

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

**BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus*
pararoseus UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

ARTHUR HENRIQUE RAUSCH RIBEIRO

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

ERECHIM, RS – BRASIL

03 de Novembro, 2011

**Bioprodução de Carotenóides por uma Nova Cepa de *Sporidiobolus*
pararoseus Utilizando Resíduos Agroindustriais**

ARTHUR HENRIQUE RAUSCH RIBEIRO

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

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D.Sc.
Orientadora

Prof. Geciane Toniazzi D.Sc.
Orientadora

Prof. , D.Sc.

Prof. , D.Sc.

Erechim, 03 de Novembro de 2011.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais por terem me mantido, auxiliando e incentivando em tudo que precisei, por todo amor e carinho que sempre me dedicaram, por serem tão especiais e cuidarem tanto de mim. A vocês que sempre acreditaram em mim e fizeram o possível para me ver feliz.

As minhas orientadoras: Eunice e Geci, pelos momentos aprendizado, pela paciência, pelo rigor com meus erros e pela amizade, carinho e compreensão.

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

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

A banca examinadora pelo tempo dedicado á análise deste trabalho.

A URI, campus Erechim e Departamento de Engenharia de Alimentos pelo uso de suas instalações.

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

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

BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus pararoseus* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

ARTHUR HENRIQUE RAUSCH RIBEIRO

Novembro/2011

Orientadoras: Eunice Valduga

Geciane Toniazzo

Os carotenóides são corantes naturais sintetizados por plantas, algas e micro-organismos. Estes são pigmentos de grande utilização industrial, têm despertado interesse devido à preocupação com o uso de aditivos químicos nos alimentos e ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana. Sua produção pela fermentação pode tornar-se industrialmente praticável e o custo da produção minimizado, com o uso de subprodutos industriais baratos como fontes de nutrientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir carotenóides por uma nova cepa de levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando resíduos agroindustriais (glicerol, água de maceração de milho - AMM e água de parboilização de arroz – APA). A bioprodução foi realizada em frascos agitados, sem iluminação, durante 120 h, variando a concentração do meio complexo (glicerol, AMM e APA), mediante o emprego de metodologia de planejamento de experimentos para maximizar a bioprodução. A recuperação dos carotenóides foi realizada empregando nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, e extração com mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). A determinação dos carotenóides totais foi realizada espectrofotometricamente ($\lambda = 448$ nm). A concentração máxima de carotenóides totais obtida foi de 843 $\mu\text{g/L}$ a 25 °C, pH inicial 4,0, 180 rpm, 40 g/L de glicerol, 40 g/L de água de maceração de milho (AMM) e 20 g/L de água de parbolização de arroz (APA). A partir dos dados da cinética de bioprodução verificou-se que a concentração máxima de carotenoides totais foi atingida em 96 h do início do processo fermentativo.

Palavras-chave: Carotenóides; *Sporidiobolus pararoseus*; glicerol, água de maceração de milho, água de parboilização de arroz.

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

BIOPRODUCION OF CAROTENOIDS BY A NEW STRAIN OF *Sporidiobolus pararoseus* USING AGROINDUSTRIAL WASTES

ARTHUR HENRIQUE RAUSCH RIBEIRO

November/2011

Advisors: Eunice Valduga

Geciane Toniazzo

Carotenoids are natural dyes biosynthesized by plants, algae and microorganisms. They are pigment highly used in industry and have drawn attention due to the concern with chemical additives used in food and their potential beneficial effect on human health. production by fermentation can become industrially feasible and the cost of production minimized, with the use of industrial byproducts cheap as sources of nutrients. In this way, the objective of this work was to optimize the bioproduction of carotenoids by a new strain of *Sporidiobolus pararoseus* using waste agroindustry (glycerin, corn steep liquor - CS and rice parboilization wastewater - RPW). The bioproduction was performed in shaken flasks without lighting, during 120 h, ranging from the concentration of the complex medium (glycerin, CS, RPW), through the employment of methodology for design of experiments to maximize bioproduction. The recovery of carotenoids was performed using liquid nitrogen and dimethyl sulfoxide (DMSO) for cell disruption, and extraction with a mixture of acetone / methanol (7:3, v/v). The determination of carotenoids was performed spectrophotometrically ($\lambda = 448$ nm). The maximum concentration of carotenoids totals obtained was 843 $\mu\text{g/L}$ at 25 °C, pH 4.0 , 180 rpm, 40 g/L of glycerin, 40 g/L of corn steep liquor (CS) and 20 g/L of rice parboilization wastewater (RPW). The data from the kinetics of bioproduction it was found that the maximum concentration of carotenoids total was achieved in 96 hours of the onset of fermentation process.

Key words: Carotenoids; *Sporidiobolus pararoseus*; glycerin; corn steep liquor; rice parboilization wastewater.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA4

2.1 Estrutura química, nomenclatura e biossíntese dos carotenoides4

2.2 Propriedades e funções dos carotenoides11

2.3 Micro-organismos produtores de carotenoides12

2.4 Fatores que exercem influência na carotenogênese.....15

2.4.1 Condições do meio de cultivo.....15

2.4.2 Temperatura.....18

2.4.3 pH.....19

2.4.4 Outros fatores que influenciam a carotenogênese.....20

2.5 Extração e recuperação de carotenoides.....22

2.6 Aplicação dos carotenoides na indústria de alimentos.....23

3 MATERIAL E MÉTODOS25

3.1 Micro-organismos e meios de cultura.....25

3.2 Substratos agroindustriais testados25

3.3 Produção de carotenoides26

3.4 Recuperação de carotenoides27

3.5 Metodologia Analítica28

3.5.1 Caracterização dos substratos agroindustriais.....28

3.5.2 Determinação de carotenoides totais.....29

3.5.3 Determinação de biomassa.....29

3.5.4 Determinação de pH30

3.5.5 Nitrogênio total.....30

3.5.6. Determinação de carbono orgânico total (TOC).....30

3.5.7 Determinação do glicerol.....30

3.6 Cinética de bioprodução30

3.7. Tratamento estatístico.....	30
<u>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	31
<u>4.1 Pré-tratamentos de substratos agroindustriais</u>	31
<u>4.2 Bioprodução de carotenoides</u>	33
<u>4.3 Cinética da Bioprodução</u>	38
<u>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES</u>	43
<u>5.1 Conclusões</u>	43
<u>5.2 Sugestões para trabalhos futuros</u>	43
<u>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	44
<u>ANEXOS</u>	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química dos carotenoides.....	5
Figura 2 Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenóides.....	6
Figura 3 Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides.....	7
Figura 4 Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides.....	8

Figura 5 Formação de carotenoides cíclicos.....	9
Figura 6 Formação de Xantofilas a partir de α Caroteno.....	10
Figura 7 Formação de Xantofilas a partir de β -Caroteno.....	10
Figura 8 Aspecto da maceração das células com Nitrogênio líquido.....	28
Figura 9 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento completo 2^3 , para a concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).....	35
Figura 10 Superfícies de resposta e curva de contorno para os carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de glicerol e água de maceração de milho (a).....	38
Figura 11 Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^2 , para a concentração de carotenoides específicos ($\mu\text{g/L}$).....	38
Figura 12 Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa e evolução do pH da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> para as condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA).....	40
Figura 13 Cinética do consumo de substrato (Nitrogênio e Carbono Orgânico Total) da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> para as condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA).....	41
Figura 14 Cinética do consumo de glicerina da cepa <i>Sporidiobolus pararoseus</i> nas condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Microrganismos empregados na bioprodução de carotenoides.....	13
Tabela 2. Fontes de substratos alternativos na produção de carotenóides.....	15
Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no Planejamento Completo 2^3	26
Tabela 4 Variáveis e níveis utilizados no Planejamento Completo 2^2	27

Tabela 5 Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (N ₂) dos substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento ácido.....	32
Tabela 6 Componentes minerais dos substratos agroindustriais antes e após o pré-tratamento com ácido fosfórico.....	33
Tabela 7 Bioprodução de Carotenóides Totais empregando diferentes substratos.....	34
Tabela 8 Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³ valores codificados (reais) com a resposta em carotenóides totais.....	35
Tabela 9 Matriz do planejamento fatorial completo 2 ² valores codificados (reais) com a resposta em carotenóides totais e específicos, biomassa e pH.....	36
Tabela 10 Resultados do coeficiente de regressão e erro padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2 ² , para os carotenóides totais.....	36
Tabela 11 Análise de variância para os carotenoides totais.....	37
Tabela 1 Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> e evolução do pH para as condições otimizadas.....	55
Tabela 2 Cinética do consumo de substrato (Nitrogênio e Carbono Orgânico Total) da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> para as condições otimizadas.....	55
Tabela 3 Cinética do consumo de glicerol da cepa <i>Sporidiobolus pararoseus</i> nas condições otimizadas.....	56

1 INTRODUÇÃO

Carotenóides são pigmentos naturais responsáveis pela coloração amarela, laranja, vermelha, sintetizados por plantas e micro-organismos (leveduras, fungos filamentosos, algumas espécies de bactérias, algas e líquens) (ARMSTRONG, 1994; NIIZU, 2003). Devido às suas propriedades corantes e ao seu potencial efeito benéfico na saúde humana (atividade pró-vitâmica A, fortalecimento do sistema imunológico, diminuição do risco de várias doenças degenerativas), tem aumentado nos últimos anos o interesse nesses compostos, pelas indústrias de alimentos (corantes e suplementos nutricionais), farmacêutica, cosmética e de ração (FRASER & BRAMLEY, 2004).

A procura por compostos naturais, devido à preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos, tem resultado num aumento de pesquisas referentes à produção de carotenóides por via fermentativa. O desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de carotenóides visa um aumento do rendimento da concentração de carotenóides assim como a redução de custos relativos ao processo, através da utilização de substratos de baixo custo, como os subprodutos agroindustriais, e ricos em açúcares e matéria orgânica, sendo que no contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza (DAS et al., 2007).

No Brasil, a bioprodução de pigmentos a partir de resíduos agroindustriais, tais como melaço de cana, água de maceração de milho - milhocina, água de parboilização de arroz e glicerol, pode ter grande apelo econômico, devido ao baixo custo destes subprodutos e à abundância de matéria primas. Neste sentido foram registradas produções anuais médias para o arroz, milho e cana-de-açúcar de 12, 42 e 410 milhões de toneladas (IBGE, 2009). Ao exemplificar, somente na parboilização de arroz são geradas quantidades expressivas de resíduos, aproximadamente 0,83 L/kg de arroz em casca (FARIA et al., 2006). Na produção de biodiesel, são gerados, aproximadamente 10 m³ de glicerina ou glicerol para cada 90 m³ de biodiesel produzidos por transesterificação. Assim, as projeções mostram uma produção de cerca de 100 mil toneladas de glicerina/glicerol por ano e cerca de 250 mil toneladas a cada ano, a partir de 2013. Estima-se que em todo o mundo a produção de glicerol alcançará 1,2 milhões de toneladas por volta de 2012, devido ao aumento da produção de biodiesel (MOTA et al., 2009).

A agroindustrialização de produtos a base de milho através de processamento úmido resulta em subprodutos sólidos e líquidos, que dispostos de forma inadequada tornam-se fontes de contaminação e agressão ao meio ambiente. Assim, atualmente estão sendo feitos diversos estudos que visam a valorização e o aproveitamento destes subprodutos da cadeia do milho (palha do

sabugo do milho, milhocina e sabugo do milho). Neste contexto a água de maceração de milho – AMM ou Milhocina tem sido utilizada como um componente importante de alguns meios de crescimento, sendo excelente fonte de nitrogênio orgânico, componente essencial para o crescimento microbiano (LOSS, 2009).

O arroz é um dos cereais de maior importância na atualidade, tanto a nível mundial como nacional, sendo constituinte básico da dieta brasileira. O Brasil encontra-se entre os 10 maiores produtores de arroz, ocupando o nono lugar no mercado mundial.

O setor agropecuário do Rio Grande do Sul é destaque nacional, com participação de 13,42% no total da produção brasileira. O cultivo do arroz no estado abrange cerca de 47,8% do total produzido no Brasil, tornando o Rio Grande do Sul um dos maiores produtores nacionais deste grão, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. A atividade do plantio e a indústria do beneficiamento do arroz constituem uma das principais atividades econômicas na metade sul do Rio Grande do Sul, correspondendo a 99,8% da produção do estado, gerando metade de toda a produção nacional, com arrozais irrigados ocupando a faixa litorânea compreendida entre os municípios de Rio Grande e Santa Vitória do Palmar (QUEIROZ & KOETZ, 1997).

A parboilização tem se tornado um dos mais importantes processos de beneficiamento do arroz. Segundo Amato e Silveira (1991), em nível de exportações, o arroz parboilizado participa em cerca de 50% deste comércio.

O arroz parboilizado representa 25% do total de arroz produzido no Brasil, assim como no resto do mundo, sendo a parbolização do arroz definida na legislação brasileira como um processo hidrotérmico, no qual o arroz em casca é imerso em água potável com temperatura superior a 58°C, seguido de uma gelatinização parcial ou total do amido e secagem (BRASIL, 1998; AMATO e SILVEIRA, 1991).

Há algumas décadas as condições ambientais e os estimulantes da carotenogênese vêm sendo examinados, a fim de melhorar a produção de carotenóides e avaliar os micro-organismos produtores de pigmento (microalgas, fungos e bactérias). A composição do meio de cultivo, tais como a fonte de carbono e nitrogênio (AKSU e EREN, 2005), presença de metais e sais (BUZZINI et al., 2005) e/ou de agentes químicos (SILVA, 2004) são fatores que necessitam de investigação para um aumento na produção.

