

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**BIOPRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR *Sporidiobolus*
salmonicolor CBS 2636 EM BIORREATOR EM BATELADA
ALIMENTADA E SEMICONTÍNUO COM RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

ROSICLER COLET

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

ERECHIM, RS – BRASIL

FEVEREIRO DE 2016

**Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636
em biorreator em batelada alimentada e semicontínuo com resíduos
agroindustriais**

Rosicler Colet

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Erechim.

Comissão Julgadora:

Prof. Eunice Valduga, D. Sc
Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, D. Sc.
Orientador

Prof. Jamile Zeni, D. Sc
URI – Campus de Erechim

Prof. Natália Paroul, D. Sc
URI – Campus de Erechim

Prof. Eloane Malvessi, D. Sc
UCS – Caxias do Sul

Prof. Rosângela Assis Jacques, D. Sc
UFRGS – Porto Alegre

Erechim, fevereiro de 2016.

Dedicatória

*Aos meus pais, Pedro e Mari,
Aos meus irmãos Rosângela, Rodrigo,
Renata e Rafael,
E ao meu afilhado Arthur,
pelo exemplo de vida e amor!
Obrigada por me incentivarem a nunca desistir.*

*“Entre as pequenas coisas que não fazemos
e as grandes que não podemos fazer,
o perigo está em não tentarmos nenhuma.”*

Confúcio

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, meus irmãos e meu afilhado Arthur que, com muito amor, carinho, apoio, confiança e superação, foram os maiores incentivadores dessa conquista.

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

Aos bolsistas Daiane, Ana Paula, Juliana, Helana, Maria Eduarda, Jaine, Gunter, Rafael, Fátima e Luana pela ajuda em todos os momentos, tornando o trabalho de pesquisa mais agradável e divertido.

A Letícia pela amizade, companheirismo, auxílio e pelos momentos de descontração.

A minha amiga Juliana Soares por ter me proporcionado o melhor presente da pós-graduação sua amizade.

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

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia e da Termodinâmica pelos momentos de ajuda e descontração, em especial Jonaina, Márcia, Marceli, Ilizandra, Simone, Naira, Fernanda, Alexandra, Cindy, Sidiane, Ana e Júnior.

A UFRGS, em especial a professora Rosângela, o professor Eliseu, e os bolsistas Bruna, Alan e Jénifer por todo ensinamento, atenção e carinho que tiveram com este trabalho.

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

A FAPEGS, CAPES, CNPq pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

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

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada e semicontínuo com resíduos agroindustriais

Rosicler Colet

Fevereiro/ 2016

Orientadores: Eunice Valduga e Marco Di Luccio.

A produção de carotenoides por rota biotecnológica tem se expandido nos últimos anos, uma vez que permite a obtenção deste produto em qualquer época do ano, ou seja, o controle do processo. Para tanto é necessário disponibilizar condições favoráveis para o desenvolvimento da levedura como: pH, temperatura, aeração, agitação, luminosidade e nutrientes. O desenvolvimento de processos biotecnológicos conduzidos em batelada alimentada e/ou semicontínuo, apresentam muitas vantagens na produção de carotenoides, como o aumento do rendimento da concentração de carotenoides, assim como a redução de custos relativos ao processo, pela utilização de matérias-primas de baixo custo, como os subprodutos agroindustriais, ricos em açúcares e matéria orgânica, sendo que no contexto nacional, o Brasil é rico em subprodutos desta natureza. Assim, este trabalho teve por objetivo a obtenção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 utilizando meio comercial (peptona e extrato de levedura) e a base de resíduos agroindustriais (água de maceração de milho - AMM, água de parboilização de arroz – APA, hidrolisado de levedura – Prodex® e glicerol bruto), em regime batelada alimentada e semicontínuo. Avaliaram-se os parâmetros cinéticos (consumo de matérias-primas: carbono, nitrogênio e glicerol; produção celular e de carotenoides) e estequiométricos da bioprodução (produtividade de carotenoides e de célula, velocidade específica de crescimento e os fatores de conversão de glicerol, carbono e nitrogênio em carotenoides e célula). A produção foi realizada em biorreator Biostat com 1 L de volume útil, sem iluminação, aeração de 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C e pH inicial 4,0, por um período de 120 h em batelada alimentada, variando-se a taxa de alimentação (75; 112,5 e 150 mL a cada 12 h) após 24 h de bioprodução. O meio utilizado foi à base de resíduos

agroindustrias (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA). Em sistema semicontínuo, realizaram-se cortes de 50 % a cada 96 h de bioprodução, comparando a produção com matérias-primas complexas (peptona e extrato de malte) e agroindustriais (AMM, APA e glicerol bruto). Para a recuperação dos carotenoides intracelular, empregou-se nitrogênio líquido combinado com dimetilsulfóxido (DMSO) para ruptura celular, seguido da extração com uma mistura de acetona/metanol (7:3, v/v). Nas condições de máxima bioprodução foi realizada a análise estrutural dos diferentes carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS). A concentração máxima de carotenoides totais, obtida em regime em batelada alimentada, foi de 4753 µg/L em 96 h de cultivo nas condições: 25°C, pH inicial 4,0, 180 rpm, taxa de aeração de 1,5 vvm, em meio composto de 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA e uma alimentação de 112,5 mL a cada 12 h. Ao utilizar o processo semicontínuo obteve-se uma bioprodução de carotenoides totais de 7388 µg/L em meio composto de 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA, em 288 h com corte de 50 %, obtendo-se uma produtividade em células (Px) de 0,104 g/L.h e uma produtividade em carotenoides totais de 41,4 µg/L.h, e com uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para a *Sporidiobolus salmonicolor* igual a 0,08 h⁻¹. A produção de carotenoides em sistema semicontínuo com resíduo é de aproximadamente 55 % superior à batelada alimentada. O composto majoritário identificado foi o all-trans- β -caroteno em todos os processos. Desta forma, foi demonstrado que os regimes batelada alimentada e semicontínuo empregando matérias-primas agroindustriais são alternativas promissoras para o aumento de escala da bioprodução de carotenoides.

Palavras-chave: Carotenoides, batelada alimentada, semicontínuo e resíduos agroindustriais.

Abstract of Thesis submitted to Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI-Campus de Erechim as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food Engineering (D.Sc.)

Rosicler Colet

February/ 2016

Advisors: Eunice Valduga and Marco Di Luccio.

The production of carotenoids by biotechnological route has been expanding in recent years, since it allows obtaining this product at any time of year, the process control. The development of biotechnological processes conducted in fed-batch and/or semicontinuous, have many advantages in the production of carotenoids, such as increased yield of the concentration of carotenoids, as well as lowering costs for the process by the use of low cost substrates, as the agro-industrial products, rich in sugars and organic matter, and in the national context, Brazil is rich in products of this nature. The production of carotenoids by biotechnological route has expanded in recent years, since it allows obtaining this product at any time of year. This requires providing favorable conditions for the development of yeast as pH, temperature, aeration, agitation, light and nutrients. Thus, this study aimed to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using complex medium (peptone and yeast extract) and based organic residues (corn steep liquor - AMM, rice parboiling water – APA, hydrolyzate yeast - Prodex® and crude glycerol) in bioreactor system with batch-fed and semicontinuous. Evaluated the kinetic parameters (substrate consumption: carbon, nitrogen and glycerol; cell production and carotenoids) and stoichiometric of bioproduction (carotenoid productivity and cell, specific growth rate and conversion factors of the glycerol, carbon and nitrogen in carotenoids and in cell). The bioproduction was performed in a bioreactor Biostat with 1 L working volume without illumination, 1.5 vvm, 180 rpm, 25 ° C and pH initial 4.0, for a period of 120 hours in fed-batch if varying the rate of feeding (75; 112.5 and 150 ml each 12 h) after 24 h bioproduction, with half the base agroindustrial waste (80 g/L of MMA, 80 g/L of crude glycerol and 20 g/L of APA). In semicontinuous system, there were 50% cuts every 96 h bioproduction, comparing production with complex substrates (peptone and malt extract) and agribusiness (AMM, APA and crude glycerol). For the recovery of the intracellular carotenoid, employed is liquid nitrogen combined with dimethylsulfoxide (DMSO) to cell disruption followed by extraction with a mixture of acetone / methanol (7: 3, v / v). In conditions of maximum bioproduction structural analysis was performed of the different carotenoids by high-performance liquid chromatography

coupled to diode array detector and a mass spectrometer (HPLC-MS-DAD). The maximum concentration of carotenoids obtained in the bioreactor in fed-batch was 4753 $\mu\text{g} / \text{L}$ in 96 h bioproduction under the conditions: 25 ° C, pH initial 4.0, 180 rpm, 1.5 vvm, amidst compound 80 g / L of crude glycerol, 80 g / L of AMM and 20 g / L of APA and a feed 112.5 mL every 12 hours. When using the semi-continuous process is obtained a bioproduction of carotenoids of 7388 $\mu\text{g} / \text{L}$ in medium composed of 80 g / L of crude glycerol, 80 g / L of AMM and 20 g / L of APA in 288 h cutting 50%, yielding a productivity of cells (Px) of 0.104 g / Lh, and a total carotenoid productivity of 41.4 g / Lh, and a maximum specific growth rate ($\mu_{\text{máx}}$) for *Sporidiobolus salmonicolor* to 0.08 h⁻¹. The production of carotenoids in semicontinuous system is approximately residue 55 fed-batch. The major compound was identified all-trans- β -carotene in all cases. Thus, it was demonstrated that the processes fed-batch and semi-continuous using agroindustrial substrates are promising alternatives for increasing scale bioproduction of carotenoids.

Keywords: Carotenoids, fed-batch, semi-continuous and agro-industrial waste.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Carotenoides	26
2.2 Classificação e Nomenclatura dos Carotenoides	27
2.3 Funções dos Carotenoides	29
2.3.1 Coloração	29
2.3.2 Atividade de pró-vitamina A	29
2.3.3 Atividade antioxidante.....	30
2.3.4 Atividade pró-oxidante.....	31
2.4 Produção de Carotenoides por Via Microbiana.....	31
2.4.1 Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides com leveduras	35
2. 4.2 Matérias-primas alternativas.....	36
2.5 Produção de Carotenoides em Sistema em Batelada Alimentada	40
2.6 Produção de Carotenoides em Sistema Semicontínuo	42
2.7 Recuperação dos Carotenoides	44
2. 8 Determinação dos Carotenoides	46
2. 9 Considerações Finais.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 Microrganismo e Meios de Cultura	50
3.1.1 Microrganismo	50
3.1.2 Manutenção do microrganismos e preparo do inoculo	50
3.1.3 Meio de bioprodução.....	51
3.1.3.1 Caracterização das matérias-primas	52
3.2. Bioprodução de Carotenoides.....	52
3.2.1 Otimização do meio de bioprodução em frascos agitados	52
3.2.2 Produção em biorreator em sistema batelada alimentada.....	53
3.2.2.1 Batelada alimentada com diferentes volumes de alimentação.....	53
3.2.2.2 Batelada alimentada com volumes iguais de alimentação.....	55
3.2.3 Produção em biorreator em sistema semicontínuo.....	55
3.2.3.1 Sistemas de corte do meio do caldo fermentado.....	55

3.2.3.2 Comparação da bioprodução com meio comercial e com meio à base de resíduos agroindustriais	56
3.2.4 Estratégia de controle do pH para a produção de carotenoides	56
3.3 Recuperação dos Carotenoides Totais.....	57
3.4 Parâmetros Cinéticos e Estequiométricos da Bioprodução	58
3.4.1 Velocidades instantâneas e específicas globais	58
3.4.2 Fatores de conversão globais	59
3.4.2.1 Produto.....	59
3.4.2.2 Biomassa celular	60
3.4.3 Produtividade global.....	60
3.5 Determinações Analíticas	60
3.5.1 Carotenoides totais	60
3.5.2 Carotenoides específicos	61
3.5.3 Concentração de células	61
3.5.4 pH.....	61
3.5.5 Concentração de glicerol residual	61
3.5.6 Carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT)	62
3.5.7 Determinação dos carotenoides	62
3.5.7.1 Materiais	62
3.5.7.2 Preparo das amostras	62
3.5.7.3 Preparação da curva analítica.....	63
3.5.7.4 Análise das soluções padrão e das amostras por HPLC-DAD e HPLC-DAD/MS-APCI	64
3.5.8 Tratamento estatístico.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Caracterização de Matérias-Primas Agroindustriais	66
4.2 Bioprodução de Carotenoides com Resíduos Agroindustriais em Frascos Agitados	67
4.2.1 Efeitos da composição do meio na bioprodução.....	67
4.2.2 Otimização da bioprodução	69
4.3 Bioprodução de Carotenoides em Biorreator Batelada Alimentada	72
4.3.1 Batelada alimentada com diferentes volumes de alimentação.....	72
4.3.2 Batelada alimentada com iguais volumes de alimentação.....	80
4.4 Parâmetros Estequiométricos da Bioprodução em Sistema Batelada Alimentada	82
4.5 Produção de Carotenoides em Sistema Semicontínuo	91

4.5.1 Sistema semicontínuo com cortes	91
4.5.2 Comportamento cinético e estequiométrico da bioprodução em processo semicontínuo com matérias-primas sintéticas e a base de resíduos agroindustriais	93
4.6 Estudo do Controle do pH para a Produção de Carotenoides.....	101
4.7 Determinação dos Carotenoides	105
5. CONCLUSÕES	113
6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
APÊNDICE	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do β –caroteno (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).....	27
Figura 2 - Estrutura química do Toruleno (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).....	28
Figura 3 - Estrutura química da Astaxantina (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).	28
Figura 4 - Estrutura química da Cantaxantina (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).....	28
Figura 5 – Mecanismo de fotoproteção (SCHAFER et al., 2002; CARIS-VEYRAT, 2007). 30	
Figura 6 - Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico cis. Adaptado de MERCADANTE (2008).	47
Figura 7 – Características macroscópicas da linhagem de <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636) cultivada em meio de cultura YMA, com 48 h de crescimento.	50
Figura 8 – Aspecto do Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides (a – Banho termostático; b – Frasco de vidro e sistema de controle) (COLET, 2015).	53
Figura 9 - Curva de crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636), durante 100 h de produção (TATSCH, 2008).....	54
Figura 10 - Aspecto das células maceradas com nitrogênio líquido.....	57
Figura 11 – Aspecto visual das amostras após filtração para retirada de interferentes.	58
Figura 12 – Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides em frascos agitados com resíduos agroindustriais em função das variáveis independentes.....	68
Figura 13 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) de <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> em função da água de maceração de milho e glicerol, respectivamente.	71
Figura 14 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 1 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h), respectivamente.	73

- Figura 15** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 2 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 75 mL a cada 12h), respectivamente. 74
- Figura 16** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 3 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 150 mL a cada 12h), respectivamente. 75
- Figura 17** - Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 2 em batelada alimentada com diferente (75 mL) e igual volume (112,5 mL) de alimentação (a); Ensaio 3 em batelada alimentada com diferente (150 mL) e igual volume (112,5 mL) de alimentação (b), porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial. 81
- Figura 18** - Produtividade em carotenoides global (P_{car}) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (112,5 mL), Ensaio 2 (75 mL) e no Ensaio 3 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e de 96 a 120 h. 82
- Figura 19** – Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células ($Y_{p/x}$) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (112,5 mL), Ensaio 2 (75 mL) e no Ensaio 3 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $pH_{inicial}$ 4,0 e de 96 a 120 h. 83
- Figura 20** – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente. 85
- Figura 21** – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente. 86
- Figura 22** – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente. 88

- Figura 23** – Biomassa em função do tempo (h) durante o cultivo de *Sporidiobolus salmonicolor* em processo semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75 % do volume de meio fermentado..... 91
- Figura 24** – Bioprodução de carotenoides totais em função do tempo (horas) durante o cultivo de *Sporidiobolus salmonicolor* em processo semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75% do volume de caldo fermentado. 92
- Figura 25** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas glicerol, COT e NT (b) para o processo semicontínuo com meio comercial (80 g/L de glicerina, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte), nas condições operacionais (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, corte de 50 % a cada 96 h até 480 h), respectivamente. 95
- Figura 26** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT (b) para o processo semicontínuo com meio agroindustrial (80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA, nas condições operacionais (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, corte de 50 % a cada 96 h até 480 h), respectivamente. 96
- Figura 27** - Produtividade em carotenoides global (Pcar) ao longo da bioprodução em processo semicontínuo com meio comercial e agroindustrial com corte de 50%, a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e 480 h..... 98
- Figura 28** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT para o Ensaio 1 em batelada alimentada sem controle de pH – BA (a) e com controle de pH – BA4 (b) (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH_{inicial} 4,0, 80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h). . 102
- Figura 29** - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT para o processo semicontínuo, sem controle de pH (SC) (a) e com

controle de pH (SC4) (b) com meio agroindustrial (80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA).....	104
Figura 30 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada com meio comercial.....	106
Figura 31 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada com meio agroindustrial.	107
Figura 32 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada Alimentada com meio comercial.....	108
Figura 33 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada Alimentada com meio agroindustrial.	109
Figura 34 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Semicontínuo com meio comercial.....	110
Figura 36 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636) no Ensaio 1 (a) e no Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	145
Figura 37 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636) no Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	145
Figura 38 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636) no processo semicontínuo com meio comercial.....	146
Figura 39 - Linearização do crescimento celular da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> (CBS 2636) no processo semicontínuo com meio agroindustrial.	146
Figura 40 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	147
Figura 41 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.....	147

Figura 42 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.	148
Figura 43 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.	148
Figura 44 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	149
Figura 45 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	149
Figura 46 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.	150
Figura 47 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.	150
Figura 48 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	151
Figura 49 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	151
Figura 50 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio comercial.	152
Figura 51 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.	152
Figura 52 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	153
Figura 53 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	153

Figura 54 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio comercial.	154
Figura 55 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.	154
Figura 56 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1 (a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	155
Figura 57 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.....	155
Figura 58 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio comercial.	156
Figura 59 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.....	156
Figura 60 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1 (a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	157
Figura 61 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.....	157
Figura 62 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio comercial.	158
Figura 63 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos empregados na bioprodução de carotenoides.	33
Tabela 2 – Estudo da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenoides por diferentes microrganismos.	38
Tabela 3 – Trabalhos que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a identificação de carotenoides.....	48
Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados no planejamento do tipo Plackett Burman (<i>Screening Design</i>) para a otimização do meio de bioprodução de carotenoides em cultivos em frascos agitados.....	52
Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a otimização do meio de bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.	53
Tabela 6 – Volume de alimentação de meio no biorreator a cada 12 h de bioprodução.	55
Tabela 7 – Composição do meio a ser alimentado no biorreator a cada 12 h de bioprodução.	55
Tabela 8 – Descrição dos ensaios realizados com e sem controle do pH.	57
Tabela 9 - Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com e sem pré-tratamento ácido, água de parboilização de arroz e do glicerol bruto.....	66
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett Burman (<i>Screening Design</i>) com valores codificados (reais) e resposta em termos de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) e pH da bioprodução com resíduos agroindustriais em frascos agitados.....	68
Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides totais bioproduzidos em frascos agitados empregando resíduos agroindustriais.	69

Tabela 12 – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de carotenoides com resíduos agroindustriais em frascos agitados.....	70
Tabela 13 – Análise de variância para a bioprodução de carotenoides totais do planejamento fatorial completo 2^2	70
Tabela 14 – Consumo de matérias-primas, em porcentagem, ao longo da bioprodução em batelada alimentada depois de 120 h.	79
Tabela 15 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em batelada alimentada dos ensaios em batelada alimentada.....	90
Tabela 16 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator dos ensaios em sistema semicontínuo em diferentes cortes a cada 96 h de bioprodução.....	93
Tabela 17 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> em biorreator dos ensaios em regime semicontínuo com meio comercial.	99
Tabela 18 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> em biorreator dos ensaios em regime semicontínuo com meio agroindustrial.	100
Tabela 19 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator dos ensaios com e sem controle do pH em batelada alimentada e em processo semicontínuo.	101
Tabela 20 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo em batelada com meio comercial conforme cromatograma da Figura 30.	106
Tabela 21 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo em batelada com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 31.	107

Tabela 22 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo em batelada alimentada com meio comercial conforme cromatograma da Figura 32.	109
Tabela 23 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo em batelada alimentada com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 33.	110
Tabela 24 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo semicontínuo com meio comercial conforme cromatograma da Figura 34.	111
Tabela 25 – Composição dos carotenoides obtidos por <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> do processo semicontínuo com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 35.	112
Tabela 26 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para Ensaio 1 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	139
Tabela 27 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o Ensaio 2 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	140
Tabela 28 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.	141
Tabela 29 – Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 2 em batelada alimentada com diferente e igual volume de alimentação, porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial.	141
Tabela 30 – Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 3 em batelada alimentada com diferente e igual volume de alimentação, porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial.	142

Tabela 31 - Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.	143
Tabela 32 - Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.	144

1. INTRODUÇÃO

O aspecto visual de um alimento natural ou processado é de extrema relevância para sua aceitação, razão pela qual a cor é uma das propriedades sensoriais mais importantes. Os carotenoides correspondem as cores vermelhas, laranja e amarela dos alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos são todas afetadas pela cor. Dentre as estratégias das indústrias para enriquecimento e favorecimento do produto que é processado, o corante exerce um efeito estimulante ao apetite do consumidor (CONSTANT et al., 2002; ESTEBAN et al., 2015).

A vasta aplicabilidade dos carotenoides resultam no aumento da demanda pelas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, cujo mercado mundial foi avaliado em 1,5 bilhões em 2014, com uma expectativa de crescimento para 1,8 bilhões em 2019 e uma taxa de crescimento anual de 3,9 % (BCC RESEARCH, 2015). Tal fato proporcionou o aumento do interesse dos pesquisadores em descobrir novas fontes, processos e técnicas que pudessem ser empregadas para intensificar a produção destes pigmentos por microrganismos, considerando que os carotenoides obtidos por síntese química envolvem um grande número de reações complexas, enquanto que estes mesmos carotenoides estão presentes naturalmente em microalgas, bactérias, leveduras e fungos (FÁBREGAS et al., 2001; BHOSALE et al., 2004; HUI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; CHAGAS et al., 2015; PRIBYL et al., 2015; HORIBE et al., 2015; BÜHLER et al., 2015; DIAS et al., 2015; COLET et al., 2015; TSAI et al., 2016; CARDOSO et al., 2016).

O grande interesse na exploração destes pigmentos ocorreu em função da variabilidade de suas aplicações. Além da utilização como corante nas indústrias alimentícias e de ração animal, estes compostos possuem propriedades antioxidantes, o que torna possível o emprego em tratamentos de prevenção ao câncer, às doenças do coração e da degeneração macular (KRINSKY & JOHNSON, 2005; VÍLCHEZ et al., 2011; VENIL et al., 2013; AKUFFO et al., 2015; WU et al., 2015; ESTEBAN et al., 2015; SONG et al., 2016; BERNSTEIN et al., 2016).

Visando os benefícios dos carotenoides, regimes de condução (batelada alimentada e semicontínuo) são considerados eficientes e versáteis para a produção de carotenoides. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio de bioprodução. O cultivo em batelada alimentada apresenta vantagens em termos de produtividade em células e em metabólitos secundários, além de ser interessante por possibilitar a manutenção da velocidade de

crescimento em valores controlados, já que a alimentação garante um controle das fontes necessárias ao crescimento, minimizando assim os efeitos de inibição pelo substrato (KIM et al., 2010; COLET et al., 2015; DIAS et al., 2015). O processo semicontínuo consiste em uma série de operações em sequência, no qual coleta-se parte do meio fermentado (cortes da fermentação) em períodos sequenciais e adiciona-se ao reator um volume de meio de fermentação igual ao volume de meio fermentado retirado, e o meio fermentado que permanece no reator serve de inóculo ao meio adicionado (SCHMIDELL et al., 2007; FERREYRA et al., 2014; CALDEIRA, 2015).

Qualquer melhoria alcançada na produtividade de carotenoides, em geral, pela variação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais, pode alterar significativamente o rendimento do produto de interesse. Portanto, é de grande interesse estudos de otimização da bioprodução de carotenoides em biorreator, visando maximizar o rendimento e reduzir custos de substratos pelo melhor aproveitamento dos componentes de meio.

Além disso, ressalta-se a possibilidade da utilização de subprodutos agrícolas de baixo custo e/ou resíduos, como matéria-prima, o que pode aumentar a viabilidade econômica do processo. Países com grande biodiversidade, como o Brasil, apresentam um grande potencial a ser explorado na utilização dessas matérias primas. Compostos obtidos naturalmente por processos biotecnológicos poderão reduzir a preocupação com a utilização de aditivos químicos em alimentos. Na literatura há relatos da utilização de substratos agroindustriais como o soro de queijo (FRENGOVA et al., 1994; AKSU & EREN, 2005, VALDUGA et al., 2009e), o mosto de uva (BUZZINI & MARTINI, 1999), derivados do processamento da cana-de-açúcar (FONTANA et al., 1996; VALDUGA et al., 2008; BARBATO, 2014), do processamento de milho (LOSS, 2009; VALDUGA et al., 2008) e glicerol da produção de biodiesel (SAENGE et al., 2011; VALDUGA et al., 2014; MACHADO & BURKERT, 2014; COLET et al., 2015; CARDOSO et al., 2016). Porém, raros são os estudos empregando batelada alimentada e sistema semicontínuo para a produção de carotenoides, com relatos da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*, reclassificada como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (RAMÍREZ et al., 2006; LIU & WU, 2007).

Dentro deste contexto, o objetivo desta tese foi realizar o estudo da produção de carotenoides pela levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator, em regime de batelada alimentada e semicontínuo, pelo desenvolvimento das seguintes etapas:

- Otimizar o meio de bioprodução a base de resíduos agroindustriais (glicerol bruto: subproduto da produção de biodiesel, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz) em frascos agitados;
- Avaliar a bioprodução, em reator, batelada alimentada em diferentes e iguais volumes de alimentação, com o meio otimizado com resíduos agroindustriais (água de maceração de milho, água de parboilização de arroz e glicerol bruto);
- Avaliar a bioprodução, em reator, em processo semicontínuo, variando-se o sistema de cortes;
- Comparar a bioprodução de carotenoides em processo semicontínuo com meio comercial (peptona e extrato de malte) e à base de resíduo agroindustrial;
- Avaliar o controle do pH ao longo da bioprodução;
- Obter os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de carotenoides em meio comercial e agroindustrial dos regimes batelada alimentada e semicontínuo.
- Identificar os carotenoides produzidos nos diferentes processos de bioprodução com meio comercial e com resíduos agroindustriais.

Esta tese está dividida em itens, conforme descrição resumida apresentada a seguir. No Item 2, serão abordados alguns aspectos teóricos da produção e recuperação de carotenoides, bem como a classificação, propriedades, estabilidade e funções, microrganismos produtores, fatores que afetam a bioprodução, emprego de resíduos agroindustriais e processo em batelada alimentada e semicontínuo relatados na literatura. O Item 3 apresenta o desenvolvimento de metodologia para a otimização do meio de bioprodução com resíduos agroindustriais, e a produção por processo em batelada alimentada e semicontínuo. No Item 4, serão abordados aspectos da bioprodução, recuperação e identificação, utilizando os diferentes processos com meio comercial e com resíduos, bem como, os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e bioprodução de carotenoides e a identificação dos carotenoides obtidos. O Item 5 apresenta as conclusões da bioprodução de carotenoides, seguido das sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

2.1 Carotenoides

Corantes são definidos como substâncias ou mistura de substâncias adicionadas aos alimentos e bebidas com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto. Para o uso desses corantes como aditivos alimentares, as indústrias devem respeitar os percentuais máximos estabelecidos pela legislação vigente. Além disso, é obrigação do fabricante informar ao consumidor (no rótulo do produto) a presença de corantes e suas especificações, Resolução - CNNPA Nº 44 de 1977 (BRASIL, 2016).

Os corantes artificiais ou sintéticos são uma classe de aditivos sem valor nutritivo, introduzidos nos alimentos e bebidas com um único objetivo de conferir a cor, tornando-os mais atrativos. Por esse motivo, do ponto de vista da saúde, os corantes artificiais em geral não são recomendados, justificando seu uso, que quase exclusivamente, comercial e tecnológico (FREITAS, 2012). A tendência mundial é a redução gradativa do uso dos corantes artificiais devido aos possíveis prejuízos à saúde (PAZZOTI, 2011; ESTEBAN et al., 2015).

Para substituir estes corantes artificiais tem-se o corante natural, que é toda substância corada extraída apenas por processos físico-químicos (dissolução, precipitação, entre outros) ou bioquímicos (fermentação) de uma matéria-prima animal ou vegetal. Esta substância deve ser solúvel no meio líquido onde vai ser introduzido o material a tingir (ARAÚJO, 2006).

Os corantes naturais são obtidos de três fontes principais, as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e microrganismos (microalgas, fungos e bactérias). Os corantes mais comumente encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais, são divididos em cinco classes principais: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonoide, antraquinona e betalaína (MENDONÇA, 2011; ESTEBAN et al., 2015).

Dentre os vários corantes empregados na indústria de alimentos, os carotenoides, responsáveis pela coloração alaranjada, desempenham um papel importante na prevenção de doenças associadas aos processos de estresse oxidativo como câncer, a catarata,

arteriosclerose e retardo do processo de envelhecimento (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004; CUARESMA et al., 2011; VENIL et al., 2013, ESTEBAN et al., 2015).

Embora os corantes naturais apresentem desvantagens (baixa estabilidade e alto custo) frente aos corantes artificiais, os naturais têm sido utilizados há anos sem evidências de danos à saúde. Portanto, apesar das desvantagens, a substituição por corantes naturais é gradativa na indústria alimentícia, pois conferem ao produto característica natural, o que aumenta a aceitação pelo consumidor (GOMES et al., 2014).

2.2 Classificação e Nomenclatura dos Carotenoides

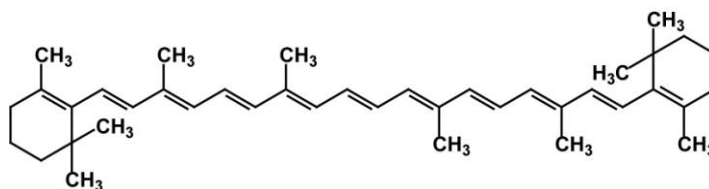
Os carotenoides são pigmentos terpenóides de 40 átomos de carbono derivados biossinteticamente a partir de duas unidades de geranylgeranil transferase de pirofosfato, solúveis, principalmente, em solventes não polares (ESTEBAN et al., 2015). Estes pigmentos são agrupados em carotenos e xantofilas. Alguns carotenos só tem carbono e hidrogênio na sua estrutura química, tais como β -caroteno e toruleno; enquanto xantofila também contém oxigênio, tais como astaxantina e cantaxantina (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).

As estruturas químicas de alguns carotenos são mostrados na Figura 1. Geralmente, os carotenoides são denominados de acordo com as variações estruturais de anéis laterais, especialmente a posição da dupla ligação. Em geral, para caroteno é utilizado o sufixo “eno”; e xantofilas o sufixo “ina” (BRITTON & HORNERO-MÉNDEZ, 1997).

Alguns dos carotenoides microbianos produzidas por leveduras relatados são (MATA-GÓMEZ et al., 2014):

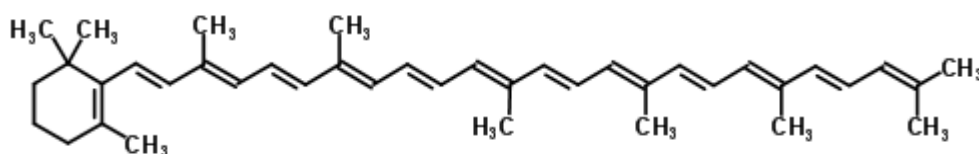
- ❖ β -caroteno (β - β' -caroteno) (Figura 1), esta molécula tem sido utilizada como corante alimentar ou como um suplemento alimentar na qualidade de provitamina A, numa gama de concentração entre 2 e 50 ppm. É adicionada a sucos e bebidas (matrizes hidrofílicas) e outros (matrizes lipofílicas), tais como manteiga, margarina e queijo (BRITTON et al., 1985);

Figura 1 - Estrutura química do β -caroteno (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).



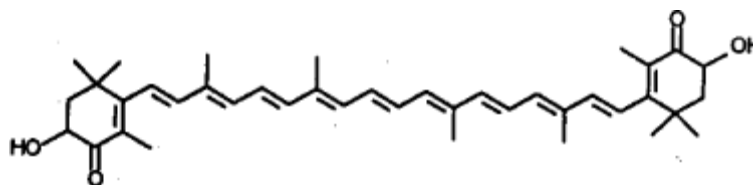
❖ Toruleno (3',4'-didehydro- β , ψ -carotene) (Figura 2), possui 13 ligações duplas conjugadas. As propriedades antioxidantes do toruleno são atribuídas ao seu sistema de dupla ligação conjugada; de fato, toruleno tem maior eficiência como antioxidante do que β - caroteno, que apresenta menos ligações duplas em sua estrutura química (SAKAKI et al., 2001-2002);

Figura 2 - Estrutura química do Toruleno (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).



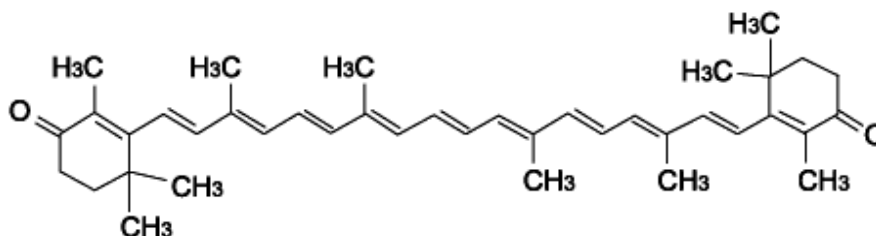
❖ Astaxantina (3, 3'-dihydroxy- β , β -carotene-4, 4'-dione) (Figura 3) é um pigmento vermelho que provoca coloração em invertebrados marinhos, peixes e aves, aplicado como um corante para conferir a cor-de-rosa-vermelha típica da salmão, truta e camarão (JOHNSON & LEWIS, 1979; REYNDERS, 1996);

Figura 3 - Estrutura química da Astaxantina (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).



❖ Cantaxantina (β - β' -carotene-4,4'-dione) (Figura 4) é de cor avermelhada e quimicamente semelhante à zeaxantina, betaína e criptoxantina (HANNIBAL, 2000).

Figura 4 - Estrutura química da Cantaxantina (BHOSALE & BERNSTEIN, 2005).



2.3 Funções dos Carotenoides

Os carotenoides, em consequência da sua estrutura conjugada de polienos, desempenham funções essenciais, tais como: coloração, atividade de pró-vitamina A, atividade antioxidante e pro-oxidante, os quais serão detalhadas a seguir.

2.3.1 Coloração

Os carotenoides são responsáveis pela coloração de frutos e vegetais, variando do amarelo, laranja, até o vermelho mais intenso, resultados da multiplicidade das duplas ligações conjugadas presentes na sua estrutura (FONTANA et al., 2000; ESTEBAN et al., 2015). A habilidade dos carotenoides de absorver luz na região visível e, consequentemente, de apresentar cor, envolve a formação do estado singlete desse e se deve ao grande número de insaturações conjugadas presentes na molécula. Quanto maior o número de insaturações mais intensa é a cor do composto. Pelo menos sete duplas ligações conjugadas são necessárias para que o carotenoide seja colorido (KRINSKY, 1994; RODRIGUEZ- AMAYA, 1999, VERONEZI & JORGE, 2011; COIMBRA & JORGE, 2013).

2.3.2 Atividade de pró-vitamina A

A dieta proporciona vitamina A na forma de vitamina pré-formada a partir de alimentos de origem animal como, por exemplo, leite, pescado e carnes, ou como carotenoides, que podem se transformar biologicamente em vitamina A, geralmente a partir de alimentos de origem vegetal. Estima-se que aproximadamente 60 % da vitamina A da dieta provem dos carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; LIRA & DIMENSTEIN, 2010; MATA-GÓMEZ et al., 2014, CARDOSO et al., 2016).

A transformação dos carotenoides pró-vitamínicos em vitamina A ocorre por clivagem central, sendo o carotenoide dividido ao meio, formando uma ou duas moléculas de retinal, que, posteriormente, é transformada em retinol (OLSON, 1999; LIRA & DIMENSTEIN, 2010; COIMBRA & JORGE, 2013).

A vitamina A desempenha diversos papéis no organismo, destacando-se sua participação no processo da visão, no crescimento, no desenvolvimento e manutenção do tecido epitelial, além das funções imunológica, de reprodução e do desenvolvimento embrionário (EL-BEITUNE et al., 2003; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2004; LIRA & DIMENSTEIN, 2010). O nível máximo de ingestão de vitamina A recomendado é de 6 mg/dia (PASSWATER, 1998; US DIETARY REFERENCE, 2015).

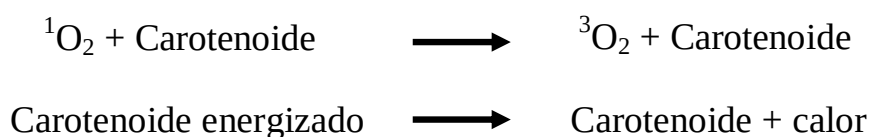
A exigência mínima para o carotenoide apresentar atividade pró-vitâmica A é ter um anel- β não substituído, com uma cadeia poliênica de onze carbonos (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). O β -caroteno destaca-se com 100 % de atividade pró-vitâmica A, por ser capaz de originar, a partir da ruptura enzimática de sua estrutura, duas moléculas de vitamina A. Na sequência, a criptoxantina com 57 %, α -caroteno com 53 %, γ -caroteno entre 42-50 % e o β -zeacaroteno, entre 20-40 % (MÍNGUEZ-MOSQUERA et al., 2002; VERONEZI & JORGE, 2011; COIMBRA & JORGE, 2013).

