 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no ensaio 1 (a) e no ensaio 2 (b).....	113
Figura 38 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no ensaio 3 (a) e no ensaio 4 (b).....	113
Figura 39 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>S. salmonicolor</i> (CBS 2636) no Ensaio 5	114
Figura 40 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o ensaio 1(a) e para o ensaio 2 (b).....	114

Figura 41 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b).....	115
Figura 42 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 5	115
Figura 43 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 1	116
Figura 44 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 2	116
Figura 45 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 3	117
Figura 46 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 4	117
Figura 47 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 5	118
Figura 48 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o ensaio 1(a) e para o ensaio 2 (b).....	118
Figura 49 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b).....	119
Figura 50 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o Ensaio 5 ..	119
Figura 51 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 1..	120
Figura 52 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 2..	120
Figura 53 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 3..	120
Figura 54 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 4..	121
Figura 55 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 5..	121
Figura 56 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o ensaio 1 (a) e para o ensaio 2 (b)	121
Figura 57 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b)	122
Figura 58 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 5	122
Figura 59 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1	123
Figura 60 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 2	123
Figura 61 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 3	123
Figura 62 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 4	124
Figura 63 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 5	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil. (ANVISA, 2001).....	21
Tabela 2 - Micro-organismos empregados na bioprodução de carotenoides.	36
Tabela 3 – Estudo da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenoides.	40
Tabela 4 – Diferentes meios reacionais de bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.....	55
Tabela 5 – Volume de alimentação de substrato no biorreator a cada 12 h de bioprodução.	57
Tabela 6 - Resultados de densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com e sem pré-tratamento ácido.	66
Tabela 7 - Bioprodução de Carotenoides Totais empregando diferentes substratos.	67
Tabela 8 – Consumo de substrato ao longo da bioprodução em batelada alimentada depois de 96 h.....	77
Tabela 9 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em batelada alimentada dos ensaios em batelada alimentada.....	91
Tabela 10 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 1 de batelada alimentada.....	111
Tabela 11 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 2 de batelada alimentada.....	111
Tabela 12 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 3 de batelada alimentada.....	111
Tabela 13 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 4 de batelada alimentada.....	112
Tabela 14 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>S. pararoseus</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 5 de batelada alimentada.....	112

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides formam um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais devido à sua ampla distribuição, a diversidade de suas estruturas e funções. Os carotenoides são uma família de mais de 700 pigmentos naturais (aproximadamente 600 carotenoides caracterizados), solúveis em gordura e sintetizados por micro-organismos carotenogênicos, plantas superiores e líquens (TAO et al., 2007). O grande interesse na exploração destes pigmentos ocorreu devido à variabilidade de aplicação dos mesmos, pois além da utilização como corante nas indústrias alimentícias e de ração animal, estes compostos possuem propriedades antioxidantes, o que torna possível o emprego dos carotenoides em tratamentos de prevenção ao câncer, às doenças do coração e a degeneração macular (BRITTON, 1995; KRINSKY e JOHNSON, 2005).

Comercialmente, os carotenoides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, o valor de mercado atual é estimado em cerca de 1,2 bilhões de dólares em 2010, com uma chance de crescer para 1,4 bilhões de dólares em 2018 com uma taxa composta de crescimento anual de 2.3. Dentre estes os que mais se destacam são o mercado de beta-caroteno, estimado em cerca de 250 milhões de dólares em 2007, aumentou para apenas 261 milhões de dólares em 2010. Este mercado deve crescer para 334 milhões de dólares até 2018 em uma taxa composta de crescimento anual de 3.1, e o da luteína cerca de 233 milhões de dólares em 2010 e deverá chegar a 309 milhões de dólares até 2018, com uma taxa composta de crescimento anual de 3.6 (REPORTSNREPORTS, 2012).

No Brasil, a indústria de alimentos representa cerca de 4 % do PIB e 30 % do total das exportações. O setor conta com mais de 38 mil empresas, 750 mil empregos diretos e faturamento anual de R\$ 58,1 bilhões, onde os Estados Unidos representam 30 %, a Europa 30 %, o Japão e a Ásia 30 % e o resto do mundo 10% deste mercado mundial (MAIMOM, 2000). A produção comercial de carotenoides a partir de micro-organismos concorre

principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos. Os carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas. Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos.

Embora os corantes sejam considerados essenciais à indústria de alimentos, podendo ser obtidos através de fontes naturais, este campo ainda não é bem explorado, em particular os produzidos por micro-organismos. Os países em desenvolvimento podem investir neste campo de conhecimento, buscando competir neste mercado, principalmente o Brasil, devido à sua imensa biodiversidade. Compostos obtidos naturalmente por processos biotecnológicos poderão reduzir a preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos. Neste contexto, muitos micro-organismos já estão sendo estudados como potenciais para bioprodução. Além disso, ressalta-se a possibilidade neste caso da produção de carotenoides por processos biotecnológicos, utilizando produtos agrícolas de baixo custo e resíduos como soro de queijo (FRENGOVA et al., 1994; AKSU e EREN, 2005, VALDUGA et al, 2009e), mosto de uva (BUZZINI e MARTINI, 1999), derivados do processamento da cana-de-açúcar (FONTANA et al., 1996; VALDUGA et al, 2008), do processamento de milho (LOSS, 2009; VALDUGA et al, 2008); e da produção de biodiesel (RIBEIRO, 2011; SAENGE et al., 2011) como forma de reduzir os custos de produção e a emissão destes subprodutos industriais e agroindustriais no meio ambiente, considerando que estes são ricos em açúcares e matéria orgânica. No contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza assim possibilitando vários estudos nesta área (RIBEIRO, 2011).

Os processos em batelada alimentada são reportados como eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive para a produção de carotenoides. Em tais processos, especialmente os que apresentam altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. O sistema em

batelada alimentada permite o controle da concentração de substrato, podendo assim minimizar os efeitos de inibição pelo substrato, considerando a possibilidade de sua adição em momentos indicados como propícios durante a fermentação (MACNEIL e HARVEY, 1990a). Na literatura, raros são os estudos empregando batelada alimentada para a produção de carotenoides, são relatados a produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (RAMÍREZ et al.; 2006) e por *Xanthophyllomyces dendrorhous* (LIU e WU, 2007).

Dentro deste contexto, o objetivo foi estudar a capacidade de produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em batelada alimentada com diferentes volumes de alimentação, avaliar a bioprodução de carotenoides empregando glicerol comercial e bruto (subproduto da produção de biodiesel), água de maceração de milho, água de parboilização de arroz e ácido mevalônico e a obtenção de parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada no biorreator.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os carotenoides, incluindo os aspectos gerais da biossíntese, classificação, condições que controlam a bioprodução, utilização de subprodutos e aplicações do modo de cultivo em batelada alimentada na bioprodução deste composto.

2.1 Pigmentos naturais

Os pigmentos naturais são grupos de substâncias com estruturas, propriedades químicas e físicas diferentes. São compostos instáveis, participam de diferentes reações e, em função disto, a alteração de cor de um alimento é um indicador das alterações químicas e bioquímicas possíveis de ocorrer durante o processamento e estocagem. Devido à instabilidade de alguns pigmentos às condições de processo, algumas vezes faz-se necessário adicionar corantes ao alimento procurando reconstituir suas características naturais (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

O conhecimento da estrutura e das propriedades dos pigmentos naturais é essencial para o dimensionamento adequado de um processo, de forma a preservar a cor natural do alimento e evitar mudanças indesejáveis de cor, e é muito importante, também, para o desenvolvimento e aplicações de corantes (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

A utilização de corantes naturais, como pigmentos alimentares, depende principalmente da sua extração econômica a partir de fontes naturais. Durante a extração, os corantes são passíveis de sofrer oxidação, isomerização, foto-oxidação ou formação de complexos metálicos. Ainda, a sua forma concentrada não pode sofrer precipitação ou polimerização. Os métodos para estabilização dos pigmentos incluem o uso alternativo de

aditivos como o ácido ascórbico, íons metálicos e vários ácidos orgânicos, ou então o encapsulamento dos pigmentos ou adsorção em gelatinas, alginatos ou silicilatos (GUNNARD, WASILESKI e ALAN, 1994).

Os corantes naturais, obtidos através de diversos processos, além de possuírem o rótulo de “naturais”, apresentam outras vantagens, como (LIN e DEMAIN, 1995; BLANC, 1998; HAJJAJ, BLANC, GOMA et al., 1998; KILIKIAN, 2002; KIM, J.H. e HYUCK, 2002):

a) encontrados em vegetais, frutas, raízes e sementes. Estima-se que somente 0,5% das plantas terrestres são exploradas quanto aos seus corantes. Portanto, a exploração de pigmentos naturais pode crescer muito, embora novas moléculas devam passar por todas as etapas do Food and Drug Administration (FDA) antes do uso regular, demandando elevados investimentos;

b) na formulação do pigmento natural industrializado, são utilizadas moléculas que conferem maior solubilidade, estabilidade, poder de emulsificação e espessantes. Estas moléculas mantêm as propriedades terapêuticas dos corantes e sua estabilidade é relativamente alta com respeito ao pH e temperatura.

Como principais desvantagens para obtenção dos corantes naturais, citam-se (KILIKIAN, 2002):

- baixa solubilidade em água.
- podem facilmente reagir com compostos aminados do meio de cultura e formar complexos solúveis em água;
- formação conjunta de metabólitos indesejáveis (por exemplo, citrinina), acarretando longos e caros testes de segurança, realizados antes do emprego destes produtos como aditivos alimentares;

- a maior parte dos pigmentos formados por via biotecnológica são intracelulares, aumentando com isso, os gastos com processos de extração e purificação dos corantes obtidos ou produzidos.

2.2 Legislação nacional e internacional para corantes

O Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares, conforme apresenta a Tabela 1, foi elaborado pelo Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos para estabelecer um Sistema Numérico Internacional (INS) de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo (CI name), baseado no número de identificação (CI). Contudo o International Numbering System (INS) não supõe uma aprovação toxicológica da substância pelo Codex (ANVISA, 2003).

Tabela 1 – Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil. (ANVISA, 2001).

INS*	CI**	CI name***	Corante
100	75300	Natural Yellow 3	Cúrcuma/curcumina
101 i	-	-	Riboflavina
101 ii	-	-	Riboflavina 5'fosfato de sódio
120	75470	Natural Red 4	Carmim, ácido carmínico, cochonilha, sais de Na, K, NH ₄ , Ca
140 i	75810	Natural Green 3	Clorofila
140 ii	75810	Natural Green 3	Clorofilina
141 i	75815	Natural Green 3	Clorofila cúprica
141 ii	75815	Natural Green 3	Clorofila cúprica, sais de Na e K
153	-	-	Carvão vegetal
160 a (ii)	75130	Food Orange 5	Carotenos: extratos naturais (alfa, beta, gama)
160b	75120	Natural Orange 4	Urucum, bixina, morbixina, annato, sais de Na e K
160c	-	-	Páprica, capsorubina, capsantina
160d	75125	Natural Yellow 27	Licopeno
160e	40820	Food Orange 6	Beta-apo-8'-carotenal
160f	40825	Food Orange 7	Éster metílico ou etílico do ácido Beta-apo-8'-carotenal
161b	-	-	Luteína
161g	40850	Food Orange 8	Cataxantina
162	-	-	Vermelho de beterraba, betanina
163 i	-	-	Antocianinas (frutas e hortaliças)

163 ii	-	-	Extratos de casa de uva
INS* - Sistema Numérico Internacional			
CI** - Número de Identificação			
CI name*** - Nome específico do aditivo			

Os corantes e lacas (um pigmento que vai colorindo mediante sua dispersão ao meio) permitidos pela legislação brasileira para uso em alimentos estão divididos nos seguintes grupos (ANGELUCCI, 1989):

C.I – Corante Orgânico Natural: é aquele obtido a partir de um vegetal ou, eventualmente, de um animal, cujo princípio tenha sido isolado com o emprego de processos tecnológicos adequados;

C.II – Corante Orgânico Sintético – é aquele obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processos tecnológicos adequados, e não encontrado em produtos naturais;

C.III – Corante Orgânico Sintético Idêntico ao Natural: é o corante elaborado sinteticamente, cuja estrutura química é semelhante a do princípio isolado do corante orgânico natural;

C.IV – Corante Inorgânico: é aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimentos;

C.V – Corante Caramelo: é aquele obtido pelo aquecimento controlado do açúcar invertido ou de outros carboidratos na presença de compostos de amônia e de sulfitos.

Os rótulos dos corantes fabricados no mercado brasileiro devem apresentar o nome comercial reconhecido e o tipo de alimento no qual pode ser aplicado. É permitida apenas a mistura de três corantes (ANVISA, 2001).

2.3 Estrutura, Classificação e Nomenclatura dos Carotenoides

A estrutura básica dos carotenoides é composta por oito unidades isoprenoides unidas de maneira que a molécula formada apresente simetria invertida no centro, de forma que os

dois grupos metílicos centrais ocupem as posições 1,6 e os outros grupos metílicos restantes permaneçam presentes nas posições 1,5 (ISLER, 1971; PFANDER, 1992; RODRIGUES-AMAYA, 1999).

A maioria das estruturas são lineares, simétricas e, de maneira geral, são derivadas de uma cadeia acíclica $C_{40}H_{56}$, a qual contém duplas ligações distribuídas ao longo da sua extensão, como apresentado na Figura 1 (ISLER, 1971; PFANDER, 1992).

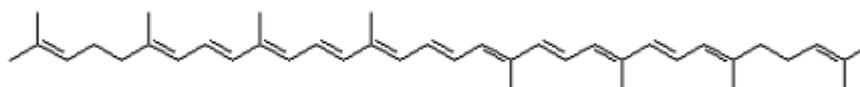


Figura 1 - Estrutura básica de um carotenoide acíclico.

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. A cor amarela, alaranjada e vermelha de muitas frutas e flores são causadas por cromoplastos de contenção geralmente desprovidos de clorofila (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 2002).

De acordo com GOODWIN (1993), as estruturas conhecidas dos carotenoides são variações das cadeias do licopeno, γ -caroteno e do β -caroteno. A origem das diferentes estruturas ocorre devido às modificações nestes esqueletos carbônicos por reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação, isomerização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, introdução de funções oxigenadas e/ou a combinação destas, contanto que os grupos metílicos centrais sejam mantidos (RODRIGUES-AMAYA, 1999). Os carotenoides podem ser acíclicos (licopeno), monocíclicos (γ -caroteno) ou bicíclicos (β -caroteno). Estes anéis podem aparecer presentes em um ou em ambos os extremos da molécula (RODRIGUES-AMAYA, 1997).

A classificação dos carotenoides é feita de acordo com as características da estrutura molecular, o que resulta na formação de dois grandes grupos: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos, cujas moléculas são formadas apenas por átomos de carbono e hidrogênio. As xantofilas são derivados oxigenados, sendo as funções hidróxi (OH), carbóxi (CO₂H), carbometóxi (CO₂Me), metóxi (OMe), aldeído (CHO), ceto (C=O) e epóxi (5,6-ou 5,8-epóxidos) as mais frequentemente encontradas. A Figura 2 apresenta a estrutura dos principais carotenoides (PFANDER, 1992; ARMSTRONG e HEARST, 1996).

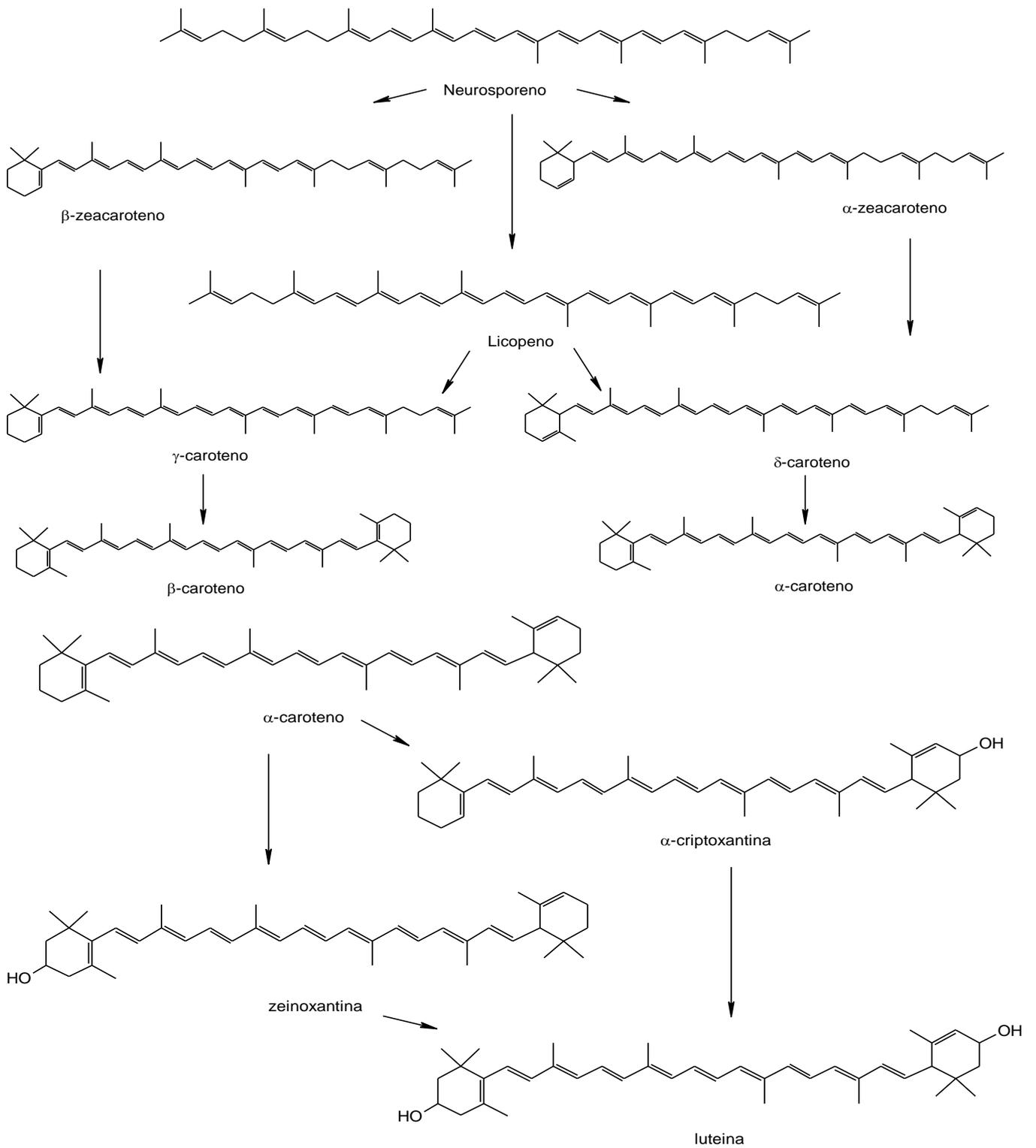


Figura 2 - Estrutura química dos principais carotenoides.

O caminho biossintético tem sido constantemente revisado e de acordo com SILVA (2004), pode ser dividido em 5 etapas: estágios iniciais, formação de fitoeno, desaturação, ciclização e formação de xantofilas, como descrito na Figura 3.

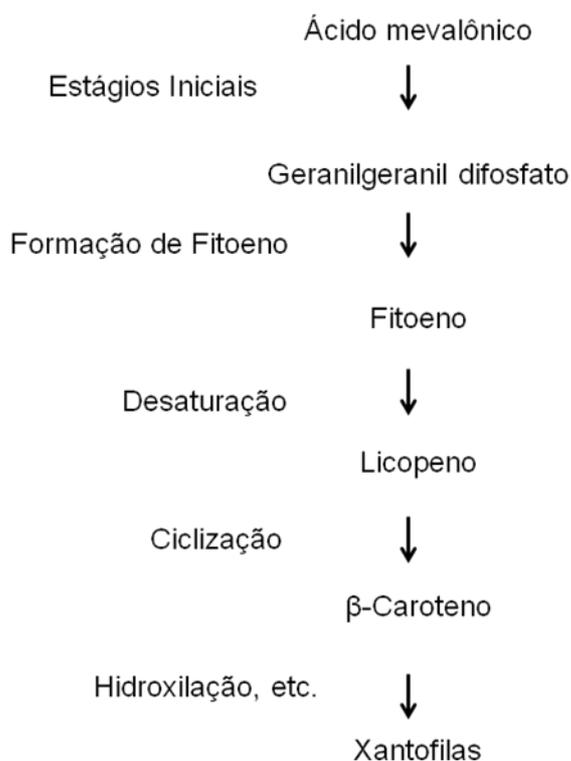


Figura 3 - Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenoides.

As reações iniciais são comuns para a biossíntese de todas as classes de terpenoides e resultam na formação de um composto de vinte carbonos, o geranylgeranyl difosfato (GGPP) como descrito na Figura 4 (SILVA, 2004).

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

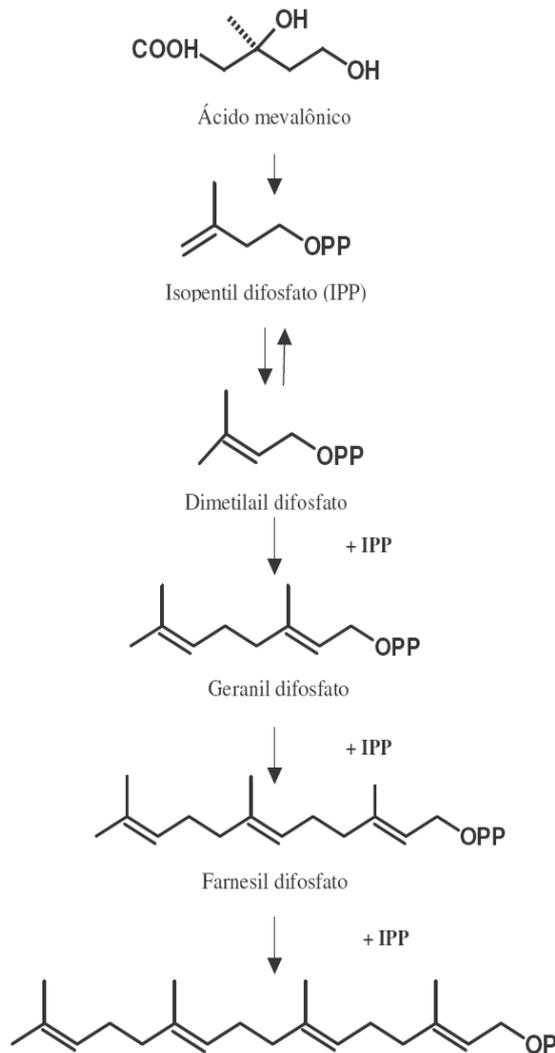


Figura 4 - Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides.

A reação chave para a carotenogênese é a dimerização de duas moléculas de geranylgeranildifosfato para formar o fitoeno, que é o primeiro carotenoide com quarenta carbonos. Segue-se uma série de desaturações a partir do fitoeno para formar fitoflueno, zetacaroteno, neurosporeno e, finalmente, licopeno (Figura 5).

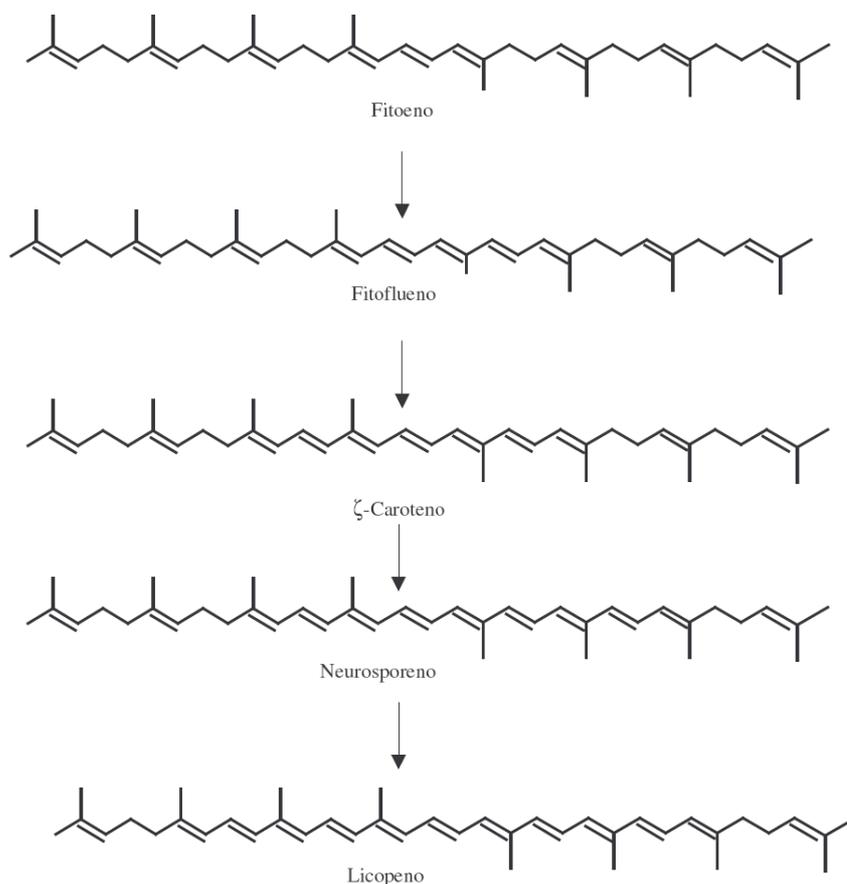


Figura 5 - Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

A ciclização pode acontecer a partir de neurosporeno ou de licopeno (Figura 6). O neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β -zeacaroteno ou o anel ϵ de α -zeacaroteno. Estes dois carotenoides são transformados em γ -caroteno e δ -caroteno, respectivamente, pela introdução de uma dupla ligação, estendendo o sistema de duplas ligações conjugadas. O licopeno pode ser também ciclizado em uma das extremidades, gerando γ -caroteno ou δ -caroteno. Estes carotenos monocíclicos sofrem ciclização na outra extremidade, resultando em β -caroteno e α -caroteno (bicíclicos), respectivamente (SILVA, 2004).

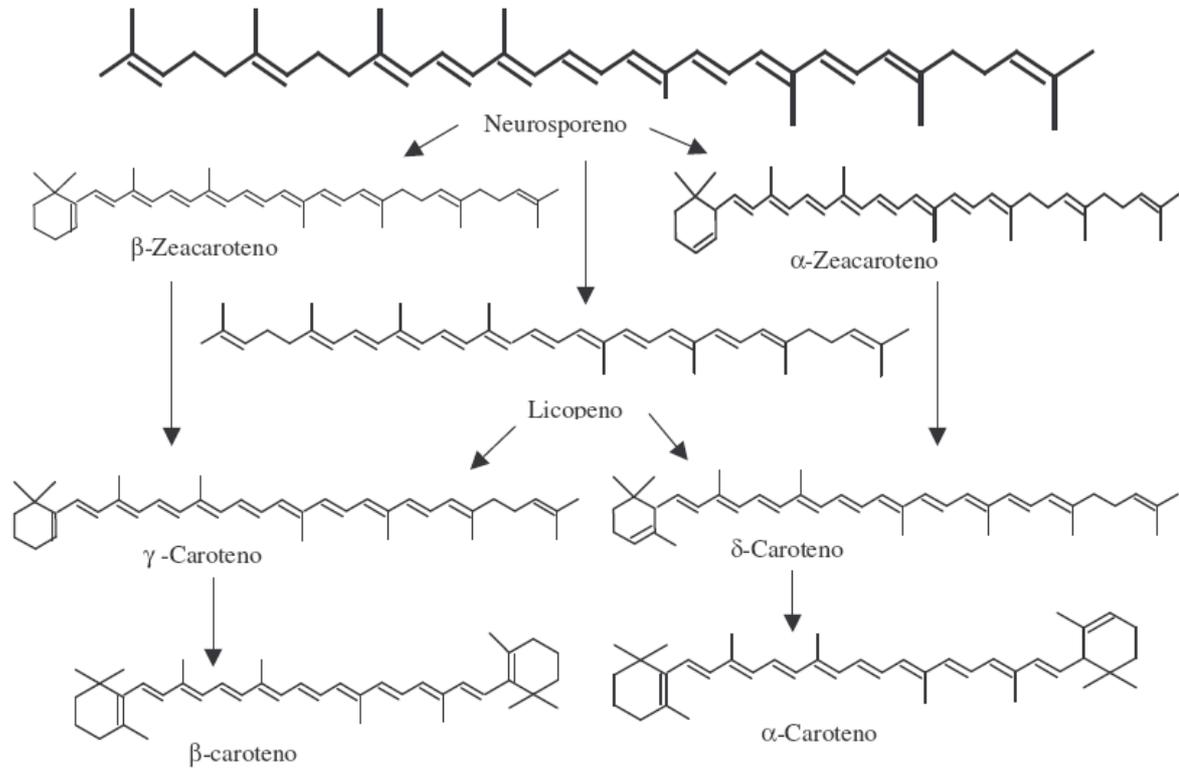


Figura 6 - Formação de carotenoides cíclicos.