Tendo isso em vista, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da bioprodução de carotenóides utilizando uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus*, empregando substratos agroindustriais (glicerol, água de maceração de milho - AMM e água de parboilização de arroz - APA) em frascos agitados.

Como forma de embasar cientificamente os resultados obtidos será apresentado um referencial teórico coerente ao assunto, seguido pela descrição detalhada do procedimento experimental adotado. A apresentação e discussão dos resultados e as conclusões e sugestões encerram este trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

2.1 Estrutura química, nomenclatura e biossíntese dos carotenoides

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

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

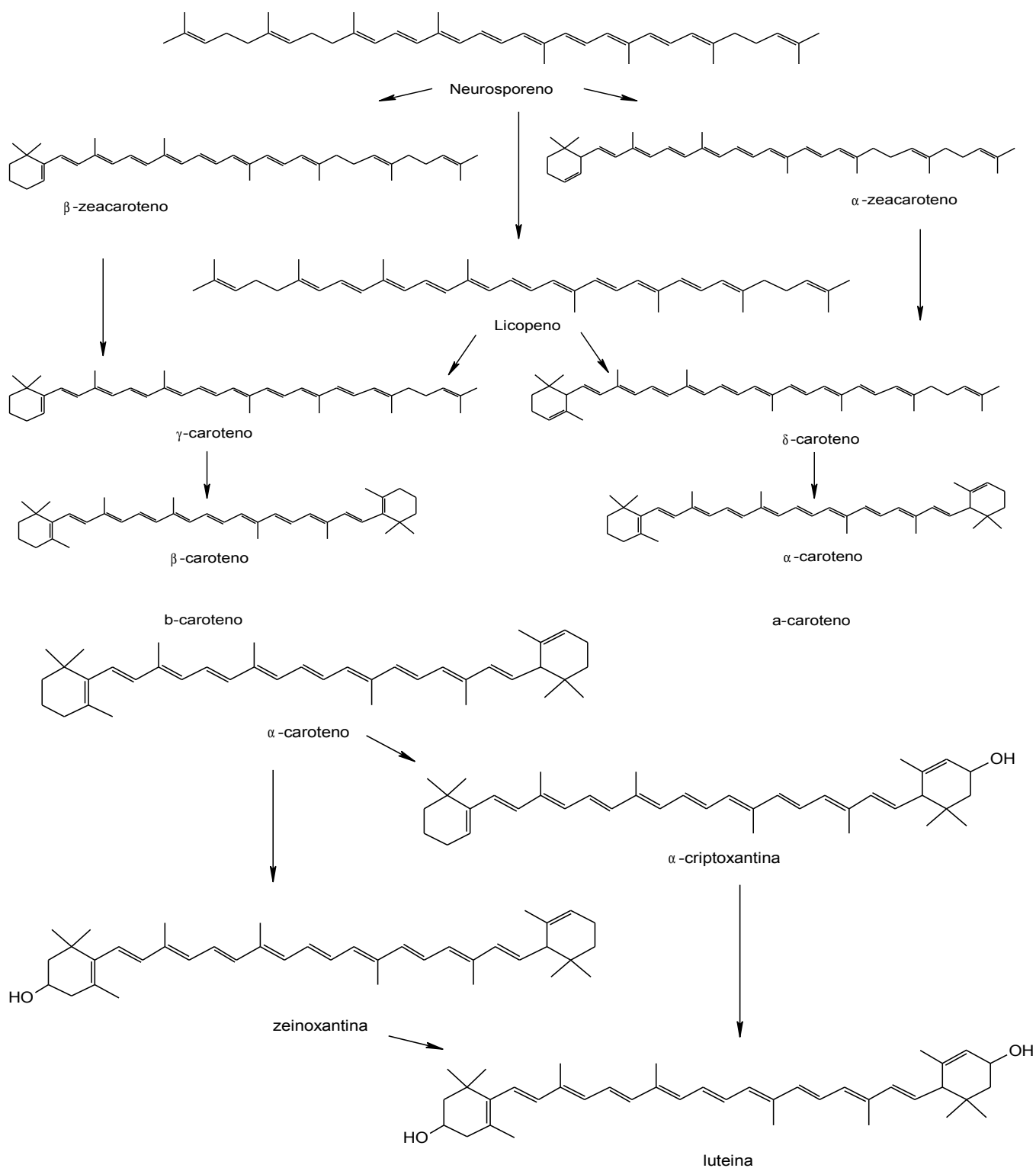


Figura 1: Estrutura química dos carotenoides

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 2.



Figura 2: Sumário dos principais estágios da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

As reações iniciais são comuns para a biossíntese de todas as classes de terpenoides e resultam na formação de um composto de vinte carbonos, o geranilgeranil difosfato (GGPP) como descrito na Figura 3 (SILVA, 2004).

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

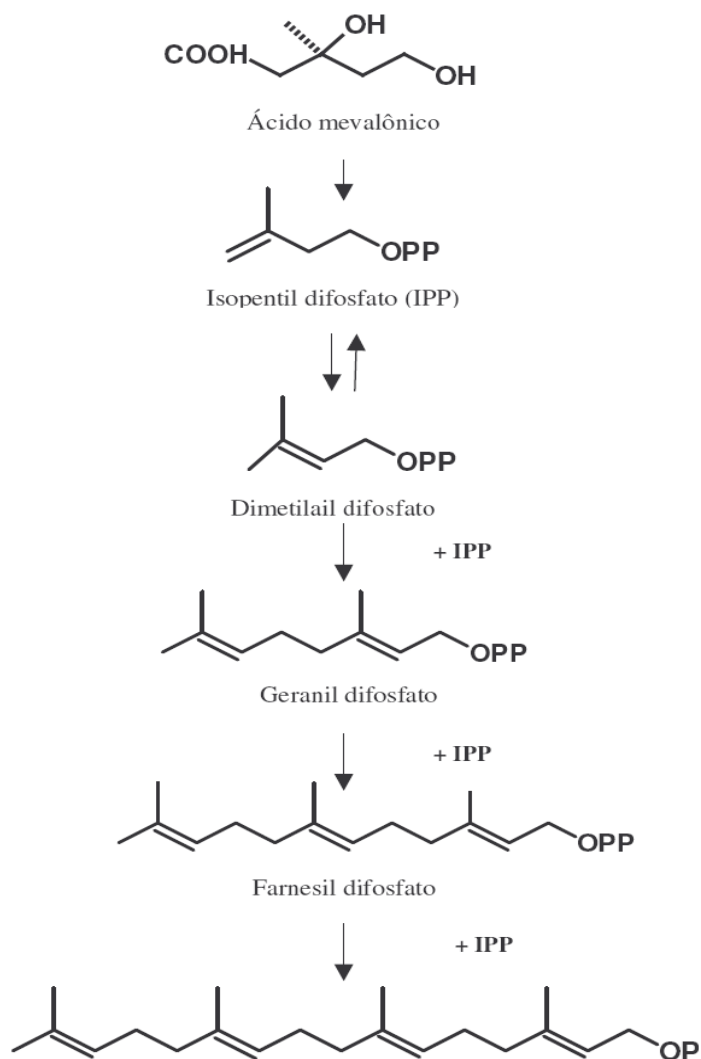


Figura 3: Estágios iniciais da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

A reação chave para a carotenogênese é a dimerização de duas moléculas de geranilgeranildifosfato para formar o fitoeno, que é o primeiro carotenóide com quarenta carbonos. Segue uma série de desaturações a partir do Fitoeno para formar Fitoflueno, Zetacaroteno, Neurosporeno e, finalmente, Licopeno (Figura 4).

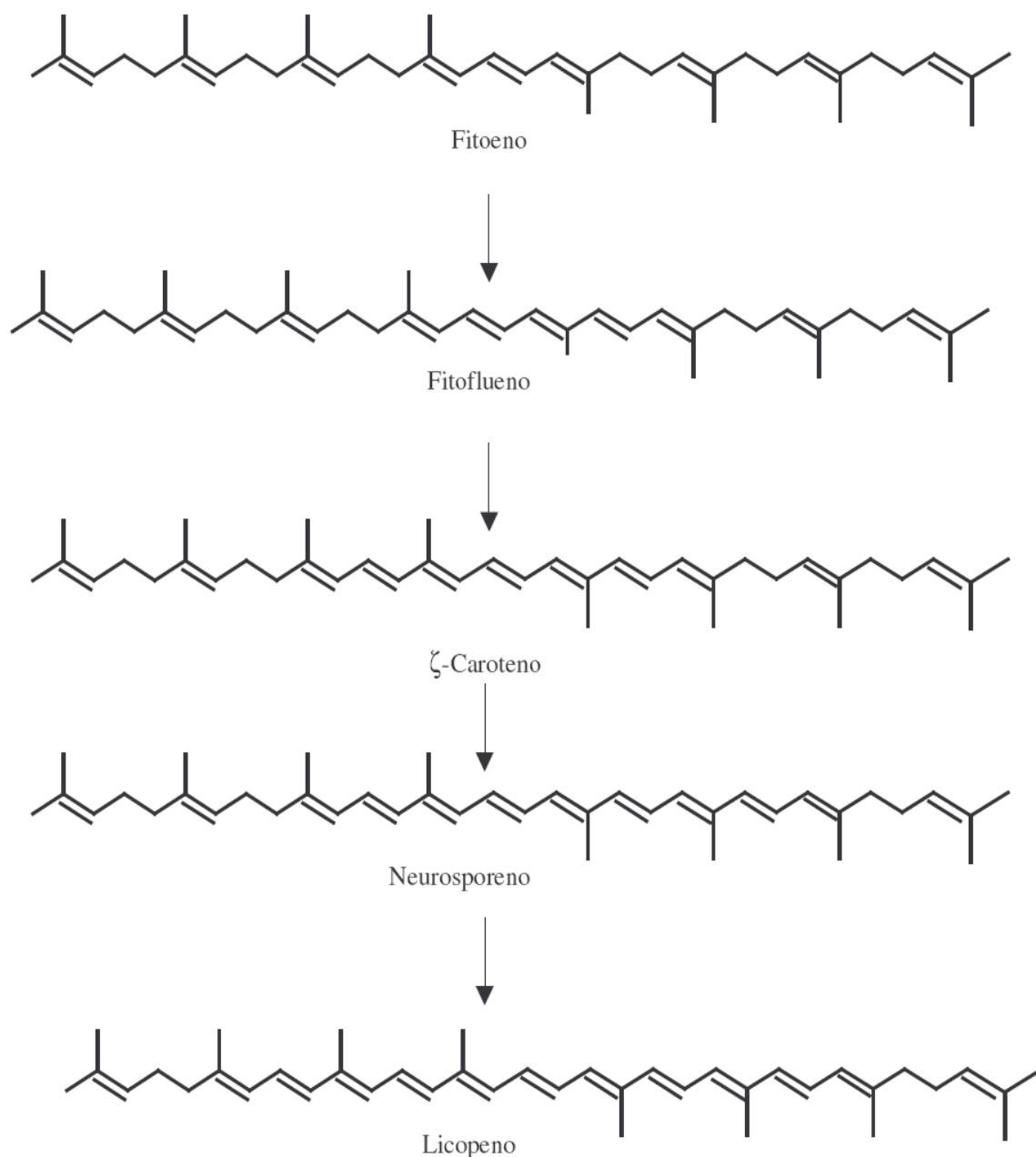


Figura 4: Estágios intermediários da biossíntese de carotenoides (SILVA, 2004).

A ciclização pode acontecer a partir de Neurosporeno ou de licopeno (Figura 5). O Neurosporeno sofre ciclização em uma das extremidades, formando o anel β de β -Zeaxaroteno ou o anel ϵ de α -Zeaxaroteno. 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 cliclizado 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).