2.3.3 Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes dos carotenoides fundamentam-se na estrutura desses compostos, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres (YOUNG & LOWE, 2001; VERONEZI & JORGE, 2011; MATA-GÓMEZ et al. 2014, MAADANE et al., 2015; CARDOSO et al., 2016).

Os carotenoides participam do mecanismo de fotoproteção (Figura 5) sequestrando o oxigênio singlete. Essa reação envolve a transferência de energia entre o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e o carotenoide para gerar oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$). O carotenoide energizado formado retorna ao estado fundamental dissipando essa energia mediante interações rotacionais com o sistema de solventes (SCHAFER et al., 2002; CARIS-VEYRAT, 2007). A energia liberada é baixa e, portanto, inofensiva ao meio celular. Esse mecanismo protege os portadores de porfirias cutâneas contra os efeitos nocivos do oxigênio singlete formado na pele a partir da exposição à luz solar. Tais efeitos protetores são indicados pela redução da concentração de β -caroteno na pele dos indivíduos afetados (WOODALL et al., 1997; MORTENSEN et al., 2001; ESTEBAN et al., 2015).

Figura 5 – Mecanismo de fotoproteção (SCHAFER et al., 2002; CARIS-VEYRAT, 2007)



Os carotenoides podem reduzir as taxas de fotooxidação, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade e proteger o DNA contra o ataque dos radicais livres (BURRI et al., 1998; MOLLER & LOFT, 2004).

2.3.4 Atividade pró-oxidante

Uma molécula com efeito pró-oxidante pode ser definida como aquela que interage com espécies reativas de oxigênio (ROS) para formar compostos mais prejudiciais para a própria biomolécula (LOWE et al., 2003; CARIS-VEYRAT, 2007; VERONEZI & JORGE, 2011; COIMBRA & JORGE, 2013). BURTON & INGOLD (1984) foram os primeiros a mencionar a atividade pró-oxidante dos carotenoides.

Existem três mecanismos principais pelos quais os carotenoides podem ser convertidos em pró-oxidantes (YOUNG & LOWE, 2001; LOWE et al., 2003; EL-AGAMEY et al., 2004; VERONEZI & JORGE, 2011; COIMBRA & JORGE, 2013):

- a) Reações com ROS ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) em que a molécula de carotenoide é oxidada e/ou clivada, gerando produtos pró-oxidantes;
- b) Altas concentrações celulares de carotenoides podem aumentar a permeabilidade das membranas biológicas para toxinas e radicais;
- c) Aumento da pressão de oxigênio ou altas concentrações de carotenoides podem levar a formação de um radical carotenoide peroxil, iniciando a lipoperoxidação.

Vários estudos demonstraram a perda da atividade antioxidante dos carotenoides como, descrito por GALINATO et al. (2007) que relataram sobre a autooxidação de carotenoides com metais. Tais autores propuseram mecanismo no qual o β -caroteno desapareceu após 10 minutos de reação com ferro, ou seja, ocorreu a autooxidação.

A oxidação de carotenoides por moléculas de oxigênio, ou seja, o processo de autooxidação constitui fenômeno um complexo que está, provavelmente, relacionado com algum fator externo (metal, radical, etc.) (CARIS-VEYRAT, 2007; VERONEZI & JORGE, 2011; COIMBRA & JORGE, 2013).

2.4 Produção de Carotenoides por Via Microbiana

A produção industrial de carotenoides naturais pode ser realizada por i) processos biotecnológicos usando fungos filamentosos, leveduras, bactérias ou microalgas; ii) extração sólido-líquido a partir de plantas. Tem sido relatado que apenas 2 % da produção mundial de β -caroteno é proveniente de fontes naturais (VOUTILAINEN et al., 2006).

No entanto, a produção e comercialização de corantes de origem de plantas apresentam alguns problemas com relação à variabilidade sazonal e geográfica que não pode

ser controlada. Por sua vez, a síntese química pode gerar resíduos perigosos que podem afetar o meio ambiente (COUNSELL, 1980; MATA-GÓMEZ et al. 2014).

A produção de carotenoides por microrganismos, apresenta algumas vantagens: os pigmentos sintetizados são considerados naturais; alguns microrganismos são capazes de se desenvolver em substratos de baixo custo; é necessário pequeno espaço para a etapa de síntese; esta não se encontra sujeita às alterações climáticas e, para completar, as condições de cultivo podem ser manipuladas de forma a estimular a produção de um carotenoide específico. Desta forma, vários estudos estão direcionados a encontrar alternativas que possam induzir a síntese de carotenoides e/ou aumentar a eficiência destes sistemas biológicos de forma que eles sejam comercialmente viáveis (AUSICH, 1997; BHOSALE, 2004; COLET et al., 2015; DIAS et al., 2015).

Na Tabela 1 estão apresentados os microrganismos, tecnologicamente, com potencial para serem empregados na bioprodução dos principais carotenoides.

Os trabalhos que relatam sobre a produção de carotenoides por microrganismos são, na grande maioria, realizados em frascos agitados, poucos apresentam dados referentes à produção em biorreator. Dentre os microrganismos investigados na produção em biorreator, destacam-se: *R. sphaeroides* (NG et al., 2011), *S. cerevisiae* (YUAN et al., 2011), *S. salmonicolor* (VALDUGA et al., 2008-2011; COLET et al., 2015), *R. glutinis* (SAENGE et al., 2011) e *R. toruloides* (DIAS et al., 2015).

Destaca-se a *Sporodiobolus salmonicolor*, é uma levedura, pertence ao reino dos fungos da divisão dos Basidiomycota, predominantemente no estado assexuado e unicelular. Três variedades de *Sporodiobolus salmonicolor* têm sido descritas: *S. albus*, *S. fischerii*, e *S. salmoneus* (KURTZMAN et al., 2011). Essas leveduras são lipossolúveis, pigmentadas de cor rosa-salmão. A superfície é suave e tem textura pastosa. A temperatura ótima para o crescimento de *S. salmonicolor* está entre 25-35 °C. A parede celular de *S. salmonicolor* contém fucose, manose, glicose e galactose. Essas leveduras crescem na presença de glicose, sacarose, maltose, etanol, glicerol, entre outros (BOEKHOUT, 1995).

Alguns trabalhos relatam a utilização de *S. salmonicolor* para produção de carotenoides (VALDUGA et al., 2009-2014; COLET et al., 2015), aroma (γ -decalactona) (FERON et al., 1996-1997; LEE et al., 1999;) e ácido (ácido 4-hidroxidecanóico) (FERON et al., 1996).

Tabela 1 - Microrganismos empregados na bioprodução de carotenoides.

Espécies	Carotenoides produzidos	Referências
Algas		
<i>Chlamydomonas acidophila</i>	β –Caroteno, Luteína, Zeaxantina, Violaxantina	CUARESMA et al. (2011)
<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 et al. (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Violaxantina	CHA et al. (2010); GUEDES et al. (2011)
<i>Dunaliella bardawill</i>	Luteína, Zeaxantina	TAKAICHI (2011)
<i>Dunaliella</i> sp.	Astaxantina, β -Caroteno	TAKAICHI (2011)
<i>Dunaliella salina</i>	β -Caroteno	PANIAGUA-MICHEL et al. (2009)
<i>Dunaliella parva</i>	Anteraxantina, β -Caroteno, Neoxantina, Violaxantina, Zeaxantina	TAKAICHI (2011)
<i>Haematococcus</i> sp.	Astaxantina, β -Caroteno	VILA et al. (2008)
<i>Haematococcus pluvialis</i> NIES-144	Astaxantina	YUAN et al. (2011)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005); MONTERO et al. (2005); DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA et al. (2007); YUAN et al. (2011); NUNES et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Fucoxantina	RYCKEBOSCH et al. (2011)
<i>Phormidium autumnale</i>	All-trans- β -caroteno, all-trans-zeaxantina, all-trans-luteína	RODRIGUES et al. (2014)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Carotenoides	PRIBYL et al. (2015)
<i>Tetraselmis</i> sp.	β -Caroteno e Luteína	TSAI et al. (2016)
Bactérias		
<i>Brevibacterium linens</i>	β -Criptoxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005); KIM et al. (2010)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Γ -Caroteno, Hidroxi- γ -Caroteno	BALDERMANN et al. (2010)
<i>Ervinia</i> sp.	β –Caroteno, Licopeno, Zeaxantina	MISAWA & SHIMADA (1998); FUGISAWA et al. (2009)
<i>Escherichia coli</i>	Licopeno	LU et al. (2011)
<i>Halobacillus halophilus</i>	Carotenoides	OSAWA et al. (2010)
<i>Halomonas elongata</i>	β -Caroteno	RODRÍGUEZ-SAÍZ et al. (2007)
<i>Flavobacteriaceae</i> sp.	Saproxantina, Mixol, Zeaxantina	SHINDO et al. (2007)
<i>Flavobacterium</i> sp.	β –Caroteno, Xantofila	SHINDO et al. (2007)
<i>Flavobacterium Multivorum</i>	Zeaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005)

Continuação da Tabela 1		
Espécies	Carotenoides produzidos	Referências
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005)
<i>Paracoccus</i> sp.	Astaxantina	FUGISAWA et al. (2009)
<i>Phaeospirillum molischianum</i>	Licopeno e Rhodopin	HORIBE et al. (2015)
<i>Phormidium laminosum</i>	Zeaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Carotenoides	AUTENRIETH & GROSH (2015)
<i>Thermus thermophilus</i>	β -Criptoxantina, Zeaxantina.	OSAWA et al. (2010) TAKANO et al. (2011)
Cianobactérias		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Carotenoides	OLIVEIRA et al. (2015)
<i>Microcystis aeruginosa</i>		
<i>Halorubrum saccharovorum</i>	Carotenoides	SANTOS et al. (2014)
<i>Synechococcus</i> sp.	β -Caroteno, β -Criptoxantina, Zeaxantina, Mixoxantofila	ZHU et al. (2010)
Fungos e leveduras		
<i>Blakeslea trispora</i>	β -Caroteno	TERESHINA et al. (2010); VARZAKAKOU et al. (2011)
<i>Candida utilis</i>	Licopeno	MIURA et al. (1998)
<i>Coriolus versicolor</i> AS5.48	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Monascus ruber</i>	Carotenoides	BÜHLER et al. (2015)
<i>Mortieralla alpina</i> M-23	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Mucor mucedo</i> AS3.2531	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Carotenoides, Astaxantina	MONTANTI (2011); MIAO et al. (2011); MICHELON et al. (2012); SILVA et al. (2012a)
<i>Phaffia rhodozyma</i> AS2.1557	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina, Zeaxantina	BHOSALE & BERNSTEIN (2005)
<i>Panus conchatus</i> AS5.154	Astaxantina	WANG et al. (2005)
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	β -Caroteno, Licopeno	BHOSALE (2004); POLAINO et al. (2010)
<i>Podospora anserine</i>	β -Caroteno, γ -Caroteno, β -Zeacaroteno, Fitoeno, Licopeno, Neurospeno, Neurosporaxantina, Toruleno	STROBEL et al. (2009)

Continuação da Tabela 1		
Espécies	Carotenoides produzidos	Referências
<i>Rhodotorula glutinis</i>	β -Caroteno, Toruleno e Torularrodina	CALDEIRA (2015)
	Astaxantina	TASKIN et al. (2011); TAO et al. (2007)
	Carotenoides	SAENGE et al. (2011)
<i>Rhodotorula graminis</i>	Caroteno	BUZZINI et al. (2005)
<i>Rhodotorula minuta</i>	β -Caroteno	MONTERO et al. (2005)
<i>Rhodotorula rubra</i>	Toruleno, Torularrodina e β -caroteno	BANZATTO et al. (2013)
<i>Rhodotorula rubra</i> AS2.670	Astaxantina	FRENGOVA et al. (2006) WANG et al. (2005)
<i>Rhodotorula graminis</i> RC04	β -caroteno	FERRAO & GARG (2012)
<i>Rhodotorula</i> sp	Carotenoides	BARBATO (2014)
	Toruleno, Torularrodina e β -caroteno	MOLINÉ et al. (2012)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Caroteno	NG et al. (2011)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Carotenoides	DIAS et al. (2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Licopeno	VERWAAL et al. (2010)
<i>Sporobolomyces</i> sp.	Toruleno	DAVOLI et al. (2004)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Toruleno, β -caroteno, Torularrodina e γ -caroteno	CARDOSO et al. (2016)
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>	Carotenoides	SA et al. (2013)
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>		
<i>Sporidiobolus</i> sp.	Toruleno β -caroteno	DAVOLI et al. (2004) RAZAVI & MARCH (2006).
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> CBS 2636		VALDUGA et al. (2008 -2011) COLET et al. (2015)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Carotenoides	CABRAL et al. (2011) ; MACHADO & BURKERT (2014); VALDUGA et al. (2014) ; MANOWATTANA et al. (2012)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	WOZNIAK et al. (2011); BREITENBACH et al. (2011)

2.4.1 Fatores que influenciam na bioprodução de carotenoides com leveduras

A produção de carotenoides por microrganismos é afetada por fatores físicos (luminosidade, temperatura e oxigênio) e pela composição do meio de cultivo (fonte de carbono e de nitrogênio, presença de aminoácidos, de íons metálicos, de solventes orgânicos e de outros compostos químicos), os quais variam em intensidade e concentração de acordo com as necessidades de cada microrganismo, podendo resultar em uma influência positiva ou

negativa na biossíntese destes pigmentos. Estes fatores podem ser empregados como estratégias para aumentar a produção ou para induzir a síntese de um carotenoide específico (BHOSALE, 2004; VALDUGA et al., 2009 a 2014; BARBOSA et al., 2015).

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

A biossíntese de carotenoides naturalmente ocasiona mudanças do pH do meio de produção, como consequência do crescimento do microrganismo. De modo geral, em leveduras, o pH do meio decresce nas primeiras 72 h de bioprodução, seguido de uma elevação durante a fase intensa de carotenogênese. A partir daí, o pH permanece constante indicando o final da bioprodução (FRENGOVA et al., 1994). O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes para o crescimento celular e formação de produto, tornando-se uma variável a ser estudada na produção de carotenoides (VALDUGA et al., 2009; COLET et al., 2015)

Outro fator é a luminosidade, pois a produção e o acúmulo de carotenoides são afetados pela irradiação de luz branca em algas, fungos e bactérias. Contudo, a intensidade e forma de iluminação variam com o microrganismo. A teoria da foto-indução pode ser descrita em dois aspectos. No primeiro, o efeito da luz sobre o crescimento do microrganismo 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; BARBOSA et al., 2015).

2. 4.2 Matérias-primas alternativas

A sacarose e a glicose são as fontes de carbono mais comumente utilizadas na bioprodução de carotenoides (VALDUGA et al., 2014). Alguns estudos têm investigado a produção de carotenoides utilizando fontes alternativas de substratos tais como cereais (aveia, trigo, cevada, milho, arroz, centeio), lipídios, glicerol, celobiose, melaço de cana de açúcar, mosto de uvas e soro de queijo com diferentes cepas microbianas, principalmente com a bioprodução em frascos agitados. A Tabela 2 apresenta uma síntese de relatos da literatura empregando substratos alternativos de baixo custo na bioprodução de carotenoides.

O crescimento de microrganismos em fontes de carbono alternativos como L-malato, acetato e/ou glicerol, requerem 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 biossíntese de ácidos nucleicos (MOAT et al., 2002; SILVA et al., 2012b).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras, sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula. Consiste em uma fonte de carbono barata e abundante, devido à inevitável geração como subproduto da produção de biodiesel (RIVALDI et al., 2012).

No Brasil, com a adição obrigatória de biodiesel aos combustíveis à base de petróleo, grandes quantidades de glicerol bruto são gerados (cerca de 10% do volume total de biodiesel). O produção de biodiesel, está estimado para atingir um total de 25 bilhões de litros em 2017 (OECD—FAO, 2016). Uma solução sustentável para essa acumulação de glicerol bruto deve ser implementada. Alguns estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono para os microrganismos, na produção de biocompostos (PAPANIKOLAOU et al., 2002; ITO et al., 2005; CHENG et al., 2007; SAENGE et al., 2011; MACHADO & BURKERT, 2014; CARDOSO et al., 2016).

MANOWATTANA et al. (2012) observaram o custo da produção para o meio composto com glicerol foi de R\$ 0,12 por mg/L em contra partida ao meio comercial de R\$ 1,27 por mg/L, provando assim a vantagem de utilizar resíduos agroindustriais na bioprodução de carotenoides.

A água de maceração de milho – AMM ou milhocina, tem sido utilizada como um componente importante de alguns meios de crescimento (Tabela 2), sendo indicado como fonte de nitrogênio orgânico, componente essencial para o crescimento microbiano (LOSS, 2009; VALDUGA et al., 2014; MACHADO & BURKERT, 2014). Além disso, contém carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato. Assim, é uma matéria-prima favorável aos processos fermentativos, quando comparado ao extrato de levedura (meio comercial utilizado como fonte de nitrogênio), considerado um complexo rico em nitrogênio, aminoácidos e vitaminas (AMARTEY & LEUNG, 2000; RIVAS et al., 2004; MACHADO & BURKERT, 2014).

Tabela 2 – Estudo da composição do meio de cultivo na bioprodução de carotenoides por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Matérias-primas utilizadas	Máxima produção de carotenoide	Melhores concentrações	Carotenoide majoritário	Referência
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Glicose, sacarose de melaço e lactose do soro de queijo	125 µg/mL	20 g/L de sacarose de melaço	-	AKSU & EREN (2007)
<i>Rhodotorula</i> sp.	Melaço e caldo de cana de açúcar	3,05 µg/mL	135 mL de melaço de cana hidrolisado nas concentrações de 25%,	-	BARBATO (2014)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Glicerol bruto, peptona e extrato de levedura	0,51 g/L	33,5 g/L de glicerol bruto, 20 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,5 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de Na ₂ HPO ₄ , 1,5 g/L de MgSO ₄ ·7H ₂ O e 4 g/L de KH ₂ PO ₄	Toruleno, β-caroteno, Torularrodina e γ-caroteno	CARDOSO et al. (2016)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> CBS 2636	Glicerol, extrato de malte e peptona	4400 µg/L (biorreator batelada alimentada)	80 g/L de glicerol, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona	-	COLET et al. (2015)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Glicerol bruto e água de maceração de miho	640 µg/L	9 a 10 g/L de glicerol e 26 a 30 g/L de água de maceração de milho	-	MACHADO & BURKERT (2014)
<i>R. glutinis</i>	Fermentado de rabanete	19 µg/Lh	-	β-caroteno	MALISORN & SUNTORN SUK et al. (2009)
<i>Blakeslea trispora</i>	Glicose, glicerol puro e mistura de glicose e glicerol	15,0 mg/g de biomassa seca	60 g/L de glicerol	β-caroteno	MANTZOURIDOU et al. (2008)
<i>R. glutinis</i>	Soro de leite	46 mg/L	-	β-caroteno	MAROVA et al. (2011)

Continuação da Tabela 2					
Microrganismo	Matérias-primas utilizadas	Máxima produção de carotenoide	Melhores concentrações	Carotenoide majoritário	Referência
<i>R. munilaginoso</i>	Meio com batata	56 mg/L	-	β-caroteno	MAROVA et al. (2011)
<i>R. acheniorum</i>	Soro de leite ultrafiltrado	262 mg/L	-	β-caroteno	NASRABADI & RAZAVI (2011)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> H110	Glicose, glicerol puro e glicerol comercial	3,84 mg/g	40 g/L de glicerol comercial	Torularrodina e β-caroteno	RAZAVI & MARCH (2006)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Água de parboilização de arroz, peptona e extrato de malte.	5,3 μg/mL	87,5 g/L de água de parboilização de arroz, 15 g/L de peptona e 16,25 g/L de extrato de malte.	-	RIOS et al. (2015)
<i>R. glutinis</i>	Glicerol bruto	135,2 mg/L	-	-	SAENGE et al. (2011)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Caldo de cana e ureia	27,75 mg/L para a cepa selvagem	-	Astaxantina	SILVA (2008)
<i>R. glutinis</i>	Penas de galinha	92 mg/L	-	-	TASKIN et al. (2011)
<i>R. glutinis</i>	Farinha de feijão e extrato de batata doce	3,48 mg/L	-	-	TINOI et al. (2005)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Melaço de cana de açúcar, água de maceração de milho e Prodex Lac	541,5 μg/L	10 g/L de melaço de cana de açúcar e Prodex Lac e 5 g/L de água de maceração de milho	-	VALDUGA et al. (2008)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Glicerol, água de maceração de milho, água de parboilização de arroz e melaço	843 μg/L	40 g/L de glicerol e água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz.	-	VALDUGA et al. (2014)

A água de parboilização de arroz também é pesquisada como matéria-prima na produção de biocompostos (VALDUGA et al., 2014; RIOS et al., 2015). No processo de parboilização, é utilizado 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. Portanto, a água de parboilização do arroz pode ser uma promissora matéria-prima a ser utilizada no meio de cultivo para a produção de carotenoides (FARIA et al., 2006).

Outro matéria-prima já relatado na literatura (Tabela 2) para a produção de carotenoides, é denominado comercialmente por Prodex-Lac® - hidrolisado de levedura (VALDUGA et al., 2008; MANERA et al., 2011), um produto com composição similar a do extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e vitaminas, e de menor custo (MANERA et al., 2011).

As leveduras são mais usadas do que as algas para a produção de carotenoides em larga escala em fermentadores, devido a sua natureza e a sua alta taxa de crescimento unicelular (FRENGOVA & BESHKOVA, 2009). Além disso, as leveduras podem se adaptar a diferentes condições ambientais e crescer sob uma ampla variedade de fontes de carbono e de nitrogênio (MOLINÉ et al., 2012).

2.5 Produção de Carotenoides em Sistema em Batelada Alimentada

Na busca de superar os problemas para obtenção de carotenoides em relação à inibição da produção pelo excesso da concentração de substrato ou por repressão catabólica, são usualmente utilizados cultivos em batelada alimentada. A batelada alimentada é a técnica utilizada em processos microbianos na qual um ou mais nutrientes são alimentados ao reator durante o cultivo, enquanto os produtos permanecem no seu interior até o final do processo (SILVA et al., 1998; BELLÃO et al., 2013; DIAS et al., 2015).

O principal propósito da batelada alimentada é controlar a concentração do substrato presente no meio de cultura. Para tal faz-se necessário definir o tipo de nutriente a ser disponibilizado e o modo de alimentação. A batelada alimentada pode ser dividida em relação à velocidade de alimentação em: constante, exponencial e otimizada (YAMANÈ & SHIMIZU, 1984; BELLÃO et al., 2013).

Os cultivos em batelada alimentada são comumente empregados na busca de alta densidade celular e/ou máxima formação de produto. Uma boa estratégia para condução da bioprodução em batelada alimentada com diversos tipos de microrganismos é a alimentação

de substrato limitante na mesma velocidade que este é utilizado pelo organismo (KLEMAN et al., 1991; BELLÃO et al., 2013; DIAS et al., 2015).

A característica básica dos processos microbianos em batelada alimentada é que as concentrações de nutrientes alimentadas no biorreator podem ser controladas voluntariamente por mudanças na velocidade de alimentação. Desta forma, a batelada alimentada é superior à batelada convencional, especialmente quando mudanças na concentração de nutrientes afetam o rendimento do metabólito desejado (YAMANE & SHIMIZU, 1984; NASRABADI & RAZAVI, 2010; SAENGE et al., 2011; BELLÃO et al., 2013).

YAMANE et al. (1997) estudaram a produção de carotenoides por *P. rhodozyma* em batelada alimentada, utilizando duas etapas. O crescimento celular foi reforçado pela baixa relação C/N na primeira fase, com a alimentação das soluções de glicose, mineral e fosfato ajustadas na mesma proporção de 180 mL/h e a taxa de alimentação da solução de amônia foi fixada em 90 mL/h. A produção de astaxantina foi reforçada pela elevação da relação C/N na segunda fase (a alimentação das soluções foram realizadas quando a concentração de oxigênio dissolvido excedeu 6,0 mg/L). As taxas de alimentação para a glicose, mineral e fosfato foram fixadas no mesmo valor que na primeira etapa, enquanto que a taxa de alimentação da solução de amônia foi de 22,5 mL/h. Neste sistema de cultivo, foi obtida a maior produção de astaxantina de 16,0 mg/L.

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

SAENGE et al. (2011) estudaram a utilização de glicerol bruto, como única fonte de carbono para a produção de lipídeos e carotenoides pela levedura *R. glutinis* TISTR 5159. A adição de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e Tween 20 como surfactante resultou no aumento da concentração de lipídeos e carotenoides. A maior concentração de biomassa foi obtida em 8,5 % m/v de glicerol e proporção C/N de 60, enquanto que para teores de lipídios e produção de carotenoides a concentração de glicerol foi de 9,5 % m/v e a relação C/N de 85.

SAENGE et al. (2011) também estudaram a produção de lipídeos e carotenoides em biorreator de tanque agitado com controle de pH em 6,0 e a taxa de aeração em 2 vvm. Em sistema batelada alimentada, iniciada no meio da fase exponencial e a cada 12 h para manter a

concentração de glicerol, eram adicionados 50 mL de glicerol bruto até completar 48 h. Uma maior produção de lipídios (6,05 g/L) e de carotenoides (135,25 mg/L) foram obtidos, comparando-se com o cultivo em batelada simples, onde a produção de carotenoides foi de 117,38 mg/L.

DIAS et al. (2015) estudaram uma nova estratégia de controle de duplo estágio de pH em batelada alimentada para a melhoria da produção de lipídios e carotenoides pela levedura *R. toruloides* NCYC 921. A estratégia de alimentação seguiu o mesmo descrito por PANn et al.(1986), com modificações. No final do cultivo descontínuo, o substrato foi alimentada com uma solução contendo nutrientes e glicose (9 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 g de extrato de levedura em 1 L de 60 % m/v de glicose), usando uma bomba peristáltica a fim de estender a fase exponencial da levedura (crescimento ativo nessa fase). A concentração de glicose residual foi sempre mantida abaixo de 50 g/L, a fim de evitar a possibilidade de inibição pelo substrato. Os resultados mostraram que quando a fase de crescimento da levedura foi realizada a pH 4,0, e a fase de acumulação de produtos foi realizada a pH 5,0, a produtividade de carotenoides foi de 0,29 g/L.h.

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

2.6 Produção de Carotenoides em Sistema Semicontínuo

Os cultivos em sistema semicontínuo propiciam alta produção de células por intervalo de tempo. Neste sistema, o biorreator é carregado no início do cultivo com o meio e o inóculo, sendo então mantido nas condições ótimas. Após o término da bioprodução, uma parcela do meio de caldo de bioprodução é removido e substituído por meio de cultivo novo, isento de células. Isso pode ser feito a qualquer momento durante o desenvolvimento do cultivo, porém, geralmente é realizado após a obtenção de alta concentração de biomassa. Esta operação, também, chamada de corte, deve ser realizada sempre que a produçãoocultivo atingir este estágio (LOURENÇO, 2006; HENRARD et al., 2011; CALDEIRA, 2015).

A concentração do microrganismo na qual é realizado o corte é chamada de concentração celular de corte, e a fração de meio de caldo fermentado, retirada com posterior adição de meio novo, é chamada de taxa de renovação de meio. Com este procedimento consegue-se obter produto com o mesmo inóculo por um tempo superior. Além disso, não há necessidade de estágios de preparação de inóculo, nem limpeza dos reatores entre um ciclo e

outro e tem-se a possibilidade de, uma vez conhecida as melhores condições de operação, obter produtividades significativamente maiores do que em processo batelada simples. O corte deve ser feito quando o microrganismo está na fase de crescimento exponencial, para não haver nova fase de adaptação, obtendo-se assim um processo quase contínuo de produção de biomassa (BORZANI et al., 2001; LOURENÇO, 2006; HENRARD et al., 2011; CALDEIRA, 2015).

Nos cultivos semicontínuos não há número preestabelecido de coletas, de forma que a remoção do caldo fermentado e a substituição por meio de cultura novo podem ser realizados, em tese, sem limite. Entretanto, este procedimento acarreta curvas de crescimento com variações bruscas de densidade de células (LOURENÇO, 2006; HENRARD et al., 2011).

Na literatura não há relatos da bioprodução de carotenoides por leveduras empregando sistema semicontínuo com resíduos agroindustriais, porém já foi relatado para a produção com meio comercial e de outros biocompostos (RADMANN et al., 2007; HENRARD et al., 2008 e 2011; FERREYRA et al., 2014; CALDEIRA, 2015).

CALDEIRA (2015) estudou a otimização da produção de lipídios (visando a produção de biodiesel) e de carotenoides pela levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921, em biorreator de 7 L com um volume de trabalho de 5 L num sistema semicontínuo. A estratégia geral de cultivo consistiu em duas etapas distintas. Numa primeira fase, após o crescimento da levedura em regime descontínuo, uma solução de nutrientes foi fornecida de modo a prolongar a fase de crescimento da levedura. Na segunda fase, assim que atingida a fase estacionária, a solução de alimentação foi substituída por uma solução de glicose concentrada (600 g/L) para induzir a síntese de materiais de reserva intracelulares, tais como lipídeos e carotenoides. Com a estratégia de dois estágios de controle de pH, foi obtida máxima concentração de biomassa (154,21 g/L), produtividade de biomassa (2,35 g/L.h), produtividade de lipídios (0,40 g/L.h), produtividade de carotenoides (0,29 g/L.h), teor total de carotenoides (0,29 mg/g) e percentagem de lipídeos totais (41,07 %).

FERREYRA et al. (2014) estudaram a obtenção de vinagre de laranja em processo semicontínuo, em escala de laboratório, a dois níveis da variável proporção de carga (vinho/vinagre): 40 % e 60 % utilizando-se como respostas velocidade de acetificação e rendimento, a 600 rpm, 0,4 vvm e 30°C. A proporção carga/descarga, não afeta significativamente ($\alpha=0,05$) as respostas durante o segundo ciclo para nenhum dos dois níveis, assim foi possível estabelecer a proporção de carga para um processo semicontínuo em 60 % para obter maior volume de vinagre de laranja.

Na literatura, há também, relatos de cultivo semicontínuo de microalgas. RADMANN et al. (2007) avaliaram o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* em fotobiorreator para a produção de biomassa, onde maiores velocidades específicas de crescimento foram de $0,134\text{ d}^{-1}$ e $0,138\text{ d}^{-1}$, com a utilização de taxas de renovação de 40 e 60 %, durante um período de 62 dias de cultivo.

HENRARD et al. (2008) cultivaram biomassa de *Cyanobium* sp. em fotobiorreatores tubulares fechados as maiores produtividades foram obtidas quando empregaram as maiores concentrações de corte (1,0 g/L e 1,2 g/L) e níveis máximos de taxa de renovação de meio (50 %), além de apresentar o maior número de ciclos (10 cortes) ao longo do cultivo.

HENRARD et al. (2011) avaliaram a influência da concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio sobre a velocidade específica de crescimento e a produtividade da célula de microalga *Chlorella* sp. durante cultivos semicontínuos. A máxima velocidade específica de crescimento foi de $0,149\text{ d}^{-1}$ e a produtividade foi de $0,091\text{ g/L.d}$ quando utilizaram concentração celular de corte 0,6 g/L e 0,8 g/L, taxa de renovação 40 e 30 %, concentração de bicarbonato de sódio de 1,6 g/L, respectivamente.

2.7 Recuperação dos Carotenoides

Os carotenoides estão presentes em uma grande variedade de células naturais, sendo a rigidez da parede celular, destas o fator que pode favorecer ou não a extração. Na parede celular que oferece menos resistência, o simples contato com o solvente adequado é suficiente para que todo o pigmento seja removido, enquanto que na parede rígida, técnicas de ruptura mecânica e de extração devem ser associadas ao processo.

A bioprodução industrial de carotenoides vem se expandindo comercialmente, porém as operações de ruptura celular, 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 (SARADA et al., 2006; PARK et al., 2007; VALDUGA et al., 2009c) e, conseqüentemente contribuindo para a redução de custo das operações de *downstream*.

O processo de extração dos carotenoides presentes em material biológico é comumente feito pela utilização de solventes orgânicos. Devido à estrutura complexa e a diversidade desses compostos encontrados em amostras vegetais, não há um protocolo único para extraí-los (QUIRÓS & COSTA, 2006). Uma vez que os carotenoides são pigmentos

lipossolúveis não saponificáveis, é comum realizar uma etapa de saponificação para remover os lipídeos que possam interferir nos procedimentos de extração com solventes apolares. A saponificação é feita utilizando-se uma solução de base, como hidróxido de potássio, em solvente polar, como metanol ou etanol, de onde os carotenoides são posteriormente extraídos (SILVA et al., 2010; XAVIER et al., 2012; SAINI et al., 2015).

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

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

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

PARK et al. (2007) testaram diferentes solventes para a ruptura das células de *R. glutinis* e extração de carotenoides 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.

Em função da forte associação dos carotenoides com as células e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, VALDUGA et al. (2009c) testaram métodos diferentes para o rompimento celular e extração com solventes. As melhores taxas de extração dos carotenoides totais bioproduzido pela levedura *S. salmonicolor* foram verificadas quando utilizou-se a combinação nitrogênio líquido e DMSO para ruptura celular e extração com mistura de acetona e metanol (7:3 v/v).

JAIME et al. (2010) estudaram a extração de carotenoides da microalga *H. pluvialis*, combinando extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando hexano e etanol como solventes. Os resultados demonstraram que a temperatura de extração tem influência positiva no rendimento, que pode ser devido a um aumento na transferência de massa da amostra para

o solvente pressurizado. Porém, o seu efeito na atividade antioxidante foi negativo, ocorrendo redução na concentração do pigmento com o aumento da temperatura de 50 a 150°C, sendo mais pronunciada em 200°C. Os melhores rendimentos foram obtidos com etanol à temperatura superior à extração, enquanto que a maior atividade antioxidante foi obtida utilizando etanol, porém, em temperaturas mais baixas.

MONKS et al. (2012) investigaram diferentes estratégias para a extração de pigmentos de carotenoides de *S. salmonicolor* (CBS 2636). A ruptura celular foi realizada utilizando dimetilsulfóxido (DMSO), dois fluidos comprimidos puros (dióxido de carbono supercrítico e propano), e também uma combinação de tratamento de fluido sob pressão, seguida por DMSO líquido. Diclorometano, etanol, acetato de etila e acetona foram testados para a extração de carotenoides. Os resultados mostraram que quando vários solventes foram utilizados, um efeito sinérgico sobre o grau de recuperação de carotenoides foi verificado. A concentração máxima de carotenoides totais (2875 g/L) foi obtido do tratamento com CO₂ supercrítico (300 bar/120 min) seguido de dimetilsulfóxido para romper a célula e, em seguida, a extração com uma solução de acetona / metanol (7:3 v/v).

MONKS et al. (2013) estudaram o rompimento celular de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) para liberar carotenoides por meio de tratamentos combinados enzimáticos, químicos e por ultrassom. No tratamento enzimático (complexo enzimático: E2), a máxima extratibilidade de carotenoides totais foi de 18,5 % (572,70 µg/L), empregando a relação de célula:enzima de 1:3,41 (m/m), a 35°C. A quantidade máxima de carotenoides recuperado foi de 572,70 mg/L obtido por hidrólise enzimática utilizando a concentração de enzima de 3,4 g de enzima por grama de células secas a 35°C, 180 rpm, 48 h de reação e extração com acetona/metanol (7:3 v/v). No entanto, os métodos químicos isolados não mostraram serem eficientes na lise celular da levedura *S. salmonicolor*, sendo que a máxima recuperação de carotenoides totais foi 155,30 µg/L (5 % de extratibilidade) ao empregar tratamento de ruptura celular com bicarbonato de sódio.

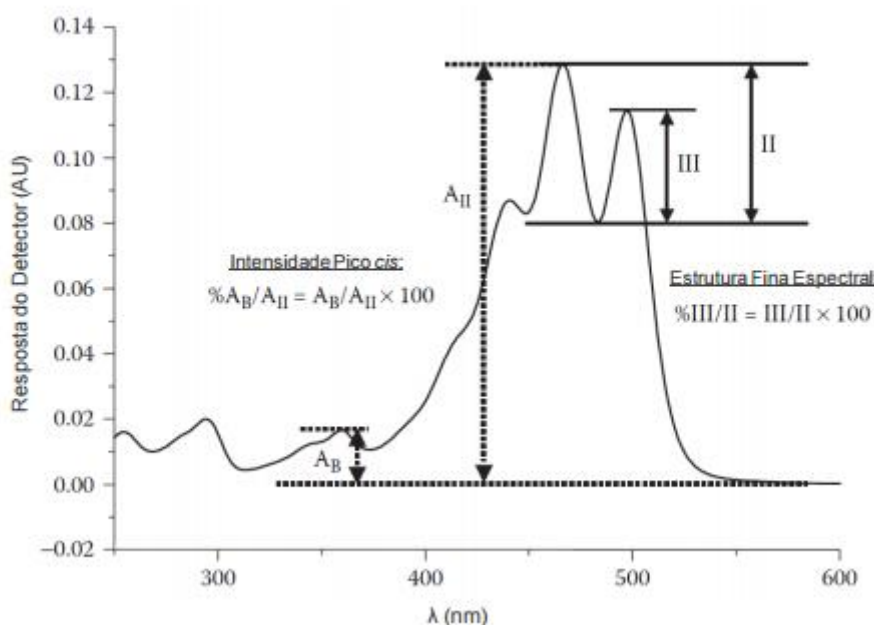
2. 8 Determinação dos Carotenoides

A quantificação de carotenoides pode ser difícil devido à instabilidade na presença de luz, oxigênio e calor dos carotenoides. Os carotenoides de estrutura conhecida podem ser conclusivamente identificados mediante, no mínimo, as seguintes informações: análises cromatográficas, espectro de absorção UV-Visível (UV-Vis) e espectro de massas (MS). Algumas derivatizações químicas também podem ser usadas para confirmar a presença e

número de grupos funcionais em xantofilas, além da comparação desses parâmetros com padrões autênticos. A espectrometria de massas e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear são técnicas indispensáveis para a elucidação da estrutura de um carotenoide desconhecido (LIAAEN-JENSEN, 1995; DELGADO-VARGAS & PAREDES-LÓPEZ, 2003; MERCADANTE, 2008).