Nos passos finais da biossíntese ocorre a introdução de substituintes como hidroxila, gerando as xantofilas (Figuras 7 e 8). Zeinoxantina, α -criptoxantina (monohidroxiladas) e luteína (dihidroxilada) são formadas por hidroxilação de α -caroteno. β -criptoxantina e zeaxantina são derivados hidroxilados de β -caroteno enquanto que a violaxantina é formada pela epoxidação da zeaxantina (SILVA, 2004).

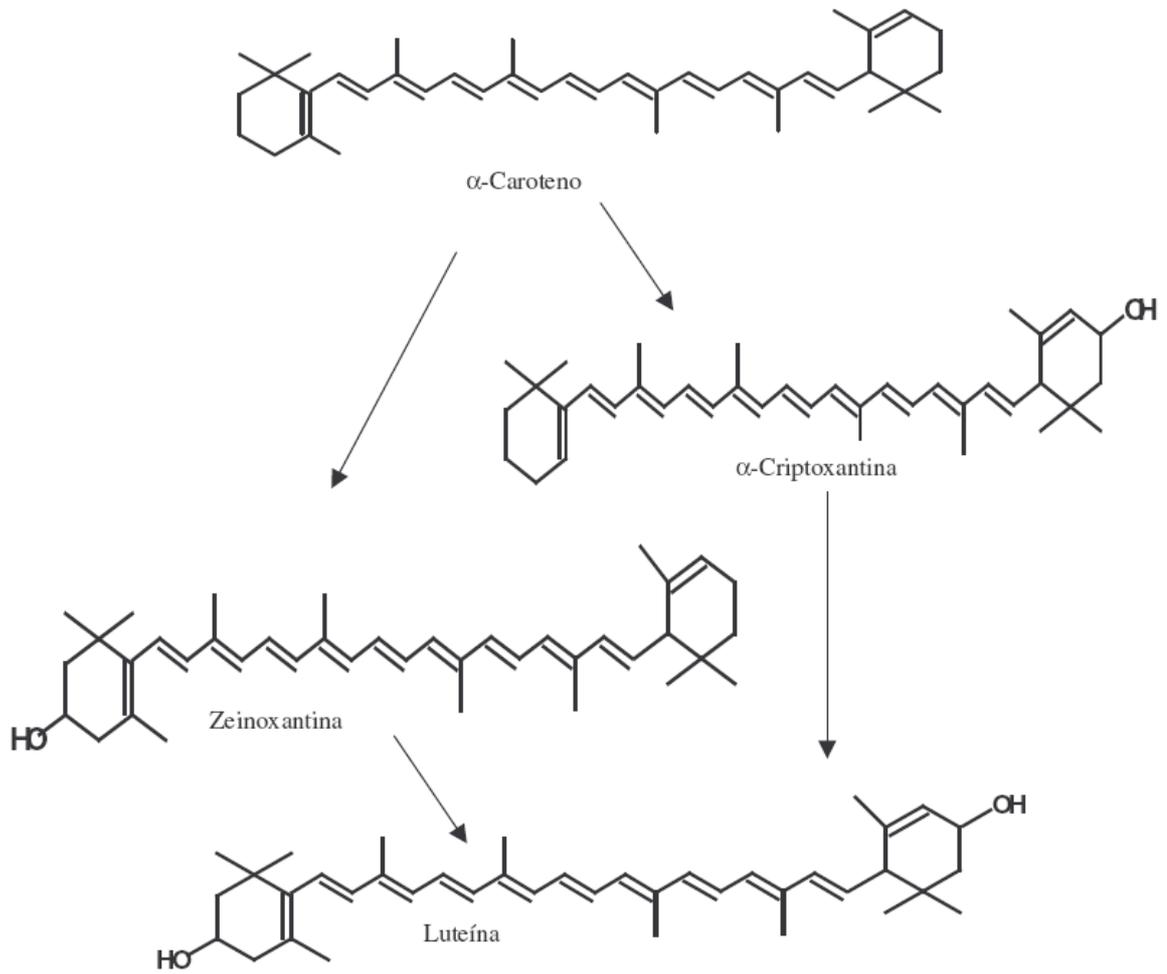


Figura 7 - Formação de xantofilas a partir de α -caroteno.

compostos é instável e sensível à luz, oxigênio, ácidos e temperaturas elevadas (PFANDER, 1992).

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenoides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e atividade pró-vitamínica. Os carotenoides são também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenoide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pró-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz (JOHNSON e SCHROEDER, 1995).

As cores destes pigmentos vão desde o amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho mais intenso, resultados da multiplicidade das duplas ligações conjugadas presentes na sua estrutura. O sistema de duplas ligações conjugadas que compõe a cadeia é denominado cromóforo e é responsável pela capacidade dos carotenoides de absorver luz na região visível (400 e 500 nm) (ARMSTRONG e HEARST, 1996). É necessário que este sistema seja composto de pelo menos 7 duplas ligações conjugadas para que o carotenoide apresente coloração. O fitoflueno, com apenas 5 duplas ligações, é incolor enquanto o ζ -caroteno com 7 ligações é amarelo. Já o β -caroteno e o γ -caroteno, apesar de possuírem o mesmo número de duplas ligações conjugadas, apresentam colorações diferentes devido ao fato do primeiro possuir dois anéis β -ionona e o segundo apenas um. Portanto, a coloração e a sua intensidade dependerão do tipo de carotenoide presente, da sua concentração e do seu estado físico (GROSS, 1991; RODRIGUES-AMAYA, 1997).

2.5 Funções e Aplicações de Carotenoides

Os carotenoides mais pesquisados por seu envolvimento na saúde humana são o β -caroteno (β , β -caroteno), α -caroteno (β , ϵ -caroteno), β -criptoxantina (β , β -caroten-3-ol),

licopeno (ψ , ψ -caroteno), luteína (β,ϵ -caroteno-3-3'-diol) e zeaxantina (β , β -caroteno-3-3'-diol) (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

A principal e mais antiga função conhecida dos carotenoides é a atividade provitamínica A, mas esta propriedade não é característica de todos os carotenoides, pois para que o pigmento apresente esta função, a sua estrutura molecular deve ser composta, no mínimo, por uma cadeia poliênica de 11 carbonos contendo um anel β -ionona. Assim, dentre os mais de 600 carotenoides conhecidos, somente 50 deles são precursores da vitamina A, como o β -caroteno, o γ -caroteno, o α -caroteno, a β -criptoxantina e a α -criptoxantina (BAUERNFEIND et al., 1981; RODRIGUES-AMAYA, 1997). O β -caroteno é o mais importante precursor da vitamina A, pois possui na sua estrutura molecular dois anéis β -ionona que originarão duas moléculas de vitamina A durante a etapa de conversão no organismo (BAUERNFEIND et al., 1981).

De acordo com TAPIERO et al. (2004) a inclusão de antioxidantes na dieta pode prevenir o surgimento de doenças cardiovasculares e câncer, pois estes compostos são capazes de interagir com espécies reativas de oxigênio que se originam no organismo desativando-as evitando assim o stress oxidativo.

A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas. 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,

As indústrias de alimentos empregam estes pigmentos na reposição da cor dos produtos perdida durante o processamento industrial e estocagem, na coloração de alimentos incolores e na uniformização da cor, já que o impacto visual causado pela cor é muito importante para a comercialização de alimentos. A coloração dos alimentos pode ser perdida

durante o processamento e armazenamento devido ao fato de que durante estas etapas os alimentos permanecem em contato com o oxigênio do ar e/ou sofrem aquecimento resultando na oxidação e na mudança estrutural das cadeias dos carotenoides. Os carotenoides também contribuem com a coloração da pele, casca e esqueleto dos animais aquáticos. A astaxantina é o carotenoide mais usado como aditivo em ração para conferir coloração a algumas espécies de peixes (SHAHIDI, 1998).

O uso de carotenoides naturais como corantes alimentícios apresentam vantagens porque são de origem natural, são estáveis na faixa de pH da maioria dos alimentos, não são corrosivos e nem são afetados por substâncias redutoras (SHAHIDI, 1998).

De acordo com UENOJO et al., (2007) os carotenoides possuem um efeito destacável na resposta imune e na comunicação intracelular e apresentam efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao envelhecimento. Além disso, há indícios de que os carotenoides em associação com outros componentes de frutas e vegetais apresentam efeito protetor contra algumas doenças crônicas. Por exemplo, o efeito sinérgico entre β -caroteno e vitaminas C e E foi observado na proteção celular, provavelmente decorrente da capacidade do β -caroteno em destruir os radicais livres e reparar os radicais de tocoferol produzidos pela ação do α -tocoferol.

O licopeno, caroteno presente em produtos de tomate, previne a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Low Density Protein - LDL) e reduz o risco do desenvolvimento de aterosclerose e doenças coronárias, além disso, outras pesquisas sugerem que este carotenoide pode reduzir o câncer de próstata, pulmão, pele e bexiga (LIMA et al., 2003).

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 permanência no mercado, 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 (MARKET FORECAST, 1992).

2.6 Produção de Carotenoides por Via Microbiana

A ocorrência de carotenoides em micro-organismos foi relatada pela primeira vez, há mais de 100 anos, quando foram isolados os pigmentos de bactérias não-fotossintéticas e de fungos (NELIS e DE LEENHEER, 1989). A partir de então, várias espécies de algas, fungos, leveduras e bactérias foram isoladas e identificadas como produtoras de carotenoides, sendo relatadas na Tabela 2 as espécies mais comumente encontradas e apresentadas na literatura. Dentre todos os micro-organismos citados, somente as microalgas *Dunaliella salina* (BOROWITZKA e BOROWITZKA, 1989) e *Haematococcus pluvialis* (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, 2004), os fungos *Blakeslea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus* (CERDÁ-OLMEDO, 1989) e a levedura *Phaffia rhopdozyma* (FLORÊNCIO et al., 1998) produzem altos níveis de carotenoides e, por isso, são utilizados em escala industrial ou demonstram ser candidatos potenciais para tal fim.

A produção de carotenoides por micro-organismos, através dos processos fermentativos, apresenta algumas vantagens: os pigmentos sintetizados são considerados naturais, alguns micro-organismos são capazes de se desenvolver em substratos de baixo custo, é necessário pequeno espaço para a etapa de síntese, esta não se encontra sujeita a alterações climáticas e, para completar, as condições de cultivo podem ser manipuladas de

forma a estimular a produção de um carotenoide específico. Desta forma vários estudos estão direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenoides e/ou aumentar a eficiência destes sistemas biológicos de forma que eles sejam comercialmente viáveis (AUSICH, 1997; BHOSALE, 2004).

Na Tabela 2 estão apresentados os micro-organismos tecnologicamente interessantes com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenoides.

Tabela 2 - Micro-organismos empregados na bioprodução de carotenoides.

Espécies	Carotenoides produzidos	Referências
Cianobactérias		
<i>Synechococcus sp.</i>	β -Caroteno, β - Criptoxantina, Zeaxantina, Mixoxantofila	ZHU et al. (2010).
Algas		
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	β -Caroteno, Luteína, Zeaxantina, Violaxantina	CUARESMA et al. (2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Anteraxantina, β -Caroteno, Clorofila, Neoxantina, Violaxantina, Zeaxantina	CORDERO et al. (2011)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Astaxantina, Luteína	CORDERO et al. (2011)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Violaxantina	GUEDES e AMARO, (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Violaxantina	CHA et al. (2010); GUEDES e AMARO (2011)
<i>Dunaliella bardawill</i>	Luteína, Zeaxantina	TAKAICHI (2011).
<i>Dunaliella sp.</i>	Astaxantina, β -Caroteno	TAKAICHI (2011)
<i>Dunaliella salina</i>	β -Caroteno	PANIAGUA-MICHEL et al. (2009)
<i>Dunaliella parva</i>	Anteraxantina, β -Caroteno,	TAKAICHI (2011)

Continuação da Tabela 2

	Neoxantina, Violaxantina, Zeaxantina	TAKAICHI (2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i> DCCBC26	β -Caroteno (trans e 9-cis)	FAZELI et al. (2006)
<i>Haematococcus sp.</i>	Astaxantina, β -Caroteno.	VILA et al. (2008)
<i>Haematococcus pluviialis</i> NIES-144	Astaxantina	YUAN et al. (2011)
<i>Haematococcus pluviialis</i>	Astaxantina	YUAN et al. (2011); BHOSALE e BERNSTEIN (2005); MONTERO et al., (2005); DOMÍNGUEZ- BOCANEGRA et al., (2007)
<i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i>	Fucoxantina	RYCKEBOSCH (2011)
Bactérias		
<i>Brevibacterium linens</i>	β -Criptoxantina	KIM et al. (2010); BHOSALE e BERNSTEIN (2005)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Γ -Caroteno, Hidroxi- γ - Caroteno	BALDERMANN et al. (2010)
<i>Ervinia sp.</i>	β -Caroteno, Licopeno, Zeaxantina	FUGISAWA et al. (2009); MISAWA e SHIMADA (1998)
<i>Escherichia coli</i>	Licopeno	LU et al. (2011)
<i>Halobacillus halophilus</i>	Carotenoides	OSAWA et al. (2010); KOCHER et al. (2009)
<i>Halomonas elongata</i>	β -Caroteno	RODRÍGUEZ-SAÍZ et al. (2007)
<i>Flavobacteriaceae sp.</i>	Saproxantina, Mixol, Zeaxantina.	SHINDO et al. (2007)
<i>Flavobacterium sp.</i>	β -Caroteno, Xantofila.	SHINDO et al. (2007)

Continuação da Tabela 2

<i>Flavobacterium multivorum</i>	Zeaxantina	BHOSALE e BERNSTEIN (2005)
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	BHOSALE e BERNSTEIN (2005)
Paracoccus sp.	Astaxantina	FUGISAWA et al. (2009)
<i>Phormidium laminosum</i>	Zeaxantina	BHOSALE E BERNSTEIN (2005)
<i>Thermus thermophilus</i>	β -Criptoxantina, Zeaxantina.	TAKANO et al. (2011). KOCHER et al. (2009)
Fungos e leveduras		
<i>Blakeslea trispora</i>	β -Caroteno	VARZAKAKOU et al. (2011); TERESHINA et al. (2010)
<i>Candida utilis</i>	Licopeno	MIURA et al. (1998)
<i>Coriolus versicolor</i> as 5.48	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Mortieralla alpina</i> M-23	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Mucor mucedo</i> AS3.2531	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Carotenoides, Astaxantina	MONTANTI (2011); MIAO et al. (2011)
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS 2.1557	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina, Zeaxantina	BHOSALE E BERNSTEIN (2005)
<i>Panus conchatus</i> as 5.154	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	β -Caroteno, Licopeno	POLAINO (2010); BHOSALE (2004)
<i>Podospora anserine</i>	β -Caroteno, γ -Caroteno, β -Zeaxantina, Fitoeno, Licopeno, Neurospeno, Neurosporaxantina, Toruleno	STROBEL et al. (2009)

Continuação da Tabela 2

<i>Rhodotorula glutinis</i>	Astaxantina	TASKIN e ERDAL (2011); TAO et al. (2011)
<i>Rhodotorula graminis</i>	Caroteno	BUZZINI et al. (2005)
<i>Rhodotorula minuta</i>	β -Caroteno	MONTERO et al. (2005)
<i>Rhodotorula rubra</i> AS2.670	Astaxantina	FRENGOVA et al. (2006) WANG et al. (2005)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Caroteno	NG et al. (2011)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Licopeno	YAN et al. (2011); VERWAAL et al, (2010)
<i>Sporobolomyces</i> sp	Toruleno	DAVOLI et al. (2004)
<i>Sporidiobolus</i> sp	β -caroteno	RAZAVI e MARCH (2006) VALDUGA et al (2008 -2011)
<i>Xanthophyllomyces</i> <i>dendrorhous</i>	Astaxantina	WOZNIAK et. al. (2011); BREITENBACH et.al. (2011)

Os trabalhos que relatam sobre a produção de carotenoides por micro-organismos 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: *R. sphaeroides* (NG et al., 2011), *S. cerevisiae* (YAN et al., 2011), *S. sp* (Valduga et al., 2008-2011) e *R. glutinis* (SAENGE et al., 2011).

2.7 Fatores que Influenciam a Produção de Carotenoides

A produção de carotenoides por micro-organismos é afetada por fatores físicos (luminosidade, temperatura e oxigênio) e pela composição do meio de cultivo (fonte de carbono e de nitrogênio, presença de aminoácidos, de íons metálicos, de solventes orgânicos e de outros compostos químicos que poderão agir como precursores da rota biossintética de

produção do pigmento), os quais variam em intensidade e concentração de acordo com as necessidades de cada micro-organismo. Logo, tais fatores podem ser manuseados e assim resultar em uma influência positiva ou negativa na biossíntese destes pigmentos. Estes fatores podem ser empregados como estratégias para aumentar a produção ou para induzir a síntese de um carotenoide específico (BHOSALE, 2004).

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

2.7.1 Composição do meio de cultivo

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

Alguns estudos têm investigado a produção de carotenoides utilizando fontes alternativas de substratos tais como grãos (aveia, trigo, cevada, milho, arroz, centeio), lipídios, glicerol, celobiose, melação de cana de açúcar, mosto de uvas e soro de queijo com diferentes cepas microbianas em frascos agitados (CUARESMA, 2011), dentre estes destacam-se os descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Estudo da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenoides.

Referência	Micro-organismo	Substratos utilizados	Máxima produção de carotenoides	Melhores concentrações de substrato	Carotenoide majoritário
AKSU e EREN (2007)	<i>R. glutinis</i>	Glicose, sacarose de melação e lactose do soro de queijo	125 µg/mL	20 g/L de sacarose de melação	-
Razavi e March (2006)	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> H110	Glicose, glicerol puro e glicerol comercial	3,84 mg/g	40 g/L de glicerol comercial	Torularrodina (3,7 mg/g) e β-caroteno (0,14 mg/g)
Davoli et al. (2004)	<i>Sporobolomyces roseus</i>	Glicose, extrato de levedura, KH ₂ PO ₄ e	412 µg/g	30 g/L de glicose, 4 g/L de extrato de levedura, 1 g/L	Toruleno e β-caroteno

		MgSO ₄ .7H ₂ O		de KH ₂ PO ₄ e 0,5 g/L de MgSO ₄ .7H ₂ O 40 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de malte e 14 g/L de peptona 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte 40 g/L de glicerol, 40 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz.	
Valduga et al. (2009a)	<i>S. salmonicolor</i> CBS 2636	Glicose, extrato de malte e peptona	1019 µg/L (frascos agitados)		-
(VALDUGA et al. 2009c)	<i>S. salmonicolor</i> CBS 2636	Glicose, peptona e extrato de malte	3318,6 µg/L		-
RIBEIRO (2011)	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Glicerol, água de maceração de milho, água de parboilização de arroz e melão	843 µg/L		-
Mantzouridou et al. (2008)	<i>B. trispora</i>	Glicose, glicerol puro e mistura de glicose e glicerol	15,0 mg/g de biomassa seca	60 g/L de glicerol	β-caroteno
Silva (2008)	<i>P. rhodozyma</i>	Caldo de cana e uréia	27,75 mg/L para a cepa selvagem	-	Astaxantina

O crescimento de micro-organismos em fontes de carbono alternativas aos carboidratos, como L-malato, acetato, ou glicerol, requer a capacidade de sintetizar hexoses necessárias para a produção de mucopeptídeos da parede celular, armazenagem de glicogênio, e outros compostos derivados de hexoses, como as pentoses, envolvidos na biosíntese de ácidos nucleicos (MOAT et al., 2002).

Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono para os micro-organismos (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al., 2007). Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática, o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes. Uma das rotas, provavelmente a principal para a oxidação de glicerol por leveduras, consiste na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase para formar glicerol-3-fosfato, que é reduzido a

dihidroxiacetona fosfato pela enzima mitocondrial glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase (FAD dependente) (GANCEDO e SERRANO, 1989).

A água de maceração de milho – AMM ou milhocina tem sido utilizada como um componente importante de alguns meios de crescimento, sendo indicado como excelente fonte de nitrogênio orgânico, componente essencial para o crescimento microbiano (LOSS, 2009). Além disso, contém carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais vitaminas e fosfato. Assim, é um meio bastante favorável aos processos fermentativos, quando comparado ao extrato de levedura (meio sintético utilizado como fonte de nitrogênio), considerado um substrato complexo rico em nitrogênio, aminoácidos e vitaminas (AMARTEY e LEUNG, 2000; RIVAS et al., 2004).

A água de parboilização de arroz também é pesquisada como substrato na produção de biocompostos. O processo de parboilização utiliza 1,12 L de água e gera 0,83 L de efluente por kg de arroz em casca, que contém altas cargas de substâncias orgânicas e nutrientes como nitrogênio e fósforo (FARIA et al., 2006). Portanto, a água de parboilização do arroz pode ser um promissor substrato para meio de cultivo para a produção de carotenoides.

2.7.2 Temperatura

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

Para estudar o efeito da temperatura no crescimento da levedura *S. ruberrimus* e na produção do carotenoide, as temperaturas de 19 °C, 23 °C, 27 °C e 31 °C foram avaliadas em biorreator durante a bioprodução, sendo o meio a base de glicerol e sulfato de amônio nas

concentrações de 67 g/L e 20 g/L, respectivamente. A produção de carotenoides ocorreu na faixa de temperatura de 19 °C à 27 °C, mas a 31 °C as células permaneceram incolores e não apresentando produção do pigmento. A maior produção de carotenoides ocorreu durante a fase de crescimento exponencial nas temperaturas de 19 °C à 27 °C, ou seja, possivelmente paralela ao crescimento da levedura em cada experimento, sendo a produção máxima de torularodina obtida em 19 °C, ao final da fase exponencial, e a mínima em 27 °C (RAZAVI e MARC, 2006).

AKSU e EREN (2005) avaliando o efeito da temperatura na produção de carotenoides por *R. mucilaginosa*. As taxas específicas de crescimento e produção do carotenoides aumentaram com o aumento da temperatura até o limite de 30 °C, possivelmente devido a desnaturação do sistema enzimático do micro-organismo. As taxas máximas de produção de células e de carotenoide foram de 0,249 h⁻¹ e 0,72 mg/g/h, respectivamente. O efeito negativo da temperatura na produção de carotenoides também foi observado por VALDUGA et al. (2009), utilizando a levedura *S. salmonicolor* sendo a temperatura ótima observada entre 25 °C a 28 °C.

A avaliação do efeito da temperatura na produção de licopeno por *E.coli* recombinante realizado por KIM et al. (2009), indicou que o aumento da temperatura de 25 °C para 37 °C resultou no aumento da produtividade de licopeno em cerca de 20 %, alcançando um rendimento final de licopeno de até 260 mg/L em 60 h.

2.7.3 Valor de pH

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

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes para o crescimento celular e formação de produto, tornando-se uma variável a ser estudada na produção de carotenoides.

Na produção com a levedura *S. ruberrimus* o pH inicial foi avaliado por RAZAVI e MARCH (2006), apresentando um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e biomassa. O conteúdo mínimo de carotenoides e células foi observado com cultivo a pH 3,5 (biomassa: 6,8 g/L; carotenoides específicos: 2,0 mg/g). A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 a 6,0, resultando o crescimento celular (11,3 g/L) e formação de pigmento (38,7 mg/L) em pH 6.

O efeito do pH inicial na concentração de carotenoides e biomassa de *S. salmonicolor* em frascos agitados também foi avaliado por VALDUGA et al. (2009a), indicando que o pH entre 4,0 e 5,0 resultaram maiores taxas de crescimento, enquanto que a máxima produção de carotenoides foi obtida em pH 4,0.

Os efeitos do pH inicial e do pH controlado durante a fermentação no cultivo de *X. dendrorhous* para produção de astaxantina foram estudados por HU et al., (2006). Na fermentação em frascos agitados foram observados pHs iniciais ótimos de 6,0 para crescimento celular (17,2 g/L) e 5,0 para produção de astaxantina (20,4 mg/L). Em relação ao pH controlado no fermentador, notou-se a existência de um pH ótimo (5,0) para a obtenção de maior concentração de astaxantina (21,8 mg/L). Os autores desenvolveram uma estratégia de controle de pH com a finalidade de aumentar a produção de astaxantina. Como o maior fator $Y_{P/X}$ (1,5 mg/g) foi obtido em pH 4,0 e o maior crescimento celular em pH 6,0, avaliou-se a produção onde nas primeiras 80 h manteve-se pH 6,0 e no restante da fermentação pH 4,0. Com essa estratégia de cultivo, obteve-se um aumento de 24,1 % de astaxantina em comparação com o cultivo em pH constante.

O valor de pH do meio de cultivo influenciou a atividade biossintética e taxa de crescimento da levedura *R. mucilaginosa* em estudo realizado por AKSU e EREN (2005).

Com a elevação do pH de 3,0 a 7,0 observou-se aumento nas taxas de crescimento e produção de carotenoides.

2.7.4 Luz/Luminosidade

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

Alguns trabalhos apresentam que 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 investigado por SAKAKI et al. (2001). Para a levedura não pigmentada *S. cerevisiae* uma fraca irradiação de luz branca não apresentou efeito sobre o crescimento das células, no entanto para levedura selvagem *R. glutinis*, a luz inibiu o crescimento celular, onde simultaneamente, a produção de torularrodina aumentou (7,9 para 14,2 mg/100g células), principalmente durante a fase exponencial.

Em estudo realizado por DOMINGUEZ-BOCANEGRA et al. (2007) com *H. pluvialis*, evidenciou que o aumento na intensidade de luz resultou no aumento da produtividade do pigmento, 767 µg/g células por dia com iluminação contínua e 535 µg/g células por dia sob condição de fotoperíodo. A indução para aumento na acumulação de astaxantina em função da 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, a pesquisa indica que limitar o

índice de nitrato junto com um nível elevado da irradiação resulta no aumento da síntese do carotenoide.

2.7.5 Taxa de agitação e aeração

AKSU e EREN (2005) mostraram que para *R. 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 no sistema disponibilizando melhor o substrato para reação. AKSU e EREN (2007) usando *R. glutinis* observaram 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 *R. glutinis* devido à redução da disponibilidade de nutrientes na superfície das células, no entanto taxas elevadas de agitação (> 250 rpm), resultaram em ruptura celular evidenciado com o aparecimento de uma fina camada oleosa sobre o meio de fermentação.

TATSCH (2008) obsevou que a agitação e a aeração proporciona uma melhor homogeneidade no meio de cultura, e conseqüentemente maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio.

2.8 Produção de Carotenoides em Sistema Batelada Alimentada

Na busca de superar os problemas para obtenção de carotenoides em relação a inibição da produção pela concentração de substrato ou por repressão catabólica são usualmente

utilizados cultivos em batelada alimentada. Batelada alimentada é a técnica utilizada em processos microbianos na qual um ou mais nutrientes são alimentados ao reator durante o cultivo enquanto os produtos permanecem no seu interior até o final do processo (SILVA et al., 1998).