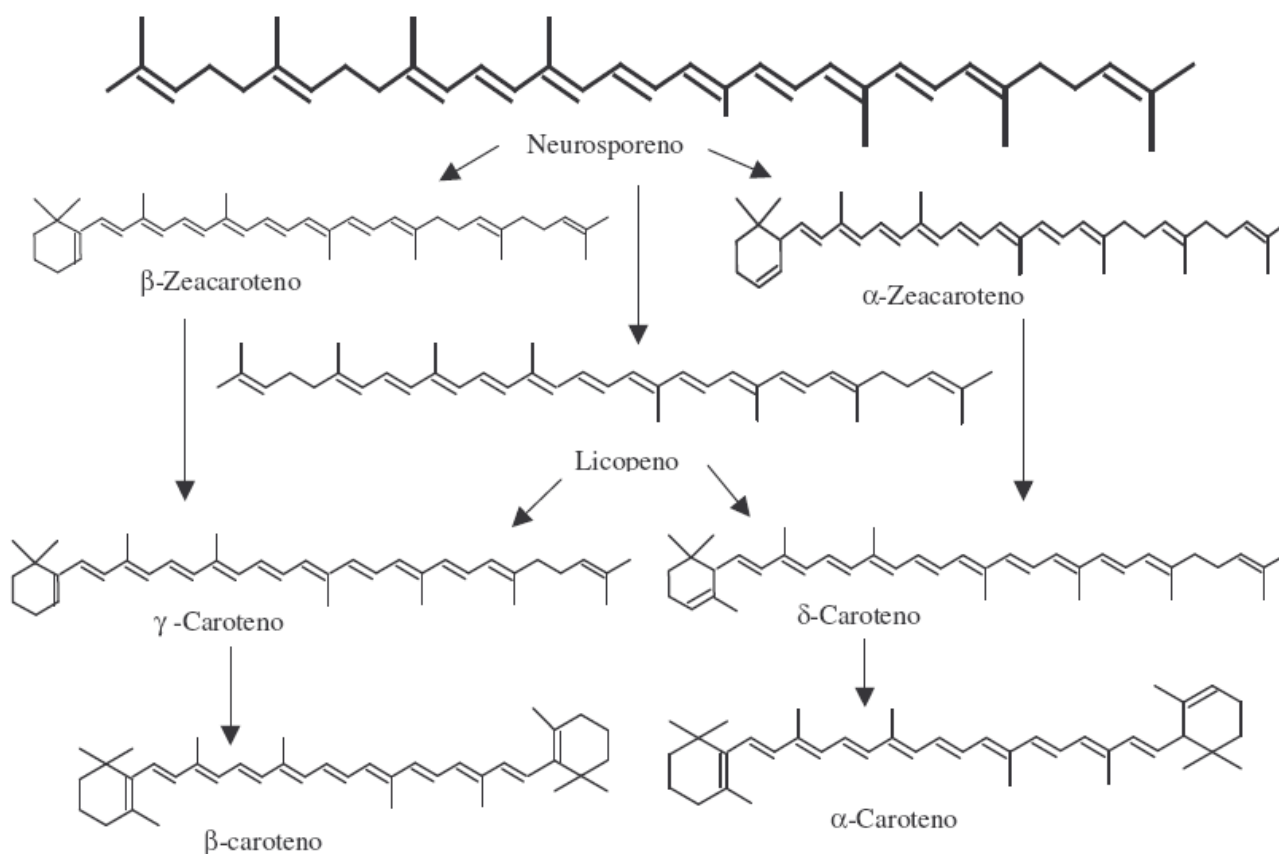


Figura 5: Formação de carotenoides cíclicos (SILVA, 2004).

Nos passos finais da biossíntese ocorre a introdução de substituintes como hidroxila, gerando as xantofilas (Figuras 6 e 7). 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).

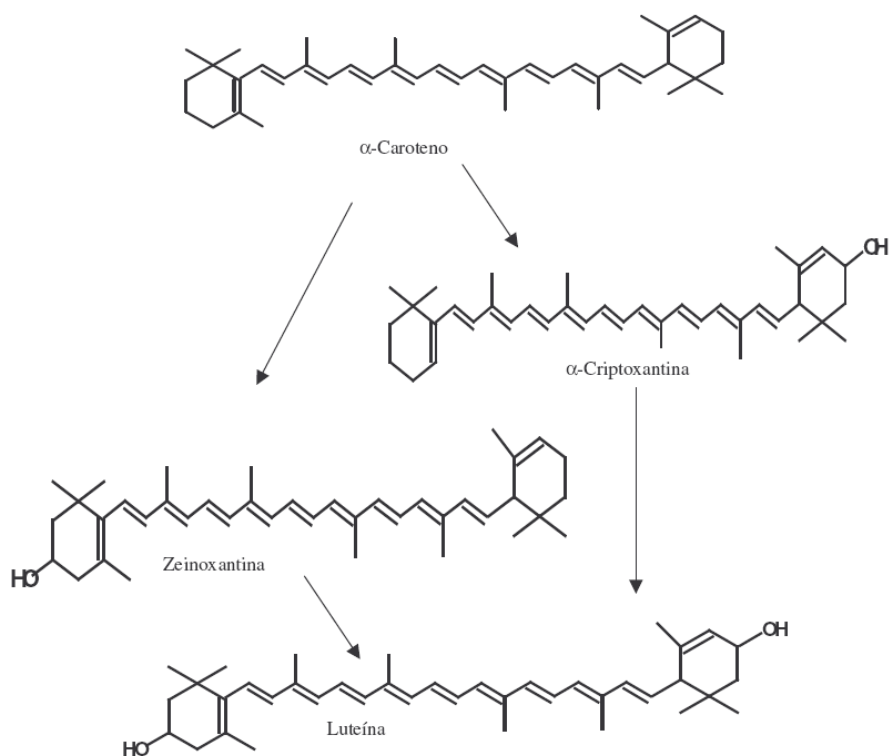


Figura 6: Formação de Xantofilas a partir de α -Caroteno (SILVA, 2004).

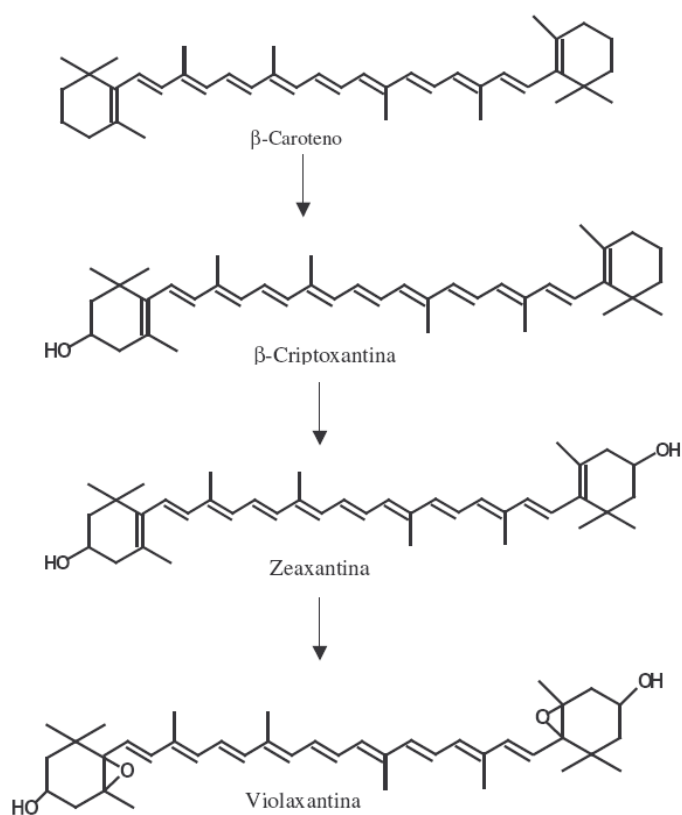


Figura 7: Formação de Xantofilas a partir de β -Caroteno (SILVA, 2004).

2.2 Propriedade e funções dos 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).

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

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

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

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

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

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

2.3 Micro-organismos produtores de carotenoides

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

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

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

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

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

Espécies	Carotenóides produzidos	Referências
Cianobactérias		
<i>Synechococcus sp.</i>	β –Caroteno, β – Criptoxantina, Zeaxantina, Mixoxantofila	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>	B –Caroteno	Paniagua-Michel et al. (2009).
<i>Dunaliella parva</i>	Anteraxantina, β - Caroteno, Neoxantina, Violaxantina, Zeaxantina	Takaichi, (2011).
<i>Dunaliella tertiolecta</i> DCCBC26	β –Caroteno (trans e 9-cis)	Takaichi, (2011).
<i>Haematococcus sp.</i>	Astaxantina, β -Caroteno.	Fazeli et al. (2006).
<i>Haematococcus pluvialis</i> NIES-144	Astaxantina	Vila et al. (2008). Yuan et al. (2011).
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	YUAN et al. (2011); Bhosale e Bernstein, (2005) ; Montero et al., (2005) ; Domínguez-Bocanegra et al. (2007).
<i>Phaeodactylum 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,	Fugisawa et al. (2009);

	Zeaxantina	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).
<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		
	β -Caroteno	Varzakakou et al. (2011); Tereshina et al. (2010).
<i>Blakeslea trispora</i>	Licopeno	Miura et al. (1998).
<i>Candida utilis</i>	Astaxantina	Wang et al. (2005).
<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	Carotenoides, Astaxantina	Montanti, (2011); Miao et al. (2011).
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	Wang et al. (2005).
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS 2.1557	Astaxantina, Zeaxantina	Bhosale e Bernstein, (2005).
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	Wang et al. (2005).
<i>Panus conchatus</i> as 5.154	β -Caroteno, Licopeno	Polaino, (2010); Bhosale, (2004).
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	β -Caroteno, γ -Caroteno, β -Zeacaroteno, Fitoeno, Licopeno, Neurospeno, Neurosporaxantina, Toruleno	Strobel et al. (2009).
<i>Podospora anserina</i>	Astaxantina	Taskin e Erdal, (2011); Tao et al. (2011).
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Caroteno	Buzzini et al. (2005).
<i>Rhodotorula graminis</i>	β -Caroteno	Montero et al. (2005).
<i>Rhodotorula minuta</i>	Astaxantina	Frengova et al. (2006); Wang et al. (2005).
<i>Rhodotorula rubra</i> AS2.670	Caroteno	Ng et.al. (2011).
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Licopeno	Yan et al. (2011); Verwaal et al. (2010).
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Astaxantina	Wozniak et. al. (2011); Breitenbach et.al. (2011).
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>		

2.4 Fatores que exercem influência na carotenogênese

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

2.4.1 Condição do meio de cultivo

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

Alguns estudos têm investigado a produção de carotenoides por fontes alternativas de substratos tais como grãos (aveia, trigo, cevada, milho, arroz, centeio), lipídios e substâncias relacionadas, glicerol, celobiose, melaço de cana de açúcar, mosto de uvas e soro de queijo (Tabela 2) por diferentes cepas em bioprodução com frascos agitados (CUARESMA, 2011).

Tabela 2. Fontes de substratos alternativos na produção de carotenoides

Subprodutos	Referências
Soro de leite ultrafiltrado	Frengova et al. (2006).
Melaço de sacarose	Aksu e Eren, (2005); Goksungur et al. (2004).
Soro de leite	Aksu e Eren, (2005).
Glicerol técnico	Cuaresma, (2011).
Fenol	Kim et al. (2004).
Água do mar	Leema et al. (2010).
Glicerol indústria de sabão	Mantzouridou et al. (2008).
Glicerol resíduo biodiesel	Holenbiovska et al. (2010).
Óleo de bagaço de oliva cru	Colle et al. (2010).
Óleo de soja	Hou et al. (2010).
Mosto de uvas	Crupi, (2010).
Leite de côco	Dominguez-Bocanegra et al. (2007).
Melaço de cana de açúcar	Valduga et al. (2007); Bhosale e Gadre, (2001).
Água de maceração de milho	Ananda e Vadlani, (2010).
Hemicelulose hidrolisada de eucalipto	Canettieri et al. (2007).
Salmoura de rabanete	Malisorn e Suntornsuk, (2009).

A produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* utilizando substratos de baixo custo (glicose, sacarose de melaço e lactose do soro de queijo) também foi estudada por Aksu e Eren, (2007). A maior concentração de carotenóides totais (125.000 µg/L) foi obtida com 20 g/L de sacarose de melaço, enquanto que, o maior rendimento de produto baseado na máxima concentração celular (35,5 mg/g) foi alcançado com a lactose do soro na concentração de 13,2 g/L.

Os resultados comprovaram que a *R. glutinis* é um micro-organismo promissor para a utilização industrial.

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

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

O glicerol tornou-se uma fonte de carbono barata e abundante, devido à inevitável geração como subproduto da produção de biodiesel. Em todo o mundo o excedente de glicerol pode levar ao encerramento das instalações dedicadas à sua produção ou refino, além disso, a viabilidade econômica da indústria de biodiesel tem sido muito afetada.

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS et al., 1980).

Vários estudos foram desenvolvidos visando a utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente a mecanismos de assimilação de glicerol por estes micro-organismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al., 2007).

Após a passagem do glicerol através da membrana plasmática pelos possíveis mecanismos, 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).

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).

É importante ressaltar ainda que o glicerol também é assimilado por algumas leveduras, e devido a isso ele foi escolhido como fonte de carbono na fermentação para a produção de carotenóides, visando uma possível utilização para a grande quantidade disponível hoje no mercado.

A água de maceração de milho – AMM ou Milhocina tem sido utilizada como um componente importante de alguns meios de crescimento, sendo 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 mais favorável aos processos fermentativos, quando comparada ao extrato de levedura (meio sintético utilizado como fonte de nitrogênio), sendo uma fonte mais rica em nitrogênio, aminoácidos e vitaminas (AMARTEY e LEUNG, 2000; RIVAS et al., 2004).

A água de parboilização de arroz também é utilizada 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 aproveitada como substrato no meio de cultivo para a produção de carotenóides.

Outro resíduo agroindustrial potencial como substrato é o melaço, que é um subproduto da produção de açúcar, tanto do açúcar de beterraba, como de cana-de-açúcar, é resultante da etapa de centrifugação ou de decantação, no processo de fabricação de açúcar. Contém açúcares redutores e parte de sacarose não cristalizada. É utilizado na fermentação para produção de diversos produtos, tendo como principal a produção de álcool, em especial o etanol, como matéria-prima para fabricar cachaça, rum, fermentos biológicos e é usado largamente em rações animais (AKSU e EREN, 2005). O Melaço é muito utilizado como substrato de fermentações, uma vez que constitui uma valiosa fonte de substâncias de crescimento, tais como ácido pantotênico, inositol, elementos traços e, em menor quantidade, biotina (BHOSALE e GADRE, 2001).