O espectro UV-Vis, que inclui características sobre o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\max}$), estrutura fina espectral (%III/II) e intensidade do pico cis (% A_B/A_{II}) (Figura 6), é sempre examinado por fornecer informações a respeito do cromóforo da molécula, além de algumas informações sobre grupos funcionais e anéis conjugados à cadeia poliênica. O espectro de massas fornece a massa molecular e o padrão característico de seus fragmentos indica a presença de alguns grupos funcionais na estrutura do carotenoide (DELGADO-VARGAS & PAREDES-LÓPEZ, 2003; MERCADANTE, 2008).

Figura 6 - Indicação do cálculo da estrutura fina e da intensidade do pico cis. Adaptado de MERCADANTE (2008).



Técnicas modernas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (HPLC-DAD-MS) proporcionam, ao mesmo tempo, informações a respeito do cromóforo e do peso molecular para cada composto individualmente. Esta técnica já foi utilizada para separar e identificar isômeros e produtos de oxidação de carotenoides (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007; FARIA et al.,

2009; ZEPKA & MERCADANTE, 2009). A identificação de carotenoides é geralmente realizada por (1) comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção dos picos desconhecidos com os padrões de referência e (2) adição de carotenoides padrão à amostra, para co-cromatografia. Para a quantificação dos carotenoides são utilizadas curvas analíticas com soluções padrão dos compostos na absorção específica máxima. A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos onde HPLC foi utilizado para identificação de carotenoides.

Tabela 3 – Trabalhos que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a identificação de carotenoides.

Amostra	Carotenoide	Eluente	Detector	Referência
<i>Vitis vinifera</i>	Luteína, β -caroteno, neoxantina	Acetato de etila e acetonitrila	HPLC-DAD/ GC-MS	YUAN & QIAN (2016)
<i>Tetraselmis sp.</i> DS3	β -caroteno e luteína	Diclorometano, metanol e acetonitrila	HPLC/ UV-VIS	TSAI et al. (2016)
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	Toruleno, β -caroteno, Torularrodina e γ -caroteno	Acetona e trifluoracético	HPLC-DAD	CARDOSO et al. (2016)
Molho de tomate	Licopeno	MTBE e metanol	HPLC-UV-MS/MS	VALLVERDU-QUERALT et al. (2015)
<i>Mamey – Fruta tropical</i>	(3S,5'R,6'S)- β -Criptoxantina 5',6'-epoxide, (3S,5'R,6'S)- β -Cryptoxanthin 5',6'-epoxide, Criptocapsantina e dioxicapsantina	Hexano e propano	HPLC-ECD/UV-VIS	TURCSI et al. (2015)
Batata doce	β -Caroteno 5,6-epoxide	Acetato de amônia, MTBE e metanol	HPLC-DAD/ SPME-GC-MS	ACHIR et al. (2014)
<i>Dunaliella</i>	Luteína, β -caroteno, violaxantina e neoxantina.		HPLC-UV-APCI-MS	DELI et al. (2014)
<i>Nostoc</i>	Echinenone			
<i>Euglena</i>	Diatoxantina, luteína e β -caroteno.			
Salmão Atlântico	Astaxantina	Acetona e hexano	HPLC-DAD	CHIMSUNG et al. (2014)

Continuação da Tabela 3				
Amostra	Carotenoide	Eluente	Detector	Referência
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina	Metanol e acetonitrila	HPLC - UV	JEONG & KIM (2014)
<i>Phormidium autumnale</i>	all- <i>trans</i> - β -caroteno, all- <i>trans</i> -zeaxantina, all- <i>trans</i> -luteína, all- <i>trans</i> -echinenone e <i>cis</i> -echinenone	Metanol e MTBE	HPLC-PDA-MS/MS	RODRIGUES et al. (2014)
Solanum sessiliflorum – Fruta da Amazônia	(all-E)- β -caroteno e (all-E)-luteína	Metanol e MTBE	HPLC-DAD-MS	RODRIGUES et al. (2013)
<i>Sporodiobolus salmonicolor</i>	β -caroteno	THF e metanol	CLAE	VALDUGA et al. (2009)

2. 9 Considerações Finais

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, pode-se observar que há um grande interesse na bioprodução de carotenoides, devido ao seu amplo potencial de aplicação nas indústrias de alimentos (corantes e em suplementos nutricionais), farmacêutica, cosmética e de alimentação animal. Além disso, a procura por compostos com conotação natural, tem resultado num aumento de pesquisas referentes à bioprodução de carotenoides.

Os processos em batelada alimentada e semicontínuo surgem para contribuir com a bioprodução de corantes, considerando a necessidade de redução de custos de produção e aumento no rendimento, buscando a equiparação da bioprodução com a síntese química. Neste sentido, raros são os relatos destes sistemas para a produção de carotenoides, desta forma, tornando-se uma estratégia de inovação para o presente estudo.

Verificou-se a possibilidade do uso de resíduos e subprodutos como fonte de carbono e nitrogênio na produção de carotenoides, buscando a valorização de um subproduto e redução de custos de produção do pigmento. Neste contexto, o Brasil é um grande produtor de biodiesel, milho e arroz, gerando respectivamente glicerol, água de maceração de milho e água de parboilização de arroz.

Assim, justifica-se a importância da pesquisa sobre a bioprodução de carotenoides em biorreator, em batelada alimentada e em processo semicontínuo, utilizando subprodutos como matérias-primas, a fim de aproveitar melhor os nutrientes do meio de bioprodução, bem como maximizar o rendimento dos compostos e reduzir custos de produção, esboçando-se estratégias para um possível aumento de escala e *downstream* de processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, relacionados à produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em processo em batelada alimentada e semicontínuo.

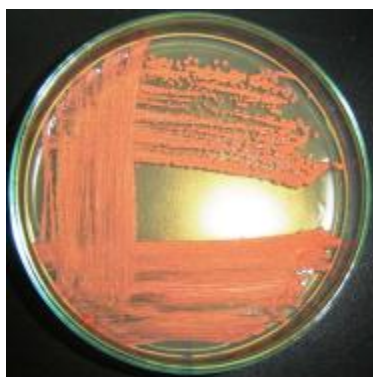
3.1 Microrganismo e Meios de Cultura

3.1.1 Microrganismo

A produção de carotenoides, em frascos agitados (ensaios preliminares) e sequencialmente em biorreator (modo batelada alimentada e semicontínuo), foram realizadas com a levedura *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Holanda).

A cultura liofilizada de *S. salmonicolor* CBS 2636 foi hidratada em meio YM (*Yeast Malt Extract*) em estufa (Tecnal, modelo TE 393/2), a 25°C por 72 h. Posteriormente, a cultura foi transferida para placas de Petri contendo meio YMA (*Yeast Malt Extract Agar*), e incubada por 48 h, a 25°C (Figura 7). Após o crescimento, as placas foram mantidas a 4°C. A cada dois meses foram realizados repiques do microrganismo.

Figura 7 – Características macroscópicas da linhagem de *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) cultivada em meio de cultura YMA, com 48 h de crescimento.



3.1.2 Manutenção do microrganismos e preparo do inóculo

Para a manutenção da cultura utilizou-se meio YMA e para o preparo do inóculo, o meio YM. O meio YMA é composto de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de

malte, 5 g/L de peptona de carne, 10 g/L de glicose (Nuclear) e 20 g/L de agar (Vetec). O meio YM foi constituído de 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glicose. Após o preparo, ambos os meios foram esterilizados a 121 °C, por 15 min, em autoclave (Phoenix, modelo AV75).

Para o preparo do inóculo, uma alçada de células da cultura estoque foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM e incubado em agitador orbital (Nova Ética, modelo 430 RDB) a 25 °C, 180 rpm, por aproximadamente 48 h (ou até atingir uma densidade óptica -DO de aproximadamente 0,7), sem iluminação.

3.1.3 Meio de bioprodução

O meio de bioprodução foi constituído por misturas de subprodutos agroindustriais: água de maceração de milho (AMM), cedida pela Corn Products – Mogi Guaçu/SP, água de parboilização do arroz (APA), cedida pela Indústria Nelson Wendt de Pelotas/RS, glicerol (glicerina bidestilada 85 % PA, Merck – Alemanha), glicerol bruto (subproduto da produção de biodiesel) produzido no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI Erechim e por matérias-primas comerciais: extrato de malte (Himedia), peptona (Himedia) e Prodex Lac® Sd (hidrolisado de levedura), cedida pela Empresa Bio Springer, de Valinhos/SP.

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

No estudo de pré-tratamento realizado na água de maceração de milho empregou-se tratamento com ácido, conforme método descrito por VALDUGA et al. (2007). Inicialmente, uma concentração de 100 g/L de água de maceração de milho foi ajustada a pH 3,0 utilizando ácido fosfórico (Nuclear) 1 mol/L. A mistura permaneceu em repouso por 24 h a 24 °C; sendo então centrifugada (Nova Ética, modelo MT-815) a 2650 xg por 15 min e ajustou-se o pH para 5,5 com solução de NaOH (Vetec) 2 mol/L.

A água de parboilização de arroz e o glicerol bruto não foram pré-tratados, pois apresentavam-se sem coloração interferente e aparentemente sem resíduos adicionais

(substâncias em suspensão) que pudessem prejudicar a produção e/ou extração dos carotenoides.

3.1.3.1 Caracterização das matérias-primas

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

- a) O teor de Carbono Orgânico Total (TOC) e de Nitrogênio Total (NT) foram determinados pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680°C para COT e 720°C e detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH.
- b) Densidade ótica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro (Agilent 8553) a 448 nm.

3.2. Bioprodução de Carotenoides

3.2.1 Otimização do meio de bioprodução em frascos agitados

Para estudar os efeitos dos diferentes resíduos agroindustriais na bioprodução de carotenoides, um planejamento do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) foi realizado em frascos agitados. Foram transferidos 10 mL do inoculo para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de meio de cultura com composição definida conforme os níveis do planejamento (Tabela 4) e fixando-se as variáveis temperatura (25 °C), agitação (180 rpm), tempo de bioprodução (120 h) e pH inicial de 4,0 (COLET et al., 2015).

Tabela 4 – Variáveis e níveis estudados no planejamento do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) para a otimização do meio de bioprodução de carotenoides em cultivos em frascos agitados.

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>		
		<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
Água de Maceração de Milho (g/L) – AMM	X ₁	40	60	80
Água de parboilização de Arroz (g/L) - - APA	X ₂	20	40	60
Glicerol Bruto (g/L)	X ₃	40	60	80
Hidrolisado de levedura - Prodex® (g/L)	X ₄	0	2,5	5

*Variáveis Independentes Fixas: 25°C, 180 rpm, 120 h, pH_{inicial} 4,0.

Baseado nos resultados obtidos no planejamento do tipo Plackett Burman (Tabela 4), outros ensaios foram realizados empregando um planejamento fatorial completo 2² para a

otimização do meio de bioprodução de carotenoides (Tabela 5). A variável dependente (resposta) foi o teor de carotenoides totais.

Tabela 5 – Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 para a otimização do meio de bioprodução de carotenoides utilizando frascos agitados.

<i>Variáveis Independentes*</i>	<i>Códigos</i>	<i>Níveis</i>				
		<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>	<i>+1,41</i>
Água de Maceração de Milho (g/L) – AMM	X ₁	65,9	70	80	90	94,1
Glicerol Bruto (g/L)	X ₃	65,9	70	80	90	94,1

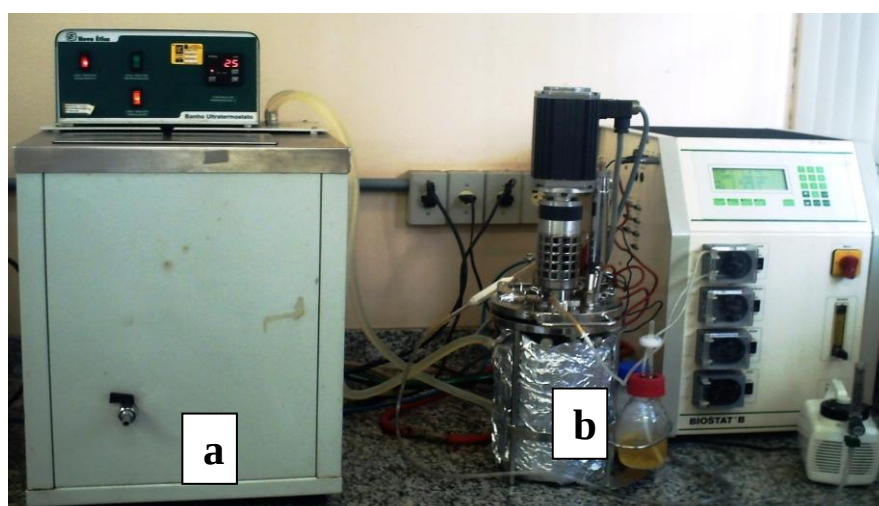
*Variáveis Independentes Fixas: água parboilização de arroz (20 g/L), 25°C, 180 rpm, 120 h, pH_{inicial} 4,0.

3.2.2 Produção em biorreator em sistema batelada alimentada

3.2.2.1 Batelada alimentada com diferentes volumes de alimentação

Os ensaios da bioprodução de carotenoides em batelada alimentada foram realizados em Biorreator Biostat B (Braun Biotech International) de 2 L, por 120 h, sem iluminação, conforme mostra a Figura 8. Os parâmetros monitorados foram temperatura, agitação e aeração. O antiespumante FG 10 Dow Corning foi esterilizado em frasco em ultravioleta durante 40 min.

Figura 8 – Aspecto do Biorreator utilizado na bioprodução de carotenoides (a – Banho termostático; b – Frasco de vidro e sistema de controle) (COLET, 2015).

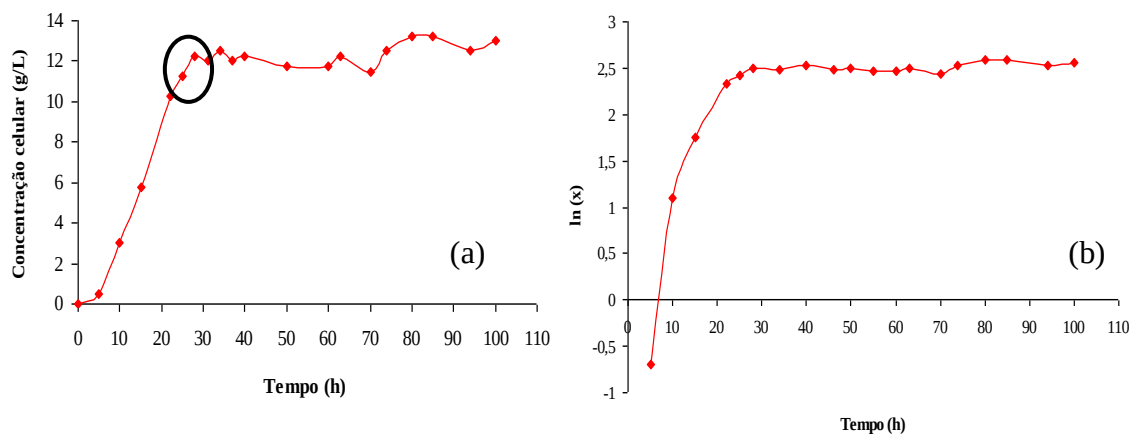


Com os resultados dos planejamentos experimentais em frascos agitados, definiu-se como meio de bioprodução em batelada alimentada a composição de 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz. Um volume inicial de 500 mL do meio de cultura foi autoclavado (Phoenix, modelo AV75) no biorreator, e separadamente, em erlenmeyer o meio a ser alimentado periodicamente (esterilizado a 121 °C, 15 min).

Após o resfriamento do sistema, foram adicionados 50 mL do pré-inoculo ao biorreator e inicializando-se a produção nas condições: pH inicial 4,0, tempo de fermentação de 96 h, temperatura de 25 °C e agitação de 180 rpm (TATSCH, 2008).

Optou-se por iniciar o sistema de batelada alimentada em 24 h de bioprodução, considerando os resultados obtidos por TATSCH (2008), que observou que em torno de 24 h de crescimento a biomassa mantinha-se praticamente constante (Figura 9), sendo este ponto o final da fase exponencial de crescimento celular.

Figura 9 - Curva de crescimento celular (a) e curva linearizada (b) da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636), durante 100 h de produção (TATSCH, 2008).



A alimentação ocorreu em 24 h de cultivo, pois este microrganismo cresce em condições de “stress”, seguindo até 84 h (Ensaio 1, 2 e 3, Tabela 6), sendo que o volume da alimentação do meio otimizado foi adicionado a cada 12 h, devido ao consumo de matéria-prima. A variável dependente e/ou resposta avaliada foi o teor de carotenoides totais.

Tabela 6 – Volume de alimentação de meio no biorreator a cada 12 h de bioprodução.

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

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

3.2.2.2 Batelada alimentada com volumes iguais de alimentação

A fim de observar se os volumes de alimentação diferentes dos ensaios anteriores estavam interferindo na resposta final da bioprodução de carotenoides totais, foi realizada a alimentação de 112,5 mL para os três ensaios, porém com concentração de nutrientes diferentes, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 – Composição do meio a ser alimentado no biorreator a cada 12 h de bioprodução.

Ensaio	Água de maceração de miho (g/L)	Água de parboilização de arroz (g/L)	Glicerol Bruto (g/L)
1	9	2,25	9
2	6	1,5	6
3	12	3	12

* Variáveis fixas: aeração: 1,5 vvm, rotação: 180 rpm, temperatura: 25 °C, pH_{inicial} 4,0, 112,5 mL a cada 12 h.

3.2.3 Produção em biorreator em sistema semicontínuo

3.2.3.1 Sistemas de corte do meio do caldo fermentado

Com o intuito de verificar se a porcentagem de volume retirado em cada corte no processo semicontínuo influenciaria na bioprodução de carotenoides realizou-se cortes de 25, 50 e 75 % do volume do caldo fermentado. Os ensaios foram realizados em Biorreator (Biostat B, Braun Biotech International) com volume total de 2 L. Em função dos resultados obtidos do planejamento de experimento (frascos agitados), trabalhou-se com o meio composto por 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz. Um volume inicial de 1 L do meio de cultura foi autoclavado (Phoenix, modelo AV75) a 121°C por 15 min, juntamente com o biorreator.

Os cultivos foram conduzidos em batelada simples por 96 h e depois tiveram 25, 50 e 75 % do volume de trabalho retirados do biorreator, ou seja, 250, 500 e 750 mL de caldo fermentado, respectivamente, e submetidos, posteriormente ao rompimento celular e extração dos carotenoides. Em seguida, o mesmo volume de meio novo foi adicionado ao biorreator, respectivamente a cada ensaio. Os ensaios foram conduzidos por 192 h realizando apenas um corte em 96 h de bioprodução, totalizando assim 2 ciclos de bioprodução.

3.2.3.2 Comparação da bioprodução com meio comercial e com meio à base de resíduos agroindustriais

Para a bioprodução em meio comercial empregou-se o meio de bioprodução definido por COLET et al. (2015) contendo 80 g/L de glicerina (glicerina bidestilada 85% PA, Merck – Alemanha), 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona. Para o meio composto por resíduos agroindustriais utilizou-se 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de água de maceração de milho e 20 g/L de água de parboilização de arroz. Um volume inicial de 1 L do meio de bioprodução foi autoclavado no biorreator. Os cultivos foram conduzidos por 96 h e após coletou-se 50 % do volume de trabalho do biorreator. Em seguida, a mesma quantidade do volume de meio novo esterilizado foi adicionado ao biorreator. Os ensaios foram conduzidos por 480 h, realizando quatro cortes após cada 96 h de bioprodução, totalizando 5 ciclos.

3.2.4 Estratégia de controle do pH para a produção de carotenoides

Com o objetivo de investigar a influência do controle ou não do pH do meio de bioprodução dos carotenoides em sistemas batelada alimentada e semicontínuo, ensaios foram realizados utilizando como referência a melhor condição de produção para os sistemas batelada alimentada (80 g/L de glicerol, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona) e semicontínuo (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA). Os ensaios ocorreram em biorreator, manteve-se fixa a agitação de 180 rpm, a temperatura de 25 °C, a aeração de 1,5 vvm e o pH 4,0, que foi controlado com a adição de solução de ácido clorídrico 2 mol/L e/ou hidróxido de sódio 2 mol/L.

A Tabela 8 apresenta a descrição dos ensaios realizados para o estudo do controle do pH em 4,0 e a evolução do cultivo com e sem controle de pH nos processos de batelada alimentada (BA) como no processo semicontínuo (SC).

Tabela 8 – Descrição dos ensaios realizados com e sem controle do pH.

Ensaio	pH inicial	pH controlado
BA	4	Não
BA4	4	Sim
SC	4	Não
SC4	4	Sim

3.3 Recuperação dos Carotenoides Totais

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

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

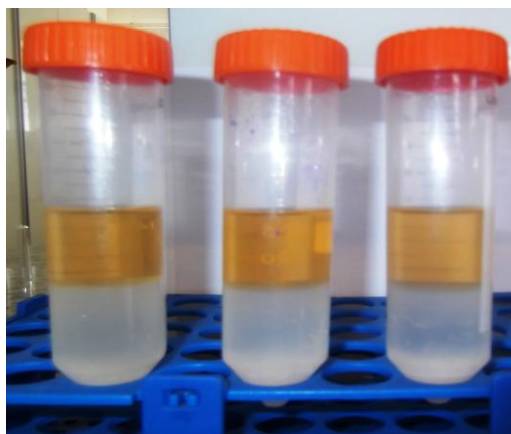
Figura 10 - Aspecto das células maceradas com nitrogênio líquido.

Ao “pellet” macerado foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec) na relação 2:1, DMSO:célula (v/v). Em seguida, o material foi vertido em tubos de centrífuga, estes foram aquecidos em banho-maria, a 55°C, durante 30 min, homogeneizando-os periodicamente em vortex (Phoenix AP-56). Posteriormente, adicionou-se 10 mL da mistura acetona (Vetec) metanol (Quimex) na razão 7:3 (v/v) e os tubos foram centrifugados novamente a 5 °C,

4478 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e foram realizadas sucessivas extrações com a mistura acetona:metanol, até que as células não apresentassem coloração.

Nas fases solventes (sobrenadante), obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20 % (p/v) e 10 mL de éter de petróleo (Dinâmica). Após agitação e separação de fases foi realizada uma filtração com adição de sulfato de sódio (Na_2SO_4 , Merck), e retirada a fase sobrenadante com auxílio de pipeta, visando assim a remoção de possíveis interferentes na quantificação dos carotenoides totais (Figura 11).

Figura 11 – Aspecto visual das amostras após filtração para retirada de interferentes.



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

3.4 Parâmetros Cinéticos e Estequiométricos da Bioprodução

Com o objetivo de obter parâmetros estequiométricos e verificar a cinética de consumo de substrato (carbono, glicerol e nitrogênio), produção celular e produção de carotenoides realizaram-se coletas de 50 mL a cada 12 h e de 10 mL a cada 24 h das amostras do caldo de bioprodução para os processos em batelada alimentada e semicontínuo respectivamente, possibilitando a construção das curvas cinéticas para cada condição de cultivo e pela triplicata das análises determinar os desvios.

3.4.1 Velocidades instantâneas e específicas globais

A partir dos perfis de concentração celular global, formação de produto global e consumo de substrato global (glicerol, nitrogênio e carbono orgânico) em relação ao tempo, é

possível determinar, por um balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato (r_s , carbono, nitrogênio e glicerol) descritas nas equações 1 a 3 (g/L.h), conforme descritas por BAILEY & OLLIS (1986).

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

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

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

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular naquele instante, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s), que serão expressas pelas equações 4 a 6, equação 6, foi calculado para os substratos carbono, nitrogênio e glicerol (h^{-1}), descritas por BAILEY & OLLIS (1986):

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

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

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

As velocidades constantes (fase exponencial), foram determinadas pelo coeficiente angular da melhor reta ajustada nas curvas que representam as cinéticas de crescimento, consumo de glicerol e produção de carotenoides.

3.4.2 Fatores de conversão globais

3.4.2.1 Produto

O fator de conversão de substrato em carotenoides, $Y_{P/S}$ (μg de carotenoides/g de substrato), sendo calculado para carbono, nitrogênio e glicerol, expresso pela equação 7:

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

3.4.2.2 Biomassa celular

O fator de conversão de substrato global em células, $Y_{X/G}$ (g de células/g de substrato), sendo calculado para carbono, nitrogênio e glicerol, expresso pela equação 8:

$$Y_{X/G} = \frac{r_x}{r_g} = \frac{dX}{dG} \quad (8)$$

A relação entre a produção de carotenoides e a produção de células global, $Y_{P/X}$ (µg de carotenoides/g de células), foi expressa pela equação 9:

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

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

3.4.3 Produtividade global

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

3.5 Determinações Analíticas

3.5.1 Carotenoides totais

A absorbância dos pigmentos solubilizados foi medida em espectrofotômetro (Agilent 8553). A concentração total de carotenoides foi estimada pelo valor medido da absorbância a 448 nm, conforme equação 10, descrita por DAVIES (1976). O coeficiente de absorbância utilizado foi referente ao β -caroteno para o metanol: $E_{1cm}^{1\%} = 2550$ (SILVA, 2004). Os resultados da concentração de carotenoides foram expressos em termos de carotenoides totais (µg/L).

$$x = \frac{Ey}{E_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (10)$$

Sendo: x = carotenoides (µg/L); y = volume da solução (mL); E = absorbância; $E_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de extinção específico: 2550.

3.5.2 Carotenoides específicos

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

3.5.3 Concentração de células

Após extração dos carotenoides, as células foram lavadas com água destilada, centrifugadas (4478 g, 5°C por 10 min) e a massa celular (g/L) foi quantificada por gravimetria em estufa (Nevoni NV- 13) a 105°C até massa constante, conforme equação 11.

$$\text{Biomassa (g/L)} = \frac{(P_2 - P_1) \times 1000}{P} \quad (11)$$

Sendo: P_2 : massa das células mais massa da placa; P_1 : massa da placa vazia; P : massa de células “in natura”.

3.5.4 pH

O pH dos meios de cultivo foram ajustados em pH 4,0 com solução de HCl 2 mol/L e acompanhado a evolução durante a bioprodução, utilizando pHmetro digital (Digimed DMPH- 2).

3.5.5 Concentração de glicerol residual

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

Inicialmente, preparou-se uma solução de periodato na concentração de 60 g/L. Adicionou-se 50 mL de água destilada e 10 mL de amostra em Erlenmeyer (300 mL). Posteriormente, adicionaram-se 5 gotas de azul bromotimol, 1 gota de H_2SO_4 0,4 mol/L e NaOH 0,05 mol/L até mudança de coloração (azul), e 100 mL de periodato. A amostra foi mantida ao abrigo da luz (papel alumínio) por 30 min. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de etilenoglicol em cada amostra e foram mantidos ao abrigo da luz por 20 min. Após esta etapa, foram adicionados 300 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram tituladas com

NaOH 0,125 mol/L e o pH controlado (8,1 para as amostras e 6,5 para o branco). A quantidade de glicerol foi expressa em g/L, conforme equação 12.

$$\text{Glicerol (g/L)} = \frac{9,209 \times M (T_1 - T_2) \times 10}{W} \quad (12)$$

Sendo: M = molaridade da solução de hidróxido de sódio; T₁ = volume (mL) gasto de NaOH na amostra; T₂ = volume (mL) gasto de NaOH no branco; W = massa (g) ou volume (mL) da amostra.

3.5.6 Carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT)

Os teores de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) foram determinados pelo método da oxidação por combustão catalítica a 680 °C para COT e 720 °C para NT com detecção por infravermelho, em equipamento Shimadzu modelo TOC-VCSH. As amostras foram diluídas 100 vezes em água ultrapura (Sistema Mili-Q[®] Millipore), antes da leitura no equipamento (SHIMADZU, On-Line TOC-V_{CSH}).

3.5.7 Determinação dos carotenoides

3.5.7.1 Materiais

Para o desenvolvimento do trabalho proposto foi utilizado um padrão de β-caroteno (95 % all-trans), adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). Os solventes metanol (MeOH) e éter metil terc-butílico (MTBE) para uso em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram adquiridos da Merck (Alemanha). Hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) foram adquiridos da Labsynth (Brasil). Os demais reagentes, todos de pureza analítica, foram também obtidos da Labsynth (Brasil). A água destilada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, EUA). A filtração dos extratos e dos solventes para análise por HPLC foi realizada em membranas de polietileno (Millipore, EUA), com porosidade 0,22 e 0,45 μm, respectivamente.

3.5.7.2 Preparo das amostras

Os carotenoides foram extraídos das amostras com a melhor condição de bioprodução nos processos em batelada, batelada alimentada e semicontínuo: com meio comercial (80 g/L de glicerol, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona) e com resíduo agroindustrial (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA), para todos os sistemas, o

corante extraído foi seco com nitrogênio comprimido. Foi realizada o preparo das amostras para a determinação dos carotenoides segundo RODRIGUES et al. (2013) onde as amostras foram transferidas para uma mistura de éter de petróleo / éter dietílico [1:1 (v / v)], e saponificadas com 10% de KOH em metanol (m/v) durante a noite (16 horas) em mesa agitadora à temperatura ambiente.

O extrato foi lavado com água destilada até se obter pH neutro nas amostras, depois adicionou-se sulfato de sódio anidro para remoção da umidade, e o solvente foi evaporado num evaporador rotativo ($T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$). O extrato seco foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob uma atmosfera de nitrogênio (99,9% de pureza) no escuro até ser realizada a análise.

O extrato de carotenoide foi dissolvido em éter de petróleo (solução estoque), e a concentração total de carotenoides foi determinada espectrofotometricamente utilizando o coeficiente específico de absorção do β -caroteno ($E_{1cm}^{1\%} = 2592$).

Para determinar a composição dos carotenoides, um alíquota da solução-estoque de cada amostra, foi evaporada sob um fluxo de N_2 , ressuspendeu-se novamente em uma mistura de Metanol / MTBE [50:50 (v/v)], depois foi submetida a ultrassom por 30 segundos, filtrada e analisada por HPLC-DAD-MS. Para evitar a degradação dos carotenoide durante as análises, a manipulação das amostras foram realizadas com pouca luz em um ambiente com temperatura controlada ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$).

3.5.7.3 Preparação da curva analítica

Para o preparo da curva analítica do β -caroteno foram pesadas 5 mg de β -caroteno (Sigma Aldrich, 98%) e diluído em 10 mL de diclorometano. Uma alíquota de 50 μL foi transferida para um balão de 10 mL, seca com N_2 e ressuspensa em éter de petróleo. Foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro para o cálculo da concentração da solução-estoque. O éter de petróleo foi considerado o branco e a leitura foi realizada a 450 nm. O cálculo da concentração da solução estoque esta descrito na Equação 13.

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs} * 10^4}{\text{Coeficiente de Absortividade}} * Fd \quad (13)$$

Sendo: Abs: Absorbância máxima

Coeficiente de Absortividade: 2592 em éter de petróleo

O fator de diluição (Fd), foi calculado de acordo com a Equação 14.

$$Fd = \frac{\text{Volume final da alíquota} * 10^3}{\text{Volume de solução estoque}} \quad (14)$$

A partir da solução estoque, foram realizadas as diluições para o preparo da curva analítica. Foi adicionada a alíquota da solução estoque, seca com N₂, e ressuspensa em 4 mL de uma solução de metanol:MTBE (7:3). A solução foi filtrada em membrana de 0.45 µm, colocada em um vial de 1.5 mL e injetada no HPLC-DAD. A curva analítica foi feita no Excel a partir das áreas dos picos nas diferentes concentrações da curva injetada.

3.5.7.4 Análise das soluções padrão e das amostras por HPLC-DAD e HPLC-DAD/MS-APCI

A análise das soluções padrão e das amostras foram baseadas na combinação dos seguintes parâmetros: ordem de eluição cromatográfica em coluna de fase reversa C30, características do espectro UV-Visível (comprimento de onda máximo (λ_{max}), espectro de massas (molécula protonada e fragmentos) e comparação com dados já reportados pela literatura.

As análises foram realizadas utilizando HPLC Shimadzu (Japão), equipado com sistema quaternário de bombeamento (modelo LC-20AD), desgaseificador on-line e sistema de injeção Rheodyne de 20 µL (Rheodyne LCC, EUA). O equipamento estava acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, modelo SPD-M20A) e a um espectrômetro de massas com analisador ion-trap (MS/MS) Bruker Daltonics (modelo Esquire 4000, Alemanha) com interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI) operando no modo positivo.

As amostras foram solubilizadas em MeOH:MTBE (1:1) e filtradas em membrana de polietileno de 0,22 µm (Millipore, EUA), imediatamente antes da injeção. Considerando colunas de fase reversa, a C30 é muito eficiente em separar isômeros geométricos de carotenoides assimétricos, cuja isomerização pode estar localizada na mesma posição em ambos os lados da molécula (Mercadante, 2008b). Por esta razão, a separação dos compostos foi realizada em coluna C₃₀ YMCTM (5 µm, 25 cm x 4,6 mm) (Waters, EUA) com temperatura do forno ajustada para 29 °C e eluída com fase móvel de metanol (fase A) e MTBE (fase B), à vazão de 0,9 mL.min⁻¹ de acordo com o seguinte gradiente: (0-67 min) 0 min, 5% B; 30 min, 30% B; 50 min, 50% B; 60 min, 50% B; 62 min, 5% B; 67 min, 5% B. O

espectro UV-Visível foi obtido entre 250 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm.

A caracterização das amostras por HPLC-DAD-MS-APCI foi baseada na comparação dos espectros de absorção e do espectro de massas com os tempos de retenção do padrão de β -caroteno, bem como dados da literatura.

3.5.8 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 8.0, com nível de confiança de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente item tem por objetivos apresentar e discutir os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, o qual primeiramente apresenta a maximização da bioprodução com meio a base de resíduos agroindustriais, seguido do estudo cinético e estequiométrico da bioprodução em batelada alimentada e semicontínuo e a identificação dos carotenoides.

4.1. Caracterização de Matérias-Primas Agroindustriais

A Tabela 9 apresenta os resultados da densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio das matérias-primas agroindustriais utilizados como componentes do meio de bioprodução de carotenoides.

Tabela 9 - Resultados de densidade ótica (D.O), carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) da água de maceração de milho com e sem pré-tratamento ácido, água de parboilização de arroz e do glicerol bruto.

Tratamento	D.O	COT (mg/L)	NT (mg/L)
AMMs	0,238 ^a ± 0,001	21648,2 ^b ± 115	4371,3 ^a ± 42,8
AMMt	0,198 ^b ± 0,001	18979,8 ^c ± 483	3643,9 ^b ± 93
APA	0,125 ^c ± 0,002	743,2 ^d ± 68	124,8 ^d ± 0,9
Glicerol Bruto	0,009 ^d ± 0,001	434669,0 ^a ± 500	261,4 ^c ± 22

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

Verifica-se que a água de maceração de milho pré-tratada quimicamente apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à densidade ótica (DO), ao teor de carbono orgânico total (COT) e ao nitrogênio total (NT), quando comparada ao substrato sem tratamento. Em relação à densidade ótica a redução foi de 17% para a água de maceração de milho. Deste modo, obteve-se, nestas condições, uma redução de densidade ótica efetiva para viabilização da etapa de recuperação e extração dos carotenoides do meio bruto fermentado.

O pré-tratamento ácido da água de maceração de milho acarretou perdas de 12 % na concentração de carbono orgânico total (COT) e 7 % para o nitrogênio. Estes resultados sugerem que o tratamento com ácido fosfórico apresentou efeito complexante de substâncias

pigmentadas e de impurezas, contribuindo assim com a clarificação do substrato agroindustrial, com diminuição efetiva da densidade ótica. BHOSALE (2004) justifica este fato, mostrando que isso ocorre devido à presença de metais pesados, não metais no meio e outros interferentes (íons, sais e etc.). Alguns destes componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção e também dificultar posterior recuperação de bioprodutos.

Levando em consideração os resultados do pré-tratamento dos resíduos, optou-se trabalhar com meio a base de água de maceração de milho tratada, e água de parboilização de arroz e glicerol sem pré-tratamento.