O principal propósito da batelada alimentada é controlar a concentração do substrato no meio de cultura, para tal faz-se necessário definir o tipo de nutriente a ser disponibilizado e o modo de alimentação. A batelada alimentada pode ser dividida em relação à velocidade de alimentação em: constante, exponencial e otimizada (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Os cultivos em batelada alimentada são comumente empregados na busca de alta densidade celular e/ou máxima formação de produto. Uma boa estratégia para condução da fermentação em batelada alimentada com diversos tipos de micro-organismos é a alimentação de substrato limitante na mesma velocidade que este é utilizado pelo organismo (KLEMAN et al., 1991).

A característica básica dos processos microbianos em batelada alimentada é que as concentrações de nutrientes alimentadas no biorreator podem ser controladas voluntariamente por mudanças na velocidade de alimentação (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Desta forma a batelada alimentada é superior à batelada convencional especialmente quando mudanças na concentração de nutrientes afetam o rendimento do metabólito desejado (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Assim, em muitos processos de produção de carotenoides, a condução do processo em batelada alimentada conduz a uma melhoria na produção do metabólito de interesse, mostrando que esse tipo de processo pode ser vantajoso para a bioprodução.

SAENGE et al. (2011) estudaram a utilização de glicerol bruto, um subproduto de usinas de biodiesel, como única fonte de carbono para a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura *R. glutinis* TISTR 5159. A adição de sulfato de amônio como fonte de

nitrogênio e Tween 20 como surfactantes resultou no aumento da concentração de lipídeos e carotenoides. A maior concentração de biomassa obtida em 8,5 % de glicerol e C/N proporção de 60, enquanto que para teores de lipídios e produção de carotenoides a concentração de glicerol foi de 9,5 % e a relação C/N de 85. A produção de lipídeos e carotenoides foram também investigadas em biorreator de tanque agitado com controle de pH em 6,0 e a taxa de aeração em 2 vvm. Em fermentação em batelada alimentada, iniciada no meio da fase exponencial e a cada 12 h para manter a concentração de glicerol, eram adicionados 50 mL de glicerol bruto até completar 48 h de fermentação. Uma maior produção de lipídios (6,05 g/L) e de carotenoides (135,25 mg/L) foram obtidos, comparando-se com o cultivo em batelada simples (produção de carotenoides de 117,38 mg/L).

NASRABADI et al. (2010) aplicaram delineamento experimental em um processo em batelada alimentada para a otimização do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), composto intermediário para a produção de cantaxantina. Para manter a concentração total de carboidratos no meio de fermentação (10 g/L) 500 mL de uma solução de alimentação foi adicionada ao ensaio em batelada alimentada entre 56 a 136 h (fase logarítmica de crescimento) utilizando diferentes vazões. A máxima produção de cantaxantina (13,17 mg/L) foi obtida em 7 dias.

YAMANE et al. (1997) estudaram a produção de carotenoides por *P. rhodozyma* em batelada alimentada, utilizando duas etapas. O crescimento celular foi reforçado pela baixa relação C/N na primeira fase, com a alimentação das soluções de glicose, mineral e fosfato ajustadas na mesma proporção (180 mL/h) e a taxa de alimentação da solução de amônia foi fixada em 90 mL/h. A produção de astaxantina foi reforçada pela elevação da relação C/N na segunda fase (a alimentação das soluções foram realizadas quando a concentração de oxigênio dissolvido excedeu 6,0 mg/L). As taxas de alimentação para a glicose, o mineral e fosfato foram fixadas no mesmo valor que na primeira etapa, enquanto que a taxa de alimentação da

solução de amônia foi de 22,5 mL/h. Neste sistema de cultivo, foi obtida a maior produção de astaxantina, 16,0 mg/L .

2.9 Recuperação dos Carotenoides

Os carotenoides estão presentes em uma grande variedade de tecidos naturais, sendo a rigidez destes o fator que pode favorecer ou não a extração. Nos tecidos que oferecem menos resistência, o simples contato com o solvente adequado é suficiente para que todo o pigmento seja removido, enquanto que nos tecidos rígidos, técnicas de extração mecânica devem ser associadas ao processo (BRITTON, 1985).

A bioprodução industrial de carotenoides vem se expandindo comercialmente, porém as operações de extração e recuperação do produto contribuem para aumento dos custos da produção. Assim, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados visando estudar a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares (VALDUGA et al., 2009c; SARADA et al., 2006; PARK et al., 2007) e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custo das operações de *downstream*.

O processo de extração dos carotenoides presentes em material biológico é comumente feito através da utilização de solventes orgânicos. PARK et al. (2007) relataram que a extração dos carotenoides presentes na parede celular de micro-organismos depende da habilidade de permeabilização do solvente através da parede celular e da solubilidade dos carotenoides no solvente usado. De acordo com SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN (1995), os solventes acetona e metanol são miscíveis em água e, por isso, são mais efetivos na extração dos carotenoides de materiais biológicos, já que estes apresentam grande quantidade de água em sua composição.

Técnicas alternativas para substituir ou minimizar a utilização de solventes orgânicos na extração dos carotenoides de materiais biológicos estão sendo desenvolvidas, já que estes compostos podem ser prejudiciais a saúde. A extração de compostos de materiais brutos por dióxido de carbono supercrítico, cujos princípios ativos são de interesse comercial para emprego na produção de alimentos, cosméticos e medicamentos, tem recebido grande atenção como método alternativo aos utilizados para a separação convencional (LIM et al., 2002).

PARK et al. (2007) testaram cinco solventes para a ruptura das células de *R. glutinis*, encontrando β -caroteno, toruleno e torularrodina no extrato. A mistura dos solventes dimetilsulfóxido (DMSO), éter de petróleo e acetona mostrou-se eficiente, gerando máxima extração quando comparada aos solventes individuais.

A extração de astaxantina de *H. pluvialis* sem homogeneização foi investigada por SARADA et al. (2006), a extração por solvente foi facilitada pelo tratamento das células com HCl 4 N a 70 °C, onde se obteve uma extração de 90 % dos pigmentos sem homogeneização.

Em função da forte associação dos carotenoides com as células e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, VALDUGA et al. (2009c) testaram 11 métodos diferentes para o rompimento celular e extração com solventes. Foi constatado que quando utilizada a combinação nitrogênio líquido e DMSO para ruptura celular e extração com mistura de acetona e metanol (7:3), obteve-se a maior recuperação de carotenoides da levedura *S. salmonicolor*.

JAIME et al. (2010) estudaram a extração de carotenoides da microalga *H. pluvialis*, combinando extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando hexano e etanol como solventes. 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. 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 maior atividade antioxidante foi obtida utilizando etanol, porém em temperaturas mais baixas.

2. 10 Considerações Finais

Através da revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, pode-se observar que 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 alimentação animal. Também que a procura por compostos com conotação natural tem resultado num aumento de pesquisas referentes à produção de carotenoides através da bioprodução.

Os processos em batelada alimentada surgem para contribuir com a produção de corantes através de micro-organismos considerando a necessidade de redução de custos de produção e aumento no rendimento, buscando a equiparação da bioprodução com a síntese química.

Verificou-se a possibilidade do uso de resíduos e sub-produtos como fonte de carbono na produção de carotenoides, buscando a valorização de um sub-produto e redução de custos de produção do pigmento. Neste contexto, o glicerol é uma fonte de carbono barata e abundante, devido à inevitável geração como subproduto da produção de biodiesel.

Assim, justifica-se a importância de pesquisar sobre a bioprodução de carotenoides em biorreator em batelada alimentada utilizando subprodutos como substratos, a fim de aproveitar melhor os componentes do meio de bioprodução, bem como maximizar o rendimento dos compostos e reduzir custos de produção, esboçando-se estratégias para um possível aumento de escala.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e Meios de Cultura

3.1.1 Micro-organismo

A produção de carotenoides, em frascos agitados (ensaios preliminares) e sequencialmente em biorreator (modo batelada alimentada), foram realizadas com uma linhagem de levedura, identificada como sendo *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636.

3.1.2 Inóculo

Para a manutenção da cultura utilizou-se meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*) e para o preparo do inóculo, o meio YM (*Yeast Malt Extract*). O meio YMA é 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). O meio YM é 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. Após o preparo, os meios foram esterilizados a 121°C por 15 min em autoclave (Phoenix, modelo AV75), e posteriormente resfriados.

3.1.3 Meio de bioprodução

a) Substratos Sintéticos

O meio foi suplementado com glicose, extrato de malte, peptona e ácido mevalônico. A composição foi definida nos ensaios apresentados na Tabela 4 (Item 3.2). Após o preparo do meio, este foi esterilizado em autoclave (Phoenix, modelo AV75) por 15 min a 121 °C.

b) Substratos Complexos

O meio de bioprodução era constituído por misturas de subprodutos agroindustriais: água de maceração de milho (AMM), cedida pela Corn Products – Mogi Guaçu/SP, água de parboilização do arroz (APA), cedida pela Indústria Nelson Wendt de Pelotas/RS, glicerol (glicerina bidestilada 85% PA, Merck – Alemanha) e o glicerol bruto (subproduto da produção de biodiesel) produzido no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI - Campus de Erechim.

Os meios industriais apresentam composição complexa, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção de carotenoides, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação devido à formação de precipitados no meio de bioprodução e/ou pela presença de pigmentos que poderão ser extraídos com os carotenoides. Desta forma, tornou-se indispensável a realização de um pré-tratamento visando a remoção de constituintes indesejáveis, para não comprometer a obtenção dos carotenoides.

No estudo de pré-tratamento realizado na água de maceração de milho empregou-se tratamento com ácido, conforme método descrito por VALDUGA et al. (2007). Inicialmente, uma concentração de 100 g/L de água de maceração de milho foi ajustada a pH 3,0 utilizando ácido fosfórico (Nuclear) 1 M. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas a 24 °C; sendo então centrifugada (Eppendorf 5403) a 2650 x g por 15 min e ajustou-se o pH para 5,5 com solução de NaOH (Vetec) 2 M.

A água de parboilização de arroz não foi pré-tratada pois, esta apresentava aparência translúcida e aparentemente sem resíduos adiconais que poderiam intervir na produção e/ou extração. Com o objetivo de verificar a utilização do glicerol bruto, subproduto do biodiesel, não foi realizado um pré-tratamento no mesmo.

3.2 Condições de Cultivo

3.2.1 Micro-organismo

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 dois meses foram realizados repiques do micro-organismo.

3.2.2 Inóculo

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 em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB) a 25°C, 180 rpm por aproximadamente 48 h (ou até atingir uma densidade óptica (DO) de aproximadamente 0,7), conforme mostra a Figura 9.



Figura 9 - Aspecto do inóculo após 48 h de cultivo da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636).

3.2.3 Produção em frascos agitados

Para estudar os efeitos dos diferentes substratos (sintéticos e/ou agroindustriais) na bioprodução de carotenoides, ensaios preliminares foram realizados em frascos agitados.

Foram transferidos 10 mL do inóculo para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de meio de cultura com composição definida conforme a Tabela 4 e incubados a 25°C, 180 rpm por 120 h em pH inicial de 4,0.

Tabela 4 – Diferentes meios reacionais de bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.

Substratos	Ensaio								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peptona (g/L)	15	15	15	-	-	-	15	15	15
Extrato de malte (g/L)	5	5	5	-	-	-	5	5	5
Glicose (g/L)	80	-	40	-	-	20	-	-	-
Glicerol (g/L)	-	80	40	40	80	20	80	80	40
Água de maceração de milho (g/L)	-	-	-	40	40	20	-	-	-
Água de parboilização de arroz (g/L)	-	-	-	20	20	20	-	-	-
Ácido mevalônico (g/L)	-	-	-	-	-	-	0,3	0,1	-

3.2.4 Bioprodução em reator com batelada alimentada

Os ensaios da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada foram realizados em Biorreator Biostat B (Braun Biotech International) com volume total de 2 L por 96 h, sem iluminação, conforme mostra a Figura 10. Os parâmetros monitorados foram temperatura, agitação e aeração. O antiespumante FG 10 Dow Corning foi esterilizado em UV durante 40 min.



Figura 10 - Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides.

Através dos resultados dos testes preliminares, optou-se em trabalhar com o ensaio 2 . Nos ensaios em batelada alimentada utilizou-se o meio composto por 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol. Um volume inicial de 500 mL do meio de cultura foi autoclavado juntamente com o biorreator, e separadamente em erlenmeyer o meio a ser alimentado periodicamente também foi autoclavado (121°C, 15 min).

Após o resfriamento do sistema, foram adicionados 100 mL do pré-inóculo ao biorreator e inicializando-se a produção nas condições: pH inicial 4,0, tempo de fermentação de 96 a 120 h, temperatura de 25°C e agitação de 180 rpm (TATSCH, 2008).

Considerando resultados obtidos por TATSCH (2008) onde observaram que em torno de 24 h de crescimento a biomassa mantinha-se praticamente constante (Figura 11), sendo neste ponto o final da fase exponencial de crescimento celular, optou-se por iniciar o sistema de batelada alimentada após as primeiras 24 h de bioprodução.

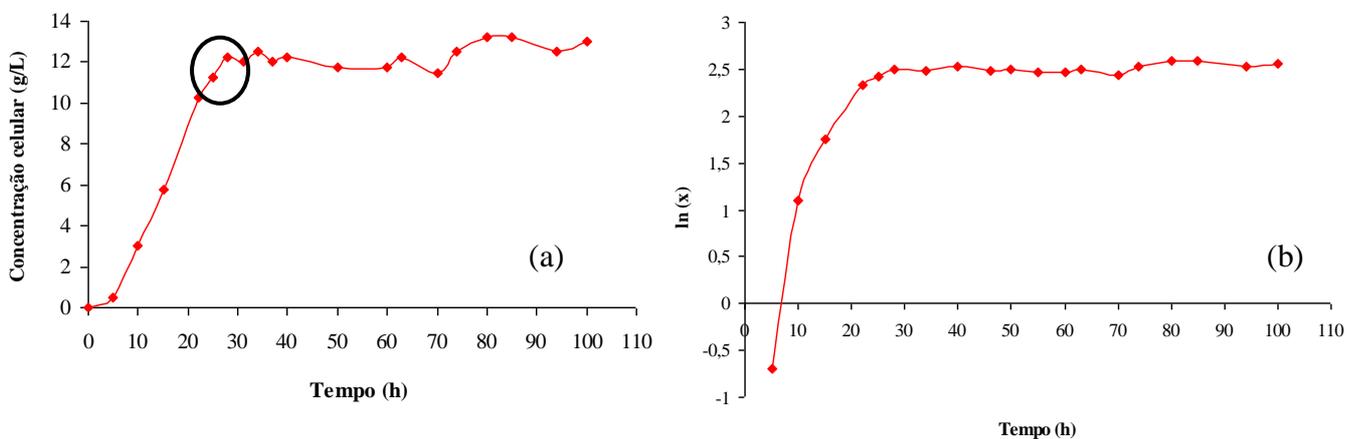


Figura 11 - Curva de crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636), durante 100 h de produção

A taxa de alimentação ocorreu a partir das 24 h de cultivo, seguindo até 84 h (Ensaio 1, 2, 3 e 5) e de 24 h até 108 h (Ensaio 4) de bioprodução (neste ensaio aumento-se o tempo de bioprodução para verificar-se o comportamento acima de 96 h de produção), sendo que o volume da alimentação do meio (Tabela 5) foi realizada a cada 12 h. Nos ensaios 1, 2, 3 e 4 utilizou-se 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol comercial; e no ensaio 5 utilizou-se 15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte e 80 g/L de glicerol bruto.

Tabela 5 – Volume de alimentação de substrato no biorreator a cada 12 h de bioprodução.

Ensaio	Volume de alimentação (mL/12 h)*
1	37,5
2	112,5
3	75
4	150
5	112,5

* Variáveis fixas: 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0.

3.3 Recuperação dos Carotenoides Totais

A extração e recuperação dos carotenoides totais foi realizada segundo método descrito por VALDUGA *et al.* (2009b), com a modificação que consiste no acréscimo de uma lavagem da célula antes da extração com 10 mL de éter etílico, para remoção do glicerol residual.

Após a bioprodução, o meio fermentado foi centrifugado a 5°C e 4478 xg por 10 min em centrífuga refrigerada (Nova Ética, modelo MT-815). Em seguida, o sobrenadante foi coletado, para análise de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol residual, e as células (5 g) foram maceradas por sucessivas vezes em graal com nitrogênio líquido (Figura 12).

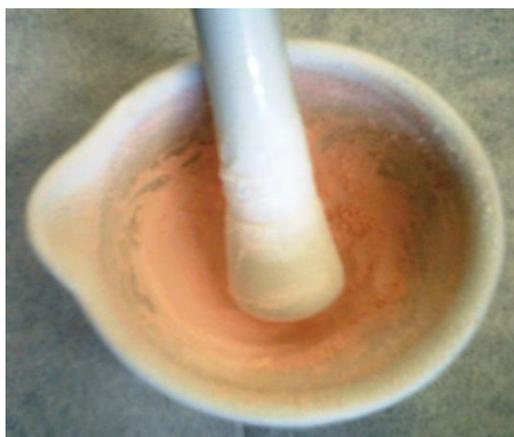


Figura 12 - Maceração das células com nitrogênio líquido.

Ao “pellet” macerado foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) na relação 2:1 (v/v) (Vetec). Em seguida os tubos foram aquecidos em banho-maria a 55 °C durante 30 min, homogeneizando-os periodicamente em vortex (Phoenix AP-56). Posteriormente foram adicionados 10 mL de solução de acetona/metanol (7:3, v/v) (Vetec e Quimex) e os tubos foram centrifugados novamente a 5°C, 4478 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e foram realizadas sucessivas extrações com acetona/metanol, até que as células não apresentassem coloração.

Posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 35°C conforme Figura 13. O pigmento foi solubilizado em metanol (Quimex) para ajuste do volume em balão volumétrico (Figura 14) e quantificação dos carotenoides totais foi realizada por espectrofotometria.



Figura 13 – Aparato para evaporação do solvente.



Figura 14 - Aspecto visual das soluções de carotenoides após extração e solubilização em metanol.

3.4 Determinações Analíticas

3.4.1 Carotenoides Totais

A absorvância dos pigmentos solubilizados foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553). A concentração total de carotenoides foi estimada pelo valor medido da absorvância a

448 nm, conforme equação (1), descrita por DAVIES (1976). O coeficiente de absorvância utilizado foi referente ao β -caroteno para o metanol: $E_{1cm}^{1\%} = 2550$ (SILVA, 2004). Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).

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

Onde: x = carotenoides ($\mu\text{g/L}$); y = volume da solução (mL); E = absorvância; $E_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de extinção específico: 2550.

3.4.2 Carotenoides Específicos

Após a obtenção dos carotenoides totais e a massa de células, realizou-se a determinação dos carotenoides específicos pela divisão da concentração (ou massa) de carotenoides ($\mu\text{g/L}$) pela concentração (ou massa) de células (g/L) (DAVIES, 1976).

3.4.3 Determinação da concentração de células

Após extração dos carotenoides, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas (4478 xg, 5 °C por 10 min) e a massa celular (g/L) foi quantificada por gravimetria em estufa (Nevoni NV- 13) a 105 °C até massa constante, conforme equação 2.

$$\text{Biomassa (g/L)} = (P_2 - P_1) * 1000 / 100 \quad (2)$$

Onde: P_2 : peso das células mais peso da placa, P_1 : peso da placa vazia.

3.4.4 pH

O pH dos meios de cultivo foram ajustados utilizando pHmetro digital (Digimed DMPH- 2) em pH 4,0 com solução de HCl 2 M.

3.4.5 Determinação da concentração de glicerol residual

O método utilizado para a determinação da concentração de glicerol foi descrito por COCKS & VAN REDE (1966). O método baseia-se na reação da amostra que contém glicerol com periodato de sódio em solução aquosa para produzir formaldeído e ácido fórmico. O ácido é quantificado por titulação da amostra com NaOH 0,125 M.

Inicialmente, preparou-se uma solução de periodato na concentração de 60 g/L. Adicionou-se 50 mL de água destilada e 10 mL de amostra em erlenmeyer (300 mL). Posteriormente, adicionaram-se 5 gotas de azul bromotinol, 1 gota de H₂SO₄ 0,4 M e NaOH 0,05 M até mudança de coloração (azul), com 100 mL de periodato. Permanecendo ao abrigo da luz (papel alumínio) por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de etilenoglicol em cada amostra e mantidos ao abrigo da luz por 20 min, após esta etapa foram adicionados 300 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram tituladas e o pH controlado (8,1 para as amostras e 6,5 para o branco). A quantidade de glicerol foi expressa em g/L, conforme equação 3.

$$\text{Glicerol (g/L)} = 9,209 \times n (T_1 - T_2) \times 10/W \quad (3)$$

Onde: M = molaridade da solução de hidróxido de sódio; T₁ = volume gasto de NaOH na amostra; T₂ = volume gasto de NaOH no branco; W = massa da amostra.

3.4.6 Carbono orgânico total (COT) e Nitrogênio total (NT)

Os teores de Carbono Orgânico Total (COT) e Nitrogênio Total (NT) foram determinados pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680 °C para COT e 720°C para NT com 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 Cinética da bioprodução e avaliação dos parâmetros estequiométricos

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato (carbono, glicerol e nitrogênio), produção celular e produção de carotenoides realizaram-se coletas de 50 mL das amostras do caldo de bioprodução a cada 12 h, para cada ensaio de biorreação conduzido, possibilitando a construção das curvas cinéticas para cada contição de cultivo.

3.5.1 Velocidades instantâneas e específicas globais

A partir dos perfis de concentração celular global, formação de produto global e consumo de substrato global (glicerol, nitrogênio e carbono orgânico) em relação ao 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_g , r_n e r_c) descritas nas equações 4 a 8 (g/L.h), conforme descritas por BAILEY & OLLIS (1986).

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

$$r_g = -\frac{dG}{dt} \quad (6)$$

$$r_n = -\frac{dN}{dt} \quad (7)$$

$$r_c = -\frac{dC}{dt} \quad (8)$$

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular naquele instante, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_g , μ_n e μ_c), que serão expressas pelas equações 9 a 13 (h^{-1}), descritas por BAILEY & OLLIS (1986):

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (9)$$

$$\mu_p = \frac{r_p}{X} \quad (10)$$

$$\mu_g = \frac{r_g}{X} \quad (11)$$

$$\mu_n = \frac{r_n}{X} \quad (12)$$

$$\mu_c = \frac{r_c}{X} \quad (13)$$

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 glicerol e produção de carotenoides.

3.5.2 Fatores de conversão global

3.5.2.1 Produto

O fator de conversão de glicerol global em carotenoides produto, $Y_{P/G}$ (μg de carotenoides/g de glicerol), foi expresso por:

$$Y_{P/G} = \frac{r_p}{r_g} = -\frac{dP}{dG} \quad (14)$$

O fator de conversão de nitrogênio global em carotenoides, $Y_{P/N}$ (μg de carotenoides/g de nitrogênio), foi expresso por:

$$Y_{P/N} = \frac{r_p}{r_n} = -\frac{dP}{dN} \quad (15)$$

O fator de conversão de carbono orgânico global em carotenoides, $Y_{P/C}$ (μg de carotenoides/g de carbono orgânico), foi expresso por:

$$Y_{P/C} = \frac{r_p}{r_c} = -\frac{dP}{dC} \quad (16)$$

3.5.2.2 Biomassa celular

O fator de conversão de glicerol global em células, $Y_{X/G}$ (g de células/g de glicerol), foi expresso por:

$$Y_{X/G} = \frac{r_x}{r_g} = \frac{dX}{dG} \quad (17)$$

O fator de conversão de nitrogênio global em células, $Y_{X/N}$ (g de células/g de nitrogênio), foi expresso por:

$$Y_{X/N} = \frac{r_x}{r_n} = -\frac{dX}{dN} \quad (18)$$

O fator de conversão de carbono orgânico global em células, $Y_{X/C}$ (g de células/g de carbono orgânico), foi expresso por:

$$Y_{X/C} = \frac{r_x}{r_c} = -\frac{dX}{dC} \quad (19)$$

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

$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = \frac{dP}{dX} \quad (20)$$

Onde:

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

r_g = velocidade de consumo de glicerol (g/L.h)

r_n = velocidade de consumo de nitrogênio (g/L.h)

r_c = velocidade de consumo de carbono orgânico (g/L.h)

r_p = velocidade de produção de carotenoides ($\mu\text{g/L.h}$)

3.5.3 Produtividade global

A produtividade global tanto em células como em carotenoides é definida, como as velocidades r_x e r_p descritas por BAILEY & OLLIS (1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização de substratos agroindustriais

A Tabela 6 apresenta os resultados da densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio dos substratos agroindustriais utilizados como componentes do meio de bioprodução de carotenoides.

Tabela 6- Resultados de densidade óptica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com e sem pré-tratamento ácido.

Tratamento	D.O	COT (mg/L)	NT (mg/L)
AMMs	0,238 ^a ± 0,001	21648,2 ^c ± 115,0	4371,3 ^a ± 428
AMMt	0,198 ^b ± 0,001	18979,8 ^b ± 482,8	3643,9 ^b ± 92,7
APA	0,125 ^c ± 0,001	743,2 ^d ± 68,5	124,8 ^d ± 0,9
Glicerol Bruto	0,009 ^d ± 0,001	434669,0 ^a ± 500,0	261,4 ^c ± 22,0

*Média ± desvio padrão, seguida de letras iguais nas colunas indicam não haver diferença significativa á nível de 5% (Teste de Tukey); AMMs – Água de maceração de milho sem pré-tratamento; AMMt – água de maceração de milho tratada, APA – Água de parboilização de arroz bruta.

Verifica-se que a água de maceração de milho pré-tratada quimicamente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à densidade óptica (DO), ao teor de carbono orgânico total (COT) e ao nitrogênio total (NT), quando comparada ao substrato sem tratamento.

O pré-tratamento ácido da água de maceração de milho acarretou perdas de 12,33 % na concentração de carbono orgânico total (COT), 16,64 % para o nitrogênio e 16,7 % para a densidade ótica. Estes resultados demonstram que o tratamento com ácido fosfórico apresentou efeito complexante de substâncias pigmentadas e de impurezas, contribuindo assim com a clarificação do substrato agroindustrial, com diminuição efetiva da densidade

ótica. BHOSALE (2004) justifica o fato, mostrando que isso ocorre devido à presença de metais pesados no meio e outros interferentes (íons, sais e etc.). Alguns destes componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção e também dificultar posterior recuperação de bioprodutos.

4.2 Bioprodução de carotenoides

Com a finalidade estudar o comportamento da levedura perante substratos agroindustriais, sintéticos e o ácido mevalônico para a bioprodução de carotenoides, ensaios prévios foram realizados empregando diferentes substratos (extrato de malte, peptona, glicerol, glicerol bruto, glicose, ácido mevalônico, água de maceração de milho tratada e água de parboilização de arroz), em produção em frascos agitados, conforme desmostrado na Tabela 7. A máxima bioprodução de carotenoides (1596 µg/L) foi observada no ensaio 7 (15 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 80 g/L de glicerol e 0,3 g/L de ácido mevalônico).

Tabela 7 - Bioprodução de Carotenoides Totais empregando diferentes substratos.

Ensaio	E. malte (g/L)	Peptona (g/L)	Glicose (g/L)	Glicerol (g/L)	AMM (g/L)	APA (g/L)	Ác. Mevalônico (g/L)	Carotenoides Totais (µg/L)
1	15	5	80	-	-	-	-	1005 ^c ± 22
2	15	5	-	80	-	-	-	1510 ^a ± 19
3	15	5	40	40	-	-	-	1323 ^b ± 22
4	-	-	-	40	40	20	-	597 ^e ± 12
5	-	-	-	80	40	20	-	573 ^e ± 11
6	-	-	20	20	20	20	-	986 ^d ± 15
7	15	5	-	80	-	-	0,3	1596 ^a ± 18

8	15	5	-	80	-	-	0,1	1564 ^a ± 18
9	15	5	-	40	-	-	-	960 ^d ± 15

*Médias (desvio padrão) seguida de letra iguais não diferem estatisticamente á nível de 95 % de confiança (Teste de Tukey); Condições fixas: 180 rpm e 25°C, pH inicial 4,0.