2.4.2 Temperatura

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

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

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

O estudo da influência da temperatura sobre o crescimento celular e produção de carotenoides da levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foi analisado por Razavi e March (2006), sendo observado o crescimento na produção celular enquanto manteve-se a temperatura entre 19 °C e 27 °C. Em temperatura superior a 27 °C ocorreu crescimento celular, porém as células não apresentaram coloração. A produção dos carotenoides ocorreu rapidamente durante a fase exponencial na maioria das temperaturas, com exceção a 31 °C. A temperatura ótima de bioprodução foi de 19 °C, onde a torularrodina foi sintetizada em quantidade superior ao β -Caroteno, 120.000 $\mu\text{g/L}$ e 5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

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

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

2.4.3 pH

A biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras. De modo geral, o pH do meio fermentativo decresce nas primeiras 72 h de fermentação, seguido de uma elevação durante a fase

intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final do processo fermentativo (FRENGOVA et al., 1994).

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial é objeto de estudo na produção de carotenóides. Para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* o pH inicial foi avaliado por Razavi e March (2006), apresentando um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e biomassa. O conteúdo mínimo de carotenóides e células foi observado com cultivo a pH 3,5 (biomassa: 6,8 g/L; carotenóides específicos: 2,0 mg/g). A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH de 3,5 a 6,0, sendo pH 6,0 ótimo para o crescimento celular (11,3 g/L) e formação de pigmento (38,7 mg/L).

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

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

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

2.4.4 Outros fatores que influenciam a carotenogênese

Componentes químicos:

Muitos agentes químicos afetam a carotenogênese em um grande número de sistemas microbióticos. Estes componentes que incluem terpenos, ionenos, aminas, alcalóides e antibióticos (BHOSALE, 2004), ácido acético, β -ionona, ácido mevalônico, difenilamina e outros aminoácidos (SILVA, 2004), piridina, imidazol, e metilptenona estimulam a formação de Licopeno em *Blaskea trispora* e *Phycomyces blakesleeanus* (FEOVILA et al., 1994).

Metais, íons e sais:

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

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

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

Luz/Luminosidade:

A produção e o acúmulo de carotenoides são positivamente afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o micro-organismo. A teoria da foto indução pode ser descrita em dois aspectos, no primeiro o efeito da luz sobre o crescimento do micro-organismo exerce papel fundamental, como estimulante da

produção; o segundo aspecto considera que o acúmulo de carotenoides na célula está associado com o aumento da atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de carotenoides (BHOSALE, 2004).

Alguns trabalhos demonstram que determinadas leveduras biossintetizam carotenoides contra os danos causados pela luz. Os efeitos da luz branca sobre o crescimento e produção de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* foi investigado por Sakaki et al. (2001). Para a levedura não pigmentada *Saccharomyces cerevisiae* uma fraca irradiação de luz branca não apresentou efeito sobre o crescimento das células, no entanto na levedura selvagem *R. glutinis*, a luz inibiu o crescimento celular, onde simultaneamente, a produção de Torularrodina aumentou (7,9 para 14,2 mg/100g células), principalmente durante a fase exponencial.

Taxa de agitação e aeração:

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

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

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

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

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

2.5 Extração e recuperação de carotenóides

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

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

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

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

2.6 Aplicação de carotenoides na indústria de alimentos

Comercialmente, os carotenoides são usados como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais, com um mercado global de aproximadamente US\$ 935 milhões/ano, sendo que somente a Astaxantina representou cerca de US\$ 150 milhões no ano de 2000 e, com um valor expressivo de US\$ 2000,00 (FRASER & BRAMLEY, 2004).

Um grande mercado de pigmentos está sendo abastecido por meio de síntese química. No entanto, na indústria alimentícia e de cosméticos, a aplicação de carotenóides quimicamente

sintetizados é restrita devido a sua toxicidade. Devido isso, a produção comercial de carotenóides usando carotenóides produzidos por micro-organismos tem sido levada em consideração por ser altamente eficiente e de processo com fácil manipulação. Numerosos estudos têm sido apresentados nos últimos anos a respeito da síntese de carotenóides por micro-organismos, incluindo *Flavobacterium* e *Micrococcus*, as algas *Dunaliella* e *Haematococcus*, os fungos *Blakeslea trispora*, e as leveduras do gênero *Phaffia*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* (CHEN et al., 2006).

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

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

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

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

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

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

A importância de carotenóides em alimentos vai além de seu papel como corante. Em se tratando de nutrição humana, a vitamina A é proveniente de alimentos de origem animal e as pró-vitaminas A de alimentos de origem vegetal, que possuem carotenóides passíveis de serem biologicamente transformados em vitamina A. Estruturalmente, a vitamina A é a metade da molécula de β -caroteno com uma molécula adicional de água. Para um carotenóide apresentar atividade pró-vitáminica A é necessário que a molécula seja constituída de um anel β não substituído e de uma cadeia poliênica de onze carbonos. Das mais de 600 estruturas de carotenóides conhecidas, pouco mais de 10% são pró-vitaminas A. Em países menos desenvolvidos, a deficiência de vitamina A é um dos problemas mais sérios de saúde pública. Em nível mundial, cerca de 60 % da vitamina A alimentar vêm das pró-vitaminas A, esta porcentagem aumenta para 80 % nos países em desenvolvimento. Esses precursores têm a vantagem adicional de não serem convertidos em vitamina A quando o corpo humano não necessita, evitando assim, potencial toxicidade causada por vitamina A em excesso (SILVA, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos e meios de cultura

A produção de carotenóides em agitador orbital foi realizada com a levedura *Sporidiobolus pararoseus*. Para a manutenção da cultura utilizou-se meio PCA e, para o preparo do inóculo, meio YM. A seguir tem-se a descrição da composição e preparo dos meios:

a) Meio de manutenção: Meio PCA (Plate Count Agar) apresentando na composição 2,5 g/L de extrato de levedura (Vetec), 5g/L triptona (Himedia), 1g/L de dextrose (Nuclear) e 20g/L de agar (Vetec). Após preparo, o meio foi esterilizado em autoclave por 15 min a 121 °C (Phoenix, modelo AV75). Após esterilização, o meio foi vertido em placas de petri até completa solidificação.

b) Meio de inóculo: Meio YM (Yeast Malt Extract) constituído de 3 g/L de extrato de levedura (Vetec), 3 g/L de extrato de malte (Acumedia), 5 g/L peptona (Himedia), 10 g/L de glicose (Nuclear). Após preparo do meio, o mesmo foi esterilizado em autoclave (Phoenix, modelo AV75) durante 15 min a 121°C.

c) Meio de bioprodução: Constituído por glicerina (Merck), Água de Maceração de Milho (Corn Products) e Água de Parboilização de Arroz (Nelson Wendt), com composição definida pelo planejamento de experimentos (Item 3.3). Após preparo do meio, o mesmo foi esterilizado em autoclave (Phoenix, modelo AV75) durante 15 min a 121 °C.

3.2 Substratos agroindustriais testados

Os substratos industriais utilizados foram, 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 e o glicerol (glicerina bidestilada 85% PA, Merck – Alemanha).

Os meios industriais que consta na composição apresenta composição complexa, e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação devido à formação de precipitados no meio de fermentação e/ou pela presença de pigmentos que poderão ser extraídos com os carotenóides, neste caso é indispensável o tratamento destes para não comprometer a recuperação dos carotenóides.

A água de maceração de milho e o melaço de cana-de-açúcar foram utilizados na concentração de 100 g/L. Inicialmente, ajustou-se o pH do melaço e da água de maceração de milho para 3,0 utilizando ácido sulfúrico (Quimex) 1 N e ácido fosfórico (Nuclear) 1 N, respectivamente.

Os substratos permaneceram em repouso por 24 horas a 24 °C; então os mesmos foram centrifugados (Eppendorf 5403) a 5000 rpm por 15 minutos e ajustou-se o pH para 4,0 no melaço e 5,5 para a água de maceração de milho, com solução de NaOH (Vetec) 2 N. No estudo de pré-tratamento realizados na água de maceração de milho empregou-se tratamento com ácido sulfúrico e/ou fosfórico (VALDUGA, 2005).

3.3 Produção de carotenóides

Inicialmente, a cultura de *Sporidiobolus pararoseus* foi transferida para placas de petri em meio PCA em estufa (Tecnal, modelo TE 393/2), a 25 °C por 120 h. Após o crescimento, as placas

foram conservadas a 4°C em refrigerador (Brastemp). A cada dois meses foram realizadas repicagens dos micro-organismos.

Para o preparo do inóculo, duas alçadas de células da cultura estoque foram transferidas para erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio YM. Após inoculação, o frasco foi coberto com papel alumínio e incubado a 25°C, 180rpm por aproximadamente 35h em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB).

Em seguida, foi transferido 10mL do inóculo, em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo 90mL de meio de cultura definido pelos planejamentos experimentais e incubados a 25 °C, 180 rpm por 120 h.

Para estudar os efeitos da composição do meio de cultura foi utilizado metodologia de planejamento de experimentos, sendo que inicialmente foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 3).

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

<i>Variáveis Independentes</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>		
		-1	0	+1
Glicerina (g/L)	X ₁	30,0	40,0	50,0
AMM (g/L)	X ₂	10,0	25,0	40,0
APA (g/L)	X ₃	8,0	20,0	32,0

* AMM – Água de maceração de milho; APA – Água de parboilização de arroz; Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm e 25°C, pH inicial 4,0.

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 realizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 (1 ponto central repetido 3 vezes e pontos axiais), onde as variáveis independentes estudadas e os níveis encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Variáveis e níveis utilizados no planejamento do tipo 2^2

<i>Variáveis Independentes</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Glicerol (g/L)	X ₁	0	11,63	40,0	68,37	80,0
AMM (g/L)	X ₂	0	5,82	20,0	34,18	40,0

* AMM – Água de maceração de milho; Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm e 25°C, pH inicial 4,0.

As respostas ou variáveis dependentes estudadas foram: carotenóides totais (µg/L), produção específica de carotenóides (µg/g), biomassa (g/L) e pH.

3.4 Recuperação de Carotenóides

A metodologia de extração e recuperação de carotenoides foi realizada segundo metodologia descrita por Valduga et al., (2009c), com modificações. As células foram centrifugadas a $6.500 \times g$, 5°C por 10 min (Eppendorf 5403) e submetidas a sucessivas macerações em almofariz, após congelamento com N_2 líquido (Figura 8). Posteriormente, adicionou-se dimetilsufóxido - DMSO (Nuclear) na relação 2:1(v/v), seguindo de aquecimento a 45°C durante 30 min (Fanem 102) e homogeneizações periódicas em vortex (Phoenix AP-56). Em seguida, adicionou-se mistura de acetona (Quimex): metanol (7:3, v/v), seguindo de centrifugações ($6.500 \times g$, 5°C , 10 min). O sobrenadante foi separado e realizaram-se extrações sucessivas, até as células apresentarem-se sem coloração. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Tecnal TE-210) a 35°C e os pigmentos foram solubilizados em metanol (Merck).



Figura 8 - Aspecto da maceração das células com nitrogênio líquido (CABRAL, 2010).

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

3.5 Metodologia analítica

3.5.1 Caracterização dos substratos agroindustriais

Para caracterizar os substratos agroindustriais brutos e após os pré-tratamentos com ácidos efetuaram-se as seguintes análises físico-químicas:

a) Minerais totais (cinzas) determinados por incineração em mufla (Novus) a 550°C de acordo com procedimentos descritos por IAL (1985);

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

c) Densidade ótica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 448 nm.

3.5.2 Determinação de carotenóides totais

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

$$x = \frac{E}{L_{1cm} \times 100} \quad (1)$$

Onde:

x = carotenóides (g).

y = solução (mL).

E = absorbância.

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

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

3.5.3 Determinação da biomassa

Após extração dos carotenóides, as células centrifugadas (6.500 rpm, 5°C por 10min), foram lavadas com água destilada, e a massa celular foi quantificada através de secagem em estufa (Fanem SE-320) a 105°C até peso constante.

3.5.4 Determinação do pH

O pH dos meios de cultivo foi determinado usando potenciômetro (DMPH-2, Digimed). Este foi fixado em 4,0 e o ajuste realizado com solução de HCl 2 M.

3.5.5 Nitrogênio Total

Foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

3.5.6 Determinação de Carbono Orgânico Total (TOC)

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

3.5.7 Determinação de glicerol

O glicerol foi determinado conforme metodologia descrita por Coks e van Rede (1966). Inicialmente, preparou-se uma solução de periodato na concentração de 60 g/L. Em seguida adicionou-se 100 ml da solução de periodato e 10 ml de amostra em erlenmeyer (250ml). Posteriormente adicionaram-se 5 gotas de azul bromotinol e 1 gota de H₂SO₄, com 100 ml de periodato. Permanecendo ao abrigo da luz (papel alumínio) por 30min. Posteriormente, adicionou-se 10 ml de etilenoglicol em cada amostra e mantidos no escuro por 20 min, após esta etapa foram adicionados 300 ml de água destilada. Em seguida, as amostras foram tituladas e o pH controlado. A quantidade de glicerol foi expressa em g/L, conforme equação 2.

$$\text{Glicerol (g/L)} = 9,209 \times n \times (T1-T2) \times 10/W \quad (2)$$

Onde: n = normalidade da solução de hidróxido de sódio; T1 = volume gasto de NaOH na amostra; T2 = volume gasto de NaOH no branco; W = Peso da amostra.

3.6 Cinética de bioprodução

Com o objetivo de verificar a cinética de consumo de substrato (nitrogênio e carbono orgânico total - COT), biomassa, evolução de pH e produção de carotenoides, realizou-se coleta de amostras de meio a cada 8 h, para uma biorreação conduzida nas condições referentes ao ponto maximizado do planejamento fatorial completo 2².