4.2 Bioprodução de Carotenoides com Resíduos Agroindustriais em Frascos Agitados

4.2.1 Efeitos da composição do meio na bioprodução

Com a finalidade de estudar o comportamento da levedura perante matérias-primas agroindustriais para a bioprodução de carotenoides, um planejamento de experimentos do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) foi realizado empregando diferentes matérias-primas (glicerol bruto, água de maceração de milho tratada, água de parboilização de arroz e hidrolisado de levedura – Prodex-Lac®) em frascos agitados, conforme desmostrado na Tabela 10. A máxima concentração de carotenoides totais foi de 2044µg/L (Ensaio 3) em meio composto por 80 g/L de AMM, 60 g/L de APA e 80 g/L de glicerol bruto, e o menor pH final de 4,67 do caldo fermentado. Também obtivemos a maior produção de carotenoides totais (4400 µg/L) em batelada alimentada com o menor valor de pH (4,06), utilizando peptona (15 g/L), extrato de malte (5 g/L) e glicerol (80 g/L) em 96 h de bioprodução (COLET et al. 2015).

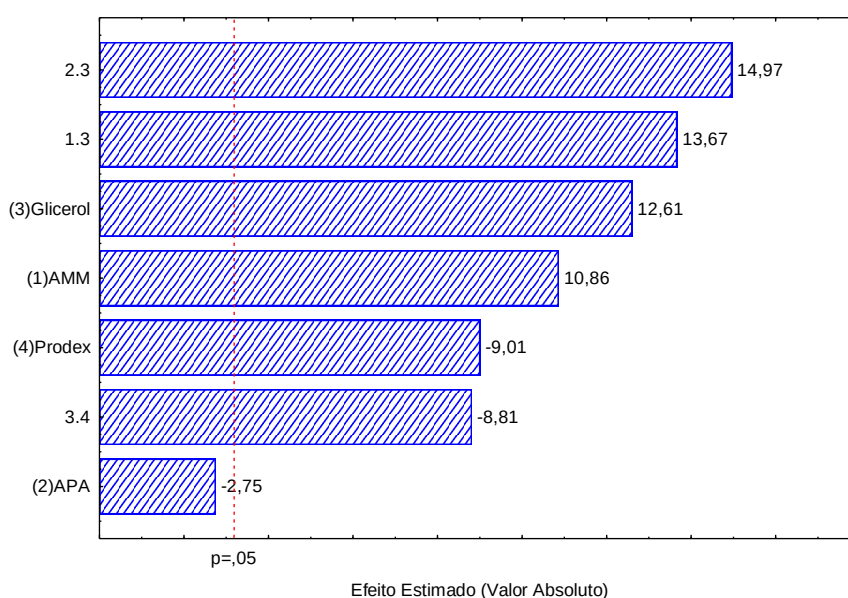
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett Burman (*Screening Design*) com valores codificados (reais) e resposta em termos de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) e pH da bioprodução com resíduos agroindustriais em frascos agitados.

Ensaio	Variáveis Independentes*				Respostas	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Carotenoides Totais ($\mu\text{g/L}$)	pH final
1	1 (80)	-1 (20)	-1 (40)	1 (5)	1057	5,67
2	1 (80)	1 (60)	-1 (40)	-1 (0)	525	4,81
3	1 (80)	1 (60)	1 (80)	-1 (0)	2044	4,67
4	-1 (40)	1 (60)	1 (80)	1 (5)	759	5,12
5	1 (80)	-1 (20)	1 (80)	1 (5)	1132	4,99
6	-1 (40)	1 (60)	-1 (40)	1 (5)	604	6,01
7	-1 (40)	-1 (20)	1 (80)	-1 (0)	929	5,14
8	-1 (40)	-1 (20)	-1 (40)	-1 (0)	1148	5,06
9	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	1078	5,34
10	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	1082	5,3
11	0 (60)	0 (40)	0 (60)	0 (2,5)	1062	5,35

*X₁ = AMM (g/L), X₂ = APA (g/L), X₃ = Glicerol (g/L), X₄ = Prodex; Variáveis independentes fixas: 180 rpm, 25 °C, 96 h e pH_{inicial} 4,0.

Os resultados da Tabela 10 foram tratados estatisticamente e os efeitos estimados das variáveis sobre a bioprodução de carotenoides totais com resíduos agroindustriais, podem ser melhor visualizados pelo Gráfico de Pareto apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Gráfico de Pareto para a bioprodução de carotenoides em frascos agitados com resíduos agroindustriais em função das variáveis independentes.



Conforme a Figura 12 observa-se que a concentração de AMM e de glicerol apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0,05$). Por outro lado, a concentração do hidrolisado de levedura - Prodex® apresentou efeito significativo negativo para a bioprodução de carotenoides, isto pode ter ocorrido devido à alguma inibição gerada por componentes do Prodex na produção do corante desejado. A concentração da água de parboilização de arroz não apresentou efeito significativo, porém quando este composto foi associado com o glicerol estes apresentaram efeito significativo positivo.

Isso indica que ao aumentar-se os níveis de água de maceração de milho e de glicerol, há uma tendência de aumento na concentração de carotenoides totais. Levando em consideração os resultados obtidos, a concentração de água de parboilização de arroz foi fixada em 20 g/L e o hidrolisado de levedura - Prodex® foi excluído da bioprodução, já que seu efeito foi negativo e o nível (-1) a concentração era nula.

4.2.2 Otimização da bioprodução

Baseado nos resultados obtidos anteriormente (Tabela 10 e Figura 12), um novo planejamento foi conduzido, planejamento fatorial completo 2^2 , visando otimizar a produção de carotenoides totais empregando resíduos agroindustriais em frascos agitados. A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento e a resposta em carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$).

Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 (valores codificados e reais) e resposta em carotenoides totais bioproduzidos em frascos agitados empregando resíduos agroindustriais.

<i>Ensaio</i>	<i>*Variáveis Independentes</i>		<i>Carotenoides ($\mu\text{g/L}$)</i>
	X_1	X_3	
1	-1 (70)	-1 (70)	1814
2	1 (90)	-1 (70)	2040
3	-1 (70)	1 (90)	1906
4	1 (90)	1 (90)	1954
5	-1,41 (65,9)	0 (80)	1738
6	1,41 (94,1)	0 (80)	1870
7	0 (80)	-1,41 (65,9)	1905
8	0 (80)	1,41 (94,1)	1927
9	0 (80)	0 (80)	2278
10	0 (80)	0 (80)	2275
11	0 (80)	0 (80)	2275

* X_1 = AMM; X_3 = Glicerol. Variáveis fixas: 96 horas, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0, 20 g/L de água de parboilização de arroz.

Verifica-se que a máxima bioprodução de carotenoides foi de 2278 µg/L (Ensaio 9) com 80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol e 20 g/L de água de parboilização de arroz, no ponto central do planejamento.

Os resultados da Tabela 11 foram tratados estatisticamente, e os resultados mostraram que todas as variáveis apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$), dentro da faixa estudada (Tabela 12).

Tabela 12 – Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para a produção de carotenoides com resíduos agroindustriais em frascos agitados.

	<i>Coeficiente de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(2)</i>	<i>P</i>
Média	2275,81	0,78	2901,68	0,0000001
(1)AMM (L)*	57,68	0,48	119,93	0,000070
AMM (Q)*	-219,52	0,57	-382,46	0,000007
(2)Glicerol(L)*	4,496	0,48	9,35	0,011254
Glicerol (Q) *	-162,95	0,57	-283,89	0,000012
1L.2L*	-44,50	0,68	-65,52	0,000233

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

A Equação 15 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a concentração de carotenoides totais em função das variáveis analisadas (AMM e Glicerol), dentro da faixa estudada. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 13) e apresentou um coeficiente de correlação de 0,97 e o F calculado 6,5 vezes maior que o valor tabelado, o qual permitiu a validação do modelo e a construção das superfícies de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 13.

Tabela 13 – Análise de variância para a bioprodução de carotenoides totais do planejamento fatorial completo 2^2 .

<i>Fontes de variação</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Quadrados médios</i>	<i>F Calculado</i>
Regressão	364540,2	5	72908,0	33,2
Resíduo	10966,2	5	2193,2	
Falta de Ajuste	10962,5	3		
Erro Puro	3,7	2		
Total	375506,4	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{tab} = 5,05$

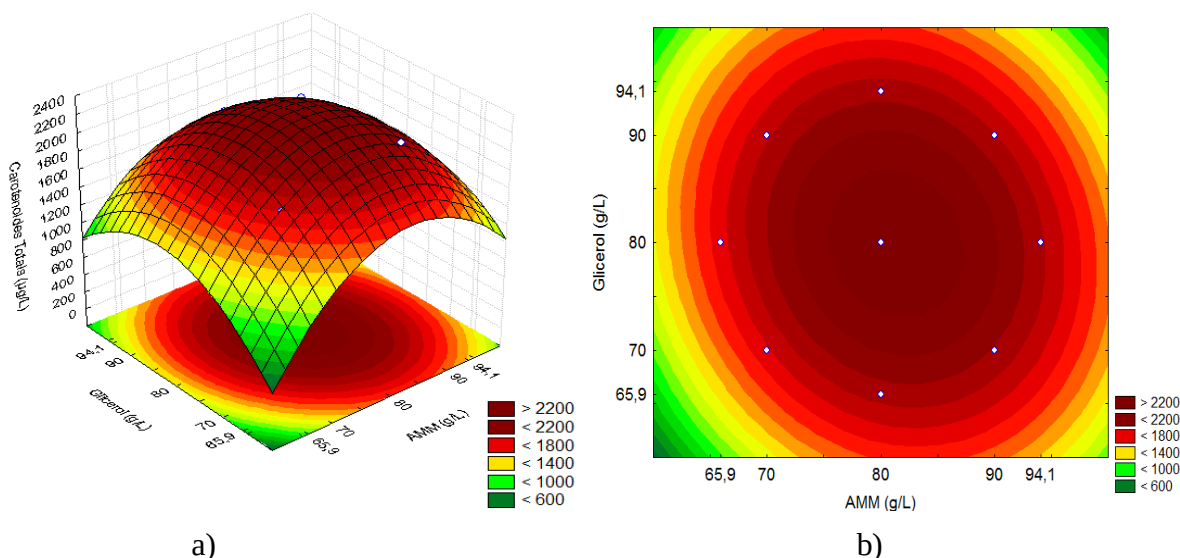
$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g/L}) = 2275,81 + 57,69 * X_1 - 219,52 * X_1^2 + 4,49 * X_3 - 162,95 * X_3^2 - 44,50 * X_1 * X_3$$

(15)

Sendo: X_1 = Água de maceração de milho (g/L); X_3 = Glicerol (g/L).

A Figura 13 permite acompanhar o comportamento das variáveis na bioprodução de carotenoides. Conforme observado nas Figuras 13 (a) e (b), a região de máxima concentração de carotenoides totais, encontram-se próximas as faixas de concentração de 80 g/L de AMM e 80 g/L de Glicerol e com 20 g/L de APA, demonstrando a otimização da bioprodução de carotenoides e um incremento de 12 % se comparado ao Ensaio 3 (Tabela 10) do planejamento do tipo *Plackett Burman*, sendo este o meio de fermentação que foi utilizado para as etapas subsequentes.

Figura 13 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) de *Sporidiobolus salmonicolor* em função da água de maceração de milho e glicerol, respectivamente.



Assim, verificou-se que o glicerol bruto é uma fonte de carbono para a bioprodução, pois apresentou uma maior concentração de carbono (Tabela 9), macronutriente fundamental para a célula microbiana, e baixa concentração de substâncias de cor, consideradas interferentes no meio de bioprodução.

CARDOSO et al. (2016) observaram também que o uso de glicerol bruto foi benéfico para a produção de carotenoides por *Sporobolomyces ruberrimus* H110 em comparação com a utilização de glicerol puro, e esta foi atribuída à presença de ácidos graxos que não reagiram durante o processo de transesterificação, obtendo um rendimento e uma produtividade maior de torularrodina, principal carotenoide produzido por *S. ruberrimus*, aumentando de 59 % para 69 %. SANTOS (2010) verificou que a elevação da concentração de glicerol de 10 g/L

para 20 g/L, proporcionou o aumento nas taxas de formação de carotenoides por *R. glutinis*, mostrando assim a eficiência do glicerol como fonte de nutrientes.

Em outros estudos, também foram realizados planejamentos sequenciais visando a otimização de carotenoides, empregando glicerol, água de maceração de milho e/ou água de parbolização de arroz como matéria-prima. VALDUGA et al. (2014) através do planejamento completo de segunda ordem otimizaram a bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, obtendo-se um teor 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.

MACHADO & BURKERT (2014) estudaram os efeitos da composição do meio de cultivo com glicerol bruto (5 a 10 g/L) e água de maceração de milho (20 a 30 g/L), como fonte de nutrientes, para a produção de carotenoides por *Sporidiobolus pararoseus*, através de um delineamento composto central rotacional 2², a 25°C, 180 rpm por 168 h. A utilização de 9 a 10 g/L de glicerol bruto e 26 a 30 g/L água de maceração de milho levou à obtenção máxima de produção em carotenoides de 640 µg/L (126,83 µg/g) em 168 h, uma concentração celular de 6,8 g/L, produtividades em carotenoides e biomassa de 4,78 g/L.h (0,55 µg/g.h) e 0,04 g/Lh, respectivamente, obtendo um ganho de aproximadamente 49 % e 56 % na produção de carotenoides volumétrica e específica, respectivamente, se comparado com o menor resultado de cada resposta, porém bioprodução menor que VALDUGA et al. (2014).

MANOWATTANA et al. (2012) compararam a produção de biopigmentos utilizando meio comercial suplementado com coproduto frente a um meio comercial, na qual a produção alcançada em carotenoides pela levedura *S. pararoseus* (TISTR5213) foi de 16,55 mg/L, 8,64 g/L de biomassa, com 34 g/L de glicerol suplementado em meio BMP. No meio comercial (YM) obtiveram uma produção de 4,87 mg/L com 6,68 g/L de biomassa, sendo as condições a 24°C, 200 rpm, por 120 h e pH inicial de 6,0.

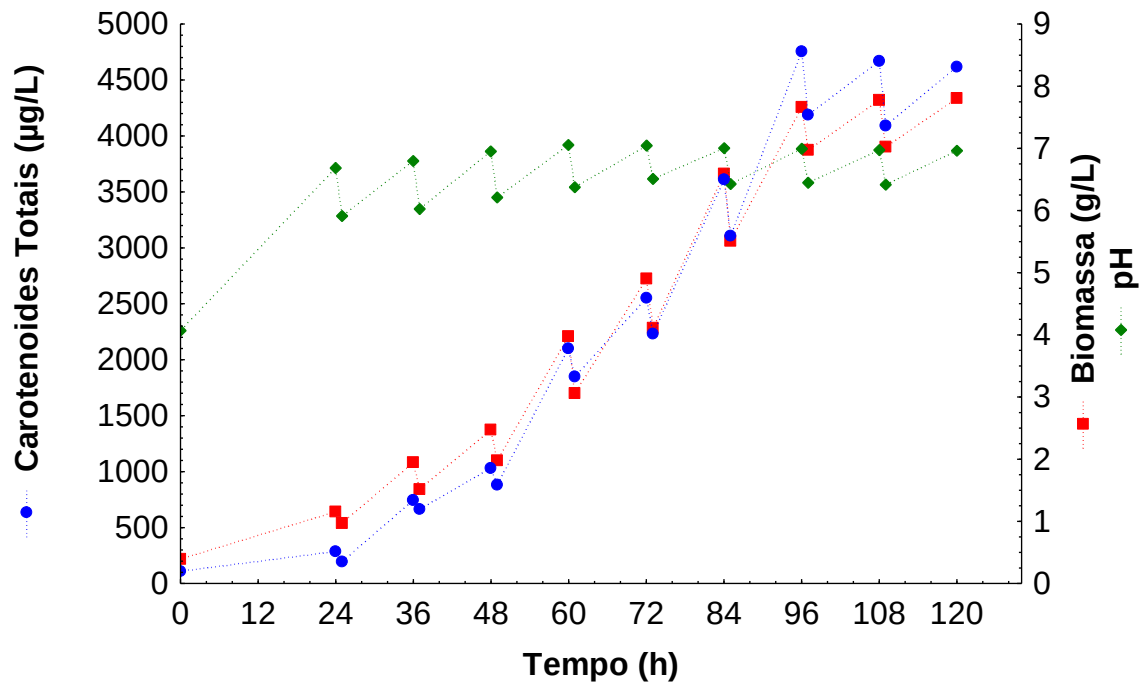
4.3 Bioprodução de Carotenoides em Biorreator Batelada Alimentada

4.3.1 Batelada alimentada com diferentes volumes de alimentação

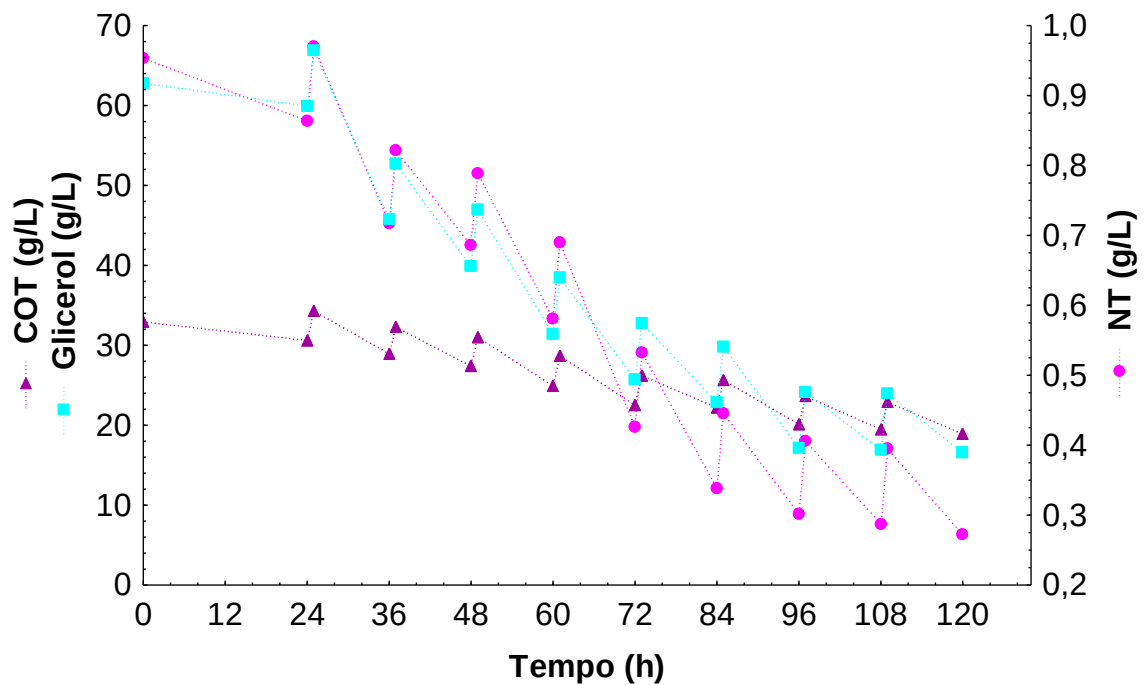
As Figuras 14 a 16 (Tabelas 26 a 28 – Apêndice), apresentam as cinéticas de crescimento celular (biomassa), da bioprodução de carotenoides, a variação do pH e consumo das matérias-primas dos ensaios realizados em batelada alimentada em biorreator com o meio

otimizado com resíduos agroindustriais (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA).

Figura 14 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 1 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 15 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 2 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 75 mL a cada 12h), respectivamente.

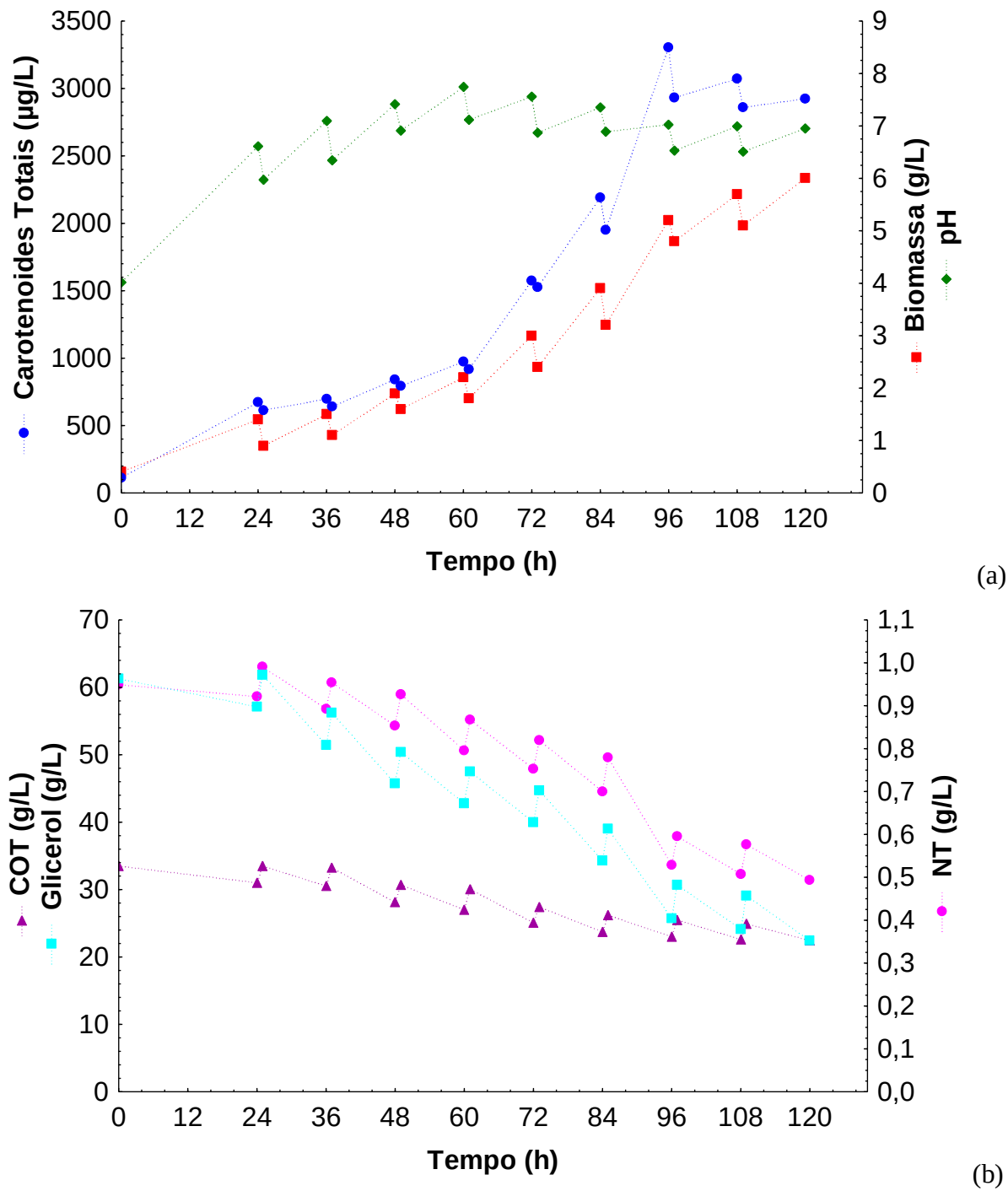
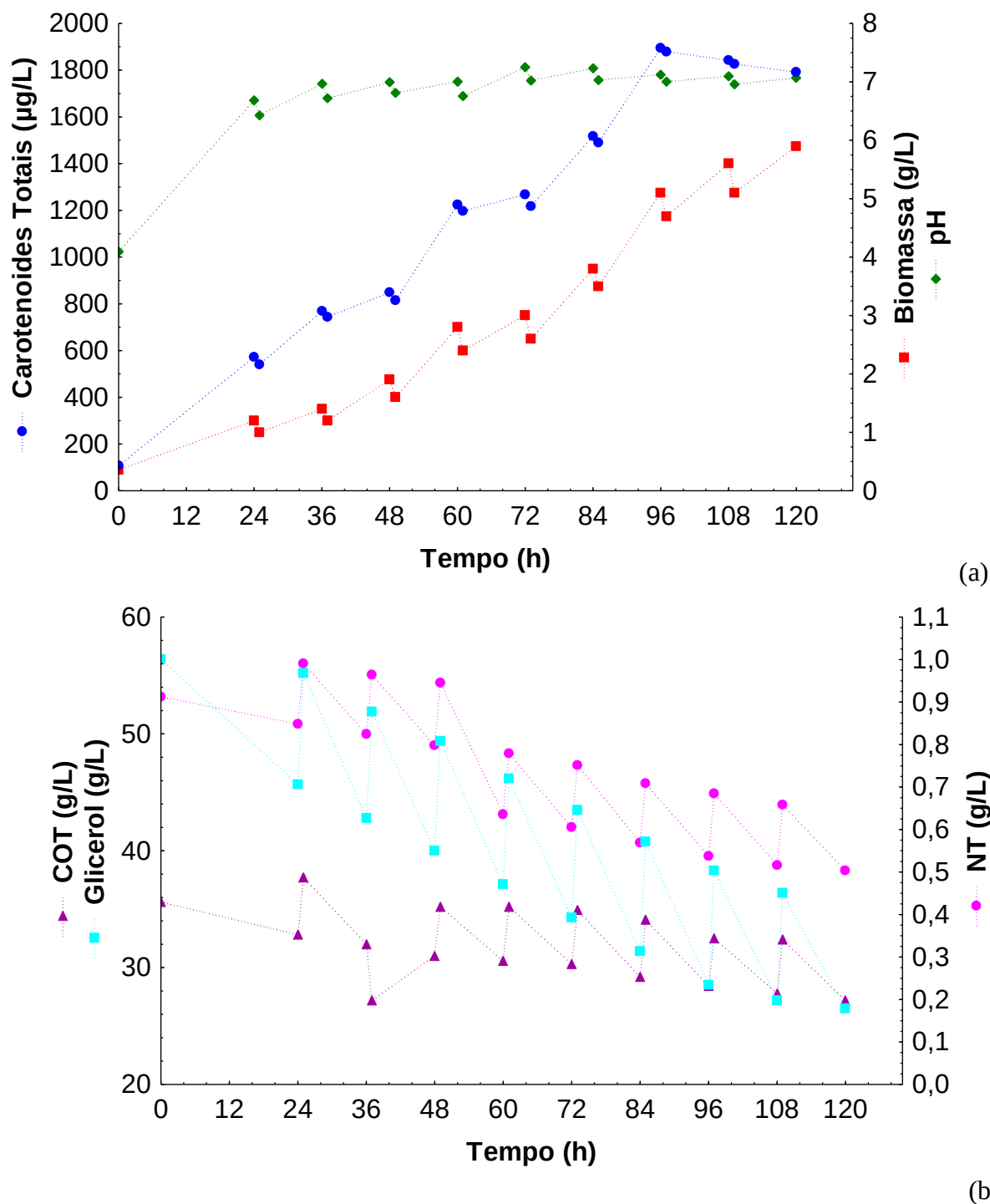


Figura 16 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT(b) para o Ensaio 3 em batelada alimentada (taxa de alimentação de 150 mL a cada 12h), respectivamente.



A concentração máxima de carotenoides totais foi de 4753 µg/L (Ensaio 1, Figura 14), em 96 h do início da bioprodução, com uma alimentação de 112,5 mL a cada 12 h. No entanto, a mínima concentração de carotenoides totais foi de 1894 µg/L em 96 h de

bioprodução no Ensaio 3 (Figura 16), ao qual se adicionou o maior volume de alimentação (150 mL) a cada 12 h. Também pode-se observar que a bioprodução de carotenoides totais diminui após 96 h de produção e continuou o consumo de substrato após este período, não havendo vantagem em continuar a bioprodução por mais de 96 horas.

Ao se comparar a utilização de meio de bioprodução constituído somente de resíduos agroindustriais, foi obtida maior concentração de carotenoides totais (4753 µg/L), quando comparado ao estudo de COLET et al. (2015) que utilizaram meio composto por glicerol, extrato de malte e peptona, no qual obteve-se 4400 µg/L de carotenoides totais, com o mesmo volume de alimentação (112,5 mL a cada 12 h) em 96 h de bioprodução. Isto torna-se interessante, do ponto de vista econômico, pois a composição do meio de cultivo é a base de resíduos agroindustriais.

Ao correlacionar a produção de carotenoides em batelada alimentada (Ensaio 1, Figura 14 - alimentação no final da fase exponencial e a cada 12 h adição de 112,5 mL de meio) com a obtida na otimização do meio de bioprodução em frascos agitados (2276 µg/L, Tabela 11), verifica-se que houve um incremento de 108 % na bioprodução. No entanto, ao comparar a produção em batelada alimentada com a obtida por COLET et al. (2015) o aumento no rendimento foi de aproximadamente 8 %.

VALDUGA et al. (2008) obtiveram teor menores de carotenoides (1019 µg/L) com o mesmo microrganismo (*S. salmonicolor* CBS 2636) em frascos agitados com concentrações de glicose de 40 g/L, extrato de malte de 10 g/L e peptona de 14 g/L, 180 rpm, pH inicial 4,0 e temperatura a 25°C. Ao utilizarem matérias-primas agroindustriais (água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar) pré-tratados com ácidos a produção foi de 541,5 µg/L, porém quando as matérias-primas foram pré-tratados com carvão ativo, a máxima concentração de carotenoides totais obtida foi de 208,6 µg/L. TATSCH (2008) no estudo da produção de carotenoides em biorreator por *S. salmonicolor* a concentração máxima (3426 µg/L) foi obtida em aproximadamente 90 h do início da biorreação, sendo que a partir de 60 h, o aumento da concentração de carotenoides foi baixo.

Estes resultados, se comparados a produção em batelada alimentada (Figura 14), demonstram um incremento de aproximadamente 40% em relação a batelada simples (TATSCH, 2008) e 133 % ao frasco agitado (Tabela 10).

SAENGE et al. (2011) também observaram a vantagem da utilização do processo em batelada alimentada, onde a produção de carotenoides por *R. glutinis* TISTR 5159 obtiveram um incremento de aproximadamente 13 % na produção em relação à batelada simples (135,25 mg/L contrastado com a batelada simples com uma produção de carotenoides de

117,38 mg/L). CHOCIAI (2002) obteve no cultivo da levedura *P. rhodozyma* (*X. dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina (após 48 e 72 h de alimentação), um incremento de 43 % contra o cultivo em batelada.

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e na formação de produto. Desta forma, o pH inicial e a evolução do mesmo é objeto de estudo na produção de carotenoides. Ao se observar as Figuras 14 a 16, verifica-se comportamento semelhante, independente do volume de alimentação de meio, no qual ocorreu um aumento de pH nas primeiras 24 h de bioprodução, depois sofrendo pequenas oscilações, ao longo da bioprodução. A carotenogênese e o crescimento foram induzidos pela elevação do pH (pH 4,0 a 7,8), sendo pH 7,0, ótimo para o crescimento celular e formação de pigmento, com máxima carotenogênese (4753 µg/L) em pH 7,0 (Figura 14) nas condições analisadas.

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

O aumento do pH nas primeiras horas de bioprodução também foi verificado por VALDUGA et al. (2009d) ao utilizar substratos agroindustriais (água de maceração de milho, melaço de cana-de-açúcar e Prodex Lac®), sendo que a evolução foi progressiva de 4,2 para 7,5 nas primeiras 30 h e após 96 h ocorreu uma elevação no pH para 8,5, mantendo-se até o final da bioprodução (120 h). Os autores atribuíram o aumento progressivo do pH, mesmo após as 24 h de bioprodução, ao fenômeno que ocorre após esgotamento completo do substrato, ocasionando também à proteólise do microrganismo. De acordo com FRENGOVA et al. (1994) a biossíntese de carotenoides ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras.

COLET et al. (2015) verificaram que independentemente do volume de alimentação de meio, ocorre um aumento de pH (7,66 a 7,87) nas primeiras 24 h de bioprodução. Após este período ocorre um decréscimo progressivo, atingindo ao final da bioprodução valores próximos a 4,0.

A bioprodução de carotenoides pela levedura *S. salmonicolor* CBS 2636 apresenta formação de carotenoides associada ao crescimento celular na fase exponencial (Figuras 14 a 16). No Ensaio 1 (Figura 14), com volume de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h, foi verificada a maior concentração de células (7,66 g/L) em 96 h de bioprodução. Esta alta concentração se deve à batelada alimentada, pois quando se alimentam meios adicionais,

incluindo fontes de carbono e nitrogênio, as células podem utilizar mais glicerol e consequentemente, terem mais nutrientes para a sua manutenção e produção, sendo que esta elevada concentração de massa celular foi convertido em maior produção de carotenoides totais, e também uma maior produção de carotenoides específicos.

Estes resultados podem ser comparados ao estudo de SAENGE et al. (2011) que obtiveram maior biomassa, teor de lipídeos, produção de lipídios e produção de carotenoides de 10,1 g/L, 61 %, 6,1 g/L e 135,2 mg/L, respectivamente, quando utilizaram batelada alimentada, sendo que a produção de carotenoides foi 2,1 vezes superiores aos da condição otimizada em batelada simples.

VALDUGA et al. (2007) observaram também que o crescimento celular em biorreator (9,98 g/L) foi duas vezes superior àquelas obtidas em frascos agitados, sendo a concentração máxima de células de 5,95 g/L. Em estudo semelhante em biorreator (batelada simples) para a maximização da produção de carotenoides com *S. salmonicolor* CBS 2636. VALDUGA et al. (2011) obtiveram concentração máxima de células de 10,97 g/L, em meio composto por 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de aeração 1,5 vvm, 180 rpm, 25° C , pH inicial de 4,0 e 90 h de bioprodução, concentração celular maior que a obtida neste trabalho (7,66 g/L).

RAZAVI & MARCH (2006) obtiveram um aumento no crescimento de *S. ruberrimus* H110 de 6,81 g/L em pH 3,5 para 11,3 g/L com aumento do pH (pH = 6), sendo que a produção máxima de pigmentos foi geralmente observada no final da fase exponencial de crescimento. No entanto MALISORN & SUNTORN SUK (2009) em seu estudo com a levedura *R. glutinis* DM 28, obtiveram valores de crescimento celular em frascos agitados (2,2 g/L) foram semelhantes aos obtidos em biorreator (2,6 g/L).

A maior produção de carotenoides específicos (620 µg/g) foi atingida no Ensaio 1 (Figura 14) em 96 h de produção, sendo que nesta mesma condição se obteve a maior produção de carotenoides (4753 µg/L), produção esta inferior a COLET et al. (2015) que obtiveram uma produção de carotenoides específicos (817 µg/g) na mesma condição da maior produção de carotenoides em biorreator em batelada alimentada com meio composto de 80 g/L de glicerina bidestilada 85 % PA, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona. Porém maior que VALDUGA et al. (2011) que otimizaram a produção de carotenoides específicos (313,8 µg/g) por *S. salmonicolor* CBS 2636 em biorreator batelada simples, em meio composto por 80 g/L de glicose, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte, taxa de aeração 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C , pH inicial de 4,0 e 90 h de bioprodução. Avaliando leveduras brasileiras pigmentadas, MALDONADE et al. (2008) obtiveram conteúdo de

carotenoides específicos máximo de 132 µg/g para *R. glutinis*, 33 µg/g para *R. minuta* e 72 µg/g para *S. roseus*, o que mostra o grande potencial da cepa *S. salmonicolor* na produção do pigmento. BUZZINI et al. (2005), em estudo com a levedura *S. salmonicolor* CBS 490, obtiveram uma produção de carotenoides totais de 613,3 µg/L, e carotenoides específicos de 34,7 µg/g em frascos agitados.

Em muitos microrganismos a carotenogênese é regulada por fatores nutricionais, tais como a disponibilidade de nitrogênio. As taxas de consumo de carbono e nitrogênio têm importante função na síntese de metabólitos secundários, determinando o tipo de metabólitos sintetizados e a extensão da produção (GARBAYO et al., 2003). Neste contexto, verifica-se pelas Figuras 14 a 16 (b) que houve um consumo gradual de nitrogênio total, carbono orgânico total (COT) e glicerol ao longo do processo, constatado pelo declínio das concentrações de carbono orgânico total e nitrogênio durante toda a bioprodução. Este comportamento sugere que as células provavelmente consomem a fonte de carbono do glicerol e que não ocorre a lise celular e proteólise sob condições de estresse, pois a quantidade de nitrogênio solúvel não aumentou.

Pode-se verificar ainda (Tabela 14) que houve maior consumo de nitrogênio (71 %) e de carbono orgânico total (42 %) no Ensaio 1, com taxa de alimentação de 112,5 mL (Figura 14 b) com 120 h de bioprodução. Porém, os menores consumos de nitrogênio (~45 %) e de carbono orgânico total (~24 %) foram verificados nos Ensaio 3 (Figura 16 b), com o maior volume de alimentação (150 mL).

Tabela 14 – Consumo de matérias-primas, em porcentagem, ao longo da bioprodução em batelada alimentada depois de 120 h.

Ensaio	Consumo de matérias-primas (%)*		
	COT	NT	Glicerol
1	42 ^a ± 0,76	71 ^a ± 1,76	74 ^a ± 1,99
2	33 ^b ± 0,53	48 ^b ± 0,84	63 ^b ± 1,39
3	24 ^c ± 0,42	45 ^b ± 0,86	53 ^c ± 1,05

* Média ± desvio padrão seguido de letras iguais nas colunas, indicam não haver diferença significativa á nível de 95% (Teste de Tukey).

COLET et al. (2015) também observaram um maior consumo de 68 % de NT e 65 % de COT no ensaio com alimentação de 112,5 mL em 96 h. VALDUGA et al. (2014)

constatarem um aumento acentuado no consumo de nitrogênio total e carbono orgânico total após 8 h de produção, chegando a 16 h de produção com consumo de 47 % de nitrogênio total e 27 % de carbono orgânico total. Comportamento semelhante foi verificado, também, em outros estudos (SANTOS, 2010; VALDUGA et al., 2011) nos quais houve um consumo constante de carbono e nitrogênio durante o processo, sendo mais acentuado no início da bioprodução.