Assim, verificou-se que o glicerol comercial foi uma fonte de carbono interessante para a bioprodução, pois apresentou uma maior concentração de carbono, macronutriente fundamental para a célula microbiana, e baixa concentração substâncias de cor, consideradas interferentes no meio de bioprodução. SANTOS (2010) verificou que a elevação da concentração de glicerol de 10 g/L para 20 g/L, proporcionou o aumento nas taxas de formação de produto por *R. glutinis*.

Observou-se que nos ensaios que foram utilizados como substrato os resíduos agroindustriais (AMM e APA) a produção de carotenoides totais diminuiu 50% se comparada aos ensaios que utilizam extrato de malte e peptona. No ensaio 6 observou-se que a redução na quantidade de água de maceração de milho e de glicerol aumentou praticamente o dobro da produção de carotenoides quando comparado aos ensaios 4 e 5.

Baseado nos resultados obtidos em frascos agitados (Tabela 7), os experimentos em batelada alimentada serão conduzidos na condição do ensaio 2 (15 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 80 g/L de glicerol), pois a bioprodução (1510 µg/L) não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das obtidas nos Ensaios 7 e 8, considerando que nestes utilizou-se o ácido mevalônico, visando a redução dos custos de processo este não foi aplicado na pesquisa. O ácido mevalônico é um agente químico estimulante na bioprodução de carotenoides, pois é um dos principais intermediários estágios da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

4.3 Comportamento Cinético

As Figuras 15 a 19 (Tabelas 9 a 13 no Anexo), apresentam as cinéticas de crescimento celular (biomassa), da bioprodução de carotenoides, a evolução do pH e consumo dos substratos dos ensaios realizados em batelada alimentada em biorreator.

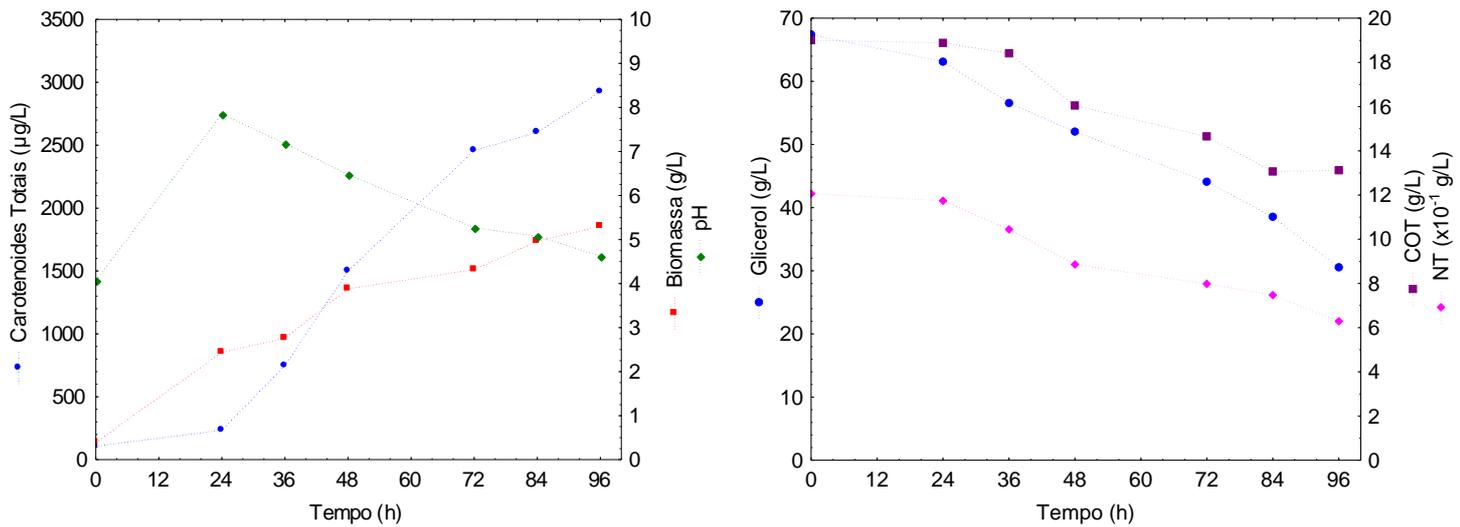


Figura 15 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 1 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 37,5 mL a cada 12h).

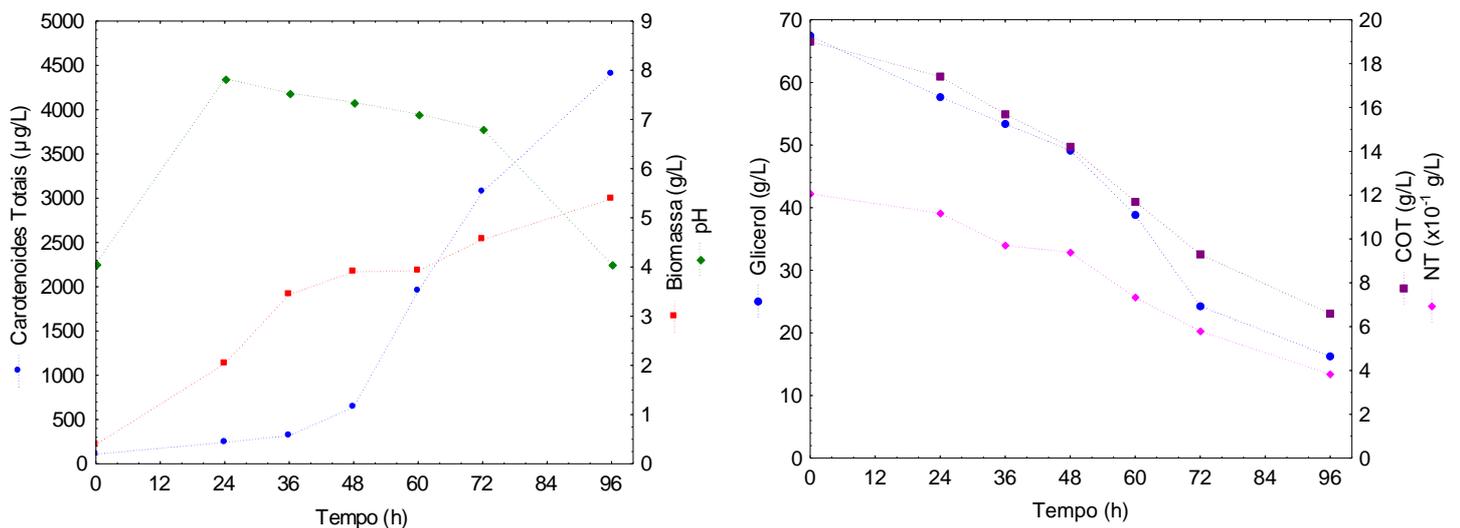


Figura 16 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 2

em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12h).

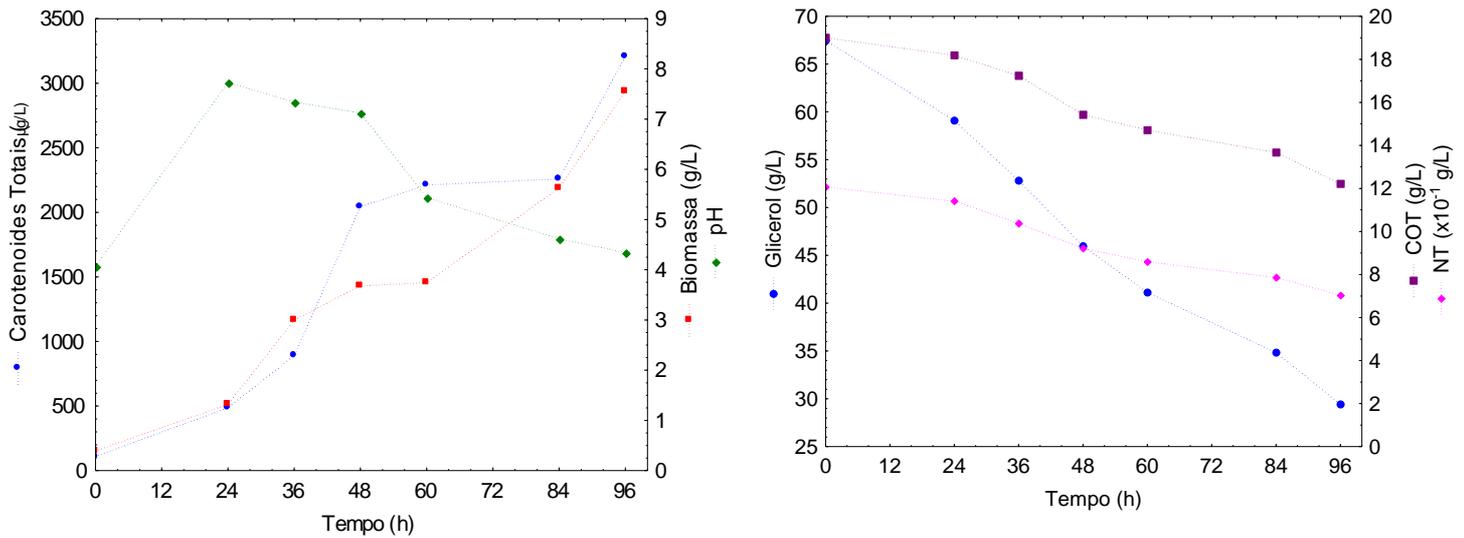


Figura 17 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 3 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 75 mL a cada 12h).

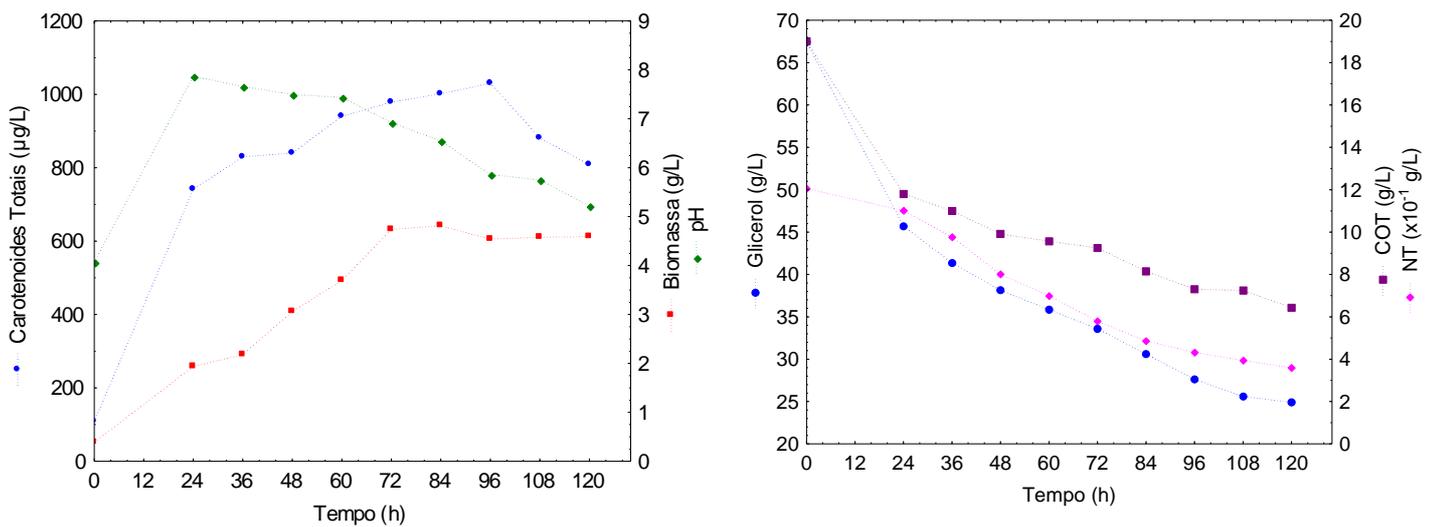


Figura 18 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 4 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 150 mL a cada 12h).

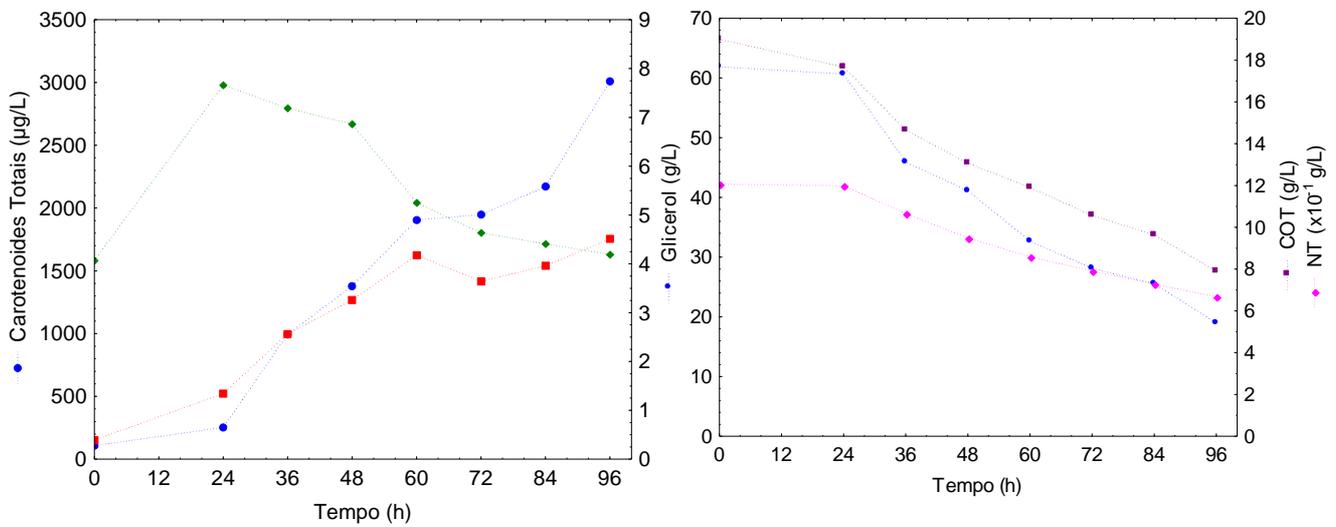


Figura 19 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, glicerol, COT e NT para o ensaio 5 em batelada alimentada (1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH 4,0, 80 g/L de glicerol bruto, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12h).

A concentração máxima de carotenoides totais foi de 4400 µg/L (ensaio 2, Figura 16), em 96 h do início da bioprodução, com uma alimentação de 112,5 mL a cada 12 h. No entanto, a mínima concentração de carotenoides totais foi de 1030 µg/L em 96 h de bioprodução (ensaio 4, Figura 18), onde se adicionou o maior volume de alimentação (150 mL) a cada 12 h. No ensaio 4 (Figura 18), também pode-se observar que a bioprodução de carotenoides totais diminui após 96 h de produção e continuou o consumo de substrato após este período.

Ao se comparar o uso dos dois tipos de glicerol, bruto e sintético, com o mesmo volume de alimentação, ao se utilizar glicerol sintético (4400 µg/L) obteve-se uma maior concentração de carotenoides totais em 96 h de bioprodução em relação ao bruto (3009 µg/L) a uma alimentação de 112,5 mL, isto pode ser explicado por não se ter realizado o pré-tratamento do glicerol bruto, caso isso ocorresse este valor poderia ser maior, porém este valor utilizando o glicerol bruto é superior aos outros ensaios realizados em batelada

alimentada, podendo ser explicado devido a ricos componentes presentes neste resíduo. Ao correlacionar a produção de carotenoides em batelada alimentada (Ensaio 2, Figura 16 - alimentação no final da fase exponencial e a cada 12 h adição de 112,5 mL dos substratos) com a obtida em frascos agitados (Tabela 7), verifica-se que houve um incremento de 66 % na bioprodução.

No entanto, ao comparar a produção em batelada alimentada com a obtida em batelada simples (VALDUGA et al, 2009) em biorreator (80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de aeração 1,5 vvm, 180 rpm, 25 ° C , pH inicial de 4,0 e 90 h), o aumento no rendimento foi de aproximadamente 22 % .

VALDUGA et al. (2008) obtiveram teor máximo de carotenoides de 1019 µg/L com o cultivo de *S. salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados com concentrações de glicose de 40 g/L, extrato de malte de 10 g/L e peptona de 14 g/L), 180 rpm, pH inicial 4,0 e temperatura a 25°C. Ao utilizarem substratos agroindustriais (água de maceração de milho e melão de cana de açúcar) pré-tratados com ácidos a produção foi de 541,5 µg/L, porém quando os substratos foram pré-tratados com carvão ativo, a máxima concentração de carotenoides totais obtida foi de 208,6 µg/L.

CABRAL et al. (2011) relataram que a concentração máxima de carotenoides totais por *S. pararoseus* foi de 852 µg/L, em meio composto de 60 g/L of glicose, 15 g/L de peptona e 15 g/L de extrato de malte. RIBEIRO (2011) otimizou a bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, obtendo-se um teor de máximo de carotenoides totais de 843 µg/L com concentração de 40 g/L de glicerol, 40 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz, 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0.

SAENGE et al. (2011) em fermentação em batelada alimentada por *R. glutinis* TISTR 5159 (alimentação começou no meio da fase exponencial e a cada 12 h para manter a concentração de glicerol era adicionado 50 mL de glicerol bruto até completar 48 h de

fermentação), obteve um incremento de aproximadamente 13 % na produção de carotenoides em relação à batelada simples (135,25 mg/L contrastado com a batelada simples onde se obteve uma produção de carotenoides de 117,38 mg/L). CHOCIAI (2002) obteve no cultivo da levedura *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina, (após 48 e 72 h de alimentação), um incremento de 43 % contra o cultivo controle.

TATSCH (2008) no estudo da produção de carotenoides em biorreator por *S. salmonicolor* a concentração máxima (3426 µg/L) foi obtida em aproximadamente 90 h do início da biorreação, sendo que a partir de 60 h, o aumento da concentração de carotenoides foi baixo. CABRAL (2010) relatou que a concentração máxima de carotenoides totais (852 µg/L) foi obtida em 102 h do início da bioprodução. RIBEIRO (2011) otimizou a bioprodução de carotenoides por *S. pararoseus*, obtendo-se um teor de máximo de carotenoides totais de 843 µg/L com concentração de 40 g/L de glicerol, 40 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz, 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial e a evolução do mesmo é objeto de estudo na produção de carotenoides. Ao se observar as Figura 15 a 19, verifica-se comportamento semelhante, independente do volume de alimentação de substrato, onde ocorreu um aumento de pH (7,66 a 7,87) nas primeiras 24 h de bioprodução. Após este período um decréscimo progressivo foi observado, atingindo ao final da bioprodução valores próximos a 4,0. Constatou-se, também, que a maior produção de caratenoides totais em batelada alimentada foi obtida no menor valor de pH (4,06), no ensaio 2 (Figura 16) nas 96 h de bioprodução.

O aumento do pH nas primeiras horas de bioprodução também foi verificado por VALDUGA et al. (2009d) ao utilizar substratos agroindustriais (água de maceração de milho,

melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), sendo que a evolução foi progressiva de 4,2 para 7,5 nas primeiras 30 h e após 96 h ocorreu uma elevação no pH para 8,5, mantendo-se até o final da bioprodução (120 h). Os autores atribuem o aumento progressivo do pH, mesmo após as 24 h de bioprodução, ao fenômeno que ocorre após esgotamento completo do substrato, ocasionando também à proteólise do micro-organismo. Este fato não foi verificado no presente estudo, pois a alimentação dos substratos ocorreu a cada 12 h de bioprodução.

De acordo com FRENGOVA et al. (1994) a biossíntese de carotenoides ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação e na fase final da bioprodução o pH permanece praticamente constante.

No estudo de TATSCH (2008), o pH inicial ótimo para o crescimento celular e concentração de carotenoides totais em biorreator por *S. salmonicolor* CBS 2636 em meio sintético variou de 4,0 a 5,0, enquanto que para maximizar a produção específica de carotenoides os valores foram próximos a 3,0.

A bioprodução de carotenoides pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 apresenta formação de carotenoides associada ao crescimento celular na fase exponencial (Figuras 15 a 19). No ensaio 3 (Figura 17), com volume de alimentação de 75 mL a cada 12 h, foi verificada a maior concentração de células (7,55 g/L) em 96 h de bioprodução. Esta alta concentração se deve à batelada alimentada, pois quando se alimenta substratos adicionais, incluindo o glicerol e fonte de nitrogênio, as células podem utilizar mais glicerol e conseqüentemente se reproduzirem mais facilmente. Porém, elevada concentração de massa celular (Figura 17), não foram convertidos em maior produção de carotenoides totais (3205 µg/L), ou seja, a produção específica foi menor.

Em estudo para determinar o potencial de leveduras vermelhas oleaginosas *R. glutinis* para a bioconversão de glicerol bruto da usina de biodiesel em lipídeos e carotenóides em

biorreator, observou-se que quando a fermentação em batelada alimentada foi aplicada se obteve a maior biomassa, teor de lipídeos, produtividade de lipídios e produção de carotenoides de 10,1 g/L, 61 %, 6,1 g/L e 135,2 g/L, respectivamente, sendo a produção de carotenoides foi 2,1 vezes superiores aos da condição otimizada (SAENGE, et al., 2011).

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

Em estudo semelhante em biorreator (batelada simples) para a maximização da produção de carotenoides com *S. salmonicolor* CBS 2636, VALDUGA et al (2011) 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 MARCH (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 (pH = 6), onde a produção máxima de pigmentos foi geralmente observada no final da fase exponencial de crescimento.

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).

A maior produção de carotenoides específicos (817,1 µg/g) foi encontrada no ensaio 2 (Figura 16) em 96 h de produção, onde nesta mesma condição se obteve a maior produção de carotenoides (4400 µg/L). VALDUGA et al., (2011) otimizaram a produção de carotenoides específicos (313,8 µg/g) por *S. salmonicolor* CBS 2636 em biorreator, em meio composto por 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de aeração 1,5 vvm, 180 rpm, 25 ° C , pH inicial de 4,0 e 90 h de bioprodução. No entanto em frascos agitados, o extrato de malte influenciou significativamente ($p < 0,05$) na produção específica de

carotenoides por *S. salmonicolor* CBS 2636, com produção específica de carotenoides de 287,7 µg/g (VALDUGA et al., 2007).

Avaliando leveduras brasileiras pigmentadas, MALDONADE 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. BUZZINI et al., (2005), em estudo com a levedura *S. salmonicolor* CBS 490, obtiveram uma produção de carotenoides totais de 613,3 µg/L, e carotenoides específicos de 34,7 µg/g em frascos agitados.

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

Verifica-se pelas Figuras 15 a 19 que houve um consumo constante de nitrogênio total, carbono orgânico total (COT) e glicerol ao longo do processo, constatado pelo declínio das concentrações de carbono orgânico total e nitrogênio durante toda a bioprodução. Este comportamento sugere que as células provavelmente consomem a fonte de carbono do glicerol e que não ocorreu a lise celular e proteólise sob condições de estresse, pois a quantidade de nitrogênio solúvel não aumentou. Pode-se verificar ainda que houve maior consumo de nitrogênio (68 %) e de carbono orgânico total (65 %) no ensaio 2 (Figura 6 e Tabela 8) com 96 h de bioprodução. Porém, os menores consumos de nitrogênio (~42 %) e de carbono orgânico total (~31 %) foram verificados nos ensaio 3 (Figura 17), com o segundo menor volume de alimentação (75 mL), e ensaio 1, com o menor volume de alimentação (37,5 mL), respectivamente.

Tabela 8 – Consumo de substrato ao longo da bioprodução em batelada alimentada depois de 96 h.

Ensaio	COT (%)	NT (%)	Glicerol (%)
Inicial	19 g/L	1,2 g/L	67,4 g/l
1	31	48	55
2	65	68	76
3	36	42	56
4	62	64	59
5	58	45	69

RIBEIRO (2011) constatou um aumento acentuado no consumo de nitrogênio total e carbono orgânico total após 8 h de produção, chegando à 16 h de produção com consumo de 47 % de nitrogênio total e 27 % de carbono orgânico total. Comportamento semelhante foi verificado, também, em outros estudos (SANTOS, 2010; SCHWARTZ, 2010) onde houve um consumo constante de carbono e nitrogênio durante o processo, sendo mais acentuado no início da bioprodução.

O constante consumo de glicerol durante a bioprodução está relacionado diretamente com o tempo de bioprodução e fase de crescimento microbiano. E esse crescimento pode ser afetado pela ausência de micronutrientes essenciais para o metabolismo celular. Observando-se as Figuras 15 - 19, nota-se que a taxa de consumo de glicerol foi aumentando ao longo da bioprodução em todos os ensaios. Ao final das 96 h de bioprodução no ensaio 2 (Figura 16) foi observado o maior consumo de glicerol (76 %), sendo o menor consumo (55 %) verificado no ensaio 1 (Figura 15), podendo ser devido aos baixos níveis de glicerol presentes no ensaio com menor volume de alimentação.

RIBEIRO (2011) observou que o consumo de glicerol (16 g/L) foi mais intenso nas primeiras 16 h e após esse período observou-se um pequeno consumo de glicerol com o

tempo, que após 96 h de bioprodução manteve-se praticamente constante, e ao final das 120 h de bioprodução foi observado um consumo total de 43 %. SAENGE (2011) constatou que o consumo de glicerol foi melhorado na batelada alimentada quando comparada com a batelada simples. SANTOS (2010) observou que a glicerina bruta foi quase completamente consumida durante a bioprodução. Já com glicerina P.A foi obtido um consumo menor, devido à ausência ou menor concentração de micronutrientes que poderiam ter favorecido o crescimento microbiano. KUSDIYANTINI (1998) verificou um consumo de glicerol superior a 50 % (40 g/L a 19,6 g/L), na produção de astaxantina em fermentação em batelada por *P. rhodozyma*.

4.4 Parâmetros estequiométricos

A Figura 20 mostra a produtividade em carotenoides dos cinco ensaios realizados.

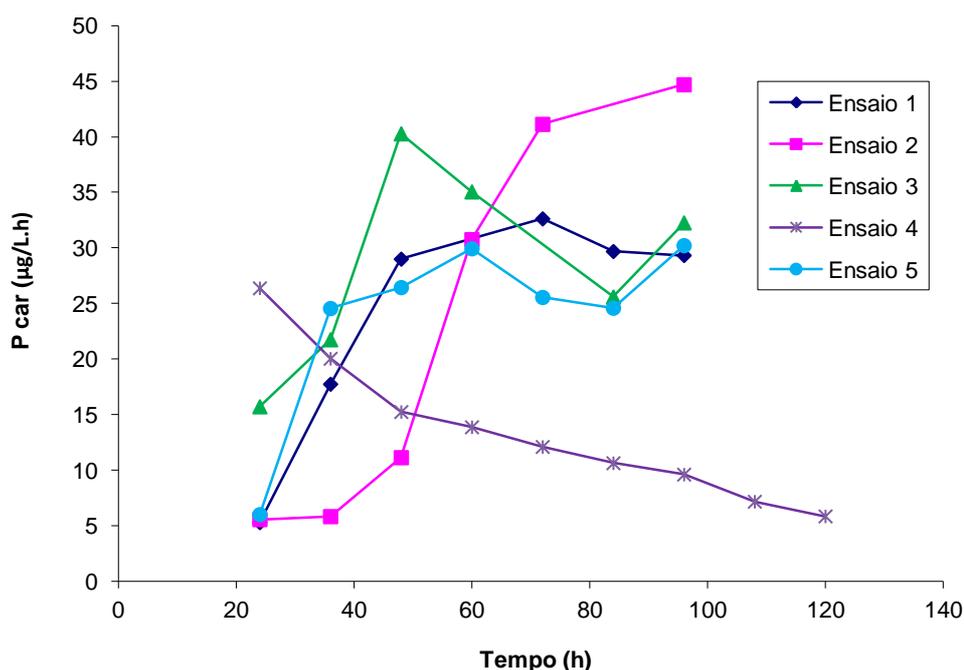


Figura 20 - Produtividade em carotenoides global (Pcar) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos ensaios 1 (37,5 mL), ensaio 2 e ensaio 5 (112,5 mL), ensaio 3 (75 mL) e no ensaio 4 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e de 96 a 120 h.