3.7. Tratamento estatístico

Os ensaios dos pré-tratamentos dos substratos foram avaliados pela análise de variância (Teste de Tukey), com nível de confiança de 95 %, utilizando *software* STATISTICA versão 7.0.

Os efeitos das variáveis investigadas dos planejamentos de experimentos foram estatisticamente tratados utilizando metodologia de planejamentos, empregando *software* STATISTICA versão 7.0, com nível de confiança de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-tratamentos de substratos agroindustriais

Na Tabela 5 tem-se as respostas para densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (COT) para os resíduos agroindustriais tratados e não tratados.

Tabela 5. Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (N₂) dos substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento ácido.

<i>Tratamento</i>	<i>D.O</i>	<i>Carbono (mg/L)</i>	<i>N₂ (mg/L)</i>
AMMs	0,238 ^c ± 0,00015	21648,20 ^d ± 115,00	4371,29 ^a ± 42,79
AMMt	0,198 ^d ± 0,00015	18979,80 ^e ± 482,80	3643,91 ^b ± 92,65
Ms	1,705 ^a ± 0,0002	35117,20 ^b ± 485,00	608,15 ^c ± 30,99
Mt	1,671 ^b ± 0,004	33988,10 ^c ± 25,00	528,11 ^d ± 9,82
APA	0,125 ^e ± 0,0002	743,2 ^f ± 68,50	124,85 ^f ± 0,919
Glicerol	0,0087 ^f ± 0,00015	434669,0 ^a ± 500,00	261,41 ^e ± 21,98

*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; Ms – Melaço sem pré-tratamento; Mt – Melaço tratado; APA – Água de parboilização de arroz tratada.

Verifica-se que a água de maceração de milho pré-tratada quimicamente apresentou diferença significativa (p<0,05) em relação a densidade ótica (D.O), o teor de carbono orgânico total (COT) e N₂, quando comparado ao substrato sem tratamento. Analisando estes resultados,

nota-se que o pré-tratamento ácido da AMM e melaço acarretaram perdas de 12,33 e 3,21% na concentração de carbono orgânico total (COT), 16,64 e 13,16% para o nitrogênio e 16,7 e 2% para a densidade ótica, respectivamente. Estes resultados demonstram que o tratamento com ácido fosfórico e sulfúrico apresentaram efeito complexante de substâncias pigmentadas e de impurezas, e assim contribuindo com a clarificação do substrato agroindustrial, com diminuição efetiva da densidade ótica. Outros trabalhos evidenciaram o mesmo comportamento, Bhosale (2004) e Roukas (1998), justificaram o fato, mostrando que isso ocorre devido à presença de metais pesados no meio e outros interferentes (íons, sais e etc.). Sendo que alguns destes componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção e também dificultar posterior recuperação de bioprodutos.

Os resultados dos minerais (micro e macronutrientes) dos substratos com ou sem pré-tratamento ácido fosfórico encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Componentes minerais dos substratos agroindustriais antes e após o pré-tratamento com ácido fósforico.

<i>Minerais</i>	<i>Substratos agroindustriais</i>	
	AMMs*	AMMt*
Al (mg/L)	2770,5 ^a ± 142,95	2647,274 ^a ± 42,36
Ca (mg/L)	316,52 ^a ± 45,44	296,58 ^a ± 18,83
Cu (mg/L)	1,52 ^a ± 0,162	1,38 ^a ± 0,169
Mg (mg/L)	739,18 ^a ± 3,02	639,83 ^b ± 2,24
Mn (mg/L)	5,73 ^a ± 0,018	5,03 ^a ± 0,034
Zn (mg/L)	20,39 ^a ± 0,143	18,97 ^a ± 0,098
Na (mg/L)	2849,1 ^a ± 40,43	370,50 ^b ± 3,1
Fe (mg/L)	13,96 ^a ± 0,277	10,11 ^b ± 0,056

	APA	Glicerol
Al (mg/L)	1345,23 ± 31,37	0,00 ± 0,00
Ca (mg/L)	452,38 ± 8,71	255,74 ± 8,74
Cu (mg/L)	1,13 ± 0,057	0,864 ± 0,006
Mg (mg/L)	211,83 ± 4,86	33,38 ± 0,915
Mn (mg/L)	40,01 ± 0,84	0,733 ± 0,007
Zn (mg/L)	12,58 ± 0,239	6,76 ± 0,227
Na (mg/L)	372,81 ± 11,32	210,14 ± 5,72
Fe (mg/L)	8,28 ± 0,208	2,3 ± 0,048

* Médias ± desvio padrão, seguidas de letras iguais nas linhas indicam não haver diferença significativa a 5 % (Teste Tukey); AMMs - Água de maceração de milho sem tratamento AMMt - Água de maceração de milho tratada, APA - Água de parboilização de arroz e glicerol.

No pré-tratamento do substrato com ácido fosfórico (Tabela 6) verificou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) no teor de alumínio, cálcio, cobre, manganês e zinco para a água de maceração de milho. Constatou-se que as maiores reduções foram verificadas para o sódio (87%),

ferro (27%) e magnésio (13 %) na água de maceração de milho. Este resultado é razoável, uma vez que a maioria dos metais possuem elevada solubilidade em soluções ácidas (VOGEL, 1981) e não precipitam.

De acordo com a Tabela 6, observa-se que o água de parboilização de arroz apresenta concentrações consideráveis de alumínio (1345 mg/L), cálcio (452 mg/L), manganês (40 mg/L) e sódio (372 mg/L). Estes minerais podem desempenhar funções fundamentais para a carotenogênese. Para o glicerol foram observados valores consideráveis de cálcio (255,74), sódio (210,14) e magnésio (33,38), macro-nutrientes que exercem funções importantes no metabolismo celular. Sendo o magnésio, co-fator chave para diversas reações enzimáticas.

4.2 Bioprodução de carotenoides

Com a finalidade de definir os substratos agroindustriais para a bioprodução de carotenóides, ensaios prévios foram realizados empregando diferentes substratos (extrato de malte, peptona, glicerol e melaço), conforme desmostrado na Tabela 7. A máxima bioprodução de carotenóides (600,98 µg/L) foi observada no ensaio 4, com 50 g/L de glicerina, 10,1 g/L de água de maceração de milho pré-tratada (AMM) e 32 g/L de água de parboilização de arroz. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos (2010) e Burkert (2010), os quais mostram que concentrações baixas de glicerol (10, 20 e 30 g/L) apresentaram melhor bioprodução, que altas concentrações. Isso é justicado pelo fato do micro-organismo utilizar outras fontes de carbono disponíveis no meio, não necessitando de grandes concentrações de glicerol para uma alta bioprodução.

Tabela 7. Bioprodução de Carotenóides Totais empregando diferentes substratos.

<i>Ensaio</i>	<i>E. malte</i>	<i>Peptona</i>	<i>Glicerol</i>	<i>Melaço</i>	<i>AMM</i>	<i>APA</i>	<i>Carotenoides Totais *</i>
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(µg/L)
1	15	15	60	-	-	-	473,10 ± 0,739 ^b
2	15	15	30	-	-	-	534,05 ± 47,86 ^b
3	15	15	-	50	-	-	524,02 ± 46,95 ^b
4	-	-	50		10,1	32	600,98 ± 3,91 ^a

* Média ± desvio padrão seguida de letras iguais não diferem estatisticamente á nível de 5% (Teste Tukey); Condições fixas: 180 rpm e 25°C, pH inicial 4,0.

Assim, sugere-se que o glicerol é uma fonte de carbono mais interessante para a bioprodução (Tabela 7), pois apresenta uma maior concentração de carbono, macronutriente fundamental para a célula microbiana, e baixa concentração substâncias de cor, consideradas interferentes no meio de

bioprodução. Valduga (2010), relata que altas concentrações de metais pesados presentes no melaço de cana-de-açúcar podem estar envolvidos em problemas críticos, influenciando o pH do substrato e estando envolvidos na inativação de enzimas associadas a biossíntese do produto. Baseado nos resultados obtidos nos ensaios prévios (Tabela 7), optou-se por trabalhar com os substratos agroindustriais, glicerol, APA e AMM, por estes apresentarem os melhores resultados de bioprodução e visando a redução dos custos de processo. A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^3 (valores reais e codificados) e a resposta em carotenóides totais. Observando os resultados obtidos neste planejamento, verifica-se que o ensaio 6 foi o que apresentou a maior concentração de carotenóides totais (803 $\mu\text{g/L}$).

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^3 , valores codificados e reais com a resposta em carotenóides totais.

<i>Ensaios</i>	<i>Variáveis Independentes</i>			<i>Carotenóides Totais ($\mu\text{g/L}$)</i>
	<i>Glicerol (g/L)</i>	<i>AMM (g/L)</i>	<i>APA (g/L)</i>	
1	-1 (30)	-1 (10,1)	-1 (8)	499,93
2	-1 (30)	-1 (10,1)	1 (32)	588,73
3	1 (50)	-1 (10,1)	-1 (8)	700,33
4	1 (50)	-1 (10,1)	1 (32)	598,82
5	-1 (30)	1 (40)	-1 (8)	294,07
6	-1 (30)	1 (40)	1 (32)	803,03
7	1 (50)	1 (40)	-1 (8)	327,75
8	1 (50)	1 (40)	1 (32)	450,88
9	0 (40)	0 (25)	0 (20)	361,86
10	0 (40)	0 (25)	0 (20)	362,70
11	0 (40)	0 (25)	0 (20)	349,77

* AMM – Água de maceração de milho; APA – Água de parboilização de arroz; Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm e 25°C, pH inicial 4,0.

A Figura 9 apresenta o gráfico de pareto do planejamento fatorial completo 2^3 . Analisando esta figura, observa-se que o glicerol foi a variável que influenciou positivamente ($p < 0,05$) na produção de carotenóides, o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1, possivelmente haverá aumento na concentração de carotenóides totais. Portanto, para maximizar a bioprodução de carotenóides totais deve-se deslocar o nível de estudo, desta variável, para valor superior. Entretanto, a AMM apresentou efeito negativo significativo, indicando que o nível deve ser deslocado para valor inferior, a fim de melhorar a produção de carotenóides.

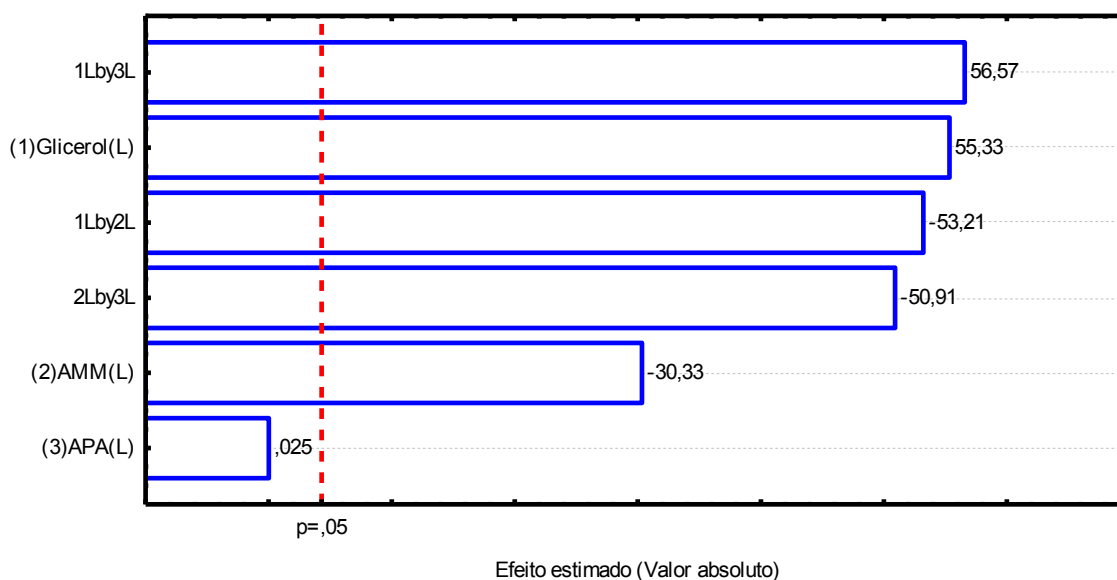


Figura 9 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento completo 2^3 , para a concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g/L}$).

A Tabela 9 apresenta os valores reais e codificados do planejamento fatorial completo 2^2 e a resposta em concentração de carotenoides totais e específicos, biomassa e pH. O ensaio 8 apresentou o melhor rendimento de carotenóides totais ($843 \mu\text{g/L}$), sob as condições de 40g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 valores codificados (reais) com a resposta em carotenóides totais e específicos, biomassa e pH.

<u>Ensaio</u>	<u>Variáveis Independentes*</u>			<u>Respostas</u>		
	Glicerol (g/L)	AMM (g/L)	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)	Carotenoides Específicos ($\mu\text{g/g}$)	Biomassa (g/L)	pH final
1	-1 (11,63)	-1 (5,82)	264,61	322,69	0,82	7.31
2	1 (68,37)	-1 (5,82)	197,68	95,50	2,07	5.36

3	-1 (11,63)	1 (34,18)	366,70	94,51	3,88	6.81
4	1(68,37)	1(34,18)	522,09	98,51	5,3	4.65
5	-1.41 (0)	0 (20)	103,43	22,48	4,6	8.17
6	1.41 (80)	0 (20)	569,07	96,78	5,88	4.05
7	0 (40)	-1.41(0)	296,63	80,17	3,7	6.51
8	0 (40)	1.41 (40)	842,84	181,26	4,65	5.87
9	0 (40)	0 (20)	665,20	102,50	6,49	5.32
10	0 (40)	0 (20)	662,35	115,59	5,73	5.03
11	0 (40)	0 (20)	659,51	104,52	6,31	4.82

* Variáveis Independentes fixas: 20 g/L de Água de Parbolização de Arroz - APA; Variáveis Independentes Fixas: 180 rpm, 25°C, pH = 4,0.