O gradual consumo de glicerol durante a bioprodução está relacionado diretamente com o tempo de bioprodução e fase de crescimento microbiano. E esse crescimento pode ser afetado pela ausência de micronutrientes essenciais para o metabolismo celular. De acordo com as Figuras 14 a 16 b, observa-se que a taxa de consumo de glicerol foi aumentando ao longo da bioprodução em todos os ensaios. Ao final de 120 h de bioprodução no Ensaio 1 (Figura 14 b) foi observado o maior consumo de glicerol (74 %), sendo o menor consumo (53 %) verificado no Ensaio 3 (Figura 16 b), possivelmente isto esteja associado ao excesso de glicerol residual no meio, nos ensaios nos quais o volume de alimentação foi maior, ocasionando inibição por excesso de substrato.

Resultados estes, similares a COLET et al. (2015) que em batelada alimentada com 112,5 mL obtiveram um consumo de 76 % de glicerol, ao utilizar um meio composto por 80 g/L de glicerina bidestilada 85 % PA, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona. VALDUGA et al. (2014) observaram um menor consumo de glicerol (16 g/L) nas primeiras 16 h e após esse período observaram um pequeno consumo de glicerol ao longo do tempo, que após 96 h de bioprodução manteve-se praticamente constante, e ao final das 120 h de bioprodução foi observado um consumo total de 43 %.

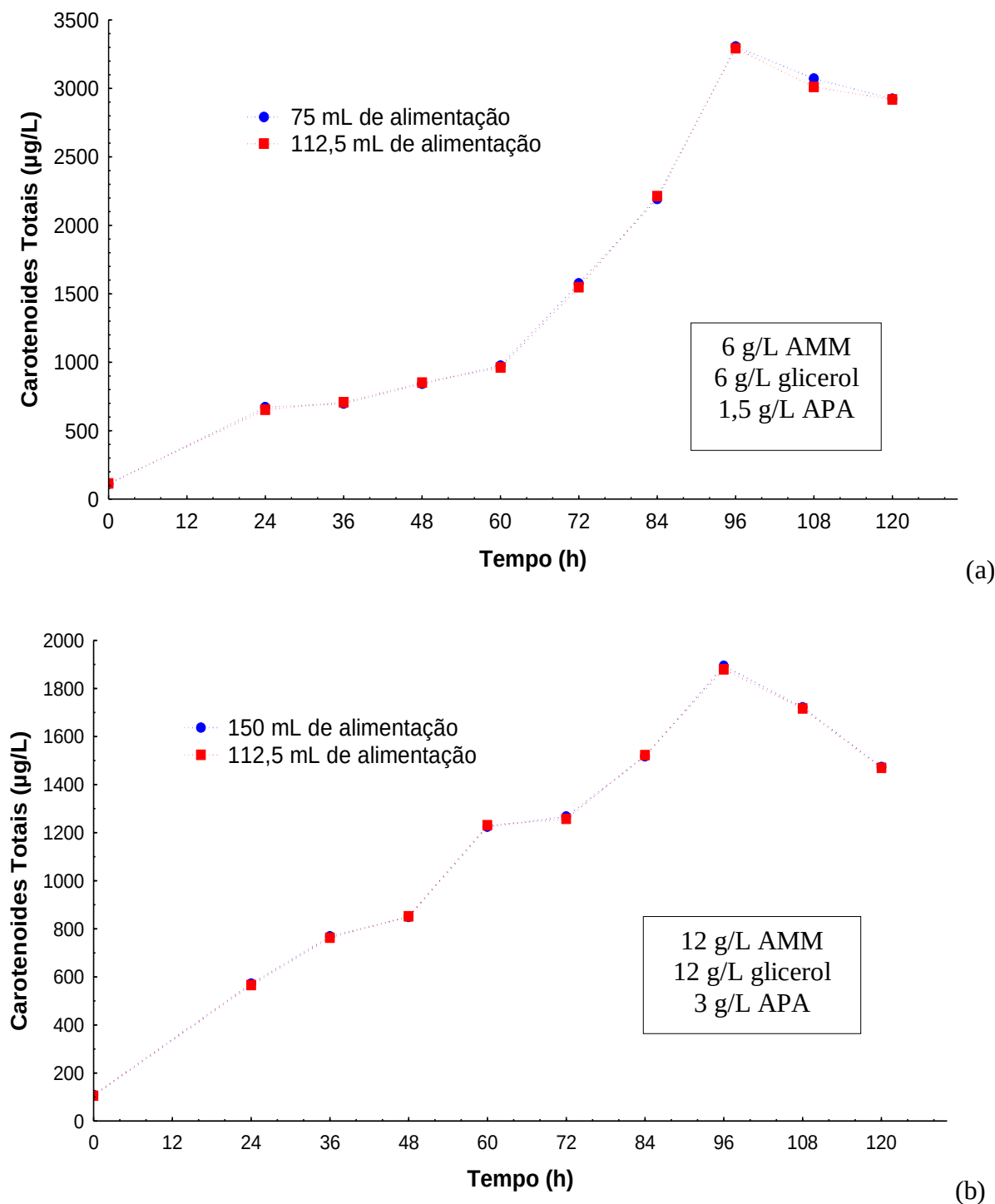
SAENGE (2011) constatou que o consumo de glicerol foi melhorado na batelada alimentada quando comparada com a batelada simples. SANTOS (2010) observou que a glicerina bruta foi quase completamente consumida durante a bioprodução, já que com glicerina (P.A) foi obtido um consumo menor, devido à ausência ou menor concentração de micronutrientes que poderiam ter favorecido o crescimento microbiano.

4.3.2 Batelada alimentada com iguais volumes de alimentação

As Figuras 17 (a) e (b), (Tabelas 29 e 30 – Apêndice) apresentam a cinética de bioprodução dos carotenoides do processo em batelada alimentada com volumes diferentes de alimentação e a sua equivalência com o mesmo volume de alimentação dos demais ensaios,

porém com concentração diferente de matérias-primas, utilizando o meio otimizado com resíduos agroindustriais (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA).

Figura 17 - Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 2 em batelada alimentada com diferente (75 mL) e igual volume (112,5 mL) de alimentação (a); Ensaio 3 em batelada alimentada com diferente (150 mL) e igual volume (112,5 mL) de alimentação (b), porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial.

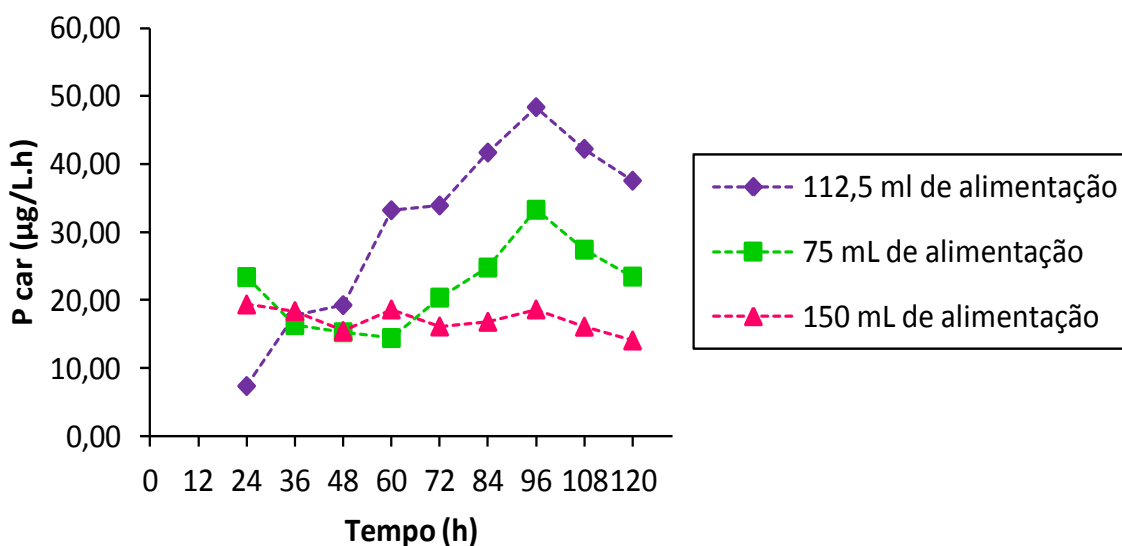


Observa-se que em ambos os ensaios não houve diferença significativa com 95 % de confiança (obtendo um p de 0,21 e 0,11 para os Ensaios 2 e 3, respectivamente) entre as diferentes estratégias do volume de alimentação no processo em batelada alimentada, onde independentemente se o volume final do biorreator foi o mesmo, porém com concentrações das matérias-primas diferentes, a bioprodução apresentou o mesmo comportamento.

4.4 Parâmetros Estequiométricos da Bioprodução em Sistema Batelada Alimentada

A Figura 18 mostra a produtividade em carotenoides do sistema batelada alimentada para os ensaios com volume de meio alimentado de 112,5 mL (Ensaio 1), 75 mL (Ensaio 2) e 150 mL (Ensaio 3) a cada 12 h de bioprodução.

Figura 18 - Produtividade em carotenoides global (P_{car}) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (112,5 mL), Ensaio 2 (75 mL) e no Ensaio 3 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e de 96 a 120 h.



De acordo com a Figura 18, no Ensaio 1 foi verificada a máxima produtividade de 48,4 µg/L.h em 96 h. Para o Ensaio 2 observa-se que até 60 h ocorreu um decréscimo da produtividade em carotenoides, obtendo-se um mínimo de 14,4 µg/L.h. A partir deste ponto ocorreu um incremento da produtividade até 96 h atingindo 33,3 µg/L.h. Isto pode ter

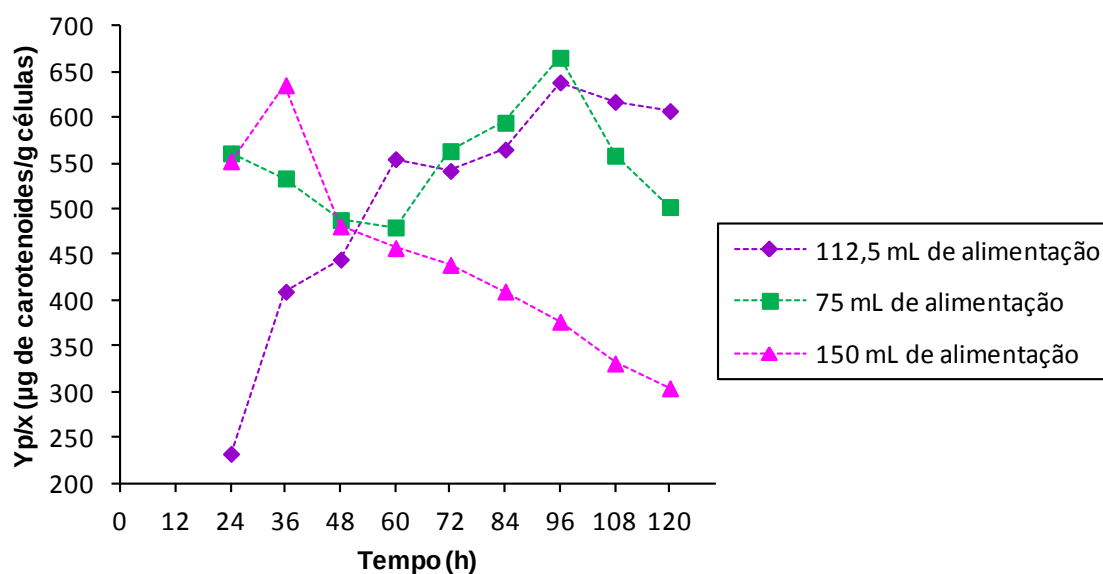
acontecido devido aos baixos níveis de nutrientes disponíveis para o microrganismo, uma vez que neste ensaio ocorreu o menor volume de alimentação a cada 12 h.

No entanto, no Ensaio 3, observa-se que a máxima produtividade em carotenoides (19,3 $\mu\text{g/L.h}$) ocorreu em 24 h e mantendo-se praticamente constante até o final da bioprodução. Isto pode ter ocorrido devido a inibição por excesso de substrato, pois a alimentação de substrato elevada (150 mL de meio a cada 12h) influenciou na diminuição da área interna livre do biorreator e consequentemente diminui a produtividade (BRANCO et al., 2010).

COLET et al. (2015) observaram o mesmo comportamento perante os diferentes volumes de alimentação, obtendo a maior produtividade (45 $\mu\text{g/L.h}$) com 112,5 mL em 96 h de bioprodução. VALDUGA et al. (2011) observaram que até 40 h ocorreu aumento da produtividade em carotenoides, obtendo-se um máximo de 56,0 $\mu\text{g/L.h}$ em batelada simples, sendo que a partir deste período ocorreu decréscimo da produtividade até o final da biorreação. VALDUGA et al. (2009) obtiveram em 50 h um máximo de 56,9 $\mu\text{g/L/h}$ em frascos agitados com meio comercial.

A Figura 19 mostra a relação entre a produção de carotenoides e a produção de células dos ensaios realizados ao longo da bioprodução.

Figura 19 – Relação entre a produção de carotenoides e a produção de células ($Y_{p/x}$) ao longo da bioprodução em batelada alimentada nos Ensaios 1 (112,5 mL), Ensaio 2 (75 mL) e no Ensaio 3 (150 mL), a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0 e de 96 a 120 h.



De acordo com a Figura 19 o fator $Y_{p/x}$ máximo de 666 $\mu\text{g/g}$ foi obtido no Ensaio 2 com 96 h de bioprodução e 639 $\mu\text{g/g}$ no Ensaio 1, a 96 h, valor este superior ao observado

por VALDUGA et al. (2011) em biorreator com batelada simples, utilizando as mesmas condições operacionais, que obtiveram uma conversão de 390 $\mu\text{g/g}$ e por VALDUGA et al. (2009) em frascos agitados, que relatam uma conversão 572,2 $\mu\text{g/g}$ na segunda fase de cultivo (desaceleração), mas inferior ao encontrado por COLET et al. (2015) de 859 $\mu\text{g/g}$ com 112,5 mL em 96 h.

Segundo LIU et al. (2006) o aumento no rendimento específico de carotenoides é indicativo de uma ampliação na biossíntese de carotenoides nas células de levedura. Possivelmente, este comportamento esteja relacionado a mudanças no metabolismo e estresse celular. O $Y_{p/X}$ no Ensaio 3 decresceu após 36 h de bioprodução, isto pode estar relacionado a maior alimentação de matéria-prima e ao baixo valor de produção de carotenoides totais e de biomassa, ocasionado pelo excesso de matéria-prima (maior taxa de alimentação: 150 mL a cada 12 h).

Segundo LUNA-FLORES et al. (2010) se $Y_{p/X}$ diminui ao longo da bioprodução, isto se deve ao excesso de substrato no meio e menor proporção de células para convertê-las em carotenoides.

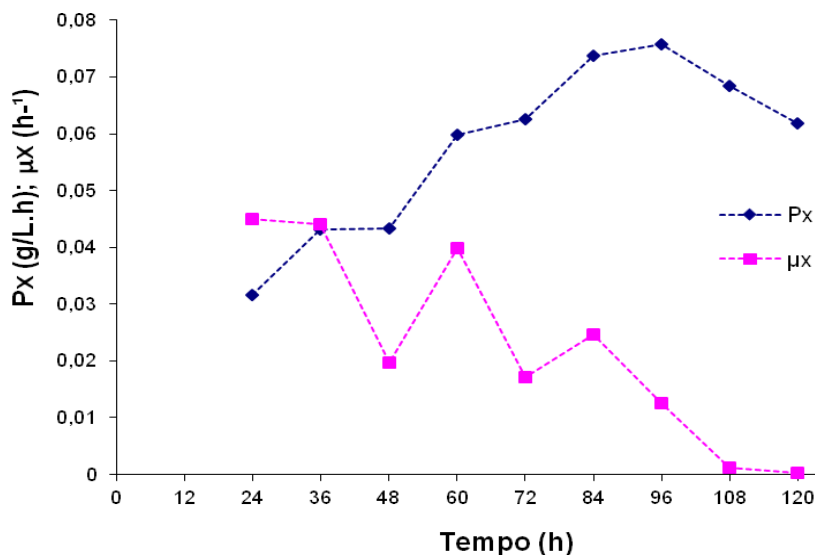
A Figura 20 (a, b, c) apresenta a evolução da velocidade específica de crescimento global (μ_x) e da produtividade em célula global (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada (Ensaio 1, 2 e 3), respectivamente.

De acordo com a Figura 20b, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi 0,052 h^{-1} (alimentação de 75 mL a cada 12 h, no Ensaio 2). Para o Ensaio 1 (Figura 20a), a máxima produtividade em células (P_x) foi de 0,076 g/L.h em 96 h. A Figura 20c, onde se alimentou 150 mL a cada 12 horas, obteve-se μ_{max} de 0,046 h^{-1} e P_x de 0,049 g/L.h. Em condição de abundância de substrato, os microrganismos crescem com velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$). Quando o substrato deixa de estar em abundância e não ocorrer inibição por substrato, μ diminui, até atingir o valor zero quando a concentração de substrato no meio se esgota totalmente.

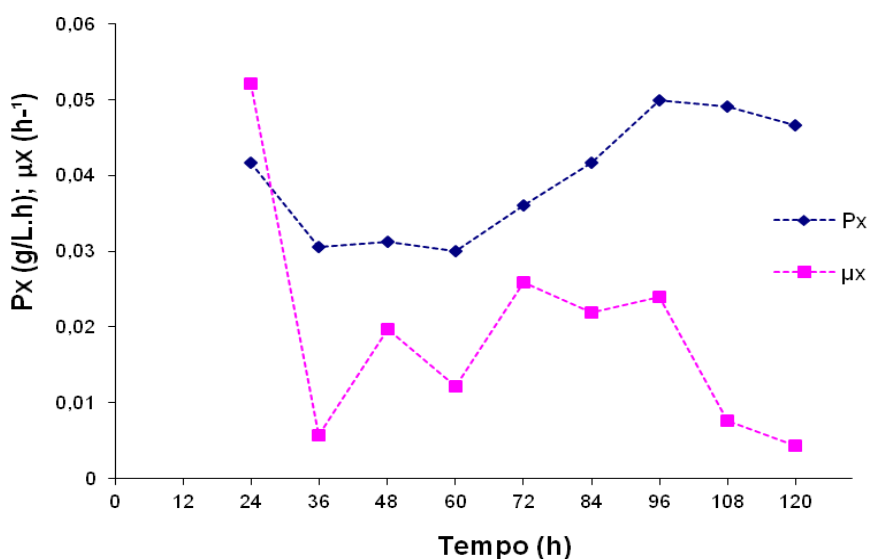
COLET et al. (2015) obtiveram velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) de 0,05 h^{-1} e a produtividade em células máxima (P_x) de 0,085 g/L.h. VALDUGA et al. (2011) em biorreator com batelada simples, obteve a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) de 0,0456 h^{-1} e a produtividade em células (P_x) máxima de 0,090 g/L.h, e a produtividade em carotenoides totais máxima de 56,0 $\mu\text{g/L.h}$. No entanto, em frascos agitados, VALDUGA et al. (2009), obtiveram para o meio comercial as maiores produtividades em relação ao meio agroindustrial, sendo que a produtividade em células (P_x)

máxima foi de 0,08 g/L/h e de 0,06 g/L/h para o meio comercial e agroindustrial e a produtividade em carotenoides totais foi de 14,2 e 10,4 $\mu\text{g/L/h}$, respectivamente.

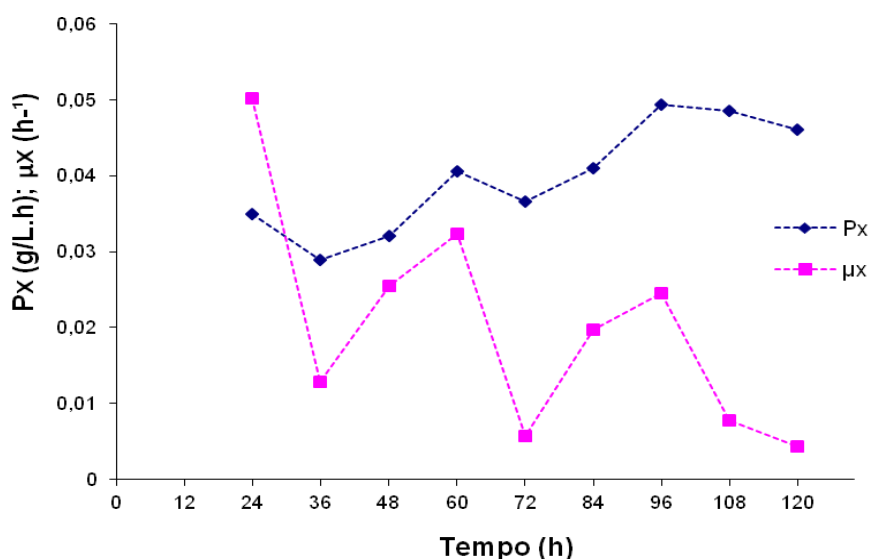
Figura 20 – Evolução da velocidade específica de crescimento (μ_x) e da produtividade em célula (P_x) durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente.



(a)



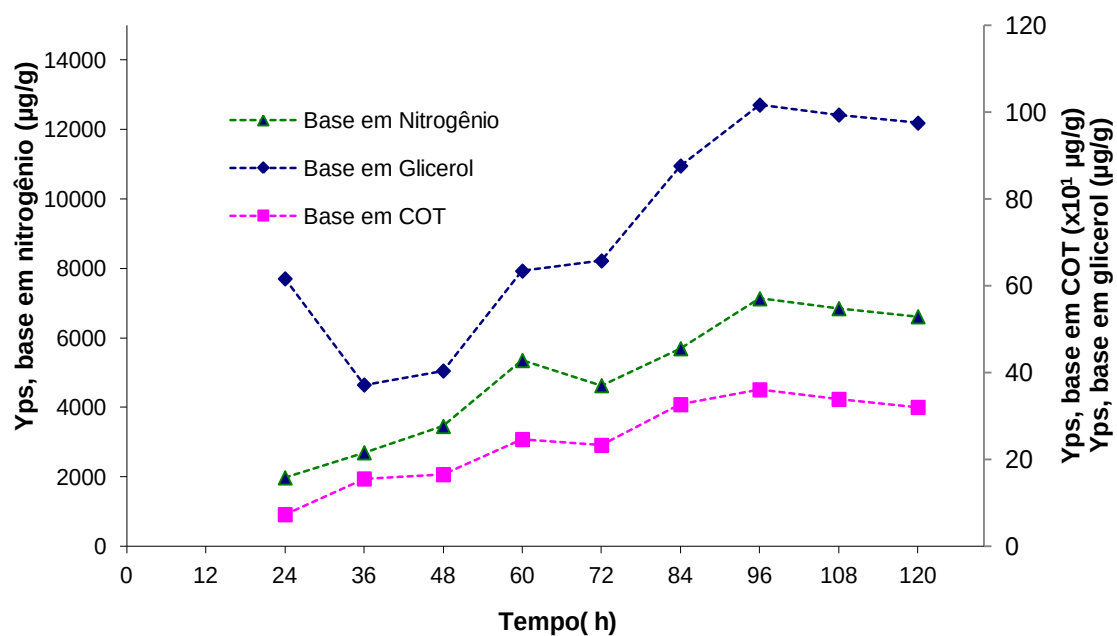
(b)



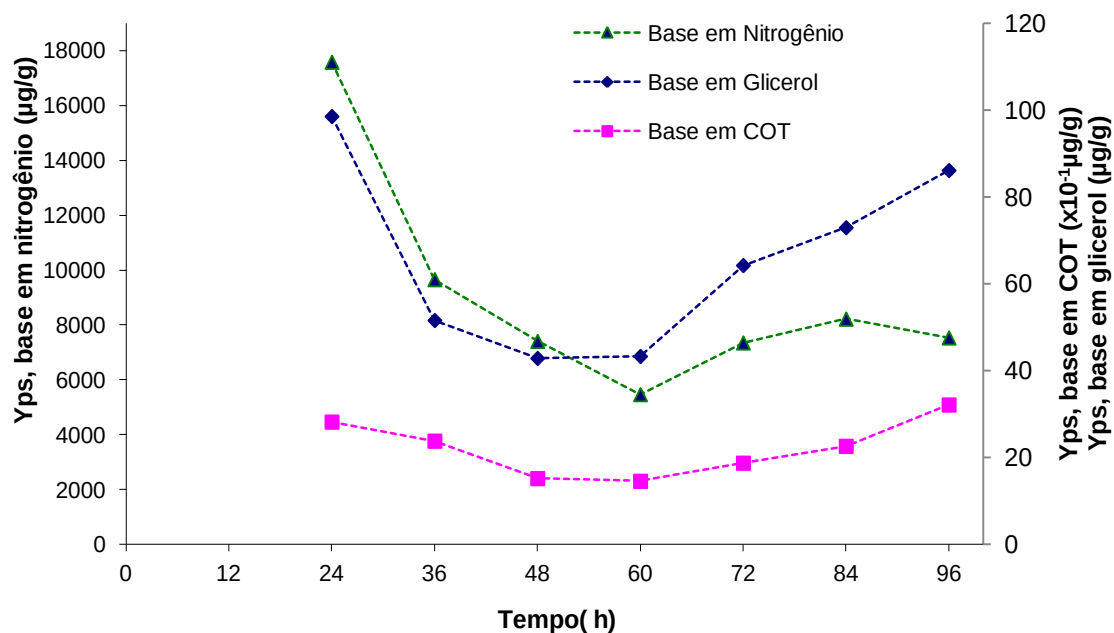
(c)

A Figura 21 (a, b, c) apresenta os fatores de conversão de glicerol, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total em carotenoides (Ensaio 1, 2 e 3), respectivamente.

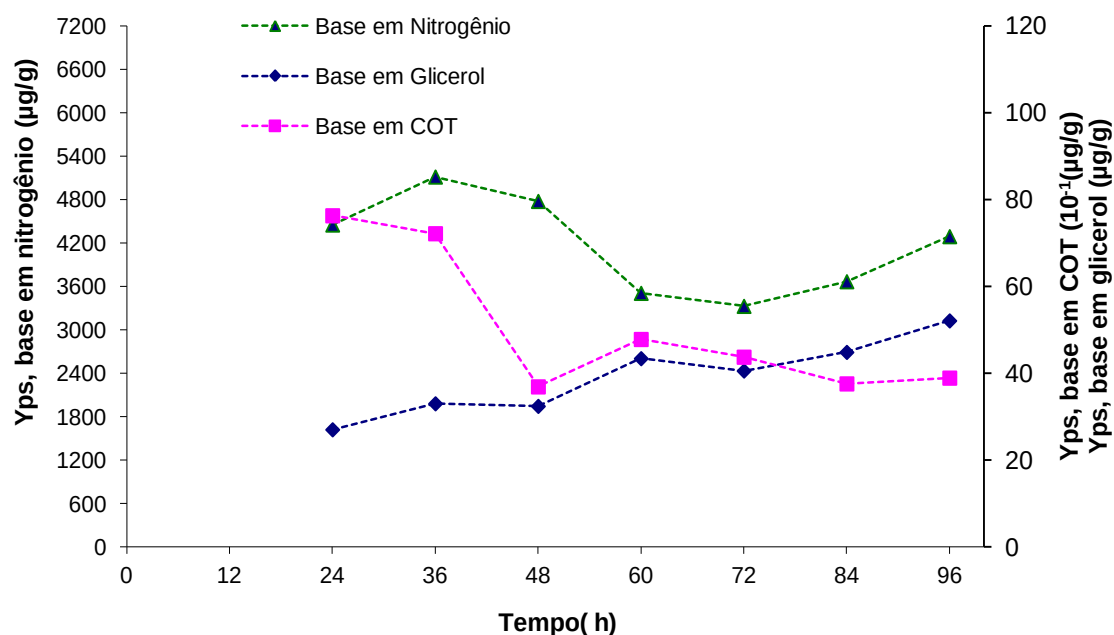
Figura 21 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides ao longo da bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente.



(a)



(b)



(c)

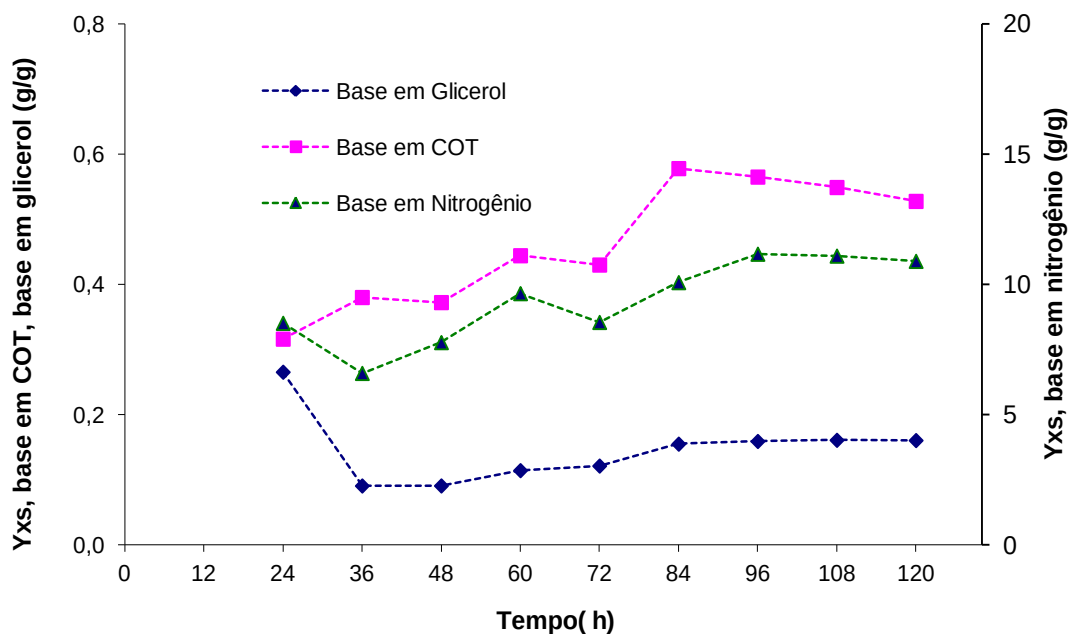
O maior fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em carotenoides foram obtidos no Ensaio 1 com 96 h de bioprodução ($101,7 \mu\text{g/g}$), no Ensaio 3 em 24 h de bioprodução ($4098 \mu\text{g/g}$) e no Ensaio 2 em 24 h de bioprodução ($17590 \mu\text{g/g}$), respectivamente. Observa-se que elevados volumes de matérias-primas adicionadas no meio ocasionaram uma queda no fator de conversão em produto, devido a menor taxa de transferência de oxigênio (BRANCO et al., 2010), isto também explica o comportamento distinto entre os ensaios, sendo que neste caso o biorreator apresentava volume de 2 L,

quando se adicionou o maior volume de alimentação (Ensaio 3), a taxa de transferência de oxigênio deve ter diminuído consideravelmente devido à diminuição da área interna do biorreator. A diminuição na concentração de células pode ter ocorrido devido ao aumento da diluição no momento da alimentação e consequentemente maior diluição do produto neste momento, ocasionou menor capacidade de conversão e a queda da velocidade específica de crescimento.

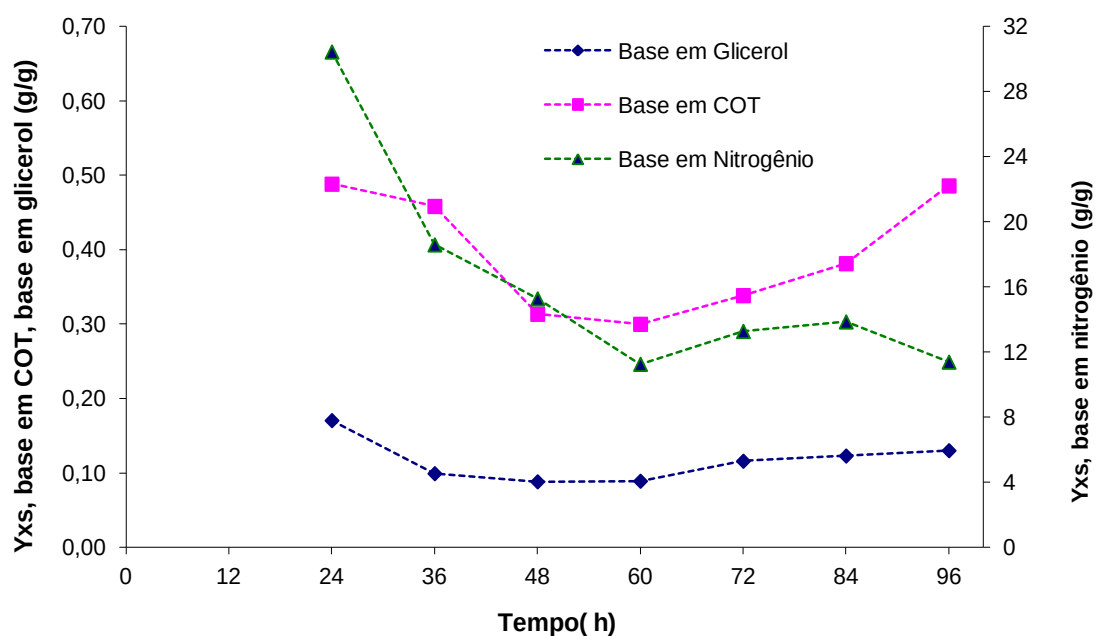
No Ensaio 1 (Figura 21a) observa-se que os fatores de conversão de glicerol, COT e NT aumentam constantemente durante a bioprodução, comprovando assim a maior produção de carotenoides totais (4753 $\mu\text{g/L}$).

A Figura 22 (a, b, c) mostram a conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células nos Ensaios 1, 2 e 3, respectivamente.

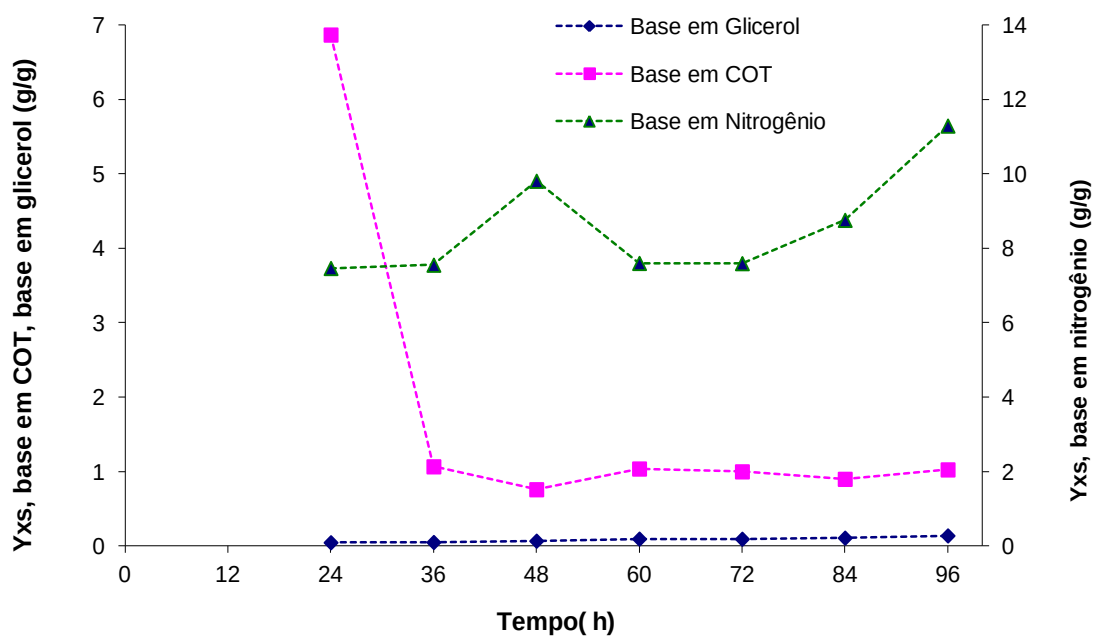
Figura 22 – Fatores de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células durante a bioprodução em batelada alimentada no Ensaio 1 (a – 112,5 mL) no Ensaio 2 (b – 75 mL) e no Ensaio 3 (c – 150 mL), respectivamente.



(a)



(b)



(c)

Nas Figuras observa-se que o maior fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio total em células foi obtido no Ensaio 1 (alimentação de 112,5 mL a cada 12 h) em 24 h de bioprodução (0,27 g/g), no Ensaio 3 em 24 h (6,87 g/g) e no Ensaio 2 em 24 h de bioprodução (30,4 g/g), respectivamente. No entanto, nos Ensaios 2 e 3 houve uma diminuição considerável na produção de células quando comparado ao Ensaio 1, porém nota-se que muita matéria-prima, isso pode ser um indicativo de alguma bioconversão para outros

produtos ou uma mudança na biossíntese. Já no Ensaio 1 houve um acréscimo na conversão dos nutrientes em carotenoides (Figura 21a) e em células (Figura 22a) comprovando assim que o consumo das matérias-primas foi convertido em maior concentração celular e consequentemente maior produção de carotenoides ao longo da bioprodução.

A Tabela 15 apresenta os maiores parâmetros cinéticos e estequiométricos globais do processo de bioprodução de carotenoides em processo de batelada alimentada pelo microrganismo *S. salmonicolor*.