No ensaio 1 observa-se que até 72 h ocorreu aumento da produtividade em carotenoides, obtendo-se um máximo de 29,7 $\mu\text{g/L.h}$, e a partir deste ponto ocorreu decréscimo da produtividade até o final da biorreação. Para o ensaio 2 nota-se que até 96 h ocorreu o aumento da produtividade, obtendo-se um máximo de 45 $\mu\text{g/L.h}$. Para o ensaio 3 observa-se que até 48 h ocorreu aumento da produtividade em carotenoides, obtendo-se um máximo de 40,3 $\mu\text{g/L.h}$, a partir deste ponto ocorreu decréscimo da produtividade até 84 h e um pequeno acréscimo até 96 h de biorreação.

Já no ensaio 4 observa-se o máximo produtividade em carotenoides ocorreu em 24 h (26,4 $\mu\text{g/L.h}$), a partir deste ponto ocorreu decréscimo da produtividade até o final da biorreação, isto pode ter ocorrido devido a diminuição da taxa de transferência do oxigênio, pois a alimentação de substrato elevada a cada 12 h influencia na diminuição da área superficial do meio dentro do biorreator e conseqüentemente diminui a produtividade (BRANCO et al., 2010). No ensaio 5 nota-se que a máxima produtividade em carotenoides ocorreu em 96 h, obtendo-se 30,2 $\mu\text{g/L.h}$, produtividade inferior ao se comparar com o ensaio 2 que utiliza as mesmas condições mas com glicerol puro, isto pode ter ocorrido devido ao glicerol bruto conter algum inibidor para a produção, já que este não foi pré-tratado. SCHWARTZ (2010) observou 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.

A Figura 21 mostra a relação entre a produção de carotenoides e a produção de células dos ensaios realizados ao longo da bioprodução.

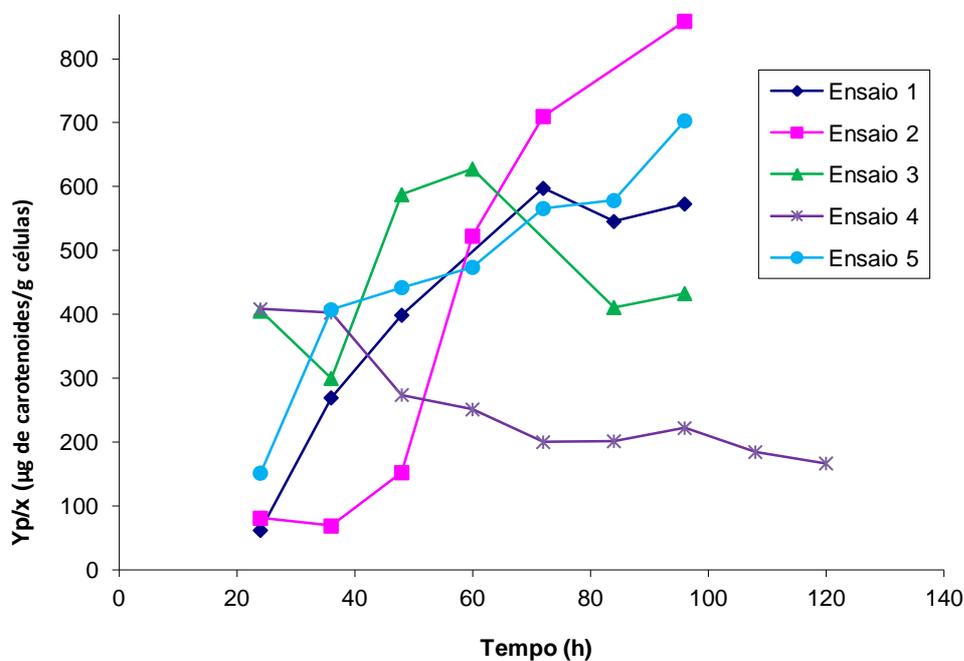


Figura 21 – Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células ($Y_{p/x}$) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos ensaios 1 (37,5 mL), ensaio 2 e ensaio 5 (112,5 mL), ensaio 3 (75 mL) e no ensaio 4 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e de 96 a 120 h.

De acordo com a Figura 21 o fator $Y_{P/X}$ máximo de 859 $\mu\text{g}/\text{g}$ foi obtido no ensaio 2 com 96 h de bioprodução. Valor este superior ao observado por SCHWARTZ (2010) em biorreator com batelada simples, utilizando as mesmas condições operacionais, onde foi obtida uma conversão de 390 $\mu\text{g}/\text{g}$ e por VALDUGA *et al.*, (2009) em frascos agitados, onde foi obtida uma conversão 572,2 $\mu\text{g}/\text{g}$ na segunda fase de cultivo (desaceleração). 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. O $Y_{P/X}$ no ensaio 4 só decresceu ao longo da bioprodução, isto pode ser relacionado a maior alimentação de substratos e ao baixo valor de produção de carotenoides totais e de biomassa.

Segundo LUNA-FLORES (2010) se $Y_{P/X}$ diminui ao longo da bioprodução isto se deve ao excesso de substrato no meio e falta de células para convertê-los em carotenoides.

As Figuras 22-26 apresentam a evolução da velocidade específica de crescimento global (μ_x) e da produtividade em célula global (P_x) durante a bioprodução nos ensaios realizados.

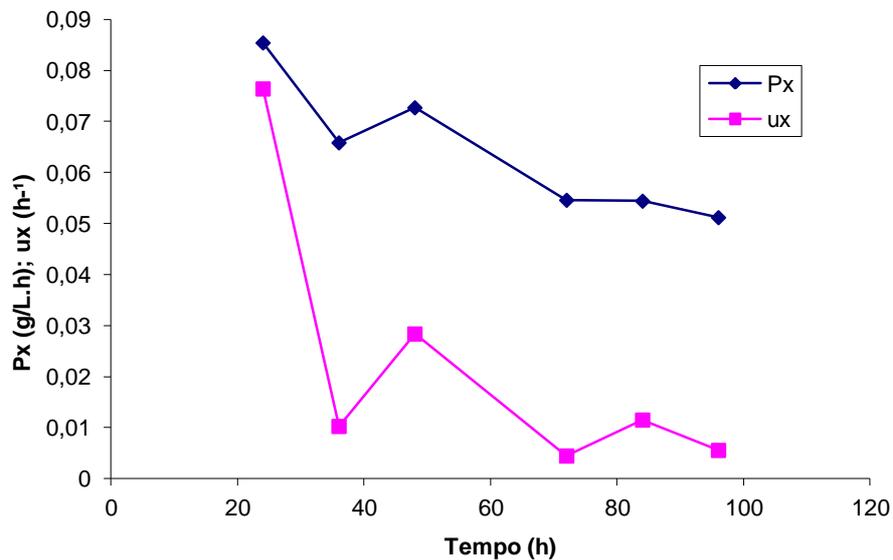


Figura 22 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e 96 h).

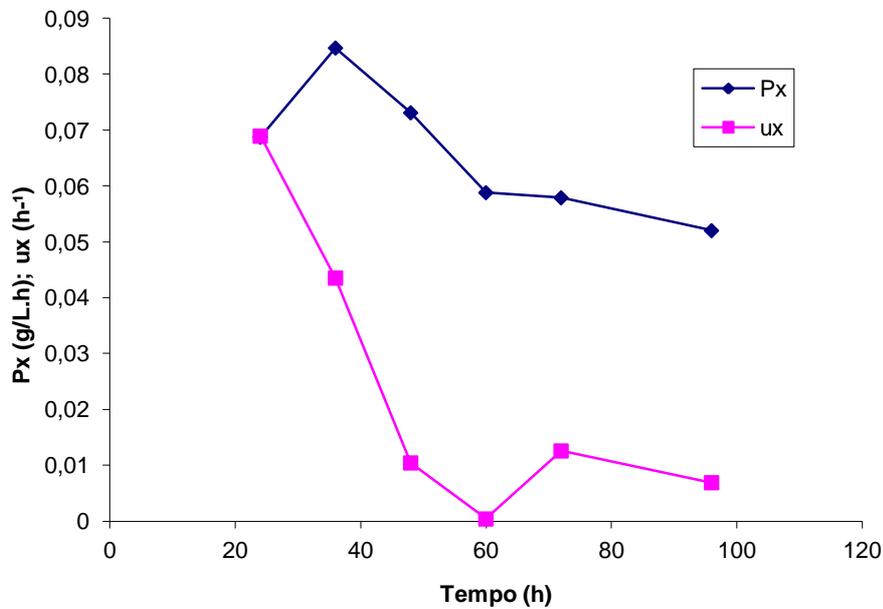


Figura 23 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

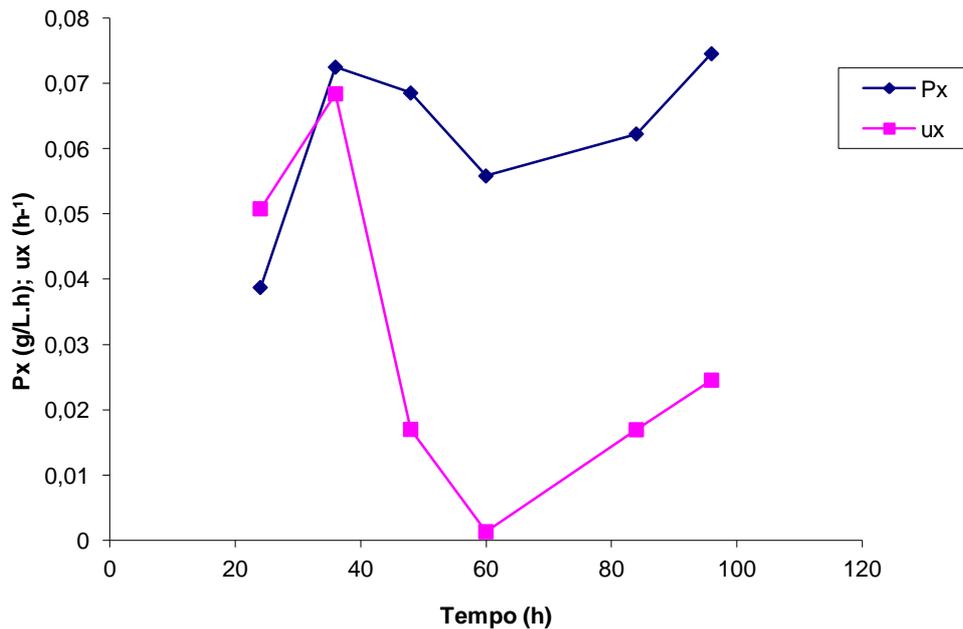


Figura 24 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

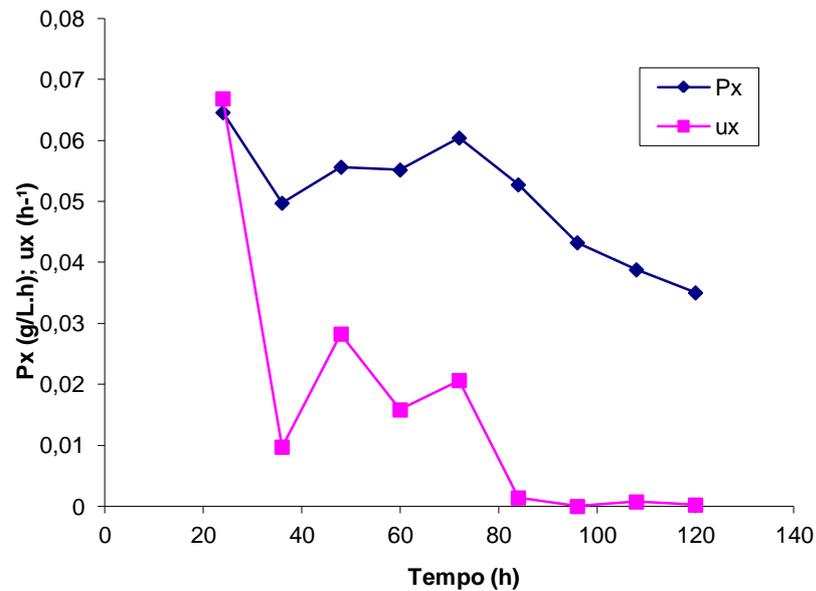


Figura 25 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 120 h).

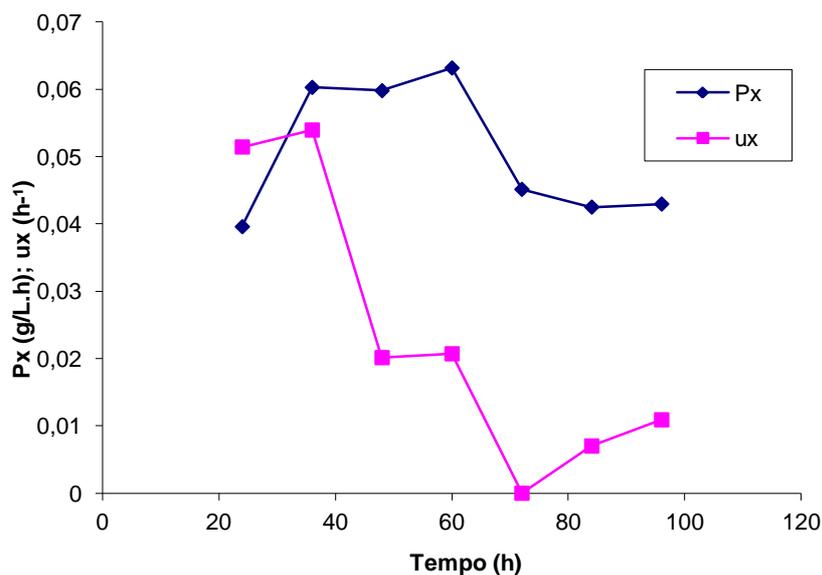


Figura 26 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

Observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi $0,05 \text{ h}^{-1}$ no ensaio 1 (Figura 22). A produtividade em células máxima (P_x) é de $0,085 \text{ g/L.h}$ nos ensaios 1 e 2 (Figuras 22 e 23). Em condição de abundância de substrato, os microrganismos crescem com velocidade máxima (μ_{\max}). Quando o substrato deixa de estar em abundância, μ diminui, até atingir o valor zero quando a concentração de substrato no meio se esgota totalmente. Observou-se este comportamento em torno de 60 h–70 h de bioprodução, dependendo do ensaio, onde nesta faixa as células consumiam todo o substrato porém não o transformavam em máxima produção de carotenoides. Logo após este período a velocidade específica aumenta devido ao acréscimo de substrato a reação.

SCHWARTZ (2010) em biorreator com batelada simples, no ponto otimizado, obteve a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) de $0,0456 \text{ h}^{-1}$ e a produtividade em células máxima (P_x) de $0,90 \text{ g/L.h}$, e a produtividade em carotenoides totais máxima de $56,0 \text{ } \mu\text{g/L.h}$.

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 27 a 31 apresentam os fatores de conversão de glicerol, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total em carotenoides.

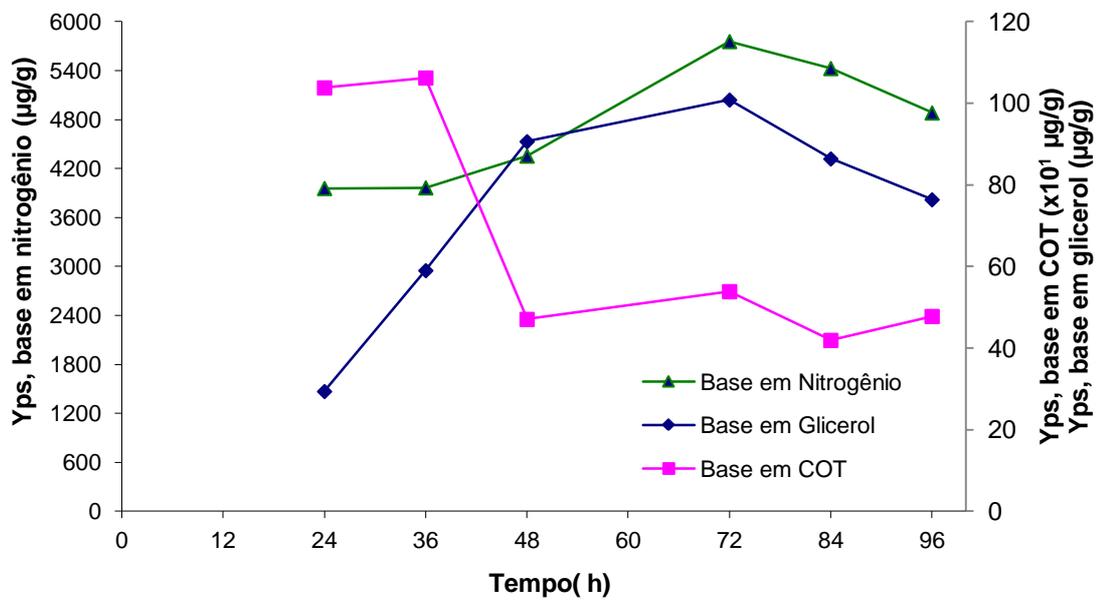


Figura 27 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

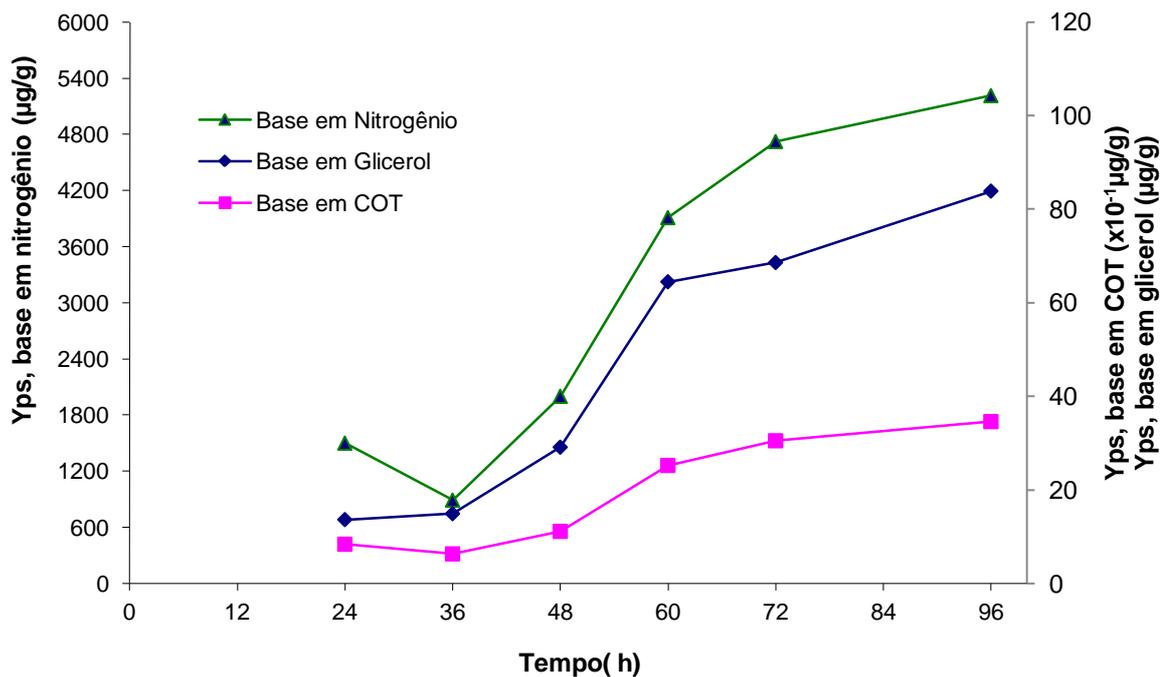


Figura 28 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

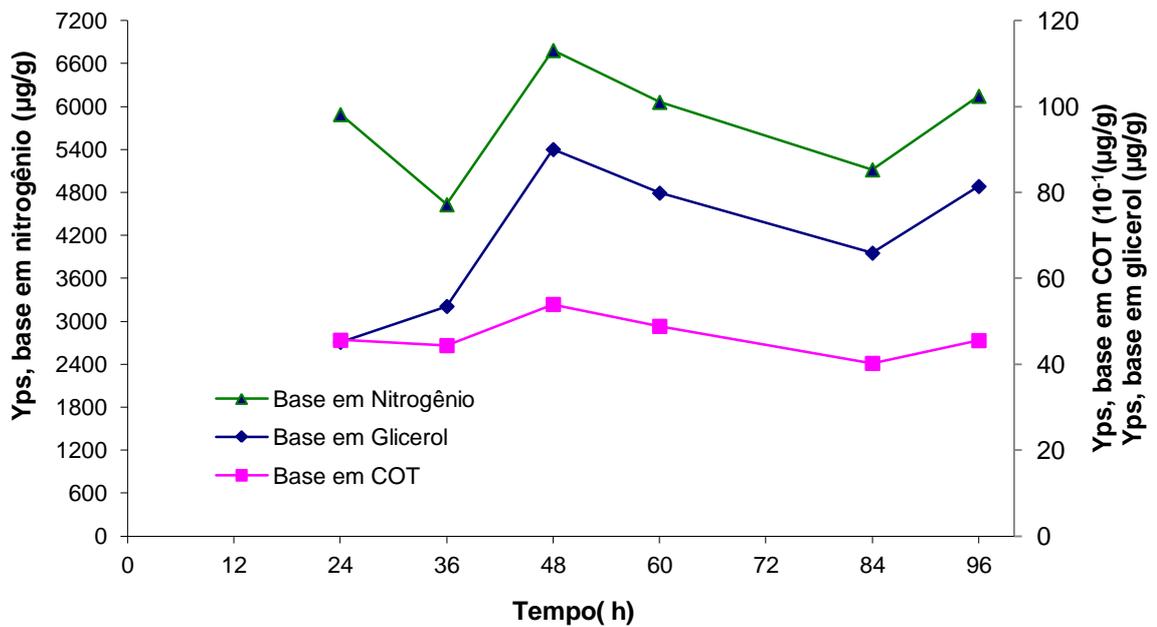


Figura 29 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e 96 h).

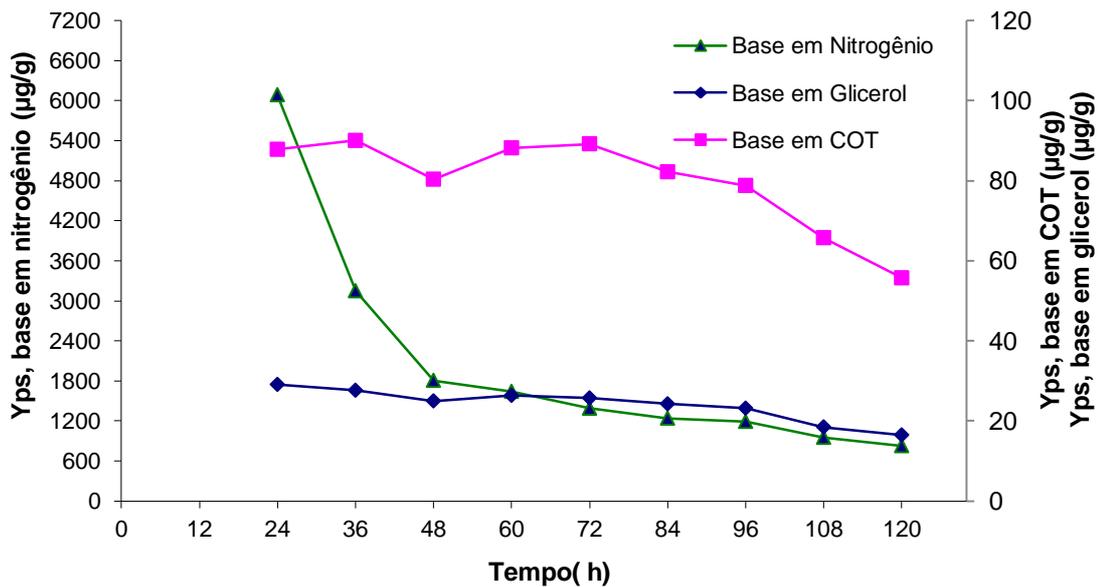


Figura 30 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e 120 h).

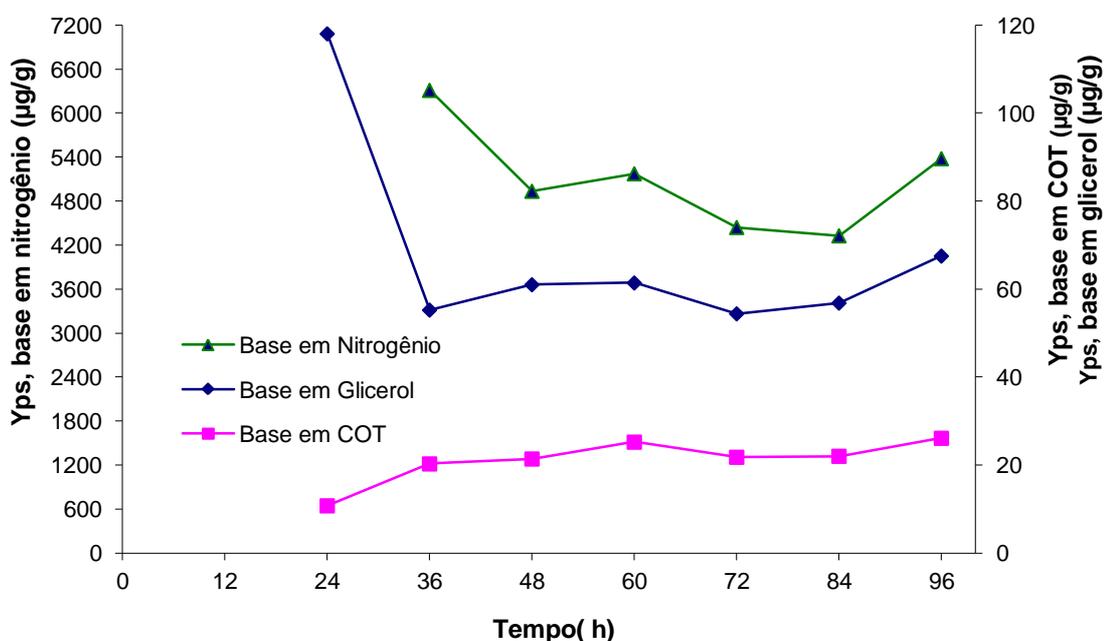


Figura 31 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e 96 h).

O maior fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides foram obtidos no ensaio 1 com 72 h de bioprodução (100,8), no ensaio 1 em 36 h de bioprodução (1062,3) e no ensaio 3 em 48 h de bioprodução (6783,4), respectivamente. Nota-se que elevados volumes de substrato adicionados na bioprodução ocasionou uma queda constante no fator de conversão de todos os substratos, devido menor taxa de transferência de oxigênio (BRANCO, et al., 2010), isto também explica o comportamento distinto entre os ensaios, onde neste caso o biorreator apresentava volume de 2 L, quando se adicionou o maior volume de alimentação, no ensaio 3, a taxa de transferência de oxigênio deve ter diminuído consideravelmente devido a diminuição da área interna e superficial do biorreator. A diminuição na concentração de células pode ter ocorrido devido o aumento da diluição no momento da alimentação e consequentemente maior diluição do produto neste momento.

No ensaio 2 observa-se que os fatores de conversão de glicerol, COT e NT aumentam constantemente durante a produção comprovando assim a maior produção de carotenoides totais (4400 $\mu\text{g/L}$).

As Figuras 32 a 36 mostram a conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células.