A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p e t, para o teor de carotenóides totais. Observa-se que todas as variáveis independentes estudadas exercem influência sobre a produção de carotenóides. Os parâmetros que não foram significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância.

Tabela 10. Resultados do coeficiente de regressão e erro padrão provenientes do planejamento fatorial completo 2², para os carotenoides totais.

	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t (2)	P
Média*	662,80	1,64	403,79	0,000006
(1)Glicerol (g/L)(L)*	93,404	1,01	92,78	0,000116
Glicerol (g/L)(Q)*	192,92	1,20	160,59	0,000039
(2)AMM (g/L) (L)*	150,03	1,01	149,03	0,000045
AMM (g/L) (Q)*	-75,474	1,20	-62,83	0,000253
1L by 2L*	55,58	1,42	39,09	0,000654

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

A Equação 3 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de carotenóides totais em função das variáveis independentes analisadas, dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 11. Verifica-se que o coeficiente de correlação obtido de 0,85 e o F calculado de 1,14 vezes maior que o valor tabelado, permitiram a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 10.

Tabela 11. Análise de variância para os carotenoides totais.

Fontes de Variação	Somas de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	472230	5	94445,97	5,78
Resíduos	81733	5	16346,61	
Falta de ajuste	81716,9	3		
Erro puro	16,2	2		

Total	553962,9	10
--------------	-----------------	-----------

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}, 95\%} = 5,05$; Coeficiente de correlação: $R = 0,85$

Equação 3:

$$C_{\text{tot}} = 662,8 + 93,5 (X_3) - 192,9 (X_3)^2 + 150,0 (X_4) - 75,5 (X_4)^2 + 55,6.X_3.X_4 \quad (3)$$

Onde: C_{tot} = carotenóides totais (ug/L); X_3 = glicerol; X_4 = AMM

Na Figura 10, observa-se que a tendência da máxima produção de carotenoides totais (843 µg/L) situa-se na faixa próxima ao ponto central de concentração (ponto axial), com concentrações de (40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA). A produção de carotenóides totais, quando comparada aos ensaios do primeiro planejamento, houve um incremento de 4,7 % na produção, com aumento da concentração de glicerol de 30 para 40 g/L e com as mesmas concentrações de AMM. Santos (2010) verificou que a elevação da concentração de glicerol de 10 para 20 g/L, proporcionou o aumento nas taxas de formação de produto por *Rhodotorula glutinis*. Já Burkert (2010) observou que o aumento da concentração de glicerina bruta de 10 para 40 g/L apresentou efeito significativo nas respostas biomassa e produção volumétrica de carotenóides, sendo que esse aumento acarretou num acréscimo em média de 6,7 g/L e 0,9 µg/mL, respectivamente.

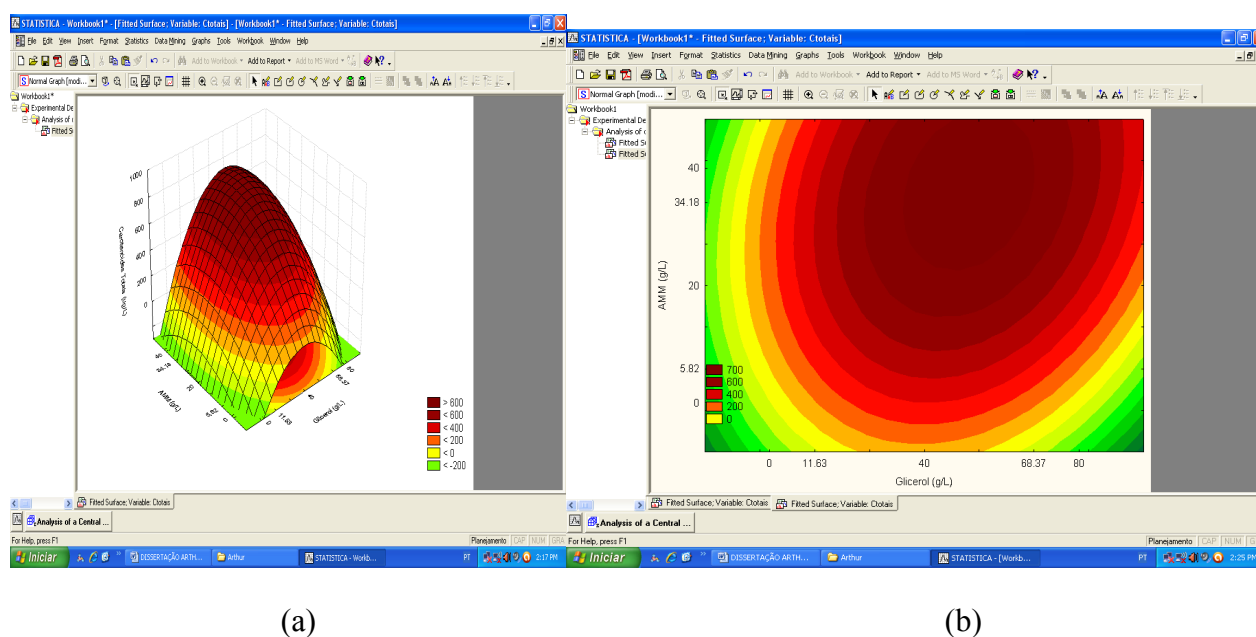


Figura 10. Superfícies de resposta e curva de contorno para os carotenoides totais (µg/L) em função da concentração de glicerol e água de maceração de milho (a).

Em relação à produção de carotenóides específicos verifica-se que a máxima concentração observada foi de 322,69 µg/g, correspondendo ao ensaio 1 (Tabela 9). Observa-se entre as variáveis estudadas, que AMM exerce efeito negativo significativo ($P < 0,05$), na faixa de estudo conforme demonstrado no gráfico de pareto (Figura 10).

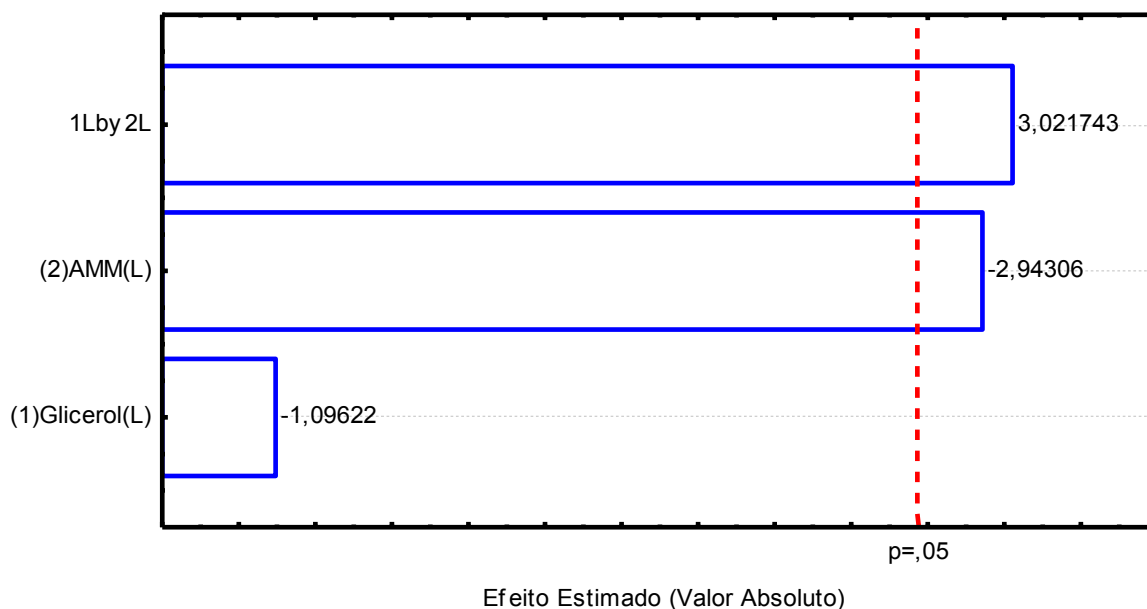


Figura 11 - Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento experimental completo 2^2 , para a concentração de carotenoides específicos (µg/L).

Burkert (2010) utilizando glicerina e água de parbolização do arroz para os ensaios de bioprodução com *Phaffia rhodozyma* em frascos agitados obtiveram uma concentração específica de carotenoides variando de 12 µg/g a 312 µg/g. Buzzini et al. (2007) obtiveram uma concentração máxima de carotenoides específicos para as leveduras *Sporidiobolus* testadas de 184 µg/g para *S. longiusculus* 82,3 µg/g para *S. roseus*.

Em relação a biomassa nenhuma das variáveis exerceu efeito significativo. A maior concentração de células obtida neste estudo foi observada no ponto central (6,49 g/L), ao comparar o crescimento celular com os obtidos na literatura com micro-organismos do mesmo gênero, verifica-se resultados semelhantes. Em trabalho com *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados, Valduga et al. (2009a) obtiveram uma concentração que variou de 1,2 g/L a 5,9 g/L, dependendo das condições de cultivo. Maldonade et al. (2008) avaliaram o crescimento celular de *Sporobolomyces* em meio YM, obtendo 3,3 g/L após 5 dias de bioprodução. Burkert (2010) verificou que a concentração de biomassa de *Phaffia rhodozyma* em meio com glicerina e água de parbolização do arroz variou entre 3,0 g/L e 17,2 g/L.

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

4.3. Cinética da bioprodução

A Figura 12 e Tabela 1 (Apêndice 1), apresentam as cinéticas de crescimento celular (biomassa), e da bioprodução de carotenóides e, a evolução do pH em frascos agitados (ensaios 8) do planejamento fatorial completo 2².

A concentração máxima de carotenoides totais (807 µg/L) foi obtida em 96 h do início da bioprodução. Os resultados encontrados por Valduga et al. (2009b), a concentração máxima de carotenoides (913 µg/L) em meio sintético por *S. salmonicolor* CBS 2636 foi atingida aproximadamente 100 h do início da bioprodução. Já no trabalho de Tatsch (2008), em biorreator por *S. salmonicolor* a concentração máxima de carotenoides (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 é baixo. Cabral (2010), relatou que a concentração máxima de carotenoides totais (852 µg/L) foi obtida em 102 h do início da bioprodução.

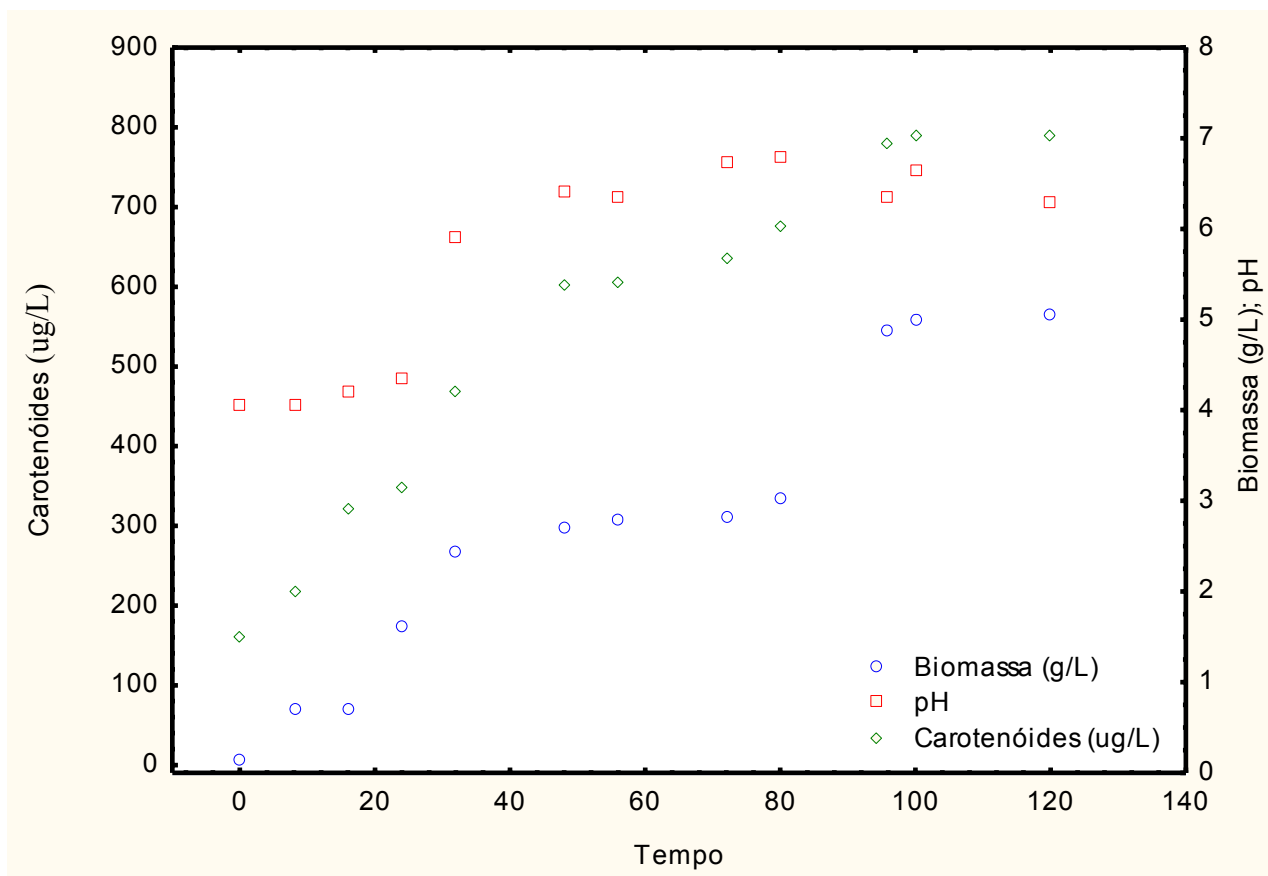


Figura 12. Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa e evolução do pH da levedura *Sporidiobolus pararoseus* para a condição otimizada (40 g/L de glicerina, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA) 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0.