Tabela 15 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em batelada alimentada dos ensaios em batelada alimentada

Parâmetros	Valor máximo obtido	Volume alimentado (mL)	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicerol)	102	112,5	96
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em glicerol)	0,27	112,5	24
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	4098	112,5	24
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em COT)	6,87	150	24
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em nitrogênio)	17590	75	24
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	30,4	75	24
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	666	75	96
P_x (g/L.h)	0,076	112,5	96
μ_x (h^{-1})	0,052	75	-

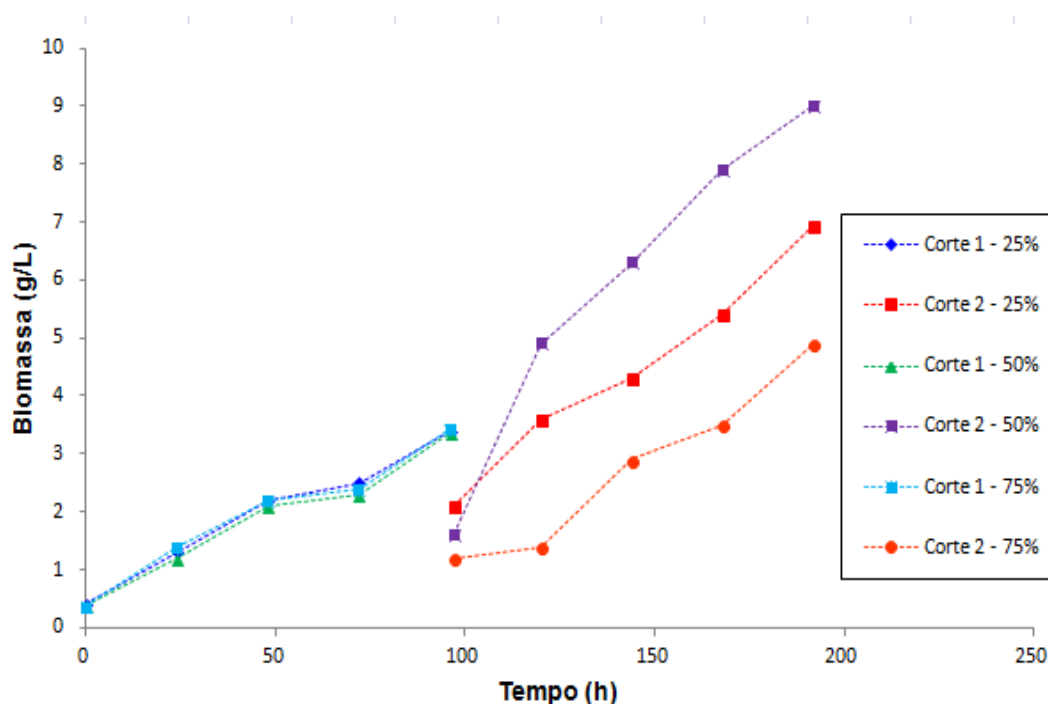
Os maiores fatores de conversão globais ocorreram em grande parte dos ensaios, nas primeiras 24 h de bioprodução (Tabela 15), nesta faixa observou-se, também, a maior elevação do pH (4 para 7,8) que resultou devido ao grande consumo de matérias-primas ocasionando a proteólise da levedura, por isso que o fator de conversão de glicerol, COT e nitrogênio em célula e o fator de conversão de COT e nitrogênio em produto foram maiores nas primeiras 24 h. Comparando os valores obtidos em frascos agitados com meio comercial (VALDUGA et al., 2009), em biorreator em meio comercial (VALDUGA et al., 2011) com os obtidos neste estudo comprova-se que a diferenciação dos fatores de conversão evidencia o comportamento distinto do crescimento celular e consumo de substratos em frascos agitados e no biorreator sistema batelada simples e alimentada.

4.5 Produção de Carotenoides em Sistema Semicontínuo

4.5.1 Sistema semicontínuo com cortes

A Figura 23 apresenta as curvas cinéticas de biomassa de *S. salmonicolor* conduzido em biorreator em sistema semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75 % do volume de meio de cultivo (condições de cultivo: 80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA, pH_{inicial} 4,0, 25°C, 180 rpm e 1,5 vvm).

Figura 23 – Biomassa em função do tempo (h) durante o cultivo de *Sporidiobolus salmonicolor* em processo semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75 % do volume de meio fermentado



De acordo com a Figura 23, observa-se que há uma boa reprodutibilidade entre os três cultivos antes do corte em 96 h. Porém após o corte observa-se que o cultivo conduzido com corte de 50 % necessitou menor tempo para atingir a concentração máxima de biomassa, do que nos cultivos conduzidos com corte de 25 e 75 %. No processo com corte de 75 %, o volume de meio de cultivo repostado a cada início de ciclo foi maior, ou seja maior quantidade de nutrientes foi disponibilizada às células, porém isto não ocasionou um maior crescimento celular, podendo ser explicado pelo tempo que o microrganismo necessitou para se adaptar e crescer neste novo meio.

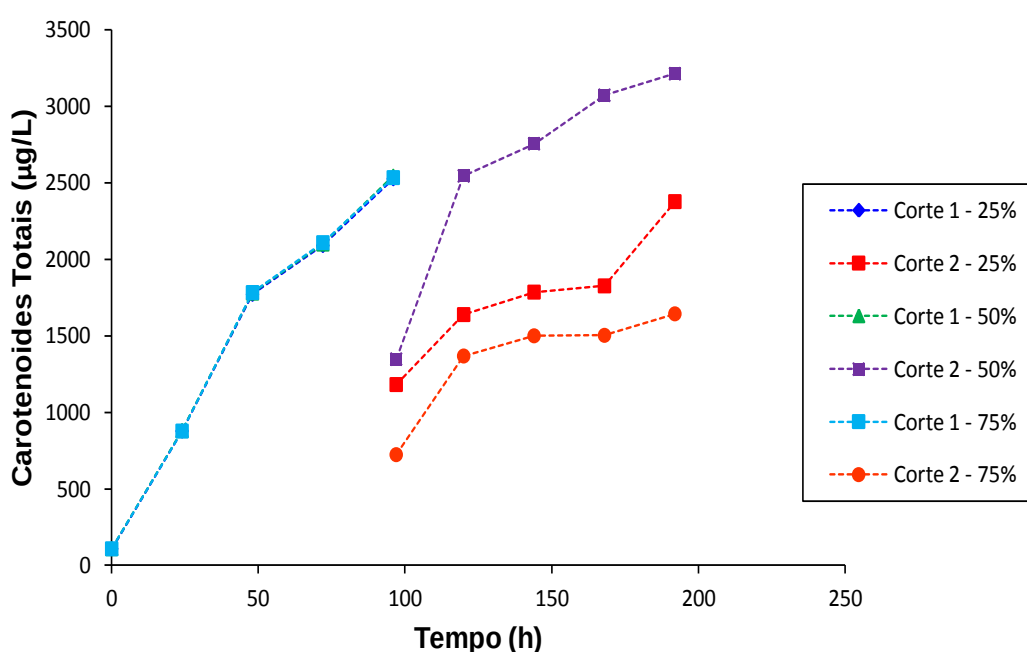
Quando se compara ao corte de 50 % com o de 25 % observa-se que a quantidade de biomassa com corte de 25 % foi inferior, o que pode ter ocorrido pela pouca quantidade de

possíveis inibidores e/ou metabólitos tóxicos retirados do caldo fermentado no processo com corte de 25 %. Isto explica as maiores velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) no processo com corte de 75 % (0,015 e 0,014 h^{-1} para o primeiro e segundo ciclos, respectivamente) do que no processo com corte de 50 % (0,016 e 0,005 h^{-1} para o primeiro e segundo ciclos, respectivamente) e com corte de 25 % (0,013 e 0,010 h^{-1} para o primeiro e segundo ciclos, respectivamente).

A concentração máxima de biomassa, obtida em cada corte, foi maior no processo que utilizou corte de 50 % (3,4 e 9,0 g/L para o primeiro e segundo ciclos) do que no processo que realizou-se corte de 75% (3,4 e 4,9 g/L para o primeiro e segundo ciclos) e 25 % (3,4 e 6,9 g/L para o primeiro e segundo ciclos).

A Figura 24 apresenta as curvas cinéticas de produção de carotenoides totais por *S. salmonicolor* para o sistema semicontínuo (mesmos experimentos anteriores). Observa-se, que a partir do segundo ciclo, no sistema com corte de 50 % se obteve a concentração máxima de carotenoides totais (3212 $\mu\text{g/L}$), ao se comparar com os bioproduzidos com cortes de 75 e 25 % (1643 e 2376 $\mu\text{g/L}$, respectivamente).

Figura 24 – Bioprodução de carotenoides totais em função do tempo (horas) durante o cultivo de *Sporidiobolus salmonicolor* em processo semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75% do volume de caldo fermentado.



As Figuras 23 e 24 mostram ainda que, em ambos os cultivos, os primeiros ciclos foram mais longos para começar a produzir biomassa e carotenoides totais, devido ao período de adaptação do microrganismo ao meio e condições de cultivo. Em ambos os casos, no segundo ciclo, como esperado, o microrganismo já se encontrava adaptado e, portanto, o tempo de reprodução das células foi menor, consequentemente se obteve maior produção de carotenoides.

A Tabela 16 apresenta a produtividade global, velocidade específica de crescimento (μ_x) e a produtividade em célula (P_x) obtida em cada ciclo. Observa-se que o corte de 50 % favoreceu a produtividade global e em célula e a velocidade específica. Portanto, para as próximas etapas definiu-se o sistema semicontínuo com cortes de 50 %, ou seja, é possível estabelecer a proporção de carga para um processo semicontínuo em 50 % a cada 96 h de bioprodução para obter-se maior produtividade em carotenoides e em células.

Tabela 16 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator dos ensaios em sistema semicontínuo em diferentes cortes a cada 96 h de bioprodução.

Parâmetros	Sistema de cortes		
	25 %	50 %	75 %
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	347	360	339
P_x (g/L.h)	0,034	0,045	0,024
μ_x (h^{-1})	0,010	0,050	0,014

Outros trabalhos relatam a importância do estudo do volume de corte do processo semicontínuo, entre eles CHAVES et al. (2014) que num estudo de diferentes formas de condução do processo de produção de polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus* sp., observou que, em relação ao processo semicontínuo com cortes de 50 e 75 % do volume de caldo fermentado, foi atingido maior produtividade global em biomassa micelial (61,02 mg/L.h) quando utilizou-se percentual de corte de 75 % e maior produtividade global em polissacarídeos (6,06 mg/L.h) quando utilizou-se percentual de corte de 50 %.

4.5.2 Comportamento cinético e estequiométrico da bioprodução em processo semicontínuo com matérias-primas sintéticas e a base de resíduos agroindustriais

As Figuras 25 e 26 (Tabelas 31 e 32 - Apêndice) apresentam as cinéticas de crescimento celular (biomassa), da bioprodução de carotenoides, a evolução do pH e consumo dos substratos, dos ensaios realizados em processo semicontínuo em biorreator com meio comercial (80 g/L de glicerina bidestilada 85 % PA, Merck, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L

de peptona - COLET et al., 2015) e com meio agroindustrial otimizado (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA) com corte de 50 % a cada 96 h. A concentração máxima de carotenoides totais obtido em meio comercial foi de 4376 µg/L (Figura 25) e em meio agroindustrial foi de 7388 µg/L (Figura 26), em aproximadamente 264 e 288 h de cultivo, respectivamente. No entanto, após o terceiro corte se observou um decréscimo da concentração de carotenoides totais até 480 h de cultivo. Porém o consumo das matérias-primas (glicerol, carbono e nitrogênio) continuou aumentando, isso pode ser um indicativo de alguma bioconversão para outros produtos secundários.

No meio comercial (Figura 25 b), ocorreu um maior consumo de glicerol (66 %) e de carbono orgânico total (22 %) no terceiro corte após 288 h de bioprodução. Nesta fase observou-se a máxima concentração de carotenoides totais (4376 µg/L), já o maior consumo de nitrogênio (60 %) ocorreu após o quarto corte (480 h).

No entanto, na bioprodução em sistema semicontínuo à base de matérias-primas agroindustriais (Figura 26 b), o maior consumo de nitrogênio (62 %) foi verificado no terceiro corte após 288 h, correlacionada com a maior concentração de carotenoides totais (7388 µg/L). Já o maior consumo de carbono orgânico total (23 %) ocorreu após 96 h de bioprodução e de glicerol (75 %) após o quarto corte e em 480 h.

A levedura *S. salmonicolor* necessitou cerca de 48 h para a adaptação com o meio e início da fase log. Após o primeiro (96 h), o segundo (192 h), o terceiro (288 h) e o quarto corte (384 h) esta adaptação ocorreu em cerca de 12 h. Isto se deve ao menor tempo da fase lag (pré-adaptação), devido o processo semicontínuo, no qual o meio não retirado do biorreator serviu de inóculo ao meio de bioprodução adicionado, sendo esta considerada uma das vantagens deste processo.

Verificou-se que depois dos cortes (Figuras 25 e 26) ocorreu diminuição momentânea da concentração da biomassa, possivelmente devido à diluição proveniente do meio novo adicionado, mas ocorreu um aumento ao longo da bioprodução, alcançando 20,86 g/L em 480 h. Porém esta alta concentração de biomassa não significou incremento da concentração de carotenoides, isto pode ser explicado a fato que à medida que os cortes vão sendo realizados a concentração celular aumenta, mas possíveis inibidores produzidos pelo microrganismo acabam dificultando seu metabolismo e a produção do produto desejado (OTERO et al., 1998).

Figura 25 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas glicerol, COT e NT (b) para o processo semicontínuo com meio comercial (80 g/L de glicerina, 15 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de malte), nas condições operacionais (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, corte de 50 % a cada 96 h até 480 h), respectivamente.

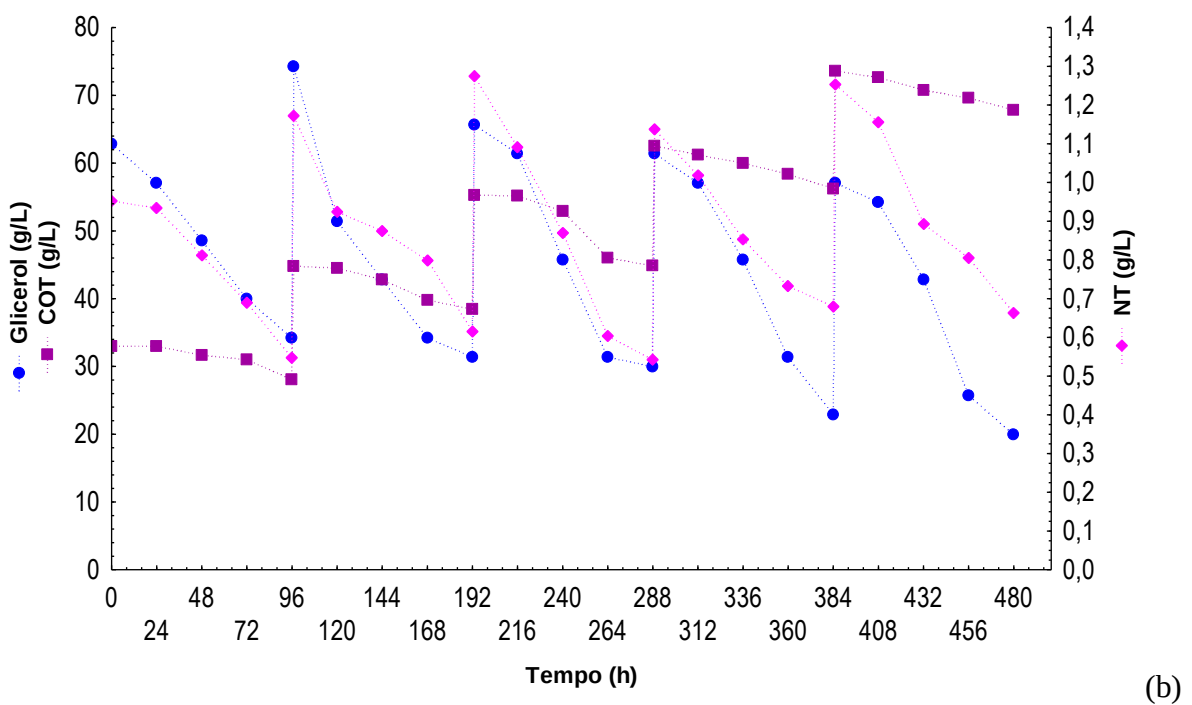
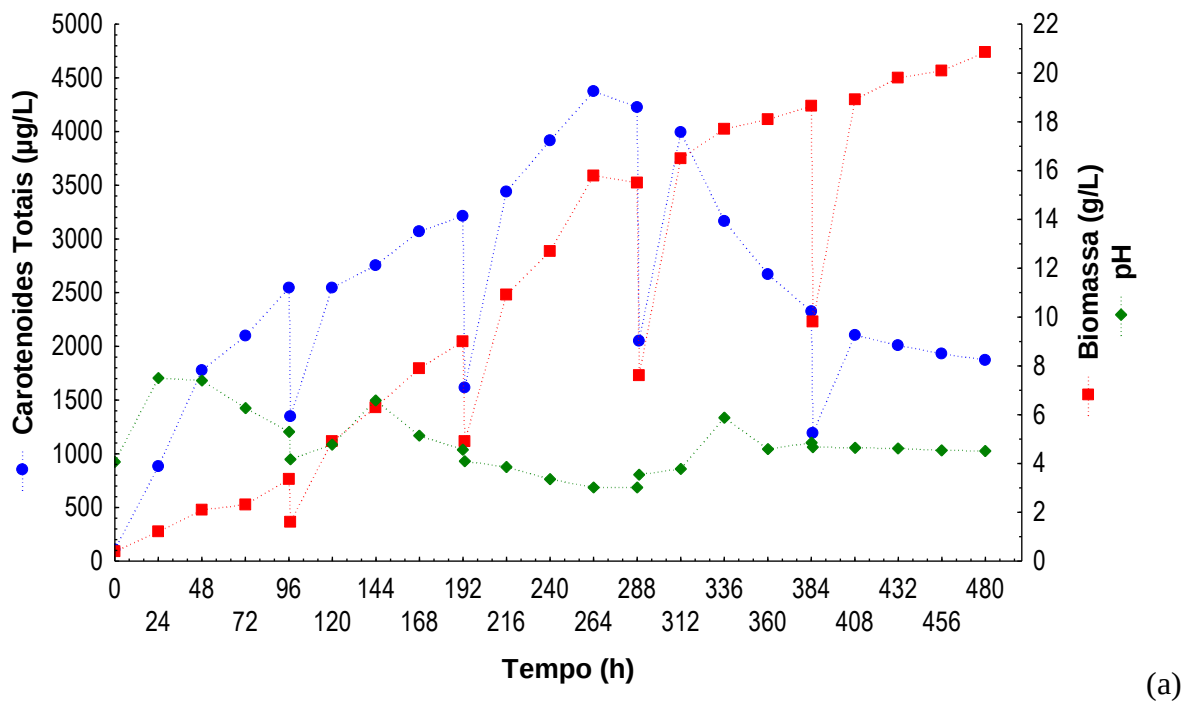
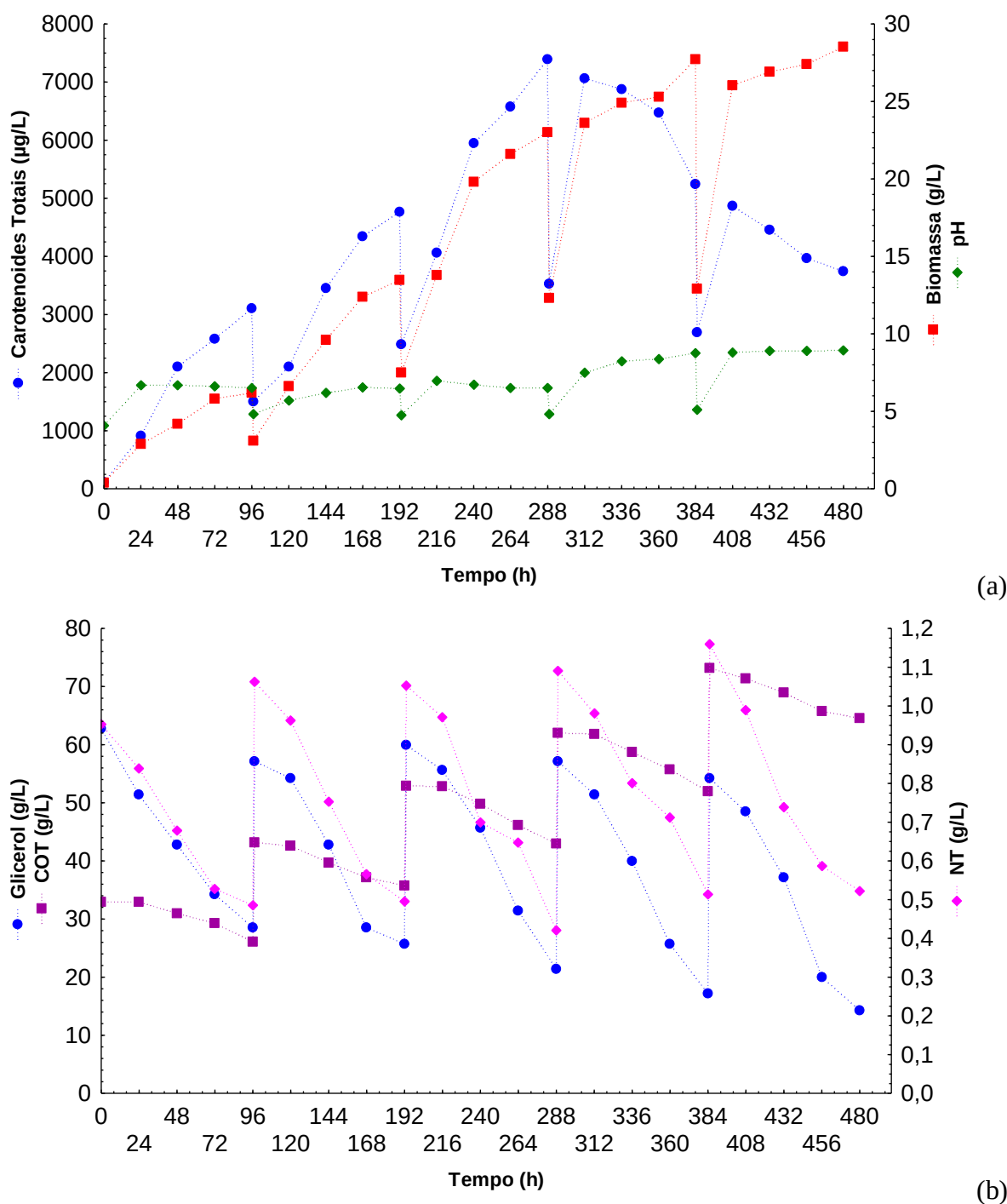


Figura 26 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa e pH (a), consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT (b) para o processo semicontínuo com meio agroindustrial (80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA, nas condições operacionais (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH inicial 4,0, corte de 50 % a cada 96 h até 480 h), respectivamente.



Assim, é conveniente levar o cultivo semicontínuo até um determinado período, quando as condições ideais de cultivo já não se fazem presentes, no caso específico do

presente estudo, o tempo seria de aproximadamente 264 h, sendo que após este período há um decréscimo da produção dos carotenoides e a produção de carotenoides deixa de ser associada a concentração de células (Figuras 25 e 26).

O pH é um dos parâmetros ambientais mais importantes que exercem influência no crescimento celular e formação de produto, e de forma geral este aumenta nas primeiras horas de fermentação (FRENGOVA et al., 1994). O pH no meio comercial diminui ao longo da bioprodução, mas no momento dos cortes ocorreu o aumento dos mesmos, porém com decréscimo na sequência chegando a maior produção de carotenoides no menor pH de 3,03 (Figura 25).

No meio agroindustrial (Figura 26) após 336 h de bioprodução ocorreu uma elevação no pH para 8,23, mantendo-se elevado até o final da bioprodução (480 h), exceto no momento do corte. Possivelmente, isto esteja relacionado à proteólise do microrganismo, fenômeno natural que ocorre após elevado consumo do substrato, principalmente quando a linhagem não utiliza outra fonte de carbono; como consequência da degradação de aminoácidos, há formação de amônia e esta pode ser responsável pela elevação do pH.

A Figura 27 mostra a produtividade em carotenoides do processo semicontínuo com meio comercial e agroindustrial ao longo do cultivo. Observa-se que o meio agroindustrial proporcionou a obtenção de maiores produtividades. Desta forma, sugere-se que os resíduos agroindustriais utilizados apresentaram nutrientes essenciais para a produção de carotenoides, dentre eles carbono e nitrogênio.

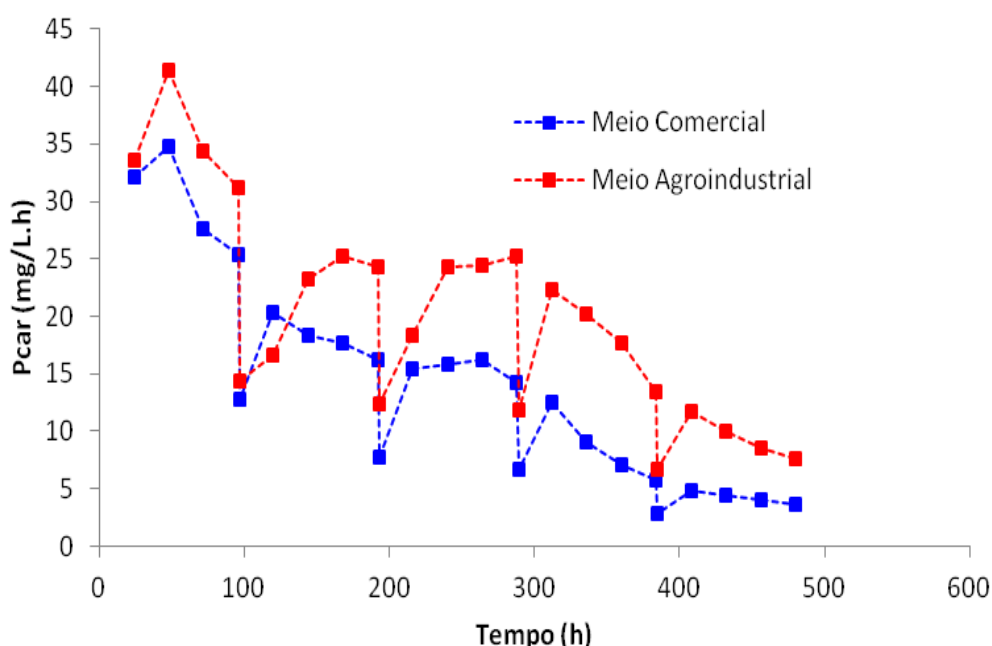
O meio agroindustrial tem maior teor de de alguns microelementos não presentes no meio comercial, como íons inorgânicos (MAIA, 2002). As leveduras exigem estes íons em concentrações tanto μM como mM para alcançar maiores aumentos de biomassa e rendimento em produto. Os microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente em função dos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais provocam alterações metabólicas significativas (SCHMIDT et al., 2011), resultando em um aumento na produção de biomassa. MENDES et al. (2013) comprovou estes dados com um estudo sobre o aumento da produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. A propagação realizada pelo processo semicontínuo foi mais eficiente do que o de batelada simples e a utilização de um meio agroindustrial suplementado com uma fonte proteica, tal como geralmente é realizado na propagação de

leveduras para produção de cachaça de alambique, forneceu aumentos de biomassa e melhores parâmetros de propagação, quando comparado com um meio comercial.

Porém, a queda da produção ao longo do processo pode ser explicada pela metabolização de compostos nitrogenados, liberando grande quantidade de amônia ao meio, quando se utilizou os resíduos. Esta hipótese concorda com os resultados observados no pH (Figura 25), nos quais se observa que há um grande aumento deste parâmetro nos meios agroindustriais ao contrário quando se utilizou meio comercial.

Figura 27 - Produtividade em carotenoides global (Pcar) ao longo da bioprodução em processo semicontínuo com meio comercial e agroindustrial com corte de 50%, a 1,5 vvm, 180 rpm, 25 °C, pH_{inicial} 4,0 e 480 h.



O meio agroindustrial tem maior teor de alguns microelementos não presentes no meio comercial, como íons inorgânicos (MAIA, 2002). As leveduras exigem estes íons em concentrações tanto μM como mM para alcançar maiores aumentos de biomassa e rendimento em produto. Os microelementos têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente em função dos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais provocam alterações metabólicas significativas (SCHMIDT et al., 2011), resultando em um aumento na produção de biomassa. MENDES et al. (2013) comprovou estes dados com um estudo sobre o aumento da produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e

semicontínuo para produção de cachaça. A propagação realizada pelo processo semicontínuo foi mais eficiente do que o de batelada simples e a utilização de um meio agroindustrial suplementado com uma fonte proteica, tal como geralmente é realizado na propagação de leveduras para produção de cachaça de alambique, forneceu aumentos de biomassa e melhores parâmetros de propagação, quando comparado com um meio comercial.

Porém, a queda da produção ao longo do processo pode ser explicada pela metabolização de compostos nitrogenados, liberando grande quantidade de amônia ao meio, quando se utilizou os resíduos. Esta hipótese concorda com os resultados observados no pH (Figura 25), nos quais se observa que há um grande aumento deste parâmetro nos meios agroindustriais ao contrário quando se utilizou meio comercial.

Nas Tabelas 17 e 18 são apresentados os principais parâmetros obtidos para a *S. salmonicolor*, calculados para os cinco cortes com a produção em meio comercial e a base de resíduos agroindustriais, respectivamente.

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em biorreator dos ensaios em regime semicontínuo com meio comercial.

Parâmetros	Meio Comercial		
	Valor máximo obtido	Corte	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicerol)	681	4	312
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em glicerol)	7,36	3	216
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	1313	1	48
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em COT)	1,34	1	48
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em nitrogênio)	45324	3	240
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	323,50	5	432
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	1042	1	72
P_x (g/L.h)	0,058	3	264
μ_x (h^{-1})	0,049	2	-

Tabela 18 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em biorreator dos ensaios em regime semicontínuo com meio agroindustrial.

Parâmetros	Meio Agroindustrial		
	Valor máximo obtido	Corte	Tempo de maior conversão (h)
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em glicerol)	833	3	193
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em glicerol)	2,49	3	193
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em COT)	990	1	48
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em COT)	1,90	1	48
$Y_{P/S}$ ($\mu\text{g/g}$) (Base em nitrogênio)	44530	4	336
$Y_{X/S}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	161,2	4	336
$Y_{P/X}$ ($\mu\text{g/g}$)	522	1	48
P_x (g/L.h)	0,104	1	24
μ_x (h^{-1})	0,084	1	-

Nestas condições, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para *S. salmonicolor* foi de 0,05 e 0,08 h^{-1} , respectivamente. A produtividade em células (P_x) máxima foi de 0,06 e 0,104 g/L.h e a produtividade em carotenoides totais é de 34,8 e 41,4 $\mu\text{g/L.h}$, respectivamente. Estes valores são superiores aos reportados em outros estudos realizados (VALDUGA *et al.*, 2009-2014; COLET *et al.*, 2015) em frascos agitados, batelada simples e batelada alimentada.

Comparando os processos de batelada alimentada e semicontínuo, se observou uma maior bioprodução quando se utilizou processo semicontínuo (7388 $\mu\text{g/L}$) com meio agroindustrial. Isto pode ser explicado devido os cortes terem ocorrido durante a fase exponencial do microrganismo, podendo assim ter uma maior bioprodução com uma mesma quantidade de substratos (LOURENÇO, 2006).

Ao se comparar a utilização de meio de bioprodução constituído somente de resíduos agroindustriais com o comercial, obteve-se uma maior concentração de carotenoides (7388 $\mu\text{g/L}$) quando se utilizou meio com resíduos agroindustriais. Esse resultado pode ser explicado devido aos ricos componentes presentes nestes resíduos (fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes) e a otimização dos mesmos.

4.6 Estudo do Controle do pH para a Produção de Carotenoides

A Tabela 19 apresenta o resumo dos máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos encontrados nos quatro ensaios representados pelas Figuras 34 (a) e (b) e 35 (a) e (b).

Tabela 19 – Máximos parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução em biorreator dos ensaios com e sem controle do pH em batelada alimentada e em processo semicontínuo.

Parâmetros	Sistemas de Produção de Carotenoides*			
	BA	BA4	SC	SC4
Carotenoides Totais (µg/L)	4753 ^c ± 173	4582 ^c ± 169	7388 ^a ± 218	5280 ^b ± 195
P _x (g/L.h)	0,076 ^b ± 0,004	0,074 ^b ± 0,004	0,104 ^a ± 0,008	0,066 ^c ± 0,003
µ _x (h ⁻¹)	0,045 ^c ± 0,002	0,045 ^c ± 0,002	0,084 ^a ± 0,004	0,055 ^b ± 0,004
Y _{P/X} (µg/g)	639 ^c ± 55	643 ^c ± 53	522 ^d ± 47	693 ^a ± 51

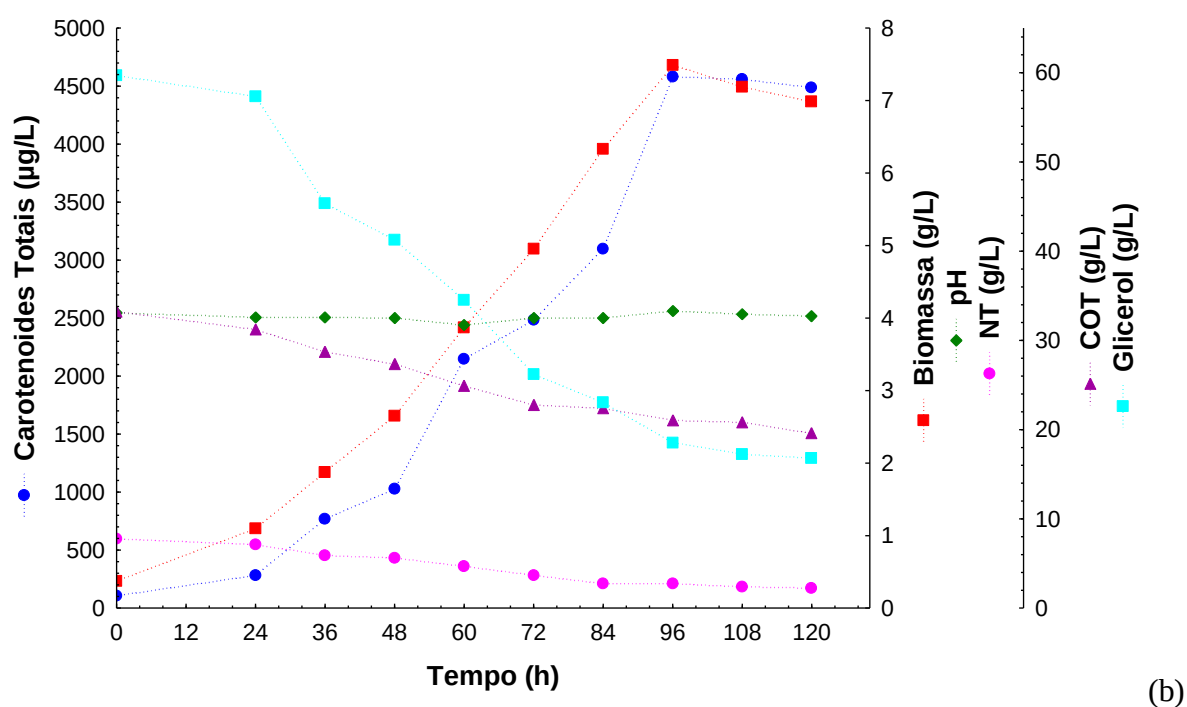
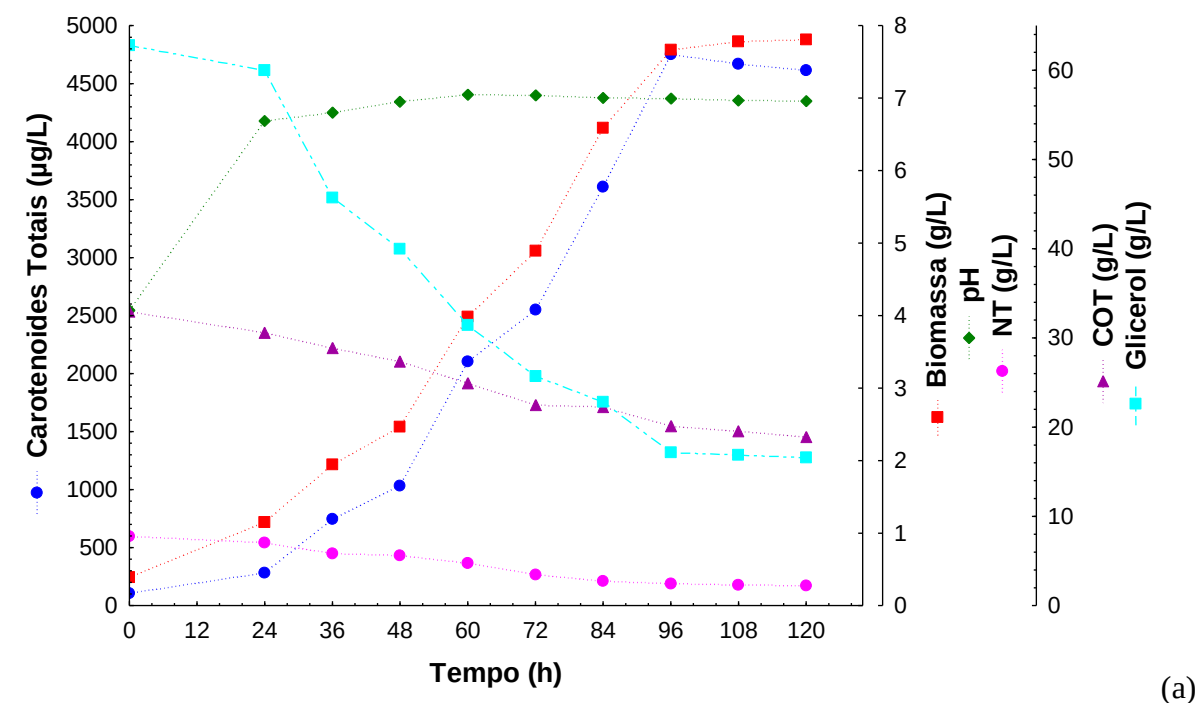
*BA e SC – Batelada alimentada e sistema semicontínuo sem controle do pH durante a bioprodução, BA4 = Batelada alimentada e semicontínuo mantendo o pH fixo em 4,0 durante a bioprodução.