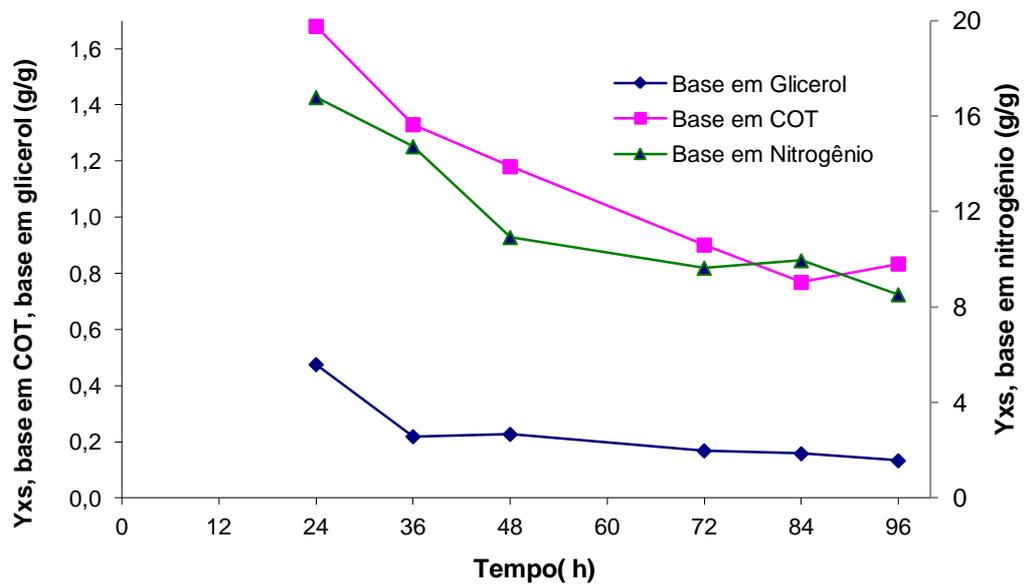


Figura 32 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (alimentação de 37,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

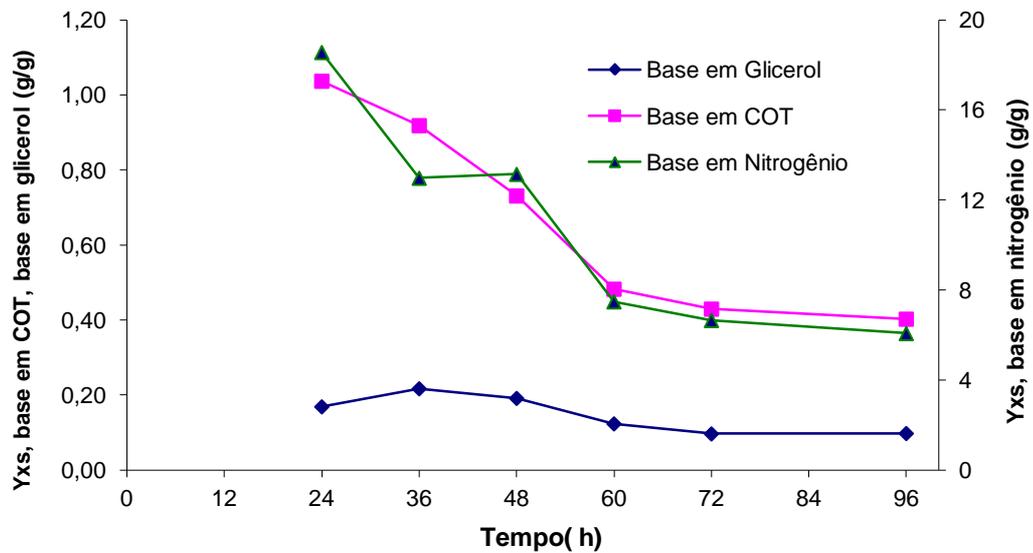


Figura 33 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 2 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

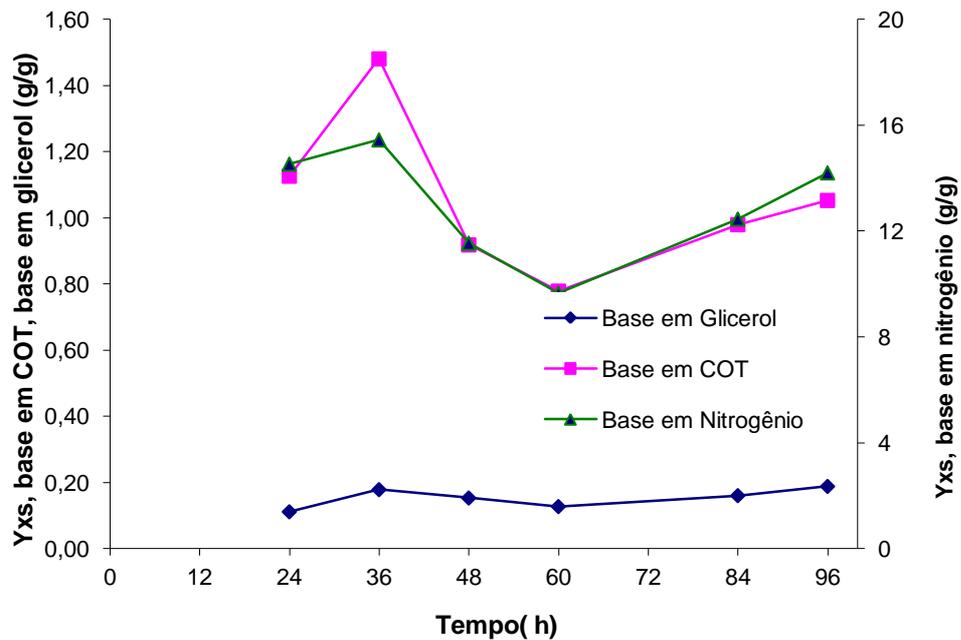


Figura 34 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 3 (alimentação de 75 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

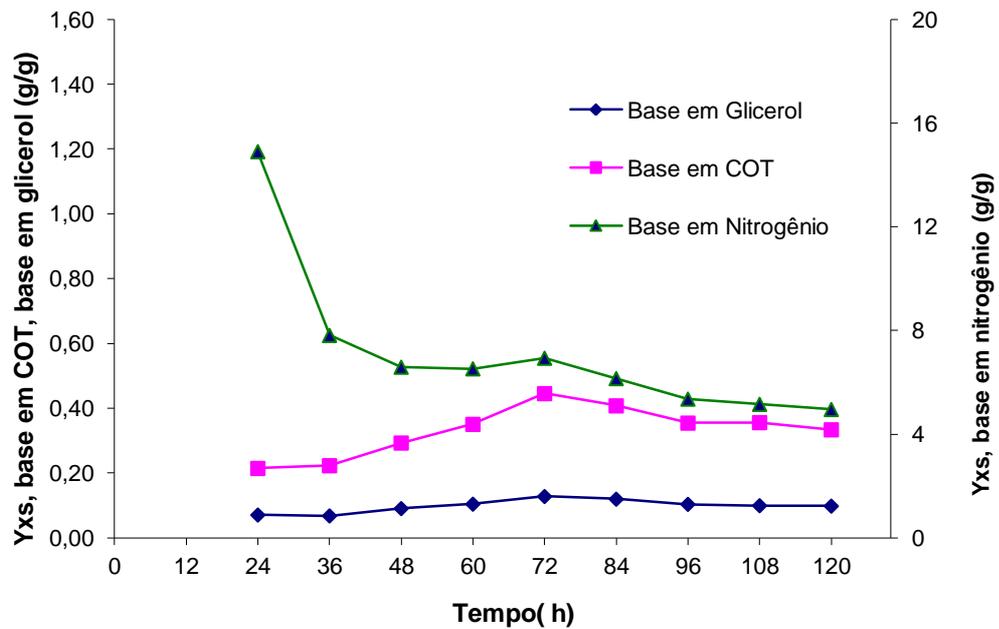


Figura 35 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 4 (alimentação de 150 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 120 h).

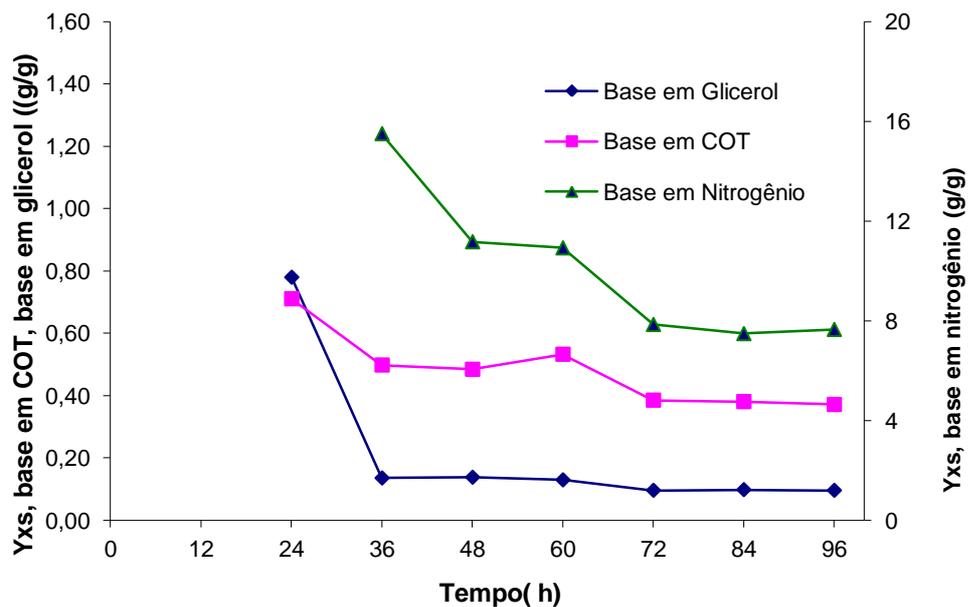


Figura 36 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 5 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e 96 h).

Nas Figuras 32 a 36 observa-se comportamento semelhante em todos os ensaios, onde ao final da bioprodução o fator de conversão permanece praticamente constante, exceto no Ensaio 3 que ocorre um pequeno aumento. O maior fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células foi obtido no ensaio 1 em 24 h de bioprodução (0,48), no ensaio 1 em 24 h (1,68) e no ensaio 5 em 24 h de bioprodução (135,71), respectivamente.

Nessa diminuição considerável, nota-se que muito substrato é consumido gerando poucas células, isso pode ser um indicativo de alguma bioconversão para outros produtos ou uma mudança muito forte no mecanismo.

A Tabela 9 apresenta os maiores parâmetros cinéticos e estequiométricos globais do processo de bioprodução de carotenoides em processo de batelada alimentada pelo micro-organismo *S. salmonicolor*.

Tabela 9 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em batelada alimentada dos ensaios em batelada alimentada

Parâmetros	Valor máximo obtido	Ensaio	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/G}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicerol)	101	1	72
$Y_{X/G}$ (g/g) (Base em glicerol)	0,78	5	24
$Y_{P/C}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	1062	1	36
$Y_{X/C}$ (g/g) (Base em COT)	1,68	1	24
$Y_{P/N}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em nitrogênio)	6783	3	48
$Y_{X/N}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	18,56	2	24
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	859	2	96
P_x (g/L.h)	0,085	1 e 2	36
μ_x (h^{-1})	0,05	2	-

Observa-se através da Tabela 9 que a maioria dos fatores de conversão ocorreram nas primeiras 24 h de bioprodução, nesta faixa observou-se também a maior elevação do pH (de 4 para 7,8) que resultou devido ao grande consumo da quantidade de substratos ocasionando a

proteólise do Mo, por isso que o fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio em célula e o fator de conversão de COT em produto foram maiores nas primeiras 24 h. Comparando os valores obtidos em frascos agitados com meio sintético (VALDUGA *et al.*, 2009), em biorreator em meio sintético SCHWARTZ (2010) com os obtidos neste estudo comprovam que a diferenciação dos fatores de conversão evidencia o comportamento distinto do crescimento celular e consumo de substratos em frascos agitados e no biorreator.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

1. Nos ensaios em frascos agitados obteve-se máxima produção de carotenoides de 1596 $\mu\text{g/L}$ no ensaio 7 (15 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de malte, 80 g/L de glicerol e 0,3 g/L de ácido mevalônico), mas como este ensaio não diferiu estatisticamente do ensaio 2 (1510 $\mu\text{g/L}$), com as mesmas condições, porém sem ácido mevalônico, mostrando assim a não necessidade do ácido mevalônico como indutor da biossíntese para este micro-organismo, obteve-se trabalhar em batelada alimentada com o Ensaio 2 visando redução de custo.
2. O teor máximo de carotenoides totais foi de 4400 $\mu\text{g/L}$ obtido no Ensaio 2, em 96 h, com 80 g/L de glicerol, 5 g/L de peptona, 15 g/L de extrato de malte, aeração de 1,5 vvm, agitação de 180 rpm, temperatura de 25 °C, pH inicial 4,0 e um volume de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h;
3. O Ensaio 3 destaca-se pela utilização de glicerol bruto, onde obteve-se o teor máximo de carotenoides totais de 3009 $\mu\text{g/L}$, em 96 h de biprodução, podendo este ser utilizado como substrato para a produção de carotenoides.
4. A bioprodução de carotenoides pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 apresenta formação de carotenoides associada ao crescimento celular na fase exponencial;
5. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) para *S. salmonicolor* em biorreator é de 0,05 h^{-1} com uma produtividade máxima em células de 0,085 g/L.h;
6. O fator de conversão de carbono orgânico total (COT) em células ($Y_{X/C}$) foi de 1,68 g/g (Ensaio 1 em 24 h), o fator de conversão de glicerol em células ($Y_{X/G}$) foi de 0,78 g/g (Ensaio 5 com 24 h). A produção específica de carotenoides ($Y_{P/X}$) foi de 859,1 μg de carotenoides/g de células no Ensaio 2 com 96 h, o fator de conversão de carbono em produto ($Y_{P/C}$) foi de 1062 $\mu\text{g/g}$ (Ensaio 1 com 36 h), enquanto que o fator $Y_{P/G}$ foi de 101 $\mu\text{g/g}$ (Ensaio 1 com 72

h) e o fator de conversão de nitrogênio total em produto ($Y_{P/N}$) foi de 6783 $\mu\text{g/g}$ (Ensaio 3 com 48 h), enquanto que o fator $Y_{X/N}$ foi de 18,56 g/g (Ensaio 2 com 24 h).

7. A bioprodução em batelada alimentada (4400 $\mu\text{g/L}$) conduziu a um aumento na concentração de carotenoides totais de 1,33 vezes se comparada à batelada simples (1510 $\mu\text{g/L}$).

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1. Avaliar a suplementação com minerais com um possível efeito estimulador ou inibidor da carotenogênese;
2. Realizar bioprodução com pH controlado e obter parâmetros estequiométricos verificando a possibilidade de alterações no pH durante a bioprodução;
3. Avaliar os efeitos da luminosidade sobre o crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenoides;
4. Cultivar *S. salmonicolor* (CBS 2636) em cultivo contínuo e semi-contínuo, e avaliar a possibilidade de reciclo de células, a fim de aumentar o rendimento de carotenoides totais;
5. Identificação e caracterização dos carotenoides;
6. Avaliar novas metodologias para extração de carotenoides;
7. Modelagem matemática do processo otimizado;
8. Realizar o pré-tratamento do glicerol bruto antes de utilizá-lo na bioprodução.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. **Letters Applied Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 240-242, 2001.

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

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

ALCANTARA, S.; SANCHEZ, S. Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 697-700, 1999.

AMARTEY, S. A.; LEUNG, J. P. C. Corn Steep Liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus Stearothermophilus* T-13, **Macedonian journal of chemistry and chemical engineering**, p. 65-71, 2000.

AMATO, G.W.; SILVEIRA FILHO, S. Parboilização de arroz no Brasil. **CIENTEC**, 91p. il, 1991.

ANGELUCCI, E. Corantes naturais versus corantes artificiais: vantagens e desvantagens. In: **Seminário de corantes naturais para alimentos**, p. 8-10, 1989.

ANVISA. Legislação/Alimentos. Resolução nº 382, de 05 de agosto de 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos.html>>. 2003 2001.

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

ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WESTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, n. 2, p. 151-167, 2002.

AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 2169-2173, 1997.

BAE, S.M.; PARKA, Y.C.; LEEA, T.H.; KWEONA, D.H.; CHOI, J.H.; KIMB, S.K.; RYUC, Y.W.; SEOA, J.H. Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 545–549, 2004.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, **McGraw- Hill Book Company**, 2ed., p. 984, 1986.

BAILLY, J. D.; QUERIN, A.; LE BARS-BAILLY, S.; BENARD, G.; GUERRE, P. Citrinin production and stability in cheese. **Journal of food protection**, v. 65, n. 8, p. 1317-1321, 2002.

BALDERMANN, S.; KATO, M.; KUROSAWA, M.; KUROBAYASHI, Y.; FUJITA, A.; FLEISCHMANN, P.; WATANABE, N. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. **Journal of experimental botany**, v. 61, p. 2967-2977, 2010.

BAUERNFEIND, J. C.; ADAMS, C. R. MARUISICH, W. L. Carotenes and other vitamin a precursors in animal feed. In: BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. **Academic Press**, New York, 1981.

BEGUM, F.; SAMAJPATI, N. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 6, p. 275-277, 2000.

BERNDT, W. O. The role of transport in chemical nephrotoxicity. **Toxicologic pathology**, v. 26, n. 1, p. 52-57, 1998.

BERNETT, K., HOVIK, R., EATON, S., WATMOUGH, N. J., AND OSMUNDSEN, H.: Intermediates of peroxisomal beta-oxidation: a study of the fatty acyl-CoA esters which accumulate during peroxisomal beta-oxidation of [U-14C] hexadecanoate. **Journal Biochemycal**, v. 27, p. 175-180, 1983.

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

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. Microbial *xanthophylls*. **Applied Microbiogy and Biotechnology**, v. 68, p. 445-455, 2005.

BHOSALE, P.; LARSON, A. J.; GRADE, R. V. Factorial analysis of tricarboxylic acid cycle intermediates for optimization of zeaxanthin production from *Flavobacterium multivorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 623-629, 2004.

BLANC, P. J. Les Pigments rouges de *Monascus*. **Biofutur**, v. 184, p. 13-17, 1998.

BLANC, P. J. *Monascus*' red pigments. **Biofutur**, v. 185, p. 34-36, 1999.

BONDY, G. S.; ARMSTRONG, C.L. Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. **Cell biology and toxicology**, v. 14, n. 5, p. 323-332, 1998.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β -carotene production (Provitamin A) with algae. In: VANDAMME, J. E. Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, **Elsevier Applied Science**: New York, p. 15-26, 1989.

BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por *Rhodotorula sp.* Cnpat-02 em processo batelada para obtenção de carotenóides. **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Fortaleza/ CE, 2010.

BREITENBACH, J; VISSER, H; VERDOES, J. C; VAN OUYEN, A. J; SANDMANN, G. Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Biotechnology letters**, v. 33, p. 755-761, 2011.

BRITTON, G. General carotenoids methods. **Methods in Enzymology**, v. 111, p. 113-149, 1985.

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

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

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

CABRAL, M. M. S. otimização da bioprodução de carotenoides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim), Erechim, 2008

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; VEGA-ESTRADA, J.; MONTES-HORCASITAS, M.C.; DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R. *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.

CERDÁ-OLMEDO, E. Production of carotenoids with fungi. In VANDAMME, J. E. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors, **Elsevier Applied Science**: New York, p. 27-42, 1989.

CHA, K. H; LEE, H. J; KOO, S.Y; SONG, D. G; LEE, D.U; PAN, C. H. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 793-797, 2010.

CHATTOPADHYAY, M. K.; JAGANNADHAM, M. V.; VAIRAMANI, M.; SHIVAJI, S. Carotenoid pigments of an antarctic psychrotrophic bacterium *Micrococcus roseus*: temperature dependent biosynthesis, structure, and interaction with synthetic membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 239, p. 85-90, 1997.

CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, H.J.; YANG, M.D.; XIU, J.M.) Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochem**, v. 42, p. 740–744, 2007.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; CHOCIAI, J. G.; BUSATO, S. B.; BONFIM, T. M. B. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 38, p. 457-462, 2002.

COONEY, J. J.; BERRY, R. A. Inhibition of carotenoid synthesis in *Micrococcus roseus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, p. 421-425, 1981.

COKS, L.V.; VAN REDE, C. Laboratory handbook for oils and fats analysis. **Academic Press**, p. 196, Londres, 1966.

CORDERO, B. F; COUSO, I.; LEÓN, R.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, M. A. Enhancement of carotenoids biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* by nuclear transformation using a phytoene synthase gene isolated from *Chlorella zofingiensis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 341-351, 2011.

CUARESMA, M.; CASAL, C.; FORJAN, E.; VILCHEZ, C. Productivity and selective accumulation of carotenoids of the novel extremophile microalga *Chlamydomonas acidophila* grown with different carbon sources in batch systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 167-177, 2011.

DA LOZZO, E. J.; OLIVEIRA, M.B.; CARNIERI, E.G. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 12, n. 5, p. 291-297, 1998.

DAVIES, B. H; Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed.), **Chemistry and Biochemistry of Plants and Pigments**, p. 138-165, Academic Press, New York, 1976.

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

DEMMIG-ADAMS B.; ADAMS III, W.W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. **Science** , v. 298, p. 2149-2153, 2002.

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

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. 783–791, 2007.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; GUERRERO LEGARRETA, I.; MARTINEZ JERÔNIMO, F.; TOMASINI CAMPOCOSIO, A. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 209-214, 2004.

EL-KADY, I.; EL-MARAGHY, S.; ZOHRI, A.N. Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. **Microbiological research**, v. 149, n. 3, p. 297-307, 1994.

FÁBREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 65-71, 2001.

FARIA, O.L.V.; KOERTZ, P.R.; SANTOS, M.S.; NUNES, W.A. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 309-317, 2006.

FAZELI, M. R ; TOFIGHI, H, SAMADI, N. & JAMALIFAR, H. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from Urmia salt lake, north of Iran. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2453 – 2456, 2006.

FEOFILOVA, E.P. Biochemical adaption of mycelial fungi to temperature stress. **Microbiology**, v. 63, p. 421-432, 1994.

FLORÊNCIO, J. A.; SOCCOL, C. R.; FURLANETTO, L. F.; BONFIM, T. M. B.; KRIEGER, N.; BARON, M.; FONTANA, J. D. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 161-164, 1998.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins.- critical reviews. **Food science and nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

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, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 888-894, 1994.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M. Beta-carotene-rich carotenoid-protein preparation and exopolysaccharide production by *Rhodotorula rubra* GED8 grown with a yogurt starter culture. **Journal of bioscience**, v. 61, p. 571-577, 2006.

FONTANA, J. D.; CZECZUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia Rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 121-125, 1996.

FUGISAWA, M.; TAKITA, E.; HARADA, H.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; OHYAMA, K.; SHIBATA, D.; MISAWA, N. Pathway engineering of *Brassica napus* seeds using multiple key enzyme genes involved in betacarotenoid formation. **Journal of experimental botany**, v. 60, p. 1319-1332, 2009.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Em The yeast III-Energy-yielding metabolism.; Rose, A.H.; Harrison, J.S., eds; **Academic Press**, New York, p. 205-259, 1989.

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 5, p. 629-634, 2003.

GOODWIN, T. W. Biosynthesis of carotenoids: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 214, p. 330, 1993.

GROSS, J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. New York: **AVI: Van Nostrand Reinhold**, p. 112, 1991.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.

GUNNARD, J.; WASILESKI, J.; ALAN, G. Production of food colorants by fermentation. **Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients**, Cap. 7, p. 205-233, 1994.

HAJJAJ, H.; BLANC, P.J.; GOMA, G.; FRANÇOIS, J. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. **Fems Microbiology Letters**, v. 164, n. 1, p. 195-200, 1998.

HEJAZI, M. A. ; HOLWERDA, E. ; WIJFFELS, R.H. Milking microalga *Dunaliella salina* for beta-carotene production in twophase bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 475 – 481, 2004.

HIPLER, U. C.; WIGGER-ALBERTI, W.; BAUER, A.; ELSNER, P. *Monascus purpureus*: a new fungus of allergenic relevance. **Mycoses**, v. 43, p. 29-31, 2000.

HIPLER, U. C.; WIGGER-ALBERTI, W.; BAUER, A.; ELSNER, P. *Monascus purpureus*--a new fungus of allergenic relevance. **Mycoses**, v. 45, n. 1-2, p. 58-60, 2002.

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

HUI, NI.; QI-HE, C.; HUI, R.; YUAN-FAN, Y.; LI-JUN, LI.; GUANG-BIN, WU.; YANG, HU.; GUO-QING, HE. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, p. 365-370, 2007.

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

HWANG, J.; HSEU, T.H. Specificity of the acid protease from *Monascus kaoliang* towards the B-chain of oxidized insulin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 614, n. 2, p. 607-612, 1980.

ISLER, O. Introduction. **In: ISLER, O. carotenoids**. p.11-29, Birkäuser, Basel, 1971.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. J. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

JACOBSEN, G.; WASILESKI, J. Production of food colorants by fermentation. In: **A. Gabelman (Ed.). Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients.**: John Wiley & Sons. Inc., p. 205-234, 1994.

JAIME, L.; RODRIGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; SANTOYO, S.; SUAREZ, S.; IBÁÑEZ, E.; SENORANS, F.J. 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.

JANARDHANA, G. R.; RAVEESHA, K.A.; SHETTY, H.S. Mycotoxin contamination of maize grains grown in *Karnataka* (India). **Food and chemical toxicology**, v. 37, n. 8, p. 863-868, 1999.

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

JUNG, K. Y.; TAKEDA, M.; KIM, D.K.; TOJO, A.; NARIKAWA, S.; YOO, B.S.; HOSOYAMADA, M.; CHA, S.H.; SEKINE, T.; ENDOU, H. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. **Life Science**, v. 69, n. 18, p. 2123-2135, 2001.

KILIKIAN, B. V. Produção de Enzimas e Pigmentos por Processos Fermentativos. **Fermentation Technology - Modulo IV**, UFSC - Florianópolis - SC, 2002.

KIM, H. J.; KIM, J.H.; HYUCK, J.O. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 649-655, 2002.

KIM, S. H.; PARK, Y. H.; SCHMIDT-DANNERT, C.; LEE, P. C. Redesign, reconstruction, and directed extension of the *Brevibacterium linens* C40 carotenoid pathway in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5199- 5206, 2010.

KIM, S.W.; KIM, J.B.; RYU, J.M.; JUNG, J.K.; KIM, J.H. High-level production of lycopene in metabolically engineered *E. coli*. **Process Biochemistry** v. 44, p. 899–905, 2009.

KIMURA, M. Aprimoramento da metodologia para determinação de carotenoides em alimentos. **Tese de doutorado em Ciência de Alimentos**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2000.

KLAÜI, H.; BAUNERFEIND, J. C. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. In: BAUNERFEIND, J. C. Carotenoids as food color. **Academic Press**, New York, p. 49-289, 1981.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. General classification of the yeasts. In : KREGER_VAN RIJ, N. J. W. ed. The yeasts: a taxonomy study. **Elsevier**, 1998, edition, 1984.

KREJCI, M. E.; BRETZ, N.S.; KOECHEL, D.A. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 167-177, 1996.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459-516, 2005.

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

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology letters**, v. 20, n. 10, p. 929-934, 1998.

KWON, S.G.; PARK, S.W.; OH, D.K. Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 1, p. 13–18, 2006.

LIM, G.; LEE, S.; LEE, E.; HAAM, S.; KIM, W. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 181-187, 2002.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEN, T. J.; PINTO, A. S.; LIMA, E. Q.; SILVA, J. F. Toxicidade aguda de *Rutina* e de *Bixa orellana*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, no. 1, p. 21-26, 2003.

LIN, T. F.; DEMAIN, A.L. Negative effect of ammonium nitrate as nitrogen source on the production of water-soluble red pigments by *Monascus sp.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 701-705, 1995.

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

LIU, Y. S.; WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 182–189, 2007.

LOSS, E. M. S. Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do milho para cultivo de cogumelos comestíveis. **Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos** - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2009.

LU, C. H.; CHOI, J. H.; ENGELMANN, M. N.; JIN, Y. S.; ERDMAN, J. W. Laboratory-scale production of (13)C-labeled lycopene and phytoene by bioengineered *Escherichia coli*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9996-10005, 2011.

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

MAIMOM, D. Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bio-inseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, **Rede para conservação e uso dos recursos genéticos – GENAMAZ**, 2000.