O pH esteve na faixa entre 4,07 e 4,36 nas primeiras 24 h de bioprodução, após este período os valores elevaram-se para faixa de pH 6, sofrendo pequenas oscilações.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto. Desta forma o pH inicial é objeto de estudo na produção de carotenóides. O efeito do pH na levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foi avaliado por Razavi & March (2006), apresentado um intenso efeito sobre o conteúdo de carotenoides e células. A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH (pH 3,5 a 6,0), sendo pH 6,0, ótimo para o crescimento celular e formação de pigmento. Esta conclusão é confirmada no presente estudo (Figura 12) onde a máxima carotenogênese (807 µg/L) foi induzida em pH de 6,3.

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

O comportamento da levedura *Sporidiobolus pararoseus* foi associado ao crescimento celular (Figura 12), onde a máxima concentração celular (5,1 g/L), correspondeu à região de máxima produção de carotenoides (807 µg/L). Comportamento semelhante foi verificado por Tinoi et al. (2005) onde a concentração de carotenóides por *Rhodotorula glutinis* em meio agroindustrial foi paralela ao crescimento celular. Em estudo de Razavi & March (2006), a produção de carotenóides foi aproximadamente paralela ao crescimento celular da levedura *Sporobolomyces ruberrimus*, onde a produção máxima de pigmentos foi geralmente observada no final da fase exponencial de crescimento.

A Figura 13 e Tabela 2 (Apêndice 2) apresentam as cinéticas de consumo de substrato (nitrogênio total e carbono orgânico total) em meio residual em frascos agitados para o ponto otimizado (ensaio 8) do planejamento experimental completo 2².

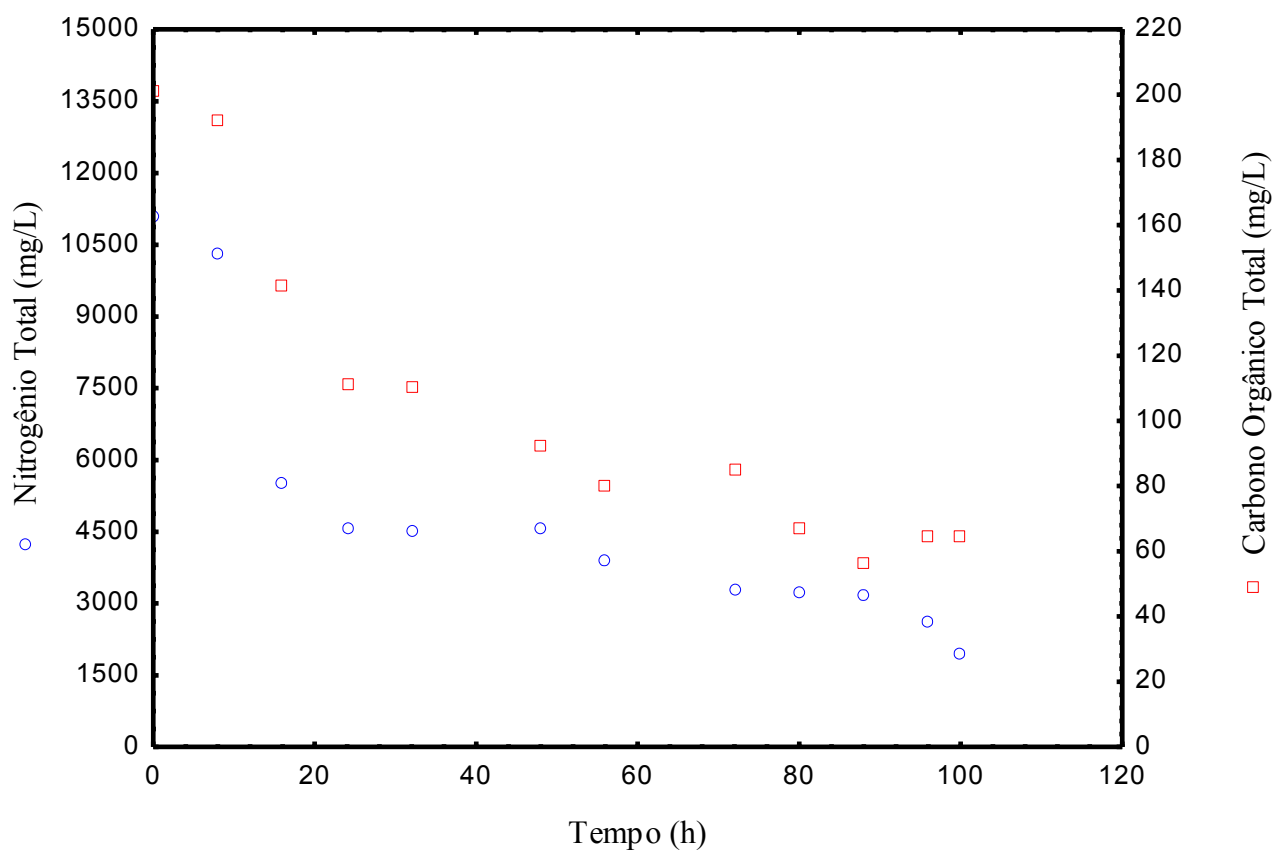


Figura 13. Cinética do consumo de substrato (Nitrogênio e Carbono Orgânico Total) da levedura *Sporidiobolus pararoseus* para as condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 40 g/L de glicerina, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA).

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

Verifica-se pela Figura 13 que houve um consumo crescente de nitrogênio total e carbono orgânico total (TOC) ao longo da bioprodução. Analisando pontualmente, observa-se um aumento acentuado no consumo de ambos após 8 h de fermentação, chegando à 16 h de fermentação com consumo de 46,7 % de nitrogênio total e 26,6 % de carbono orgânico total. Comportamento semelhante foi visto com outros micro-organismos, como nos estudos de Santos (2010) e Schwartz (2010) onde houve um consumo crescente de carbono e nitrogênio durante o processo, sendo mais acentuado no início da bioprodução.

Na Figura 14 e Tabela 3 (Apêndice 2) pode ser melhor observado o consumo de substrato (glicerol) durante a cinética do ponto otimizado (ensaio 8) do planejamento fatorial completo 2².

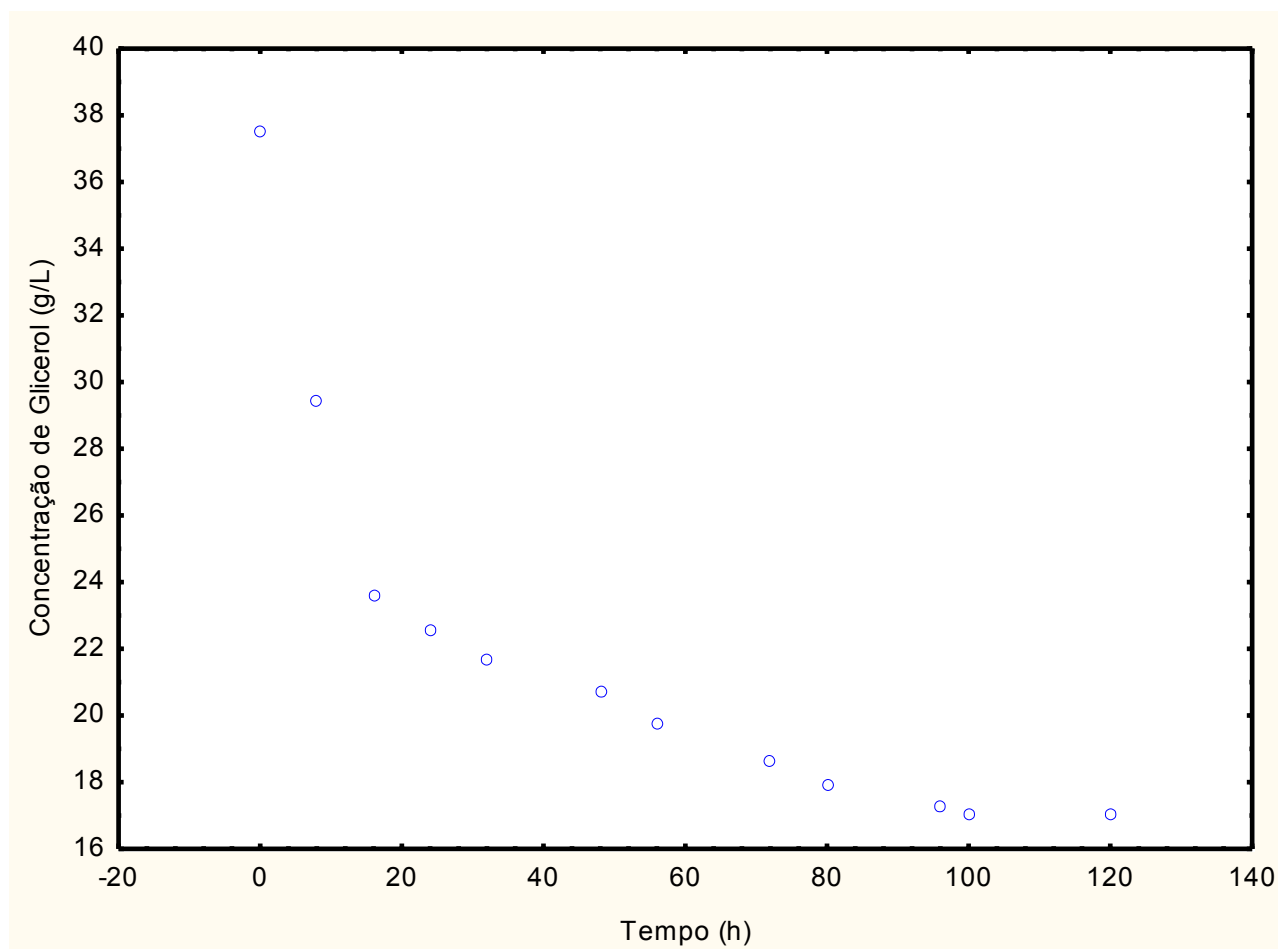


Figura 14 - Cinética do consumo de glicerol da cepa *Sporidiobolus pararoseus* nas condições otimizadas (180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, 40 g/L de glicerol, 40 g/L de AMM e 20 g/L de APA).

O aumento do consumo de glicerol está relacionado diretamente com o tempo de bioprodução e fase de crescimento microbiano. Examinando a Figura 14 nota-se 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, após 96 h de bioprodução manteve-se praticamente constante. Ao final das 120 h de bioprodução foi observado um consumo foi de 54,6 %. 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 a ausência ou menor concentração de micronutrientes que poderiam ter favorecido o crescimento microbiano. Kusdiyantini (1998) verificou um consumo de glicerol superior a 50 %, de 40 g/L a 19,6g/L, em produção de astaxantina em fermentação em batelada por *Phaffia rhodozyma*.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O planejamento completo de segunda ordem possibilitou a otimização da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, obtendo-se um teor de máximo de carotenoides totais de 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.

A cinética demonstrou que a concentração máxima de carotenoides totais foi atingida em 96 h de bioprodução, estando associada a produção de biomassa. Houve consumo crescente de nitrogênio total e carbono orgânico total (TOC) ao longo da bioprodução. O consumo de glicerol (20,49 g/L) foi mais intenso nas primeiras 16 h e a partir deste período observou-se um pequeno consumo até o final da bioprodução, atingindo máximo de 54,6 %.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1. Estudar a bioprodução de carotenoides com a levedura *Sporidiobolus pararoseus* em biorreator e em batelada alimentada;
2. Avaliar a bioprodução de carotenoides empregando glicerol bruto (subproduto da produção de biodiesel);
3. Identificar e caracterizar os carotenoides produzidos por *Sporidiobolus pararoseus*, por cromatografia líquida (CLAE);
4. Avaliação de parâmetros cinética e estequiométricos;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 107-113, 2007.
- ALLEN, N. *et al.* Specifications for glycerol. British Standards International, v. 2621-2625, 1964.
- AMARTEY, S. A.; LEUNG, J. P. C. Corn Steep Liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus Stearothermophilus* T-13
- AMATO, G. W.; SILVEIRA, S. F. Parboilização do arroz no Brasil. Porto Alegre: CIENTEC. Boletim Técnico, 98 p., 1991.
- AMBROSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 233-243, 2006.
- ANANDA, N; VADLANI, P. V. Production and optimization of carotenoid-enriched dried distiller's grains with solubles by *Phaffia rhodozyma* and *Sporobolomyces roseus* fermentation of whole stillage. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, v. 37(11), P. 1183-1192, 2010.
- ARMSTRONG, G. A. Eubactéria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol* v. 176, p. 4795- 4802, 1994.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, No. 26, 56-62, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the association of the analytical chemists, 16 ed. Washington, 1995.
- 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 (11), p. 2967-2977, 2010.
- BHOSALE, P. GADRE, R.V. b-Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant., *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 26, p. 327–32, 2001.
- BHOSALE, P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 351-361, 2004.