Ao se comparar a utilização do controle ou não do pH do meio ao longo da bioprodução, observa-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) no processo semicontínuo, onde a concentração de carotenoide, a produtividade e a velocidade específica máxima de crescimento diminuíram (5280 µg/L, 0,066 g/L.h e 0,055 h⁻¹) quando se mantém fixo o pH (4,0) durante a bioprodução. De acordo com FRENGOVA et al. (1994) a biossíntese de carotenoides ocasiona mudanças do pH do meio de fermentação, como consequência do crescimento de leveduras.

De acordo com a Figura 28 (a) e (b) observa-se que não existe uma diferença significativa entre o processo em batelada alimentada com controle e sem controle do pH ao longo da bioprodução, obtendo uma máxima produção de carotenoides de 4582 µg/L e 4753 µg/L, respectivamente. VALDUGA et al. (2007; 2008) estudaram o efeito do pH inicial na concentração de carotenoides e biomassa de *S. salmonicolor* em frascos agitados, e verificaram que o melhor pH de crescimento se encontra entre 4,0 e 5,0, enquanto que a máxima produção de carotenoides se dá em pH 4,0, como a bioprodução com controle de pH

ocorreu nesta faixa, não houve diferença significativa entre os ensaios utilizando meio comercial.

Figura 28 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT para o Ensaio 1 em batelada alimentada sem controle de pH – BA (a) e com controle de pH – BA4 (b) (1,5 vvm, 180 rpm, 25°C, pH_{inicial} 4,0, 80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA, taxa de alimentação de 112,5 mL a cada 12 h).



Em ambos, verifica-se um comportamento associado do crescimento celular e da bioprodução de carotenoides. Estes resultados corroboram os resultados de FREITAS et al. (2014) no qual concluíram que os carotenoides produzidos pela levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 são produtos mistos, porque estão associados ao crescimento celular e a produção de carotenoides.

CALDEIRA (2015) obteve a maior produtividade de carotenoides (0,29 g/L.h) por *Rhodotorula glutinis* quando o pH do meio de cultura foi ajustado a 4,0 durante a fase de crescimento da levedura. Quando a cultura atingiu a fase estacionária, foi novamente ajustado para a 5,0 e utilização de uma turbina adicional adaptada ao eixo do rotor do biorreator, de modo a garantir uma transferência de oxigênio mais eficiente no meio de cultura, para promover a acumulação de produtos lipídicos de armazenamento, tais como os carotenoides.

Comparando as Figuras 29 (a) e (b) observa-se que existe uma diferença significativa entre o processo semicontínuo com controle e sem controle do pH ao longo da bioprodução com resíduos agroindustriais, obtendo-se uma máxima produção de carotenoides de 5280 µg/L e 7388 µg/L, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada ao se comparar com os resultados obtidos na Figura 26, onde a maior bioprodução de carotenoides ocorreu no pH 8, conseqüentemente controlar o pH em 4,0 não é favorável quando se utiliza meio de produção a base de resíduos agroindustriais.

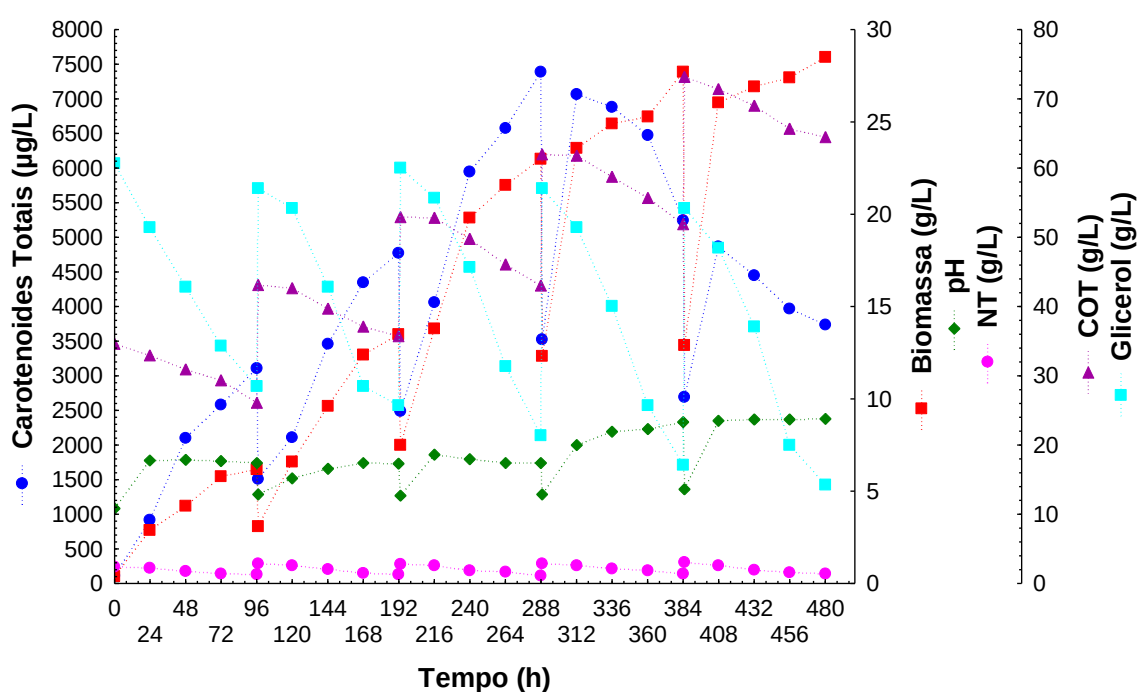
Esta diferença pode ser explicada através de alguns trabalhos que relatam que as condições ótimas para a produção de carotenoides não são as mesmas que para o crescimento celular, sendo uma estratégia para aumentar a produção de carotenoides um duplo estágio de controle do pH.

DIAS et al. (2015) observaram que o pH ideal para a produção de biomassa e lipídios pela levedura vermelha *R. toruloides* NCYC 921 é 4,0, e para a produção de carotenoides é 5,0. Com base nesta diferença, um controle de pH, na forma de duplo estágio foi estudado. Os resultados mostraram que quando a fase de crescimento da levedura foi realizada a pH 4,0, e a fase de acumulação de produtos foi realizada a pH 5,0, a biomassa, a produção de carotenoides totais e lipídios foram significativamente melhorados em comparação com o cultivo em batelada alimentada realizado no pH fixo (4 ou 5), obtendo uma produtividade de 2,35 g/Lh, 0,29 g/Lh e 0,40 g/Lh, respectivamente.

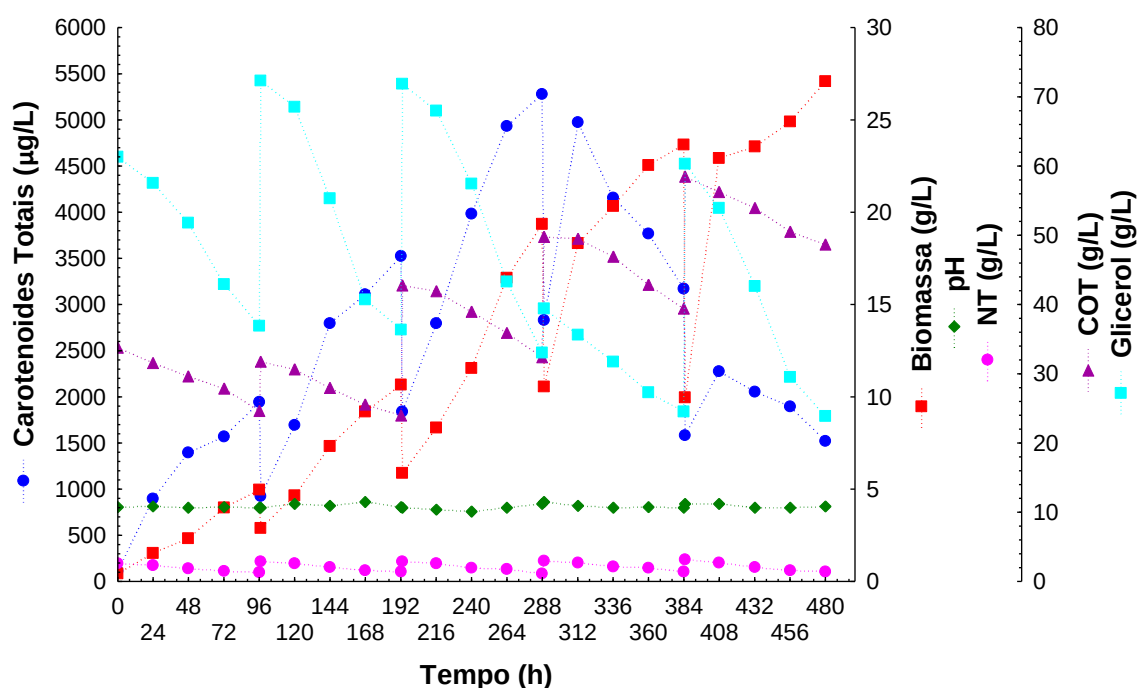
LUO et al. (2013) estudaram a influência do pH inicial no crescimento e produção de β-caroteno de uma levedura recombinante de vinho (*Saccharomyces cerevisiae* T73-63) num meio que continha suco de uva em frascos agitados. Os ensaios foram realizados nas

condições de 30 °C, 200 rpm em frascos agitados de 300 mL de meio. Os seus resultados demonstraram que o pH ótimo para o crescimento e produção de β -caroteno não eram os mesmos. A levedura cresceu melhor a pH 7 (10,1 g/L DCW) e produziu maior concentração em carotenoides a pH 5 (22,38 mg/L).

Figura 29 - Cinética de produção de carotenoides, biomassa, pH, consumo de matérias-primas: glicerol, COT e NT para o processo semicontínuo, sem controle de pH (SC) (a) e com controle de pH (SC4) (b) com meio agroindustrial (80 g/L de glicerol bruto, 80 g/L de AMM e 20 g/L de APA).



(a)



Os efeitos do pH (inicial e controlado) também foram estudados por HU et al. (2006), durante o cultivo de *X. dendrorhous* para produção de astaxantina. Na bioprodução em frascos agitados foram observados pH 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 biorreator, 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 o crescimento celular, HU et al. (2006) obtiveram a maior concentração de biomassa no pH 6,0 (17,2 g/L). Em função da variabilidade dos resultados, os autores desenvolveram uma estratégia de controle de pH com a finalidade de aumentar a produção de astaxantina. Como o fator de conversão $Y_{P/X}$ (1,5 mg/g) foi mais elevado em pH 4,0 e o maior crescimento celular foi em pH 6,0, os mesmos realizaram a bioprodução e nas primeiras 80 h manteve-se o pH em 6,0 e na sequência em 4,0. Com essa estratégia de cultivo, a concentração de astaxantina foi de 27,0 mg/L, proporcionando um aumento de 24,1 % em comparação com o cultivo em pH constante.

4.7 Determinação dos Carotenoides

O conjunto de carotenoides sintetizados pela levedura *S. salmonicolor* foram extraídos e identificados conforme descrito no item 3.5.7. Nove carotenoides foram detectados por HPLC (Figura 30) no extrato obtido por processo em batelada com meio comercial (COLET et al. 2015), sendo 5 identificados com base nas informações combinadas (ordem de eluição,

tempo de retenção, espectros de absorção, íons moleculares e fragmentos gerados) a partir da eluição cromatográfica (0 min – 5%; 0-30 min – 30%; 30-50 min – 50%; 50-60 min – 50%; 60-62 min – 5%; 62-67 min – 5%) em uma coluna C₃₀, características de UV-VIS e espectros de massa (Tabela 20).

Figura 30 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada com meio comercial.

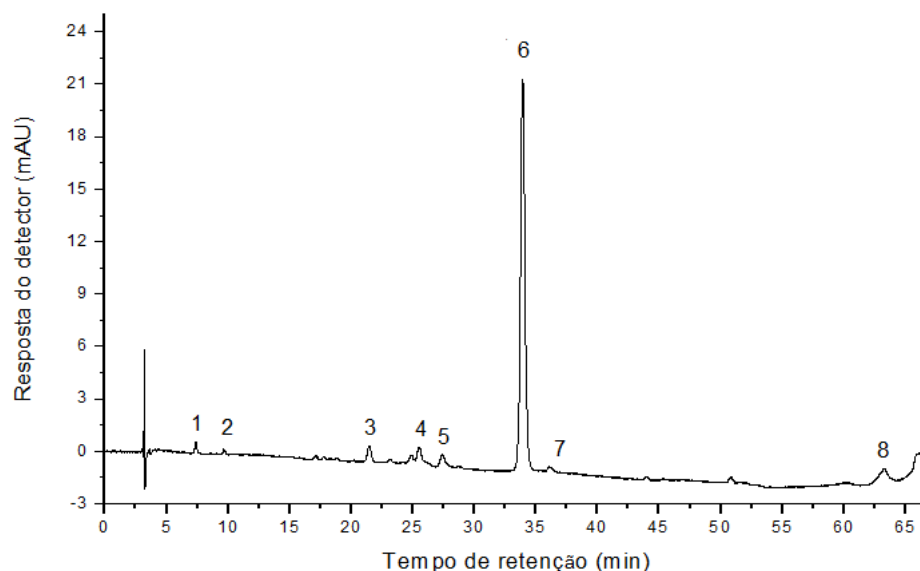


Tabela 20 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo em batelada com meio comercial conforme cromatograma da Figura 30.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	7,37	423	all-trans- β -apo-12'-caroteno	1,1	351	333
2	9,64	428	all-trans- β -apo-10'-caroteno	0,5	377	-
3	21,46	422 / 4450 / 475	all-trans- β -criptoxantina	2,9	553	535 / 461
4	25,51	405 / 426 / 451	não identificado	2,6	-	-
5	27,39	400 / 427 / 452	não identificado	2,6	-	-
6	33,92	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	85,2	537	399 / 444
7	36,07	446	não identificado	0,6	-	-
8	50,82	422 / 442 / 473	9-cis- β -caroteno	0,9	537	399 / 444
9	63,31	-	não identificado	3,4	-	-

Três carotenoides foram detectados por HPLC (Figura 31) no extrato obtido por processo em batelada com meio agroindustrial (COLET et al. 2015), sendo 2 identificados com base nas informações combinadas, com características de UV-VIS e espectros de massa (Tabela 21).

Figura 31 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada com meio agroindustrial.

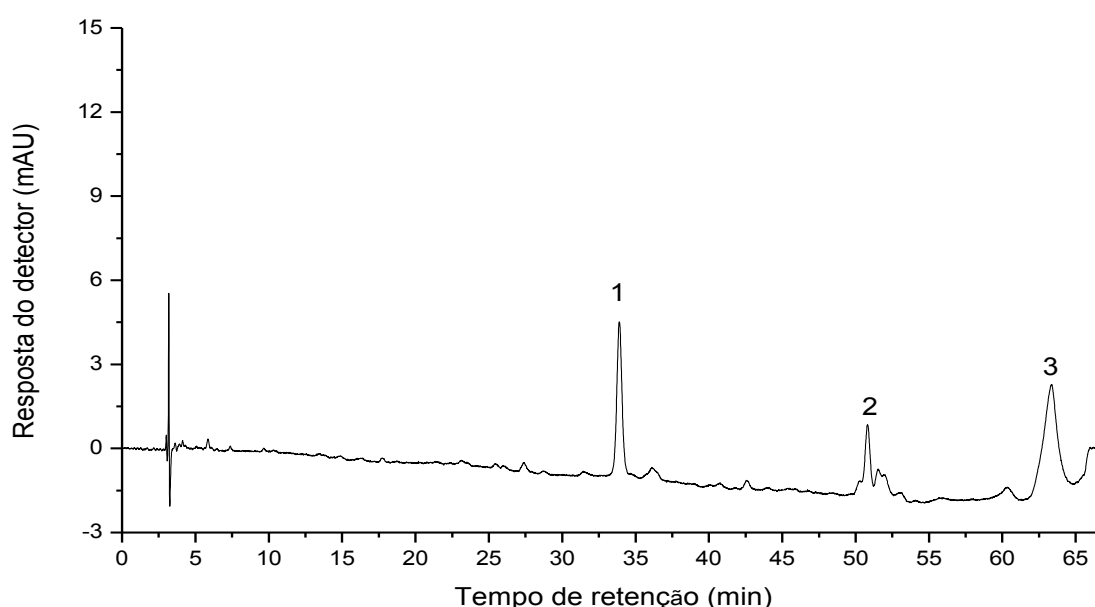


Tabela 21 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo em batelada com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 31.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	33,89	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	30,1	537	399 / 444
2	50,81	435 / 458 / 493	all-trans- γ -caroteno	9,9	537	499 / 368
3	63,36	450 / 481 / 518	não identificado	53,4	-	-

Comparando as Figuras 30 e 31 foi possível observar algumas diferenças entre os cromatogramas), o que confirmou a suposição de que a alteração da fonte de carbono no meio de cultivo em batelada resultaria na síntese de diferentes carotenoides. NELIS & DE LEENGHER (1989) afirmaram que carotenoides sintetizados por microrganismos não-

fototróficos podem variar de acordo com a natureza do substrato (hidrocarbônico ou não) utilizado no meio de crescimento. Com isso, o cromatograma dos carotenoides sintetizados em meio comercial em batelada, mostra que nesta condição, a levedura provavelmente sintetizou um maior número de pigmentos, já que os picos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 aparecem exclusivamente neste caso, enquanto que no cromatograma dos carotenoides sintetizados em meio com resíduos agroindustriais, somente o pico 1 apresenta semelhança a Figura 31, sendo o carotenoide majoritário, quantificado por análise semiquantitativa, levando em consideração a área, com 85 % e 30 % de all-trans- β -caroteno, respectivamente.

Resultados similares foram relatados por FU et al. (2013), que observaram alterações das quantidades proporcionais entre os carotenoides com a mudança da quantidade e da qualidade da luminosidade.

Três carotenoides foram detectados por HPLC (Figura 32 e Figura 33), e 3 carotenoides foram identificados com base nas informações combinadas a partir da eluição cromatográfica sobre uma coluna C₃₀, características de UV-VIS e espectros de massa (Tabela 22 e 23) das amostras em batelada alimentada com meio comercial (Figura 32) e com meio com resíduo agroindustrial (Figura 33), respectivamente.

Figura 32 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada Alimentada com meio comercial.

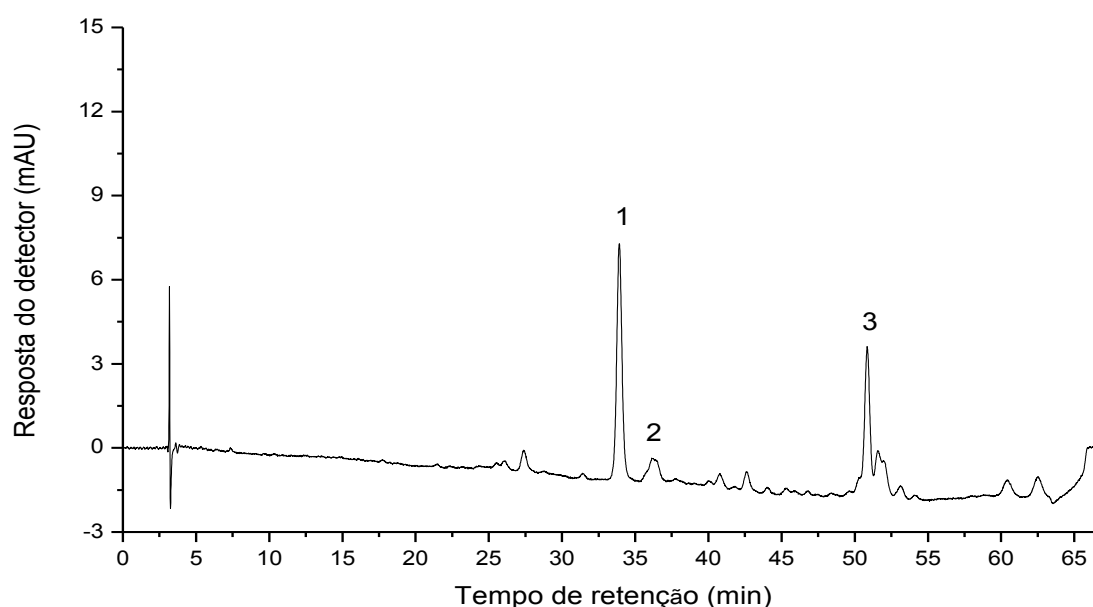
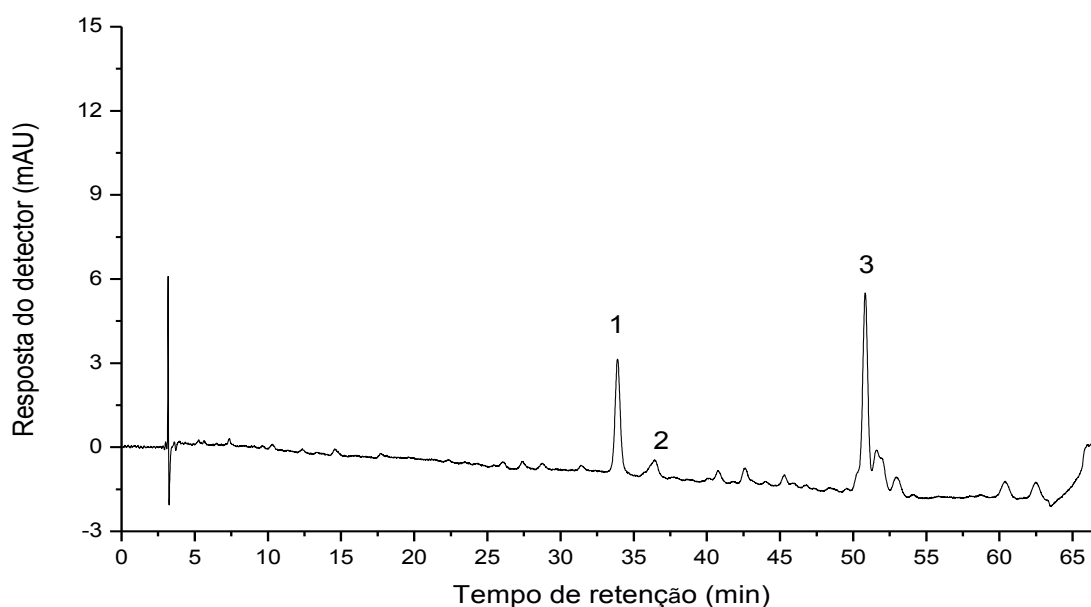


Tabela 22 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo em batelada alimentada com meio comercial conforme cromatograma da Figura 32.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	33,91	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	55,2	537	399 / 444
2	36,12	422 / 442 / 473	9-cis- β -caroteno	10,4	537	399 / 444
3	50,85	435 / 458 / 493	all-trans- γ -caroteno	26,1	537	499 / 368

Figura 33 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Batelada Alimentada com meio agroindustrial.



Nas Figuras 32 e 33 é possível observar que não houve diferença entre os cromatogramas, mesmo utilizando diferentes meios de bioprodução em processo batelada alimentada, obtendo o carotenoide majoritário all-trans- β -caroteno (55 %) e all-trans- γ -caroteno (49 %), respectivamente. Resultado similar a CHAGAS et al. 2015 avaliaram o crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* pela biofixação de CO₂ liberado pela produção de cerveja, onde se variou o tipo e a quantidade de CO₂ produzida pelas fermentações, através da quantidade de dextrose e o tempo de cultivo. Obtendo-se em todos os cultivos o mesmo perfil de carotenoides representando cerca de 46,7 $\pm$ 2,0% de leteína,

22,5±1,6% de β -caroteno, 9,50±0,66% de zeaxantina, 1,10±0,16% de α -caroteno e 20,2±3,0% para outros.

Tabela 23 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo em batelada alimentada com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 33.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	33,89	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	25,5	537	399 / 444
2	36,44	422 / 442 / 473	9-cis- β -caroteno	1,82	537	399 / 444
3	50,85	435 / 458 / 493	all-trans- γ -caroteno	48,8	537	499 / 368

Nove carotenoides foram detectados por HPLC (Figuras 34 e 35), sendo que 8 carotenoides foram identificados com base nas informações combinadas a partir da eluição cromatográfica sobre uma coluna C₃₀, características de UV-VIS e espectros de massa (Tabela 24 e 25) das amostras em sistema semicontínuo com meio comercial (Figura 34) e com meio com resíduo agroindustrial (Figura 35), respectivamente.

Figura 34 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Semicontínuo com meio comercial.

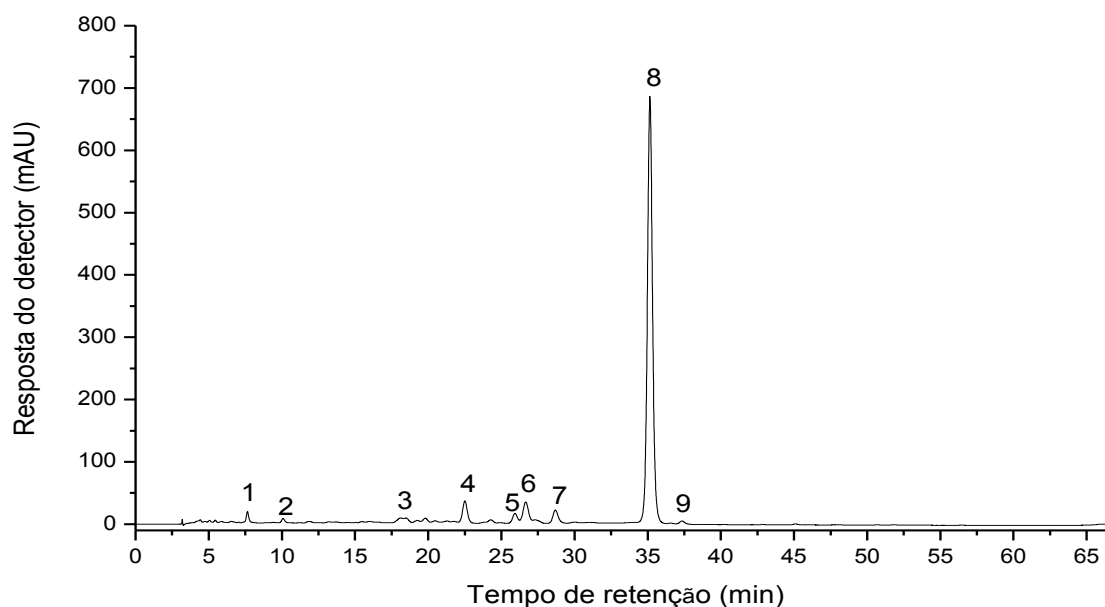


Tabela 24 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo semicontínuo com meio comercial conforme cromatograma da Figura 34.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	7,64	418	all-trans- β -apo-12'-caroteno	1,2	351	333
2	10,07	428	all-trans- β -apo-10'-caroteno	0,5	377	—
3	18,09	441	all-trans- β -apo-8'-caroteno	0,4	-	-
4	22,5	422 / 450 / 475	all-trans- β -criptoxantina	3,8	553	535 / 461
5	25,92	459	não identificado	1,9	-	-
6	26,66	400 / 427 / 452	all-trans- α -zeacaroteno	4,7	539	455
7	28,69	332 / 420 / 443 / 473	15-cis- β -caroteno	2,7	537	444
8	35,14	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	83,2	537	399 / 444
9	37,34	422 / 442 / 473	9-cis- β -caroteno	0,6	537	399 / 444

Figura 35 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos carotenoides por processo em Semicontínuo com meio com resíduos agroindustriais.

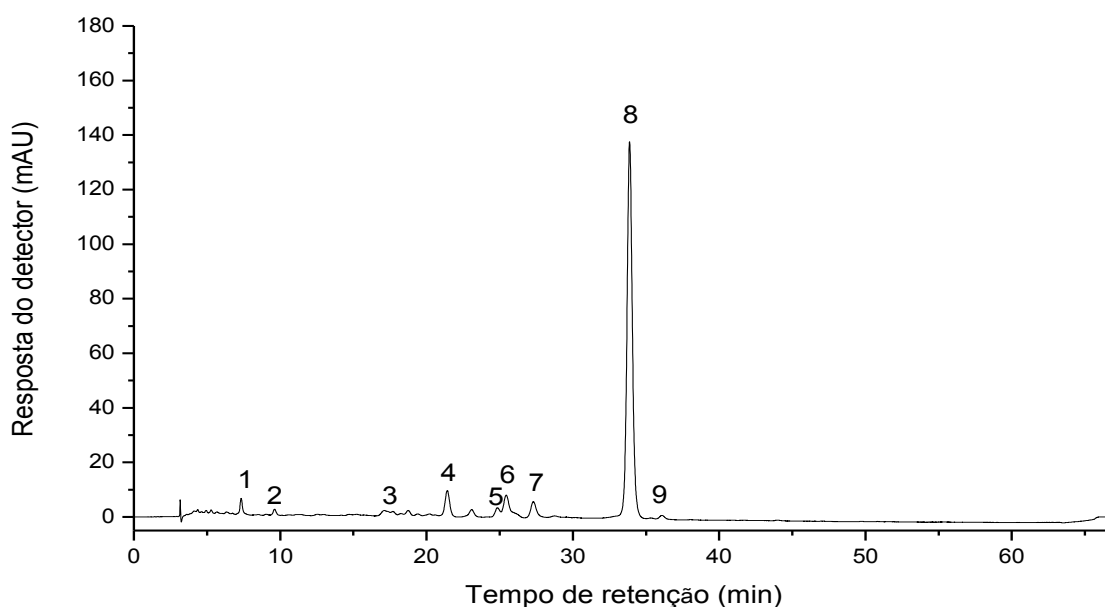


Tabela 25 – Composição dos carotenoides obtidos por *Sporidiobolus salmonicolor* do processo semicontínuo com meio com resíduos agroindustriais conforme cromatograma da Figura 35.

Número do pico	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Composição	Quantificação por área (%)	[M+H] ⁺ (m/z)	MS/MS (+) (m/z)
1	7,32	418	all-trans- β -apo-12'-caroteno	1,8	351	333
2	9,61	428	all-trans- β -apo-10'-caroteno	0,7	377	–
3	18,09	440	all-trans- β -apo-8'-caroteno	0,6	-	-
4	21,42	422 / 450 / 475	all-trans- β -criptoxantina	4,89	553	535 / 461
5	23,1	459	não identificado	1,5	-	-
6	25,4	400 / 427 / 452	all-trans- α -zeacaroteno	4,2	539	455
7	27,3	332 / 420 / 444 / 473	15-cis- β -caroteno	3,7	537	444
8	33,87	421 / 450 / 476	all-trans- β -caroteno	81,1	537	399 / 444
9	36,11	422 / 442 / 473	9-cis- β -caroteno	0,8	537	399 / 444

Nas Figuras 34 e 351 é possível observar que não houve diferença entre os cromatogramas, mesmo utilizando diferentes meios de bioprodução em processo semicontínuo, obtendo o carotenoide majoritário all-trans- β -caroteno (83 % e 81 %), respectivamente. ÚBEDA (2008) estudou a capacidade da bactéria *Kocuria rhizophila* de sintetizar carotenoides quando submetida ao crescimento em meio de cultivo contendo diferentes fontes de carbono: solúvel (sacarose) ou insolúvel (óleo de soja). Observou que existiu diferença entre meios de produção e os carotenoides identificados, onde o meio de cultivo contendo sacarose mostra-se que a bactéria provavelmente sintetizou um maior número de pigmentos.

Conclui-se através das Tabelas 20 a 25 e as Figuras 30 a 35 que o processo utilizado e o meio de bioprodução de carotenoides interfere diretamente na produção de diferentes compostos, porém observou-se que o carotenoide majoritário em ambos os processos é o β -caroteno com suas derivações.

Os espectros UV-Vis obtidos para cada um dos carotenoides extraídos forneceram importantes informações a respeito da estrutura fina qualitativa, apesar de não terem sido

suficientes para uma identificação quantitativa conclusiva, onde a espectrometria de massas apresentou interferentes.

5. CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

1. Ao correlacionar a produção de carotenoides em processo de batelada alimentada e semicontínuo empregando meio comercial (80 g/L de glicerina, 5 g/L de extrato de malte e 15 g/L de peptona), verifica-se uma maior concentração de carotenoides totais (4400 µg/L) em batelada alimentada, sendo 1,5 % superior ao atingido pelo sistema semicontínuo (4376 µg/L) com corte de 50 % (v/v).
2. No processo em batelada alimentada observa-se que não existe diferença significativa no uso de diferentes volumes de alimentação para bioprodução de carotenoides, ou seja, pode-se utilizar volumes diferentes ou equivalência da concentração das matérias-primas num mesmo volume de alimentação, que o resultado não varia estatisticamente.
3. A máxima produção de carotenoides em sistema semicontínuo foi de 7388 µg/L em 288 h, com corte de 50 % a cada 96 h, ao utilizar meio otimizado à base de resíduos agroindustriais (80 g/L de AMM, 80 g/L de glicerol bruto e 20 g/L de APA), demonstrando um incremento de aproximadamente 55 % na concentração quando comparado ao processo de batelada alimentada (4753 µg/L em 96 h).
4. O processo semicontínuo apresenta-se como uma alternativa para o aumento da bioprodução de carotenoides em biorreator, sendo obtida uma produtividade em células (Px) de 0,104 g/L.h e em carotenoides totais de 41,4 µg/L.h, com velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para *S. salmonicolor* igual 0,08 h⁻¹.
5. No processo semicontínuo após o terceiro corte a bioprodução de carotenoides reduziu devido a possíveis inibidores produzidos pelos microrganismos.
6. O controle do pH ao longo da bioprodução de carotenoides não apresenta diferença significativa no processo que utiliza meio comercial, porém no caso do meio a base de resíduos agroindustriais, o controle do pH em 4,0 apresentou uma queda de aproximadamente 40 % na produção de carotenoides quando comparado ao processo sem controle de pH.

7. O processo utilizado (batelada, batelada alimentada e semicontínuo) e o meio de bioprodução (comercial ou com resíduos agroindustriais) interferem diretamente na produção e identificação dos carotenoides produzidos por *Sporodiobolus salmonicolor*. O carotenoide majoritário em ambos os processos é o all-trans- β -caroteno, com 85 %, 45 % e 83 %, respectivamente para o meio comercial e com 30 %, 49 % e 81 %, respectivamente para o meio com resíduos agroindustriais.

8. A produção de carotenoides, usando como meio os resíduos agroindustriais, torna-se uma alternativa para o aproveitamento do glicerol bruto, resíduo da indústria de biodiesel, substrato rico em carbono, de baixo custo e abundante no Brasil, e também de água de maceração de milho e de água de parboilização de arroz.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Através da experiência adquirida neste trabalho acerca da bioprodução de carotenoides em biorreator, podem-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

1. Realizar bioprodução com alterações no pH durante as fases de bioprodução;
2. Realizar a quantificação dos carotenoides nos três sistemas de bioprodução;
3. Avaliar os efeitos da luminosidade sobre o crescimento celular da levedura *S. salmonicolor* (CBS 2636) e produção de carotenoides;
4. Modelagem matemática do processo otimizado;
5. Realizar o microencapsulamento dos carotenoides produzidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIR, N.; PENICAUD, C.; BECHOFF, A.; BOULANGER, R.; DORNIER, M.; DHUIQUE-MAYER, C. Use of multi-response modelling to investigate mechanisms of beta-carotene degradation in dried orange-fleshed sweet potato during storage: from carotenoids to aroma compounds. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 6, p. 1656-1669, 2014.
- AMARTEY, S.A.; LEUNG, J.P.C. Corn Steep Liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus Stearothermophilus* T-13. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, p. 65-71, 2000.
- ARAÚJO, M.E.M. Corantes naturais para têxteis – da Antiguidade aos tempos modernos. **Conservar Patrimônio**, n. 2-4, p. 39-51, 2006.
- AKSU, Z.; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985–2991, 2005.
- AKSU, Z.; EREN, A.T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107–113, 2007.
- AKUFFO, K.O.; NOLAN, J. M.; HOWARD, A. N.; MORAN, R.; STACK, J.; KLEIN, R.; KLEIN, B. E.; MEUER, S. M.; SABOUR-PICKETT, S.; THURNHAM, D. I.; BEATTY, S. Sustained supplementation and monitored response with differing carotenoid formulations in early age-related macular degeneration. **Eye – Clinical Study**, v. 29, p. 902-912, 2015.
- AUSICH, R.L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 2169-2173, 1997.
- AUTENRIETH, C.; GHOSH, R. Random mutagenesis and overexpression of rhodopin-3,4-desaturase allows the production of highly conjugated carotenoids in *Rhodospirillum rubrum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 572, p. 134-141, 2015.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, **McGraw- Hill Book Company**, 2ed., p. 984, 1986.
- BALDERMANN, S; KATO, M; KUROSAWA, M; KUROBAYASHI, Y; FUJITA, A; FLEISCHMANN, P; WATANABE, N. Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the

floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. **Journal of experimental botany**, v. 61, p. 2967-2977, 2010.