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

- MALDONADE, I. R. Produção de carotenoides por leveduras. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**, Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP), Campinas, 2003.
- MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM 28 in fermented radish brine. **Bioresource technology**, v. 99, n. 7, p. 2281-2287, 2009.
- MANTZOURIDOU, F. TSIMIDOU, M.Z.; NAZIRI, E. 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.; NAZIRI, E. 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 F. Biopigments: biotech pigments poised to challenge synthetic colors; biopigment market could reach \$350 million by 2000. **Industrial Bioprocessing**, May, 1992.
- McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Viscous fermentation products. Critical Review in **Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 275-304, 1990a.
- McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Fermentation: A Practical Approach. **IRL PRESS at Oxford University Press**, 1 ed, 1990.
- MELIM MIGUEL, A.S.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for glucose 6-phosphate dehydrogenase production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p, 248–252, 2007.
- MIAO, L.; CHI, S.; TANG, Y.; SU, Z.; YIN, T.; GUAN, G.; LI, Y. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. **FEMS yeast research**, v. 11, n. 2, p. 192-201, 2011.
- MIRÓN, A. S. ; GARCÍA, M.M.C. ; CAMACHO, F.G. ; GRIMA, E.M. ; CHISTI, Y. 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.
- MISAWA, N.; SHIMADA, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 169-181, 1998.
- MIURA, Y.; KONDO, K.; SHIMADA, H.; SAITO, T.; NAKAMURA, K.; MISAWA, N. Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 2 e 3, p. 306, 1998.
- MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P.; Microbial physiology, Moat, A.G.; Foster, J.W.; Spector, M.P., eds, **Wiley-Liss**, New York, p. 363, 2002.
- MONTANTI, J.; NGHIEM, N. P.; JOHNSTON, D. B. Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 5, p. 655-65, 2011.

MONTERO, O; MACÍAS-SÁNCHEZ, MD; LAMA, CM; LUBIÁN, LM; MANTELL, C; RODRÍGUEZ, M. & OSSA, EM. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from a marine strain of the *Cyanobacterium Synechococcus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9701-9707, 2005.

NASRABADI, M.R.N.; RAZAVI, S.H. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 361–368, 2010.

NELIS, J.; DE LEENHEER, A. P. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. In: VANDAMME, J. E. Microbial production of carotenoids other than β -caroteno. **Elsevier Applied Science**: New York, p. 15-26, 1989.

NG, I. W.; ADAMS, P. G.; MOTHERSOLE, D. J.; VASILEY, C.; MARTIN, E. C.; LANG, H. P.; TUCKER, J. D.; NEIL, H. C. Carotenoids are essential for normal levels of dimerisation of the RC-LH1-PufX core complex of *Rhodobacter sphaeroides*: characterisation of R-26 as a crtB (phytoene synthase) mutant. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 9, p. 1056-1063, 2011.

OSAWA, A.; ISHII, Y.; SASAMURA, N.; MORITA, M.; KOCHER, S.; MULLER, V.; SANDMANN, G.; SHINDO, K. Hydroxy-3,4-dehydro-apo-8'-lycopene and methyl hydroxy-3,4-dehydro-apo-8'-lycopenoate, novel C(30) carotenoids produced by a mutant of marine bacterium *Halobacillus halophilus*. **The journal of antibiotics**, v. 63, n. 6, p. 291-295, 2010.

PANIAGUA-MICHEL, J.; CAPA-ROBLES, W.; OLMOS-SOTO, J.; GUTIERREZ-MILLAN, L. E. The Carotenogenesis Pathway via the Isoprenoid- β -carotene Interference Approach in a New Strain of *Dunaliella salina* Isolated from Baja California Mexico. **Marine Drugs**, v. 7, p. 45-56, 2009.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. J. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002.

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.

PEREIRA, D. G.; OROZCO, S.B.; TONSO, A.; KILIKIAN, B.V. Efeito das condições de agitação e aeração na síntese de metabólitos secundários por *Monascus purpureus* CCT 3802. **SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis - SC: Anais - artigo 102 CD-room, 7 p, 2003.

PFANDER, H. Carotenoids: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 3-13, 1992.

PHAFF, H. J.; LARECDA, D. P. Isolation of yeasts from natural sources. In: Isolation of biotechnology organisms from nature. New York, **McGraw-Hill**, p. 53-79, 1990.

POLAINO, S.; HERRADOR, M. M.; CERDÁ-OLMEDO, E.; BARRERO, A. F. Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. **Organic and biomolecular chemistry**, v. 8, n. 19, p. 4229-4231, 2010.

RAMÍREZ, J. 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.

RAMÍREZ, J.; OBLEDO, N.; ARELLANO, M.; HERRERA, E. 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.; MARCH, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus H110* Using Technical Glycerol as Carbon Source. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering** v.25, n. 3, p. 59-64, 2006.

REPORTSNREPORTS, <http://pt.yooarticles.com/article/the-global-market-for-carotenoids-reportsnreports-com> acessado em 13/01/2012.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher: **Instituto Mauá de Tecnologia**, p. 184, 2004.

RIBEIRO, A. H. R. Bioprodução de carotenoides por uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus* utilizando resíduos agroindustriais. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim), Erechim, 2011.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PARAJÓ, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 1, p. 93-98, 2004.

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

RODRIGUES-AMAYA, B. D. A guide to carotenoids analysis in foods. Washington, D.C.: **International Life Science Institute Prece**, p. 2-14, 1999.

RODRIGUES-AMAYA, B. D. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin a carotenoids in prepared. **Processed and Stored Foods**, p. 1-8, 1997.

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.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; EECKHOUT, M.; RUYSSSEN, T.; FOUBERT, I. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11063-11069, 2011.

SABATER-VILAR, M.; MAAS, R.F.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation research**, v. 444, n. 1, p. 7-16, 1999.

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

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

SANTOS, J. R. Utilização de glicerol como fonte de carbono para obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*. **Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Ceará, 2010.

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

SCHIEDT, K.; LIAAEN-JENSEN, S. Isolation and analysis. In: BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds.) **Carotenoids**. Basel: Birkhäuser, vol 1A, p. 71-80, 1995.

SCUDAMORE, K. A.; HETMANSKI, M.T. Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. **Food additives and contaminants**, v. 12, n. 3, p. 377-382, 1995.

SCHWARTZ, C. R. M. Otimização da produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim), Erechim, 2010.

SHAHIDI, F.; METUSALACH; BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 1, p. 61–67, 1998.

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

SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos**– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 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*. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná (UFPR)**, Curitiba, 2008.

SOUZA, L. C. Distribution of yeasts in nature. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S.ed. The yeasts: Biology of the yeasts. Londin, **Academic press**, v. 1, p. 79-106, 1969.

SQUINA, F. M.; YAMASHITA F.; PEREIRA, J. L.; MERCADANTE, A. Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *Rhodotorula glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. **Food Biotechnology**, v. 16, p. 227-235, 2002.

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

TAKAICHI, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1101-1118, 2011.

TAKANO, H.; KONDO, M.; USUI, N.; USUI, T.; OHZEKI, H.; YAMAZAKI, R.; WASHIOKA, M.; NAKAMURA, A.; HOSHINO, T.; HAKAMATA, W.; BEPPU, T.; UEDA, K. Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 10, p. 2451-2459, 2011.

TAN, T.; ZHANG, M.; GAO, H. Ergosterol production by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 366-370, 2003.

TAO, L.; YAO, H.; CHENG, Q. Genes from a *Dietzia* sp. for synthesis of C₄₀ and C₅₀ beta-cyclic carotenoids. **Gene**, v. 386, p. 90-97, 2007.

TAO, Z.; WANG, G.; XU, X.; YUAN, Y.; WANG, X.; LI, Y. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy. **FEMS microbiology letters**, v. 314, n. 1, p. 42-48, 2011.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100-110, 2004.

TASKIN, M.; ERDAL, S. Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT-5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1440-1445, 2011.

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

TERESHINA, V. M.; MEMORSKAIA, A. S.; KOTLOVA, E. R.; FEOFILOVA, E. P. Lipid composition of zygomycetous fungi *Blakeslea trispora* under stimulation of lycopene synthesis. **Mikrobiologiya**, v. 79, n. 1, p. 39-44, 2010.

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

TRUSCOTT, T. G.. β -carotene and disease: a suggested pro-oxidant and antioxidant mechanism and speculations concerning its role in cigarette smoking. **Journal Photocem Photobiology Biology**, v. 35, p. 233-235, 1996.

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

ÚBEDA, B. T. estudo da produção de carotenóides pela bactéria *Kocuria rhizophila*. **Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008

VALDUGA, E. ; TREICHEL, H.; VALERIO, A.; JACQUES, R.A.; FURIGO JÚNIOR, A.; LUCCIO, M. Di . Pré-tratamento de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

VALDUGA, E. ; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.Di ; 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. Optimization of the bio-production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food and Bioprocess Technology: An international Journal**, v. 2, p. 415-421, 2009a.

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

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

VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; DI LICCIO M. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 61-69, 2009d.

VALDUGA, E., TATSCH, P. O., VANZO, Larissa T., RAUBER Fernanda, LUCCIO, Marco Di, TREICHEL, Helen. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1060 - 1065, 2009 e.

VALDUGA, E. ; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; NASCIMENTO FILHO, I.; FURIGO JÚNIOR, A.; Di LUCCIO, M. Head Space Solid Phase Microextraction (HS - SPME) of volatile organic compounds produced by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** (Impresso), v. 30, p. 987-992, 2010.

VALDUGA, E.; SCHWARTZ, C.R. M.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Evaluation of aeration and substrate concentration on the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in bioreactor. **European Food Research & Technology** (Print), v. 232, p. 453-462, 2011.

VARZAKAKOU, M.; ROUKAS, T.; PAPAIOANNOU, E.; KOTZEKIDOU, P.; LIAKAPOULOU-KYRIAKIDES, M. Autolysis of *Blakeslea trispora* during carotene production from cheese whey in an airlift reactor. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 7-21, 2011.

VERWAAL, R.; JIANG, Y.; WANG, J.; DARAN, J. M.; SANDMANN, G.; VAN DEN BERG, J. A.; VAN OOVEN A. J. Heterologous carotenoid production in *Saccharomyces cerevisiae* induces the pleiotropic drug resistance stress response. **Yeast**, v. 27, n. 12, p. 983-998, 2010.

VIEGAS, M. C. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. **Tese de Doutorado em Engenharia Química**, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, p. 150, 2003.

VILA, M.; COUSO, I.; LÉON, R. Carotenoid content in mutants of the Chlorophite *Clamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1147-1152, 2008.

WEEDON, B. C. L. Occurrence. In: **Isler, O. carotenoids**. p. 29-53, Birkäuser, Basel, 1971.

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

WOZNIAK, A.; LOZANO, C.; BARAHONA, S.; NIKIITSCHKEK, M.; MARCOLETA, A.; ALCAÍNO, J.; SEPULVEDA, D.; BAEZA, M.; CIFUENTES, V. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. **FEMS yeast research**, v. 11, p. 252-262, 2011.

YAMANE, Y.I.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471-4478, 1997.

YUAN, G. L.; LIANG, H. Y.; WANG, Z. Q.; YANG, X. F.; LIU, D.; LIU, J. F.; DUAN, C. Q. Important role of catalase in the production of β -carotene by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under H_2O_2 stress. **Current microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1056-1061, 2011.

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

ZHU, Y.; GRAHA, J. E.; LUDWIG, M.; XIONG, W.; ALVEY, R. M.; SHEN, G.; BRYANT, D. A. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7002. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, p. 86-99, 2010.

APENDICE

Tabela 10 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *S. pararoseus*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 1 de batelada alimentada.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,07	109	19007	1206	67,4
24	2,4	7,85	235	18885	1174	63,1
36	2,8	7,18	747	18406	1045	56,6
48	3,9	6,48	1500	16050	886,4	52,1
72	4,3	5,27	2457	14647	798,1	44,1
84	5,0	5,08	2602	13060	746,6	38,5
96	5,3	4,62	2924	13116	629,5	30,5

Tabela 11 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *S. pararoseus*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 2 de batelada alimentada.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,07	109	19007	1206	67,4
24	2,0	7,83	242	17416	1117	57,7
36	3,4	7,54	318	15687	971	53,4
48	3,9	7,35	643	14206	939	49,1
60	3,9	7,11	1954	11690	734	38,8
72	4,6	6,81	3070	9295	579	24,3
96	5,4	4,06	4400	6600	383	16,3

Tabela 12 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *S. pararoseus*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 3 de batelada alimentada.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,07	109	19007	1206	67,4
24	1,3	7,73	486	18181	1142	59,1
36	3,0	7,34	891	17244	1037	52,8
48	3,7	7,12	2042	15424	921	46
60	3,7	5,44	2212	14704	859	41,1
84	5,6	4,62	2258	13667	786	34,8

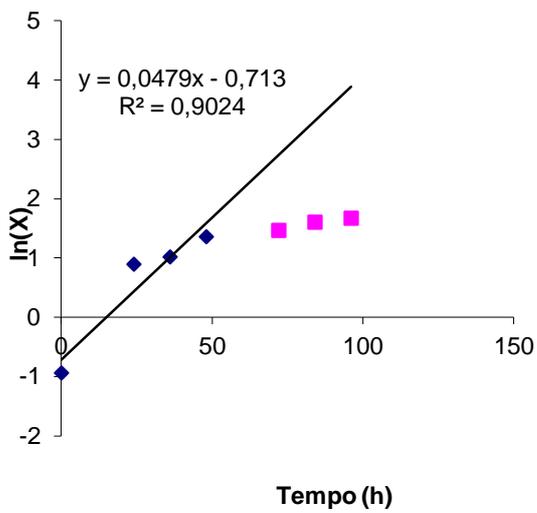
96	7,6	4,34	3205	12208	702	29,4
----	-----	------	------	-------	-----	------

Tabela 13 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *S. pararoseus*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 4 de batelada alimentada.

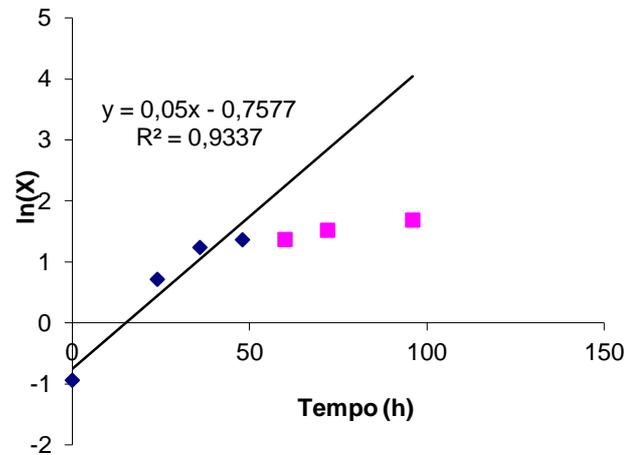
Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,07	109	19007	1206	67,4
24	1,9	7,87	742	11798	1102	45,7
36	2,2	7,66	830	10997	977	41,3
48	3,0	7,5	840	9905	801	38,1
60	3,7	7,44	940	9574	699	35,9
72	4,7	6,92	979	9249	579	33,6
84	4,8	6,55	1001	8150	486	30,6
96	4,5	5,86	1030	7311	432	27,6
108	4,6	5,75	881	7250	394	25,6
120	4,6	5,22	809	6433	359	24,9

Tabela 14 - Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *S. pararoseus*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o ensaio 5 de batelada alimentada.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,07	109	19007	1206	61,9
24	1,3	7,66	253	17670	1199	60,7
36	2,6	7,19	992	14650	1066	45,9
48	3,3	6,86	1377	13080	949	41,1
60	4,2	5,25	1905	11890	859	32,7
72	3,6	4,64	1948	10570	792	28,1
84	4,0	4,41	2174	9630	729	25,6
96	4,5	4,19	3009	7900	667	19

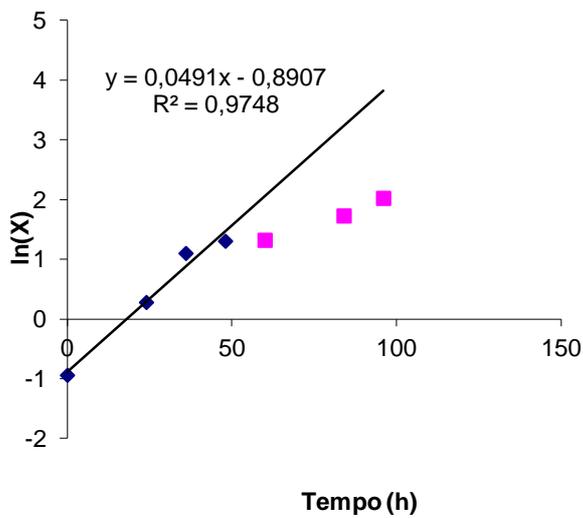


(a)

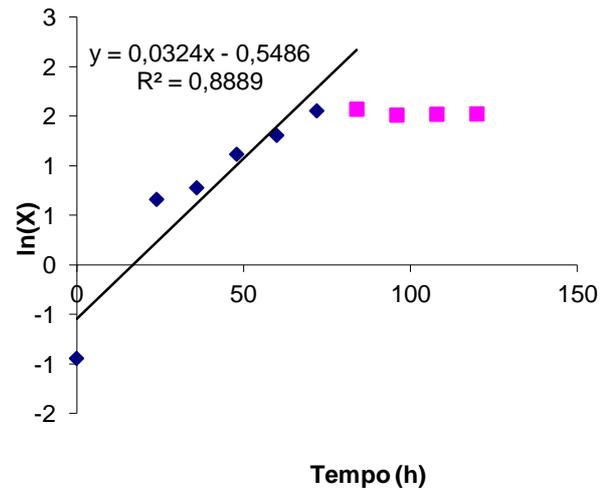


(b)

Figura 37 - Linearização do crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no ensaio 1 (a) e no ensaio 2 (b)



(a)



(b)

Figura 38 - Linearização do crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no ensaio 3 (a) e no ensaio 4 (b)

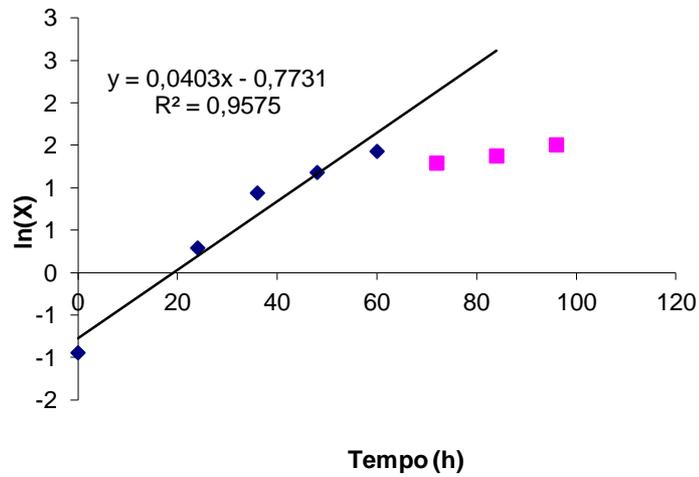


Figura 39 - Linearização do crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) no

Ensaio 5

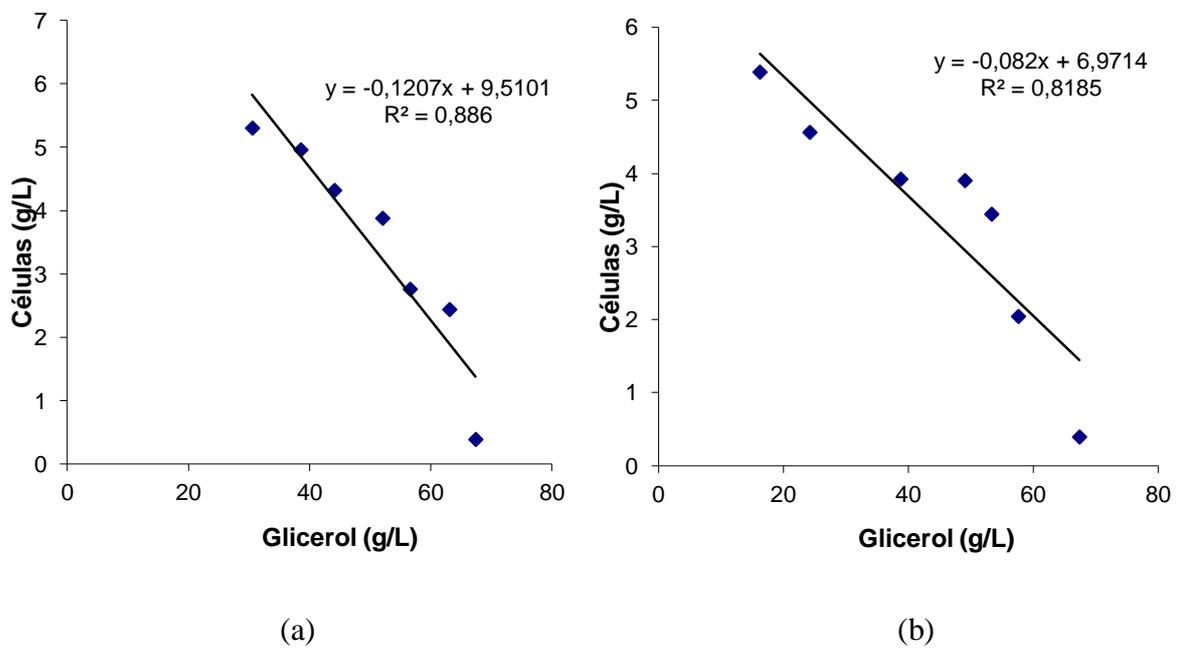


Figura 40 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o ensaio 1(a)

e para o ensaio 2 (b)

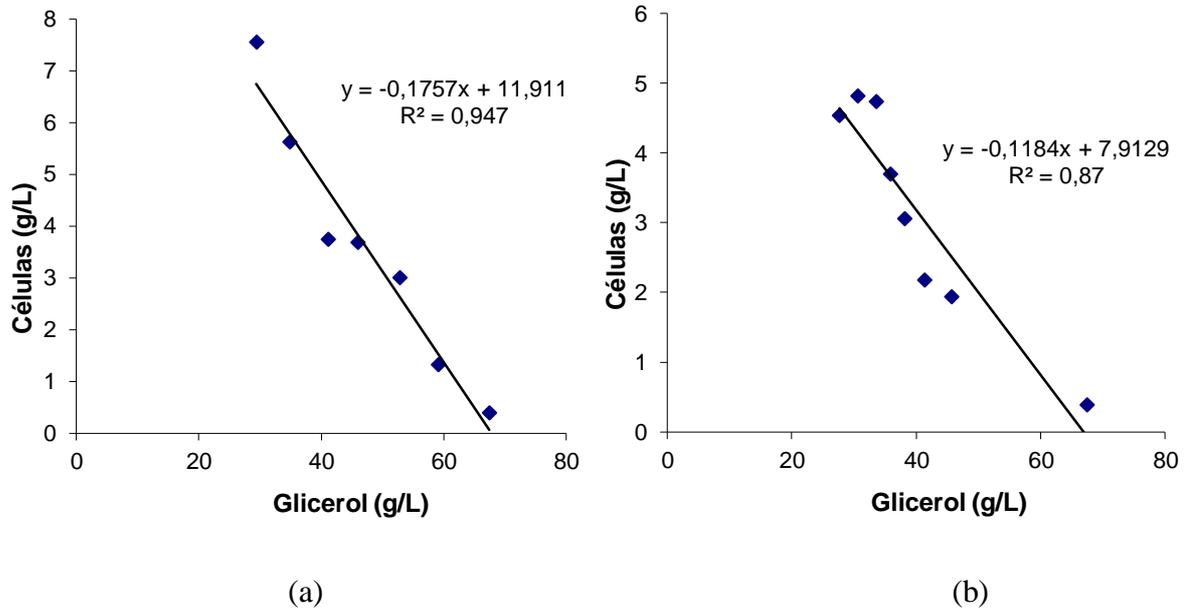


Figura 41 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b)

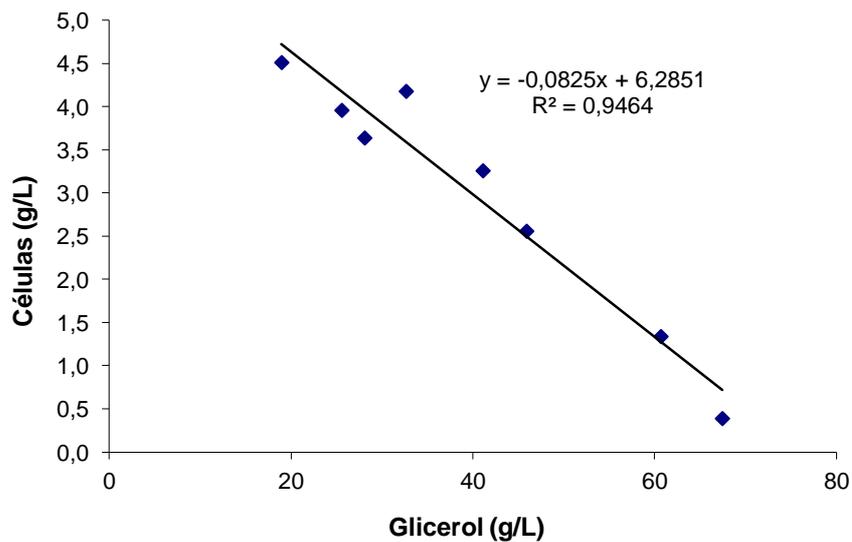


Figura 42 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 5

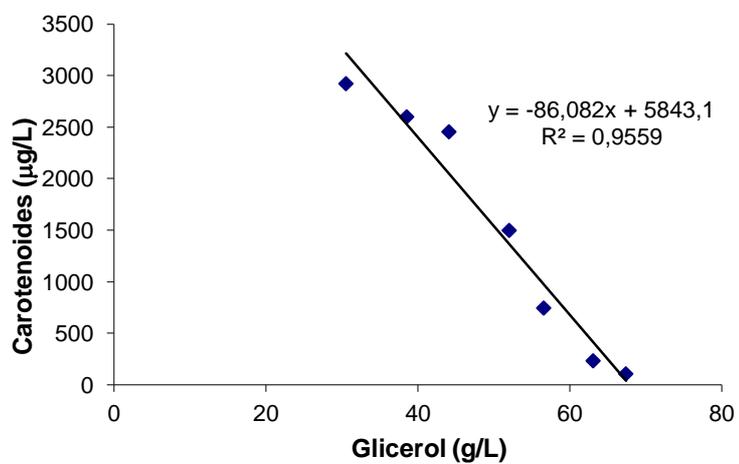


Figura 43 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 1

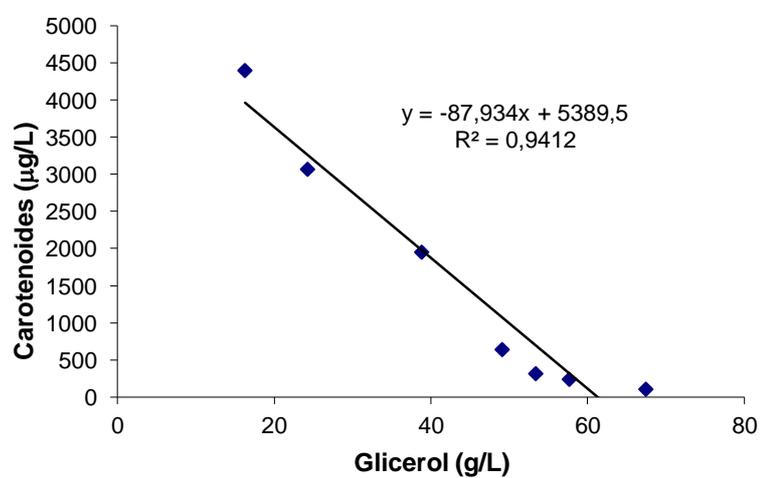


Figura 44 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 2

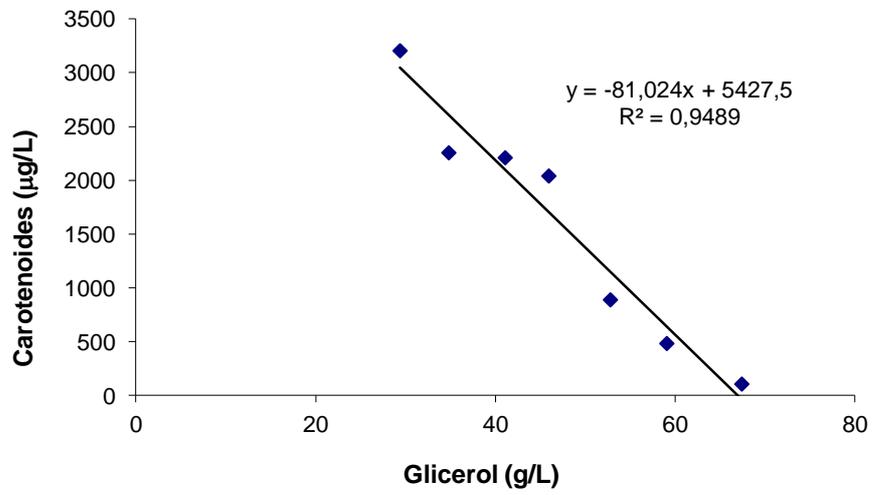


Figura 45 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 3

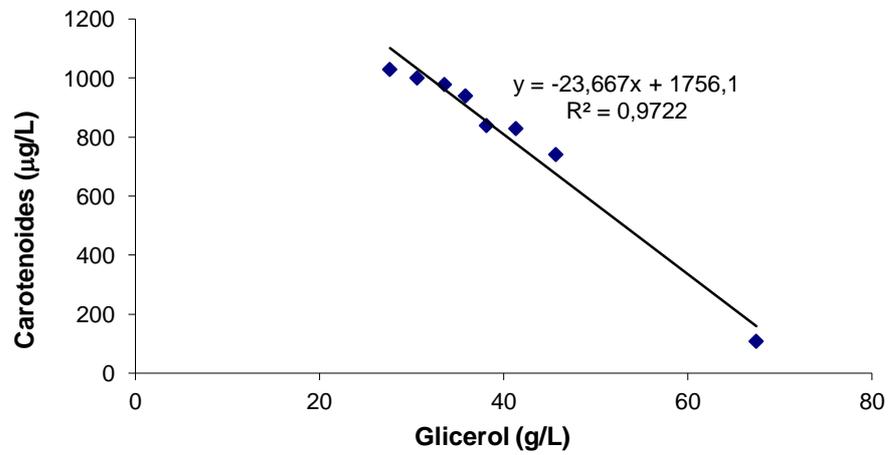


Figura 46 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 4

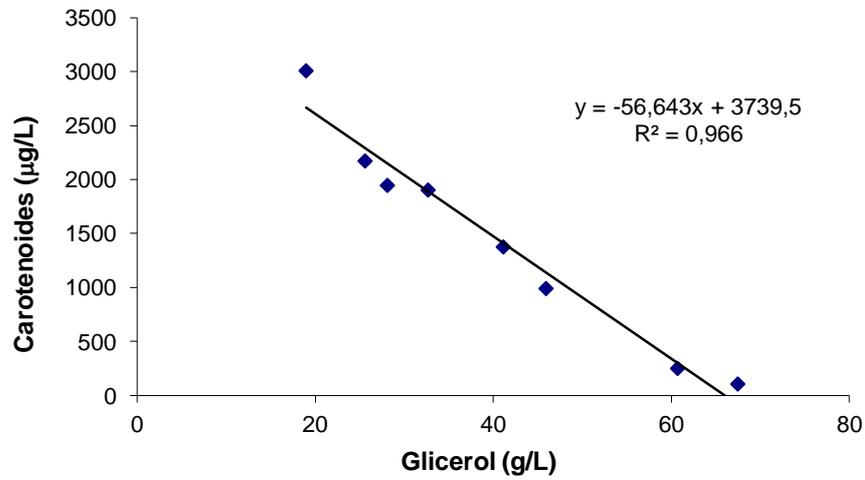


Figura 47 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/G}$ com base em glicerol para o Ensaio 5