- BOTELLA-PAVÍA, P; RODRÍGUES-CONCEPCION, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improves foods. *Physiologia Plantarum*, v. 126, p. 369-381, 2006.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA SECRETARIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Normas de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do arroz. Brasília, v.8, n.20, p. 1-25, 1988.
- 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 (4), p. 755-761. 2011.
- BRISSON, D. *et al* Glycerol: a neglected variable in metabolic process? In: *BioEssays* v.23, p. 534-542, 2001.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* v. 9, p. 1551- 1558, 1995.
- 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*. Erechim, 2010. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim).
- CANETTIERI, E. V. et al. [Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology](#). *Bioresource technology*, v. 98(2):422-8, 2007.
- 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 (2), p. 793-797, 2010.
- COKS, L.V.; van REDE, C. Laboratory handbook for oils and fats analysis. Acad. 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(2), p. 341-351, 2011.

- CRUPI, P; MILELLA, R. A; ANTONACCI, D. [Simultaneous HPLC-DAD-MS \(ESI+\) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes](#). Journal of mass spectrometry, v. 45(9):971-80, 2010.
- 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.
- DAS, A., YOON, S., LEE, S., KIM, J., OH, D., KIM, S. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 77, p. 505–512, 2007.
- DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W.W. III. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* v. 298, p. 2149– 2153, 2002.
- FARIA, O. L. V.; KOETZ, P. R.; SANTOS, M. S.; NUNES, W. A. Remoção de fósforo de efluentes de parbolização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n.26, v. 2, p. 309-317, 2006.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress and Lipid Research*, v. 43, p. 228-265, 2004.
- 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 (7-8), p. 571-7, 2006.
- FRENGOVA, G. I; SIMOVA, E. D. & BESHKOVA, D. M. Effect of temperature ranges on the production of yeast pigments co-cultivated with lacto-acid bacteria in whey ultra filtrate. *Biotechnology Letters*, v. 17, p. 1001 – 1006, 1995.
- FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA & GRINGOVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 888 – 894, 1994.
- 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 ketocarotenoid formation. *Journal of experimental botany*, v. 60, p. 1319-1332, 2009.
- GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E. & BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 629 – 634, 2003.

- GIBNEY, M. J; MACDONALD, I. A. & ROCHE, H. M. *Nutrição & Metabolismo*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., 2006.
- GUEDES, A. C; AMARO, H. M; MALCATA, F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, v. 9 (4), p. 625-644, 2011.
- HAALAND, P. D; *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, v. 105, p. 259, 1989.
- HAYMAN, E. P.; YOKOYAMA, H.; CHICHESTER, C. O.; SIMPSON K. L. Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bacteriology*, v. 120, p. 1339-1343, 1974.
- HOLEMBIOVSKA, S. L; TYMOSHENKO S. H; MATSELIUKH, B. P. Influence of carbon and nitrogen sources on biosynthesis of lycopene by *Streptomyces globisporus* 4Lcp. *Mikrobiologiya*, v. 72(6):46-51, 2010.
- HOU, Z; GAO, Y; YUAN, F; LIU, Y; LI, C; XU, D. [Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of beta-carotene emulsion stabilized by soybean soluble polysaccharides and chitosan](#). *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 58 (15), p. 8604-11, 2010.
- HU, Z-H; ZHENG, Y-G; WANG, Z. & SHEN, Y-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 586-590, 2006.
- JOHNSON & SCHROEDER, Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.
- LEEMA, J. T; KIRUBAGARAN, R; VINITHKUMAR, N. V; DHEENAN, P. S; KARATHIKAYULU, S. [High value pigment production from Arthrospira \(Spirulina\) platensis cultured in seawater](#). *Bioresource technology*, v. 101(23):9221-9227, 2010.
- KANG, D.K.; AN, J.Y; PARK, T.H & SIM, S.J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v.31, p. 234-238, 2006.
- 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 (15), p. 5199- 5206, 2010.
- KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. *Manual do Biodiesel*, Edgard Blücher: São Paulo, cap. 11, 2006.

- KÖCHER, S; JÜRGEN, B; MÜLLER, V. & SANDMANN, G. Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. Arch Microbiol, v. 191, p. 95-104, 2009.
- LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEN, T. J., PINTO, A. S., LIMA, E. Q. & SILVA, J. F. Toxicidade aguda de Rutina e de *Bixa orellana*., Acta Farm. Bonaerense, 22 (1), 21-26, 2003.
- LIU, Y.-S & WU, J. Y. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. Biochemical Engineering Journal, v. 27, p. 331 – 335, 2006.
- LIU, Y. S & WU, J. Y. Optimization of cell growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. Biochemical Engineering Journal, v. 36, p. 182 – 189, 2007.
- LOSS, E. M. S. Aproveitamento de resíduos da cadeia produtiva do milho para cultivo de cogumelos comestíveis. Campinas, 2009. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- 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 (18), p. 9996-10005, 2011.
- MANTZOURIDOU, F; NAZIRI, E. & TSIMIDOU, M. Z. Industrial glycerol as Supplementary Carbon Source in the Production of β -carotene by *Blaskea trispora*. Journal of Agricultural and food Chemistry, v. 56, p. 2668-2675, 2008
- MANTZOURIDOU, F; TSIMIDOU, M. Z. & ROUKAS, T. Performance of Crude Olive Pomace Oil during Carotenoid Production by *Blaskea trispora* in Submerged Fermentation, v. 54, p. 2575-2581, 2006.
- MALDONADE, I. R; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. Food Chemistry, v. 107, p. 145 – 150, 2008.
- MALDONADE, I. R; ROUKAST, T. & KOUTZERIDOU, P. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, p. 65 – 70, 2007.
- MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M. HEREDIA, F. J. Application of Tristimulus Colorimetry To Estimate the Carotenoids Content in Ultrafrozen Orange Juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 7266-7270, 2003.

- 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 (2) p.192-201, 2011.
- MILLER, G. L. Analytical Chemistry, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.
- MIURA, Y; KONDO, K; SHIMADA, H; SAITO, T; NAKAMURA, K. & MISAWA, N. Production of Lycopene by the Food Yeast, *Candida utilis* That Does Not Naturally Synthesize Carotenoid, v. 58, nos 2 e 3, 20/Abril, 5/Maio, 1998.
- MISAWA, N & SHIMADA, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. Journal of Biotechnology, v. 59, p. 169-181, 1998.
- 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 (5), p.655-65, 2011.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Glicerquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel. Química Nova, Vol. 32, No. 3, 639-648, 2009.
- 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 (9), p. 1056-1063, 2011.
- NIIZU, P. Y. Fontes de Carotenóides Importantes para a Saúde Humana. Campinas, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- OLIVEIRA, J. S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L). Florianópolis, 2005. Tese de Doutorado em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).
- OLSON, J.A.; KRINSKY, N. I. Introduction: the colorful fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **Faseb Journal** v. 9, p. 1547– 1550, 1995.
- 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 (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.

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

PFANDER, H. Key to Carotenoids, 2nd ed. BIRKHAUSER, BASEL, 1987.

POLAINO, S; HERRADOR, M. M; CERDÁ-OLMEDO, E; BARRERO, A. F; Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Organic and biomolecular quimistry*, v. 8 (19), p.4229-31, 2010.

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

QUEIROZ, M. I; KOETZ, P. R. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. *Revista Brasileira de Agrociência* v.3, no 3, 139-143, Set.-Dez., 1997.

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

RAZAVI, S.H & MARCH, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. *Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering* , v. 23, n. 3, p. 59 – 64, 2006.

REHM, H. Microbial production of glycerol and other polyols. *Biotechnology, Special microbial process*. Weinheim: VCH, vol. 6B , p. 52-64, 1988.

RYCKEBOSCH, E; MUYLAERT, K; EECKHOUT, M; RUYSEN, T; FOUBERT, I. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, Epub ahead of print, 2011.

RIVAS, B. et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *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.

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.

- SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; TADA, A.; MIKI, W. & KOMEMUSHI, S. Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 3, p. 294 – 297, 2001.
- SARADA, R. R. VIDHYAVATHI, D. USHA, AND G. A. RAVISHANKAR, An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7585 – 7588, 2006.
- SHINDO, K; KIKUTA, K; SUZUKI, A; KATSUTA, A; KASAI, H; HIASUMOTO-HIROSE, M; MATSUO, Y; MISAWA, N. & TAKAICHI, S. Rare carotenoid (3R)-saproxanthin and (3R, 2'S)-myxol, isolated from novel marine (*Flavobacteriaceae*) and their antioxidativa activities. *Appl Microbiollogy ans Biotechnology*, v. 74, p. 1350-1357, 2007.
- SHIH, C. T & HANG, Y. D. Prodution of carotenoids by *Rhodotorula rubra* from Sauerkraut brine. *Lebensm.-Wiss. U.-Technology*, v. 29, p. 570-572, 1996.
- SILVA, C. M. Produção de Carotenóides pela Levedura *Phaffia rhodozyma* CEPA NRRL-Y 17268 utilizando glicerina e a água de parbolização de arroz. Rio Grande, 2010. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande.
- SILVA, C; CABRAL, J. M. S & KEULEN, F. V. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas sp.* *Biotechnology Letters*, v.26, p. 257-262, 2004.
- SILVA, M. C. Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos. Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
- SILVEIRA, A. B. *et al.* Produção de Astaxantina por *Mucor circinelloides* a partir de Milhocina. Pernambuco, 2008. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade Católica de Pernambuco.
- SCHWARTZ, C. R. M. Otimização da produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim).
- STROBEL, I; BREITENBACH, J; SCHECKHUBER, C. Q; OSIEWACZ, H. D & SANDMANN, G. Carotenoids and carotenogenic genes in *Podospora anserine*: engineering of the carotenoid composition extends the life span of the mycelium, v.55, p. 175-184, 2009.
- SUTHERLAND, F. C. W.; KILIAN, S. G. & PREEZ, J. C. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Letters*, v.18, p. 975-980, 1996.

- TAKAICHI, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, v. 9 (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 (10), p. 2451-2459, 2011.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 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 (1) p. 42-48, 2011.
- 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 (8), p. 1440-1445, 2011.
- TATSCH, P. T. Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator. Erechim, 2008. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada (URI-Campus Erechim).
- 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 (1) p. 39-44, 2010.
- TINOI, J.; RAKARIYATHAM, R. L. & DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2551 – 2557, 2005.
- UENOJO, M; JUNIOR M. R. M & PASTORE, G. M. Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação para formação de Compostos de Aroma. *Química nova*, v. 30, n. 3, p.616, 622, 2007.
- VALDUGA, E. Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. Florianópolis, 2005. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

- VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; DI LICCIO M.; JACQUES, R. A. Pré-tratamentos 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.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LICCIO M. Optimozation of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, v. 2, p. 415-421, 2009a.
- VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LUCCIO M. Kinetic and Stoichiometric Parameters in the Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in Synthetic and Agroindustrial Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p.61-69, 2009b.
- VALDUGA, E.; VALÉRIO A.; TATSCH, P. O.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A. & DI LUCCIO M. Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), *Food and Bioprocess Technology*, v.2, p. 234-238, 2009c.
- 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, 2009d.
- 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 (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 (12), p. 983-998, 2010.
- VILA, M; COUSO, I & LÉON, R. Carotenoid content in mutants of the Chlorophite *Clamydomonas reinhardtii* with low expression levels of phytoene desaturase. *Process Biochemistry*, 2008.
- WANG, S. L; SUN, J. S; HAN, B. Z & WU, X. Z. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* using high hydrostatic pressure and response surface methodology. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 8, p. 325 – 329, 2007.

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

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 (3), p.252-262, 2011.

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

YAN, 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 (3), p. 1056-1061, 2011.

YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr. Opin. Biotechnol, v. 18, p. 213–219, 2007.

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

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.

ANEXOS

Tabela 1: Cinética da bioprodução de carotenóides, biomassa da levedura *Sporidiobolus pararoseus* e evolução do pH para as condições otimizadas.

Tempo	Biomassa	pH	Carotenóides
0	0,16	4,07	160,46
8	0,70	4,05	218,95
16	0,72	4,2	321,57
24	1,62	4,36	349,02
32	2,44	5,91	467,97
48	2,70	6,4	601,63
56	2,78	6,35	605,10
72	2,82	6,74	636,86
80	3,02	6,79	676,86
96	4,88	6,34	807,52
100	5,00	6,64	789,41
120	5,06	6,29	789,21

Tabela 2: Cinética do consumo de substrato (Nitrogênio e Carbono Orgânico Total) da levedura *Sporidiobolus pararoseus* para as condições otimizadas.

Tempo	Nitrogênio	Carbono
0	11110	201,1
8	10340	192,4
16	5514	141,2
24	4591	111,3
32	4521	110
48	4600	92,67
56	3902	80,05
72	3268	85,47
80	3257	66,94
88	3189	56,26
96	2621	64,84
100	1969	64,38

Tabela 3: Cinética do consumo de glicerol da cepa *Sporidiobolus pararoseus* nas condições otimizadas.

Tempo	Concentração de Glicerol
0	37,53
8	29,47
16	23,60
24	22,56
32	21,64
48	20,72
56	19,80
72	18,65
80	17,96
96	17,27
100	17,04
120	17,04