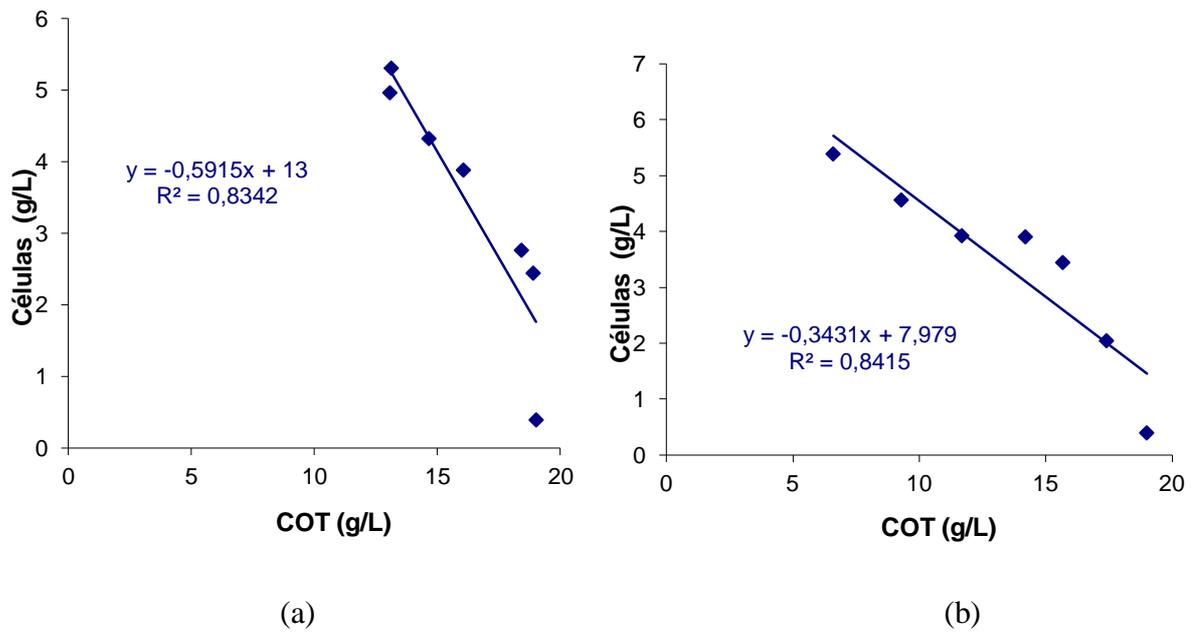


Figura 48 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o ensaio 1(a) e para o ensaio 2 (b)

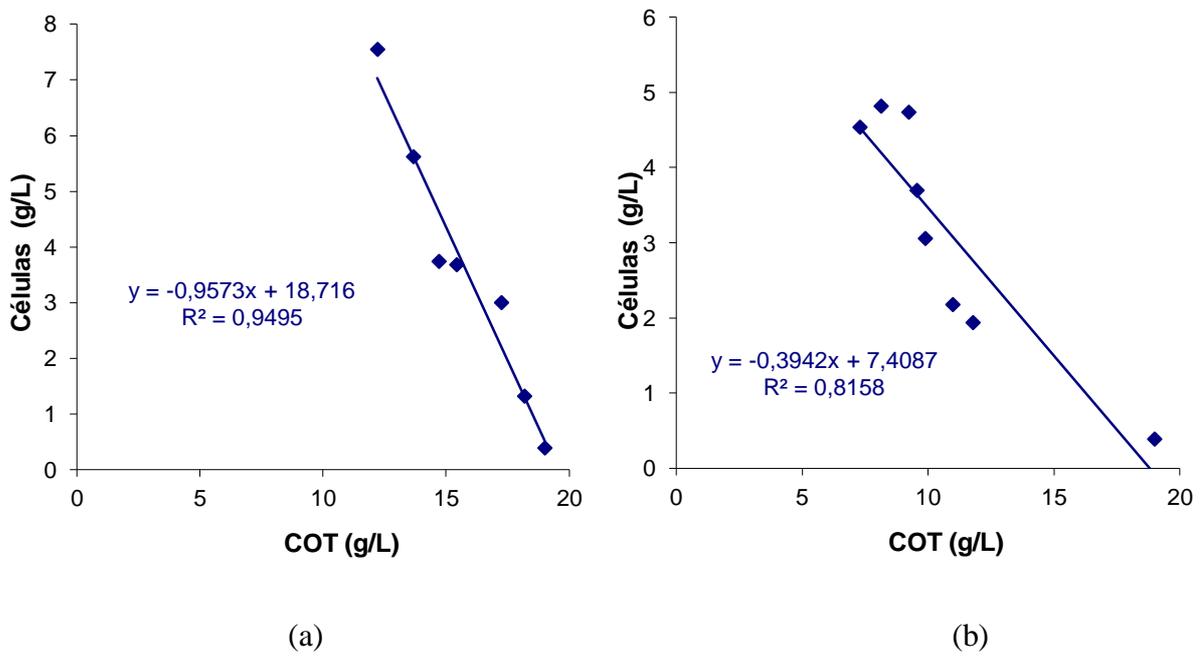


Figura 49 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b)

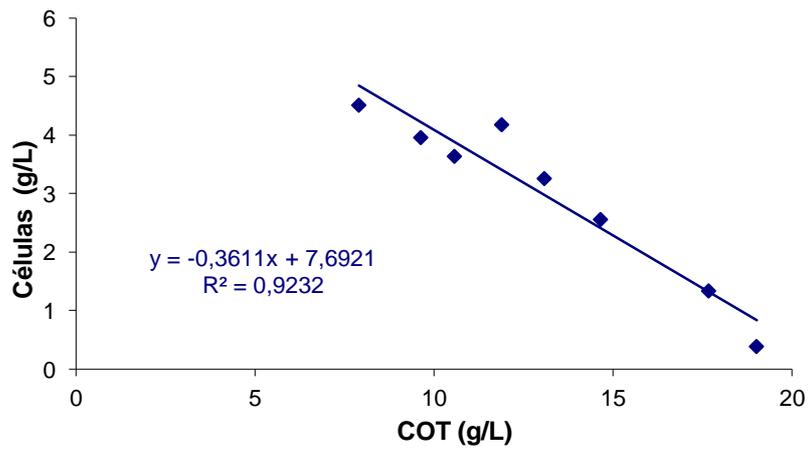


Figura 50 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/C}$ com base em COT para o Ensaio 5

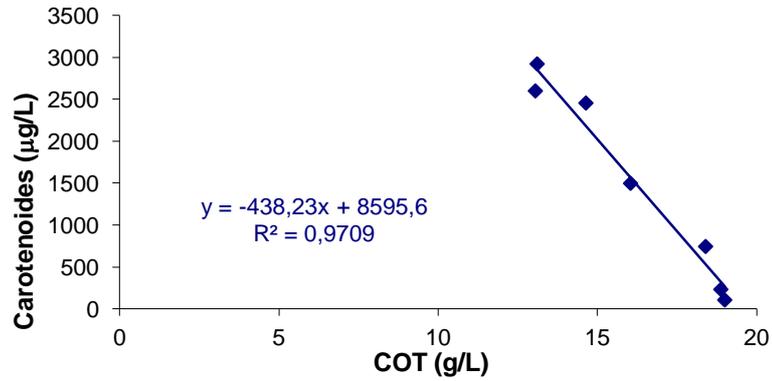


Figura 51 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 1

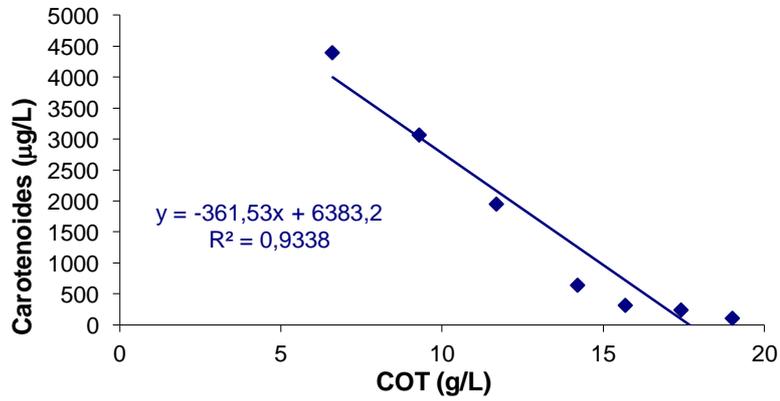


Figura 52 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 2

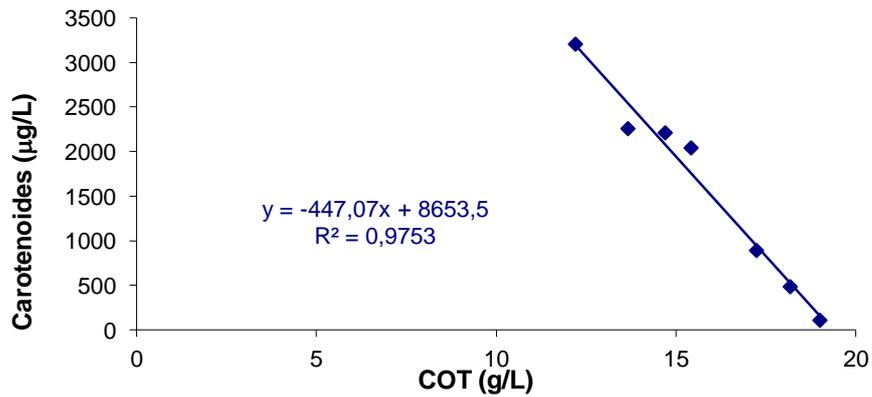


Figura 53 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 3

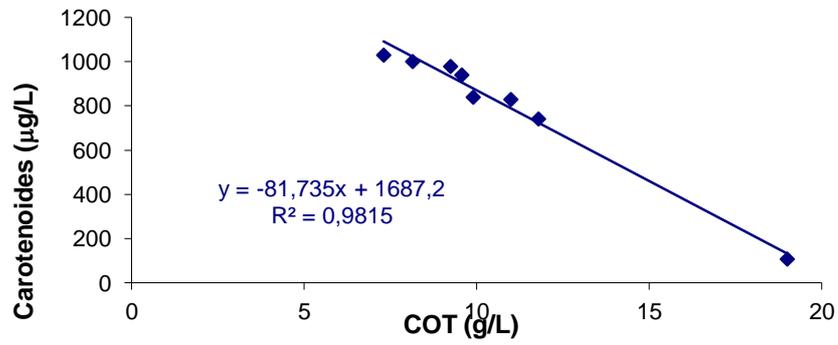


Figura 54 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 4

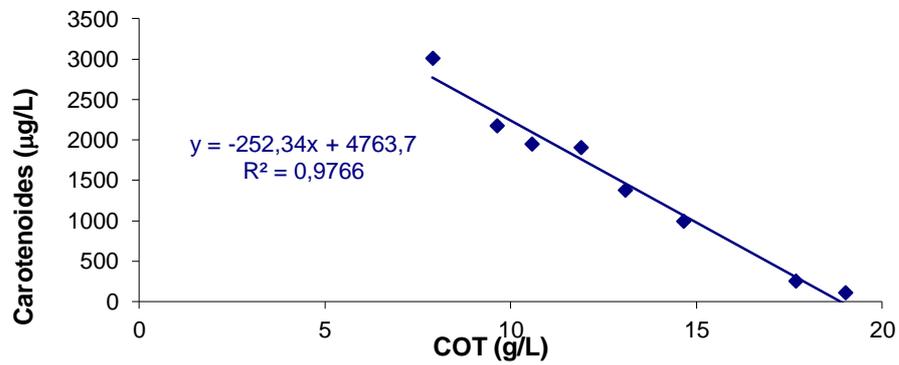


Figura 55 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/C}$ com base em COT para o Ensaio 5

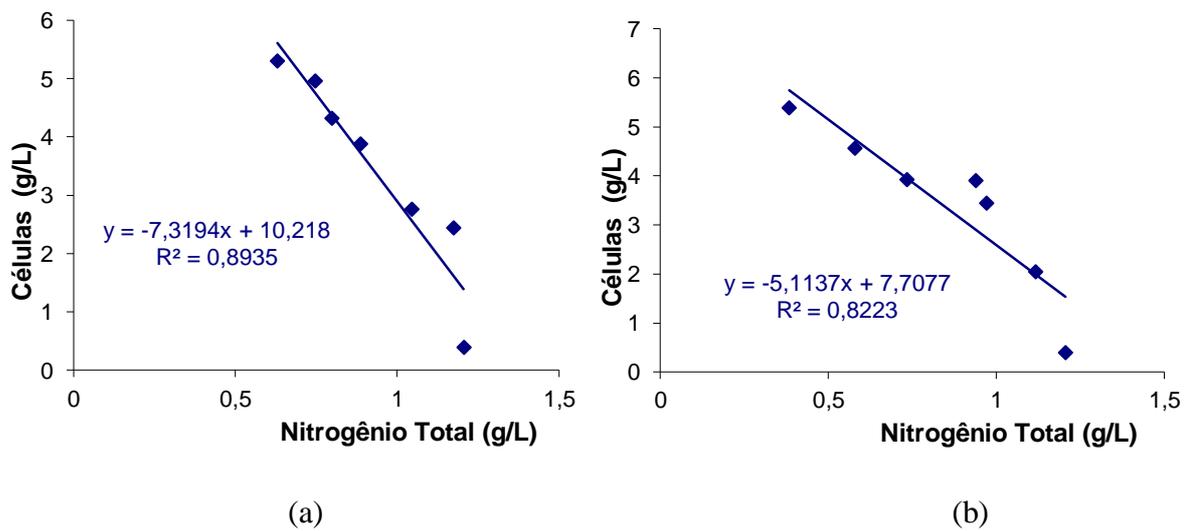


Figura 56 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o ensaio 1 (a) e para o ensaio 2 (b)

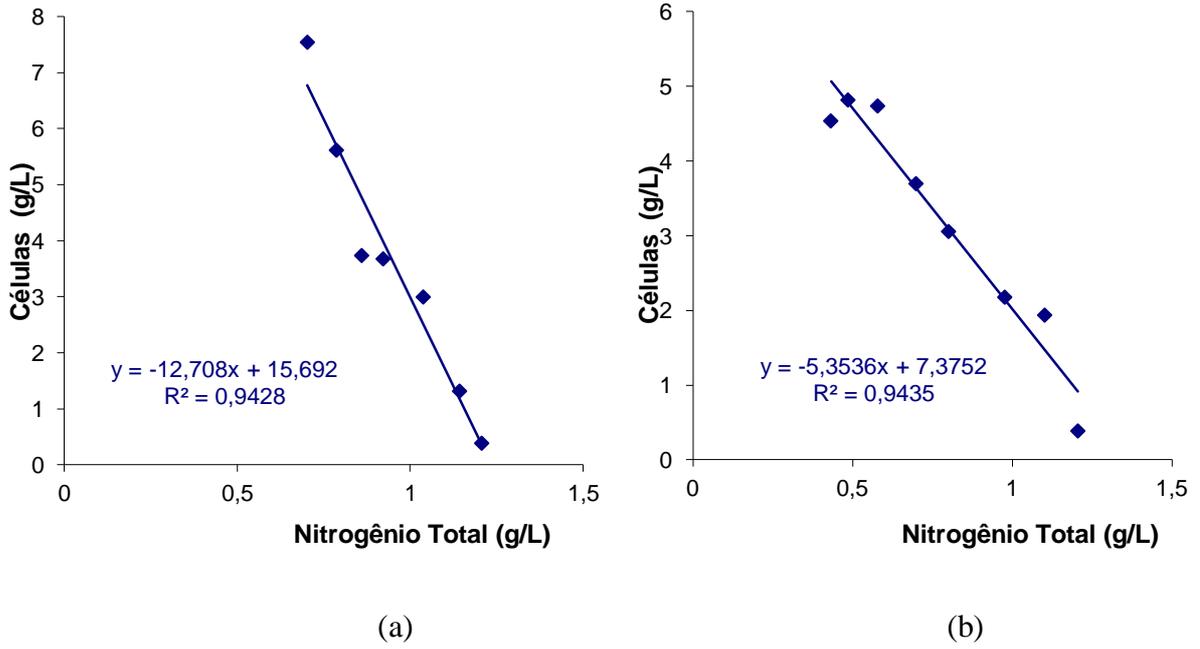


Figura 57 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o ensaio 3 (a) e para o ensaio 4 (b)

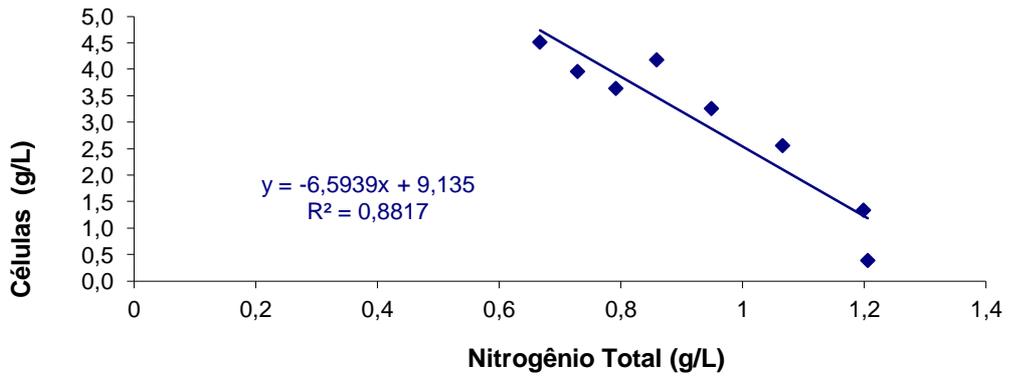


Figura 58 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/N}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 5

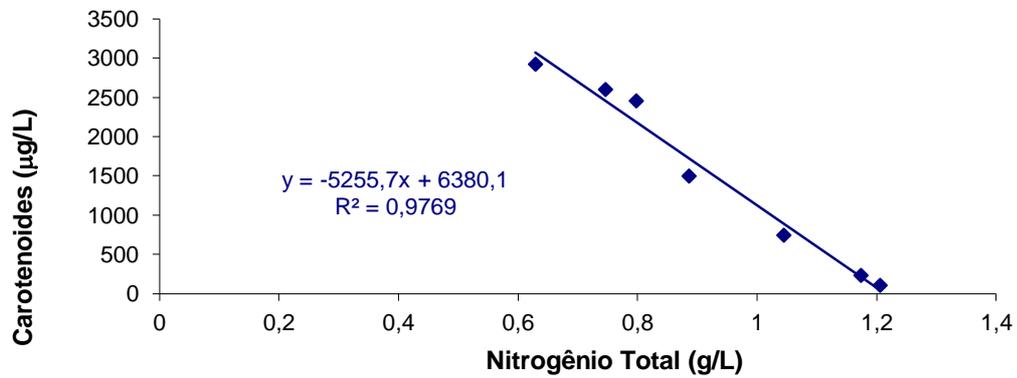


Figura 59 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o

Ensaio 1

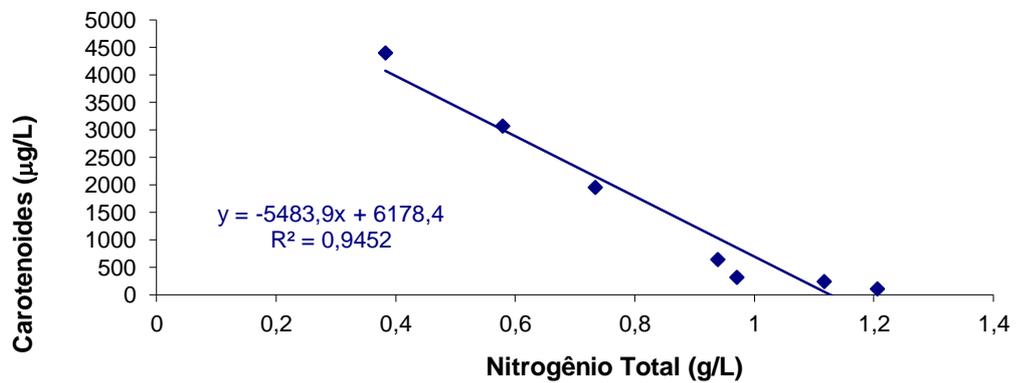


Figura 60 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o

Ensaio 2

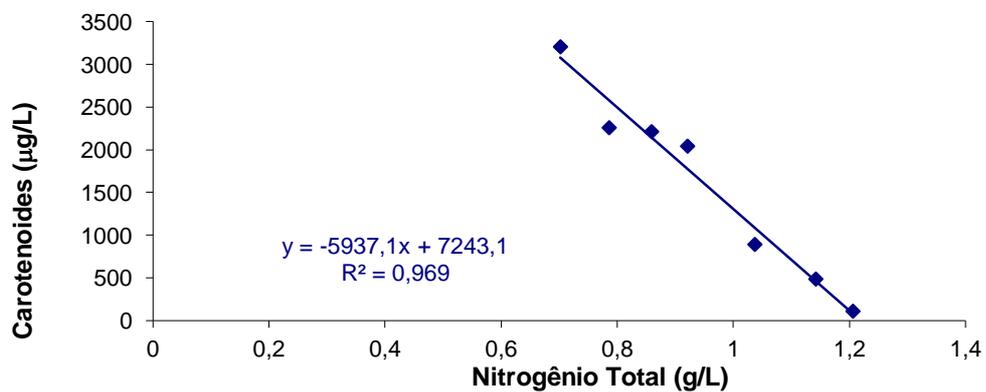


Figura 61 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o

Ensaio 3

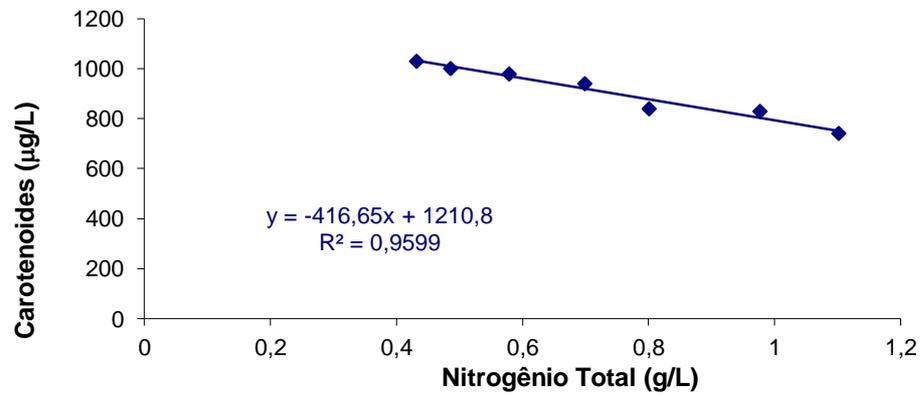


Figura 62 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o

Ensaio 4

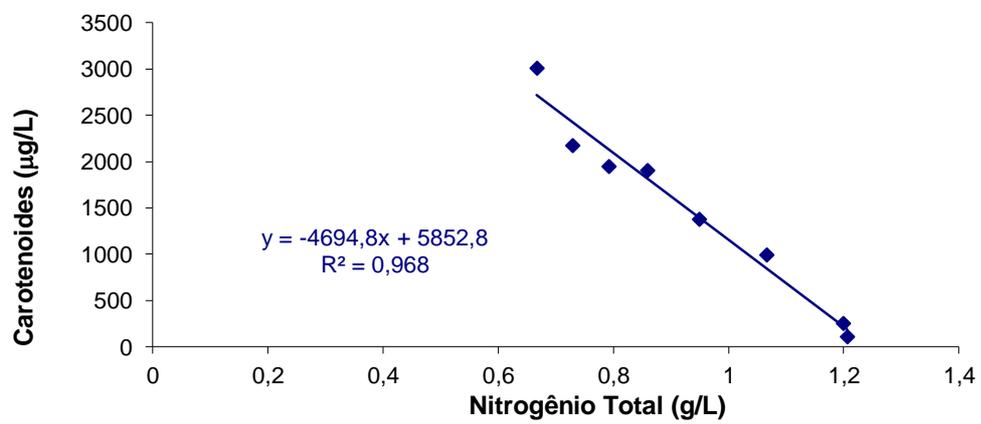


Figura 63 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/N}$ com base em nitrogênio total para o

Ensaio 5