BARBATO, J. Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* SP. em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura. **Trabalho de conclusão de curso** em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, Paraná, 2014.

BARBOSA, N. A.; PAES, M. C. D.; GUIMARÃES, P. E. O.; PEREIRA, J. Carotenoid retention in minimally processed biofortified green corn stored under retail marketing conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, p. 363-371, 2015.

BANZATTO, D.; FREITA, L.A.; MUTTON, M.J.R. Produção de carotenoides por *Rhodotorula rubra* cultivada em caldo, melão e xarope de cana-de-açúcar. **Food Science and Technology**, v.33, n.1, p. 14-18, 2013.

BCC Research: The global market for carotenoids, julho de 2015 [<http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025e.html>] - acessado em 11/01/2016.

BELLÃO, C.; ANTONIO, T.; ARAUJO, M.L.; BADINO JR, A.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 257-266, 2013.

BERNSTEIN, P. S.; LI, B.; VACHALI, P. P.; GORUSUPUDI, A.; SHYAM, R.; HENRIKSEN, B. S.; NOLAN, J. M. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 50, p. 34-66, 2016.

BHOSALE, P.; JOGDAND, V.V.; GADRE, R.V. Stability of β -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 584–590, 2003.

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

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

- BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. Microbial *xanthophylls*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 445-455, 2005.
- BOEKHOUT, T. Heterobasidiomycetes: Systematics and Applied Aspects. **Studies in Mycology**. n. 38, 1995.
- BORZANI, W.; SHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnología Industrial**. Editora Edgard Blucher Ltda., v.II., São Paulo, 2001.
- BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por *Rhodotorula* sp. Cnpq-02 em processo batelada para obtenção de carotenóides. **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Fortaleza/ CE, 2010.
- BRASIL. Resolução - CNNPA Nº 44, DE 1977, disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/29906780474588e892cdd63fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES Acesso em 18 de janeiro de 2016.
- BREITENBACH, J; VISSER, H; VERDOES, J. C; VAN OUYEN, A. J; SANDMANN, G. Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Biotechnology letters**, v. 33, p. 755-761, 2011.
- BRITTON, G. General carotenoids methods. **Methods in Enzymology**, v. 111, p. 113-149, 1985.
- BRITTON, G.; HORNERO-MÉNDEZ D. Carotenoids and colour in fruit and vegetables. In *Phytochemistry of fruit and vegetables*. Edited by Tomás-Barberán, F.A. & Robins, R.J. **Clarendon Press**, Oxford, p. 11-27, 1997.
- BÜHLER, R. M. M.; MÜLLER, B. L.; MORITZ, D. E.; VENDRUSCOLO, F.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. Influence of Light Intensity on Growth and Pigment Production by *Monascus ruber* in Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 1277-1289, 2015.
- BURRI, B.J. LIN, Y.; NEIDLINGER, T.R.; MULLER, H.G.; DUEKER, S.R.; CLIFFORD, A.J. Estimating the concentration of beta-carotene required for maximal protection of low-density lipoproteins in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 837-845, 1998.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v.11, n. 224, p. 569-573, 1984.

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

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

CABRAL, M.M.S.; CENCE, K.; ZENI, J.; TSAI, S.M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L.L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research & Technology** (Print), v. 233, p. 159-166, 2011.

CALDEIRA, J.P.R.A. Production of lipids (for biodiesel) and carotenoids from the yeast *Rhodotorula glutinis* grown in a bench reactor, in a fed-batch system. **Dissertação de Mestrado** de Microbiologia Aplicada, Universidade de Lisboa, 2015.

CARDOSO, L.A.C.; JACKEL, S.; KARP, S.G.; FRAMBOISIER, X.; CHEVALOT, I.; MARC, I. Improvement of *Sporobolomyces ruberrimus* carotenoids production by the use of raw glycerol. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 374-379, 2016.

CARIS-VEYRAT, C. Antioxidant and prooxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products. In: SOCACIU, C. Food colorants: chemical and function properties. **Washington: CRC Press**, p. 177-195, 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, p. 793-797, 2010.

CHAGAS, A.L.; RIOS, A.O.; JARENKOW, A.; MARCÍLIO, N.R.; AYUB, M.A.Z.; RECH, R. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 981-988, 2015.

CHAVES, M.B.; LIBARDI JR, N.; BORGES, G.M.; WISBECK, E.; GERN, R M.M.; FURLAN, S.A.; FURIGO JR, A. Production of bioactive substances in fed-batch and semi-

continuous culture by *Pleurotus Ostreatus*. **Chemical Engineering Transactions**, v.38, p. 307- 312, 2014.

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

CHIMSUNG, N.; TANTIKITTI, C.; MILLEY, J.E.; VERLHAC-TRICHET, V.; LALL, S.P. Effects of various dietary factors on astaxanthin absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture Research**, v. 45, n. 10, p. 1611-1610, 2014.

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

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and fatty acids present in oils extracted from palm fruits. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 31, p. 309-320, 2013.

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

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

CONSTANT, P.B L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim doCEPPA**, v. 20, n. 2, 2002

COOPER, D.A.; ELDRIDGE, A.L.; PETERS, J.C. Dietary carotenoids and lung cancer: a review of recent research. **Nutrition Reviews**, v. 57, n. 5, p. 133-145, 1999.

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

COUNSELL, J. Some synthetic carotenoids as food colours. In Developments in food colour. Edited by Walford Journal London: **Applied Science**, p. 151-187, 1980.

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.

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

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

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Carotenoids. In: Natural colorants for food and nutraceutical uses. **CRC**, New York, 2003.

DELI, J.; GONDA, S.; NAGY, L.Z.; SZABO, I.; GULYAS-FEKETE, G.; AGOCS, A.; MARTON, K.; VASAS, G. Carotenoid composition of three bloom-forming algae species. **Food Research International**, v. 65, p. 215-223, 2014.

DIAS, C.; SOUSA, S.; CALDEIRA, J.; REIS, A.; SILVA, T. L. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R.; PONCE-NOYOLA, T.; TORRES-MUÑOZ, J.A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 75, p. 783–791, 2007.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; McGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.G.; YOUNG, A.J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 430, n. 1, p. 37-48, 2004.

EL-BEITUNE, P.; DUARTE, G.; NUNES, E.M.; QUINTANA, S.M.; VANNUCHI, H. Deficiência da vitamina A e associações clínicas: revisão. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 4, p. 355-363, 2003.

ESTEBAN, R.; MORANA, J. F.; BECERRILB, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 63-75, 2015.

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

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

FARIA, A. F.; HASEGAWA, P. N.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; PURGATTO, E.; MERCADANTE, A. Z. Cultivar influence on carotenoid composition of loquats from Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 196–203, 2009.

FERRAO, M.; GARG, S. Shake flask optimization of β -carotene production in *Rhodotorula graminis* RC04. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 52, p. 11431-11437, 2012.

FERREYRA, M.M.; SCHVAB, M.C.; DAVIES, C.V.; GERARD, L. M.; SOLDA, C.A. Obtención de vinagre de naranja en proceso semicontinuo, a escala laboratorio. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, v. 25, n. 49, p. 154-165, 2014.

FERON, G.; DUFOSSE, L.; PIERARD, E.; BONNARME, P.; QUERE, J. L.; SPINNLER, H. Production, Identification, and Toxicity of g-Decalactone and 4-Hydroxydecanoic Acid from *Sporidiobolus spp.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2826-2831, 1996.

FERON, G.; DUFOSSÉ, L.; MAUVAIS, G.; BONNARME, P.; SPINNLER, H. E. Fatty acid accumulation in the yeast *Sporidiobolus salmonicolor* during batch production of gamma-decalactone. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, n. 1, p. 17-24, 1997.

FREITAS, A.S. Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012.

FREITAS, C.; NOBRE, B.; GOUVEIA, L.; ROSEIRO, J.; REIS, A. New at-line cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. **Process Biochemistry**, v. 49, p.554-562, 2014.

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

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

FRENGOVA, G. I. ; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 163–80, 2009.

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

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 1, p. 48-54, 2000.

FU, W.; Guðmundsson, O.; Paglia, G.; Herjólfsson, G.; Andr sson, O. S.; Pals on, B. O.; Brynj lfsson, S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2395-403, 2013.

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

GALINATO, M.G.; NIEDZWIEDZKI, D.; DEAL, C.; BIRGE, R.R, FRANK, H.A. Cation radicals of xanthophylls. **Photosynthesis Research**, v. 94, n. 1, p. 67-78, 2007.

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

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized

mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 5, p. 629-634, 2003.

GOMES, L.M.M. Petito, N.; Costa, V. G.; Falcão, D. Q.; Araújo, K. G. L. Inclusion complexes of red bell pepper pigments with b-cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. **Food Chemistry**, v. 148, p. 428–436, 2014. .

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

HANNIBAL, L.; LORQUIN, J.D.; ORTOLI, N.A.; GARCÍA, N.; CHAINTREUIL, C.; MASSON-BOIVIN, C.; DREYFUS, B.; GIRAUD, E. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium* sp. Strain ORS278. **Journal Bacteriol**, v. 182, p. 3850–3853, 2000.

HENRARD, A.A.; MORAIS, M.G.; FERNANDES, K.B.; COSTA, J.A.V. Cultivo de *Cyanobium* sp. em fotofotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo. In: **Anais do XVII COBEQ**, Recife, Brasil, 2008.

HENRARD, A.A.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp.. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897-4900, 2011.

HORIBE, T.; QIAN, P.; HUNTER, C. N.; HASHIMOTO, H. Stark absorption spectroscopy on the carotenoids bound to B800–820 and B800–850 type LH2 complexes from a purple photosynthetic bacterium, *Phaeospirillum molischianum* strain DSM120. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 572, p. 158-166, 2015.

HU, Z.C.; ZENG, 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.

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

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

JAIME, L.; RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I.; CIFUENTES, A.; SANTOYO, S.; SUAREZ, S.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORANS, F.J. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Science and Technology** v. 43, p. 105–112, 2010.

JEONG, J.S.; KIM I.H. Effect of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on growth performance, meat quality, and fecal noxious gas emission in broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 12, p. 3138-3144, 2014.

JOHNSON, E.A.; LEWIS, M. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, p. 173–183, 1979.

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

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

KRINSKY, N.I. The biological properties of carotenoids. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

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

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts: A Taxonomic Study, edição 5, Amsterdam: **Elsevier**, 2011.

LEE, S.; CHENG, H.; CHEN, W.; CHOU, C. Effect of physical factors on the production of γ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 845-850, 1999.

LIAAEN-JENSEN, S. Combined approach: identification and structure elucidation of carotenoids. In: Carotenoids: Spectroscopy, v. 1B. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Birkhäuser, Basel**, p. 343, 1995.

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

LIRA, L.Q.; DIMENSTEIN, S. Vitamina A e Diabetes Gestacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p.355-9, 2010.

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.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações. **São Carlos: Editora RiMa**, 2006.

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

LOWE, G.M.; VLISMAS, K.; YOUNG, A.J. Carotenoids as prooxidants? **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 363-369, 2003.

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

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

LUO, H.; NIU, Y.; DUAN, C.; SU, H.; YAN, G. A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 195-200, 2013.

MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; ARROUSSI, H. E.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13-19, 2015.

MACHADO, W.R.C.; BURKERT, J.F.M. Produção de carotenoides microbianos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 6, n. 2, p. 59-69, 2014.

MAIA, A.B.R.A. Equipamentos para a produção de cachaça. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 23, n. 217, p. 63-66, 2002.

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

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

MANERA, A.P.; ORES, J.C.; RIBEIRO, V.A.; RODRIGUES, M.I.; KALIL, S.J.; MAUGERI FILHO. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2011.

MANOWATTANA, A.; SEESURIYACHAN, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T. Optimization of carotenoids production by red yeast *Sporobolomyces pararoseus* TISTR5213 using waste glycerol as the sole carbon source. **KKU Research Journal of Humanities and Social Sciences**, v. 17, n. 4, 607-621, 2012.

MANTZOURIDOU, F.; TSIMIDOU, M.Z.; NAZIRI, E. Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 56, p. 2668–2675, 2008.

MAROVA, I.; CARNECKA, M.; HALIENOVA, A.; CERTIK, M.; DVORAKOVA, T.; HARONIKOVA, A. Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p.338-342, 2011.

MATA-GÓMEZ, L.C.; MONTAÑEZ, J.C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 12, p. 1-11, 2014.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenóides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas**, v. 54, n. 2, p. 149-155, 2004.

MENDES, T.A.O.; PINTO, L.M.; MENDES, D.S.O.; MALTA, H.L.; OLIVEIRA, E.S. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013.

MENDONÇA, J.K. Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias. f. 97. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MERCADANTE, A.Z. Analysis of carotenoids. In: Food colorants – chemical and functional properties. C. Socaciu. **CRC**, New York, p. 447-478, 2008.

MIAO, L.; CHI, S.; TANG, Y.; SU, Z.; YIN, T.; GUAN, G.; LI, Y. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. **FEMS yeast research**, v. 11, n. 2, p. 192-201, 2011.

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

MÍNGUEZ-MOSQUEIRA, I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids and provitamin A in functional foods. In: HURST, W.J. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. **CRC Press**, p. 101-158, 2002.

MISAWA, N.; SHIMADA, H. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 169-181, 1998.

MIURA, Y.; KONDO, K.; SHIMADA, H.; SAITO, T.; NAKAMURA, K.; MISAWA, N. Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 2 e 3, p. 306, 1998.

MOAT, A.G.; FOSTER, J.W.; SPECTOR, M.P. Microbial physiology, Moat, A.G.; Foster, J.W.; Spector, M.P., eds, **Wiley-Liss**, p. 363, 2002.

MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; ROOCK, M. VAN. Production of Torularhodin, Torulene, and β -Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. **Microbial Carotenoids From Fungi**, v. 898, p. 275-283, 2012.

MOLLER, P.; LOFT, S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. **Mutation Research: fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 551, n. 1-2, p. 79-89, 2004.

- MONKS, L.M.; TIGGEMANN, L.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; VALDUGA, E. Assessment of carotenoids recovery through cell rupture of *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 using compressed fluids. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2353-2359, 2012.
- MONKS, L.M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.
- MONTANTI, J.; NGHIEM, N.P.; JOHNSTON, D.B. Production of astaxanthin from cellulosic biomass sugars by mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 5, p. 655-65, 2011.
- MONTERO, O.; MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; LAMA, C.M.; LUBIÁN, L.M.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; OSSA, E.M. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from a marine strain of the *Cyanobacterium synechococcus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9701-9707, 2005.
- MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L.H.; TRUSCOTT, T.G. The interaction of dietary carotenoids with radical species. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 13-19, 2001.
- NASRABADI, M.R.N.; RAZAVI, S.H. Use of response surface methodology in a fed-batch process for optimization of tricarboxylic acid cycle intermediates to achieve high levels of canthaxanthin from *Dietzia natronolimnaea* HS-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 361-368, 2010.
- NASRABADI, M.; RAZAVI, S. Optimization of β -carotene production by a mutant of the lactose-positive yeast *Rhodotorula achenorium* from whey ultrafiltrate. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, p. 445-454, 2011.
- NELIS, J.; DE LEENHEER, A. P. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. In: VANDAMME, J. E. Microbial production of carotenoids other than β -caroteno. **Elsevier Applied Science**, p. 15-26, 1989.
- NG, I.W.; ADAMS, P.G.; MOTHERSOLE, D.J.; VASILEY, C.; MARTIN, E.C.; LANG, H.P.; TUCKER, J.D.; NEIL, H.C. Carotenoids are essential for normal levels of dimerisation of the RC-LH1-PufX core complex of *Rhodobacter sphaeroides*: characterisation of R-26 as a crtB (phytoene synthase) mutant. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, n. 9, p. 1056-1063, 2011.

NUNES, M.; VIEIRA, A.A.H.; PINTO, E.; CARNEIRO, R.L.; MONTEIRO, A.C. Carotenogênese em células de *Haematococcus pluvialis* induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.8, p. 825-832, 2013.

OECD—FAO Agricultural Outlook 2008–2017. <http://www.oecd.org/trade/agricultural-trade/40715381.pdf>. Acessado em 19 de janeiro de 2016.

OLIVEIRA, V.E.; MIRANDA, M.A.C.N.; SOARES, M.C.S.; EDWARDS, H.G.M.; OLIVEIRA, L.F.C. Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 373-380, 2015.

OLSON, J.A. Bioavailability of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, n. 1, p. 21-25, 1999.

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

OTERO, A.; DOMÍNGUEZ, A.; LAMELA, T.; GARCÍA, D.; FÁBREGAS, J. Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 227, p. 23-34, 1998.

PANIAGUA-MICHEL, J.; CAPA-ROBLES, W.; OLMOS-SOTO, J.; GUTIERREZ-MILLAN, L.E. The carotenogenesis pathway via the isoprenoid- β -carotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from baja California Mexico. **Marine Drugs**, v. 7, p. 45-56, 2009.

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

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

PASSWATER, R.A. All about antioxidants. **Avery Publishing Group**, p. 96, 1998.

PAZZOTI, G.S.O. Utilização de corantes na indústria que processa balas, pirulitos e chicletes. **Revista Científica UNILAGO**, 2011. Disponível em: [http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/UTILIZA%](http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/UTILIZA%20)

C3%87%C3%83O%20DE%20CORANTES%20NA%20IND%C3%9ASTRIA%20QUE%20PROCESSA%20BALAS,%20PIRULITOS%20E%20CHICLETES.pdf. Acesso em: 15 jan. 2015.

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, n. 19, p. 4229-4231, 2010.

PRIBYL, P.; CEPÁK, V.; KASTÁNEK, P.; ZACHLEDER, V. Elevated production of carotenoids by a new isolate of *Scenedesmus* sp. **Algal Research**, v. 11, p. 22-27, 2015.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 97-111, 2006.

RADMANN, E.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**, v. 265, p. 118-126, 2007.

RAMÍREZ, J.; OBLEDO, N.; ARELLANO, M.; HERRERA, E. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a fedbatch culture using a low cost medium feeding. **Revista Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis**, v. 4, art. 5, p. 1- 9, 2006.

RAZAVI, S.H.; MARCH, I. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. **Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering** v.25, n. 3, p. 59-64, 2006.

REYNDERS, M.B.; RAWLINGS, D.E.; HARRISON, S.T.L. Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 649–654, 1996.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. São Paulo: Edgard Blucher, 1. ed, p. 155-157, 2004.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 343-350, 2009.

RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Rice parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 4, p. 401-410, 2015.

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

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; BRANCO, R. F.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol for the production of ribonucleotides and microbial biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 7, p. 2054-2067, 2012.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and phenolic compounds from solanum sessilif lorum, an unexploited amazonian fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3022-3029, 2013.

RODRIGUES, D.B.; FLORES, E.M.M.; BARIN, J.S.; MERCADANTE, A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, p. 144-148, 2014.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Latin american food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, n. 3, p. 74-84, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Brasília: **Ministério de Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas**, p. 99, 2008.

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

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

SA, T.N.M.; LANDIM, P.G.C.; LEITE, A.K.F.; RODRIGUES, S. Produção de carotenóides por leveduras isoladas do bagaço do caju. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - X

Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013, Foz do Iguaçu. **Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2013.

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

SAINI, R.K.; NILE, S.H.; PARK, S.W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735-750, 2015.

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.

SANTOS, R.C.; NEVES, M.C.R.; KAELE, J.D.B.; BONFIM, T.M.B. Carotenoids produced by the halophilic archaea *Halorubrum saccharovorum*. In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2014, Porto Alegre. **Anais do VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada**, p. 218-218, 2014.

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

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, p. 294–297, 2001.

SAKAKI, H.; NOCHIDE, H.; KOMEMUSHI, S.; MIKI, W. Effect of active oxygen species on the productivity of torularhodin by *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, (Suppl 21), p. 338–340, 2002.

SCHAFER, F.Q.; WANG, H.P.; KELLEY, E.E.; CUENO, K.L.; MARTIN, S.M.; BUETTNER, G.R. Comparing β -carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 671-681, 2002.

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

SCHMIDELL, W.; SOARES, H.M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R.J.; BERTOLA, N.C.; CONTREAS, E.M. Tratamento Biológico de Águas Residuárias. **Florianópolis: Ed. Tribo da Ilha**, 2007.

SCHMIDT, S.A.; DILLON, S.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P.A.; CHAMBERS, P.J. Impacts of variations in elemental nutrient concentration of Chardonnay musts on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation kinetics and wine composition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 679-687, 2011.

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

SILVA, A.S.; CRUZ, A.J.G.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. The effect of the addition of invert sugar on the production of cephalosporin C in fed-batch bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 15, p. 320-325, 1998.

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

SILVA, P.L.L. Avaliação comparativa da formação de biomassa, astaxantina e parede celular das cepas mutante PR-18 e selvagem da levedura *Phaffia rhodozyma*. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas** - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2008.

SILVA, M. L. C.; KOBLITZ, M. G. B.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina. Ciências Agrárias** (Impresso) , v. 31, p. 669-681, 2010.

SILVA, C.M.; BORBA, T.M.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, p. 1556-3758, 2012a.

SILVA, S. S.; RIVALDI, J. D. ; SARROUH, B F ; BRANCO, R F ; MANCILHA, I. M. ; SILVA, S. S. . Biotechnological Utilization of Biodiesel-Derived Glycerol for the Production of Ribonucleotides and Microbial Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 2054-2067, 2012b.

SONG, J.; LI, D.; HE, M.; CHEN, J.; LIU, C. Comparison of Carotenoid Composition in Immature and Mature Grains of Corn (*Zea Mays* L.) Varieties. **International Journal of Food Properties**, v.19, n. 2, p. 351-358, 2016.

SÖZER, Ö. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria. Ph.D. **Thesis. University of Szeged**. Biological Research Centre. Hungarian Academy of Sciences Szeged, p. 1-90, 2011.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology** v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.

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. **Current Genetics**, v. 55, p. 175-184, 2009.

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

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

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

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100-110, 2004.

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

TASKIN, M.; SISMAN, T.; ERDAL, S.; BASARAN, E.K. Use of waste chicken feathers as peptone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 657-665, 2011.

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

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

TSAI, H.; CHUANG, L.; CHEN, C.N. Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis sp.* DS3. **Food Chemistry**, v. 192, p. 682-690, 2016.

TURCSI, E.; MURILLO, E.; KURTÁN, T.; SZAPPANOS, Á.; ILLYÉS, T. Z.; GULYÁS-FEKETE, G.; AGÓCS, A.; AVAR, P.; DELI, J. Isolation of β -Cryptoxanthin-epoxides, Precursors of Cryptocapsin and 3'-Deoxycapsanthin, from Red Mamey (*Pouteria sapota*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 6059-6065, 2015.

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

US DIETARY REFERENCE. **Food and Nutrition Information Center**, <https://fnic.nal.usda.gov/> - Acesso em 15 de janeiro de 2015.

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

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

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; VANZO, L.T.; RAUBER, F.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1060 - 1065, 2009.

VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TREICHEL, H.; FURIGO JÚNIOR, A.; LUCCIO, M.D. Optimization of the bio-production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS

2636) using response surface technique. **Food and Bioprocess Technology: An international Journal**, v. 2, p. 415-421, 2009a.

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

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

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; DI 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, 2009d.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; VANZO, L.T.; RAUBER, F.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Assessment of hydrolysis of cheese whey and use of hydrolysate for bioproduction of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1060 - 1065, 2009e.

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

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A.H.R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 207-213, 2014.

VALLVERDU-QUERALT, A.; REGUEIRO, J.; ALVARENGA, J.F.R.; TORRADO, X.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Carotenoid profile of tomato sauces: Effect of cooking time and content of extra virgin olive oil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9588-9599, 2015.

VARZAKAKOU, M.; ROUKAS, T.; PAPAIOANNOU, E.; KOTZEKIDOU, P.; LIAKAPOULOU-KYRIAKIDES, M. Autolysis of *Blakeslea trispora* during carotene

production from cheese whey in an airlift reactor. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 7-21, 2011.

VENIL, C.K.; ZAKARIA, Z.A.; AHMAD, W.A. Review: Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemical**, v. 48, p. 1065–1079, 2013.

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

VERONEZI, C.M.; JORGE, N. Carotenoides em abóboras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 9-20, 2011.

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

VÍLCHEZ, C.; FORJÁN, E.; CUARESMA, M.; BÉDMAR, F.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 319-33, 2011.

VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1265–1271, 2006.

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.

WOODALL, A.A.; BRITON, G.; JACKSON, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1336, n. 3, p. 575-586, 1997.

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

- WU, J.; CHO, E.; WILLETT, W. C.; SASTRY, S. M.; SCHAUMBERG, D. A. Intakes of Lutein, Zeaxanthin, and Other Carotenoids and Age-Related Macular Degeneration During 2 Decades of Prospective Follow-up. **JAMA Ophthalmology**, v. 33, n. 12, p. 1415-1424, 2015.
- XAVIER, A. A. O.; MERCADANTE, A. Z.; DOMINGOS, L. D.; VIOTTO, W. H. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2057-2062, 2012.
- YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 30, p. 147-194, 1984.
- YAMANE, Y.I.; HIGASHIDA, K.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4471-4478, 1997.
- YUAN, G.L.; LIANG, H.Y.; WANG, Z.Q.; YANG, X.F.; LIU, D.; LIU, J.F.; DUAN, C.Q. Important role of catalase in the production of β -carotene by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under H_2O_2 stress. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1056-1061, 2011.
- YUAN, F.; QIAN, M. C. Development of C_{13} -norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir grapes. **Food Chemistry**, v. 192, p. 633-641, 2016.
- YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n.1, p. 20-27, 2001.
- ZEPKA, L. Q.; MERCADANTE, A. Z. Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. **Food Chemistry**, v. 117, p. 28-34, 2009.
- ZHU, Y.; GRAHA, J. E.; LUDWIG, M.; XIONG, W.; ALVEY, R.M.; SHEN, G.; BRYANT, D.A. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, p. 86-99, 2010.

APÊNDICE

Tabela 26 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para Ensaio 1 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,39	4,07	109	32,9	0,953	62,8
24	1,15	6,68	285	30,6	0,864	59,9
24'	0,97	5,91	197	34,3	0,970	66,93
36	1,95	6,80	746	28,9	0,717	45,7
36'	1,52	6,03	665	32,3	0,822	52,75
48	2,47	6,95	1032	27,4	0,686	39,9
48'	1,98	6,21	881	31,0	0,789	46,96
60	3,98	7,05	2101	24,9	0,581	31,4
60'	3,06	6,38	1848	28,7	0,690	38,42
72	4,90	7,04	2550	22,5	0,426	25,7
72'	4,11	6,51	2232	26,2	0,532	32,79
84	6,59	7,00	3612	22,2	0,338	22,8
84'	5,51	6,43	3106	25,6	0,445	29,80
96	7,66	6,99	4753	20,1	0,302	17,1
96'	6,97	6,45	4187	23,6	0,406	24,14
108	7,78	6,97	4671	19,5	0,287	16,9
108'	7,02	6,42	4091	22,9	0,395	23,97
120	7,81	6,96	4615	18,9	0,272	16,6

Tabela 27 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o Ensaio 2 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,4	4,02	111	33,5	0,949	61,3
24	1,4	6,61	672	31,0	0,921	57,1
24'	0,9	5,97	614	33,5	0,991	61,8
36	1,5	7,1	698	30,5	0,892	51,4
36'	1,1	6,34	642	33,2	0,954	56,2
48	1,9	7,42	843	28,1	0,854	45,7
48'	1,6	6,91	792	30,7	0,926	50,4
60	2,2	7,74	975	27,0	0,795	42,8
60'	1,8	7,12	918	30,0	0,867	47,5
72	3,0	7,56	1576	25,1	0,753	40,0
72'	2,4	6,87	1524	27,4	0,819	44,7
84	3,9	7,35	2192	23,7	0,700	34,3
84'	3,2	6,89	1952	26,2	0,779	39,0
96	5,2	7,02	3306	23,0	0,529	25,7
96'	4,8	6,53	2930	25,5	0,596	30,7
108	5,7	6,99	3071	22,6	0,507	24,1
108'	5,1	6,51	2859	24,9	0,576	29,1
120	6,0	6,95	2924	22,4	0,493	22,4

Tabela 28 – Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,36	4,09	108	35,6	0,913	56,4
24	1,2	6,68	572	32,8	0,849	45,7
24'	1,0	6,43	541	37,7	0,990	55,2
36	1,4	6,97	769	32,0	0,824	42,8
36'	1,2	6,72	743	27,2	0,964	51,9
48	1,9	6,99	849	31,0	0,798	40,0
48'	1,6	6,81	816	35,2	0,945	49,4
60	2,8	7	1224	30,6	0,635	37,1
60'	2,4	6,76	1198	35,2	0,779	46,2
72	3,0	7,25	1267	30,3	0,605	34,3
72'	2,6	7,02	1217	34,9	0,752	43,5
84	3,8	7,23	1518	29,2	0,569	31,4
84'	3,5	7,03	1490	34,1	0,709	40,8
96	5,1	7,12	1894	28,4	0,537	28,5
96'	4,7	7	1878	32,5	0,685	38,3
108	5,6	7,10	1843	27,8	0,516	27,2
108'	5,1	6,96	1827	32,4	0,658	36,4
120	5,9	7,07	1792	27,2	0,504	26,5

Tabela 29 – Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 2 em batelada alimentada com diferente e igual volume de alimentação, porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial.

Tempo (h)	Carotenoides Totais (µg/L) 75 mL de Alimentação	Carotenoides Totais (µg/L) 112,5 mL de Alimentação
0	111	114
24	672	653
36	698	707
48	843	852
60	975	961
72	1576	1548
84	2192	2212
96	3306	3294
108	3071	3011
120	2924	2918

Tabela 30 – Cinética da bioprodução de carotenoides para o Ensaio 3 em batelada alimentada com diferente e igual volume de alimentação, porém com equivalência de matérias-primas utilizando meio com resíduo agroindustrial.

Tempo (h)	Carotenoides Totais (µg/L) 150 mL de Alimentação	Carotenoides Totais (µg/L) 112,5 mL de Alimentação
0	109	105
24	572	566
36	768	763
48	849	852
60	1224	1230
72	1267	1257
84	1518	1522
96	1894	1879
108	1721	1717
120	1473	1469

Tabela 31 - Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,32	4,05	135	31,5	0,932	59,6
24	1,2	7,50	880	32,9	0,934	57,1
48	2,1	7,40	1778	31,7	0,812	48,5
72	2,3	6,27	2099	31,0	0,689	40,0
96	3,4	5,29	2543	28,0	0,548	34,3
97	1,6	4,17	1347	44,7	1,172	74,2
120	4,9	4,78	2544	44,5	0,924	51,4
144	6,3	6,59	2755	42,8	0,875	42,8
168	7,9	5,13	3071	39,8	0,798	34,3
192	9,0	4,56	3212	38,4	0,615	31,4
193	4,9	4,09	1614	55,2	1,275	65,7
216	10,9	3,86	3438	55,2	1,091	61,4
240	12,7	3,35	3916	52,9	0,869	45,7
264	15,8	3,02	4376	46,0	0,604	31,4
288	15,5	3,03	4224	44,9	0,543	30,0
289	7,6	3,54	2053	62,6	1,137	61,4
312	16,5	3,79	3995	61,2	1,019	57,1
336	17,7	5,87	3166	60,0	0,854	45,7
360	18,1	4,60	2668	58,4	0,732	31,4
384	18,7	4,85	2325	56,2	0,68	22,8
385	9,8	4,68	1191	73,6	1,254	57,1
408	18,9	4,64	2103	72,7	1,156	54,2
432	19,8	4,61	2007	70,7	0,893	42,8
456	20,1	4,54	1933	69,6	0,805	25,7
480	20,9	4,52	1871	67,8	0,664	20,0

Tabela 32 - Cinética da bioprodução de carotenoides, biomassa da levedura *Sporidiobolus salmonicolor*, evolução do pH e consumo de carbono orgânico total, nitrogênio e glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	pH	Carotenóides Totais (µg/L)	Carbono Orgânico Total (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	Glicerol (g/L)
0	0,42	4,07	129	34,6	0,921	60,7
24	2,9	6,68	914	32,9	0,839	51,4
48	4,2	6,7	2098	30,9	0,678	42,8
72	5,8	6,63	2582	29,3	0,527	34,3
96	6,2	6,52	3106	26,1	0,486	28,5
97	3,1	4,81	1505	43,1	1,062	57,1
120	6,6	5,7	2105	42,6	0,962	54,2
144	9,6	6,2	3455	39,7	0,753	42,8
168	12,4	6,54	4349	37,1	0,566	28,5
192	13,5	6,48	4771	35,7	0,495	25,7
193	7,5	4,75	2488	52,9	1,052	60,0
216	13,8	6,98	4063	52,8	0,971	55,7
240	19,8	6,72	5945	49,8	0,7	45,7
264	21,6	6,51	6575	46,1	0,647	31,4
288	23,0	6,51	7388	43,0	0,421	21,4
289	12,3	4,81	3528	62,0	1,091	57,1
312	23,6	7,49	7067	61,8	0,98	51,4
336	24,9	8,23	6877	58,7	0,801	40,0
360	25,3	8,37	6471	55,7	0,712	25,7
384	27,7	8,75	5247	51,9	0,513	17,1
385	12,9	5,12	2694	73,2	1,159	54,2
408	26,0	8,81	4866	71,4	0,989	48,5
432	26,9	8,89	4454	69,0	0,739	37,1
456	27,4	8,89	3973	65,7	0,587	20,0
480	28,5	8,92	3741	64,5	0,522	14,3

Figura 36 - Linearização do crescimento celular da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) no Ensaio 1 (a) e no Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

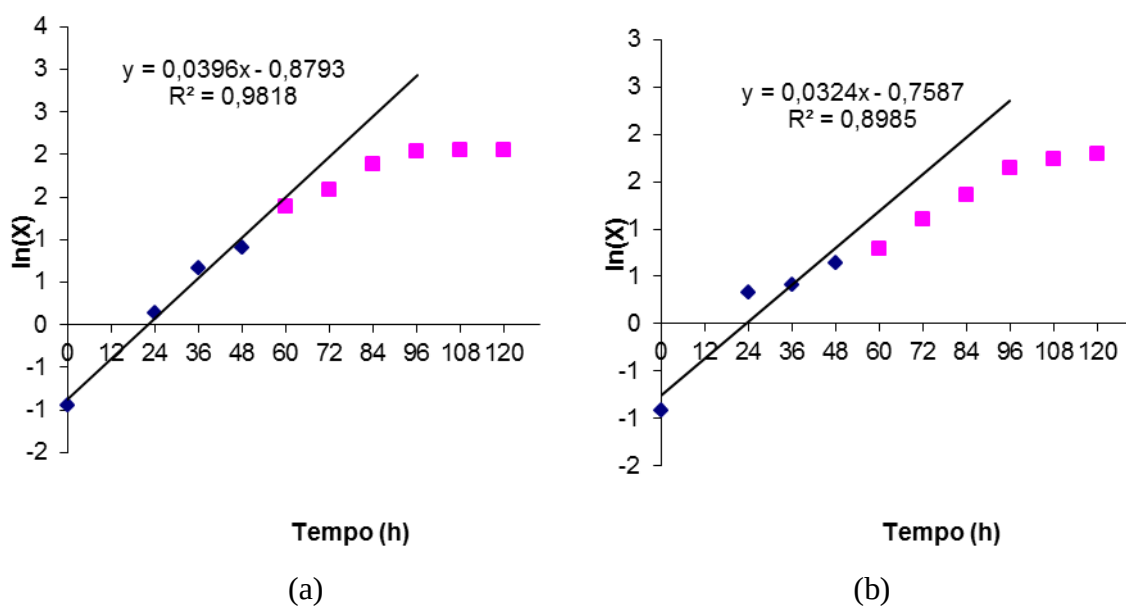


Figura 37 - Linearização do crescimento celular da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) no Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

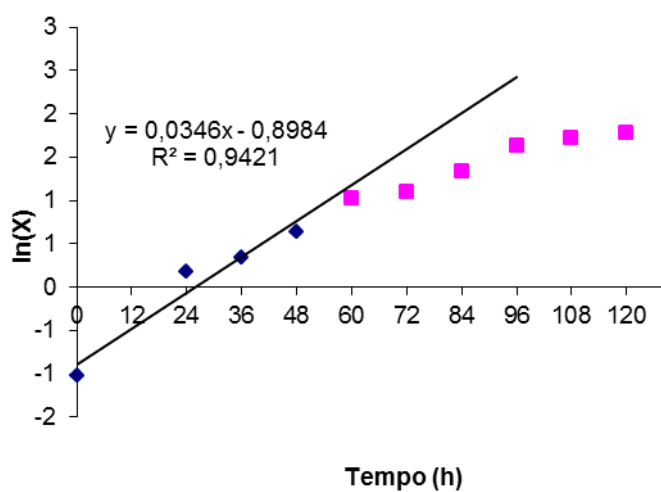


Figura 38 - Linearização do crescimento celular da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) no processo semicontínuo com meio comercial.

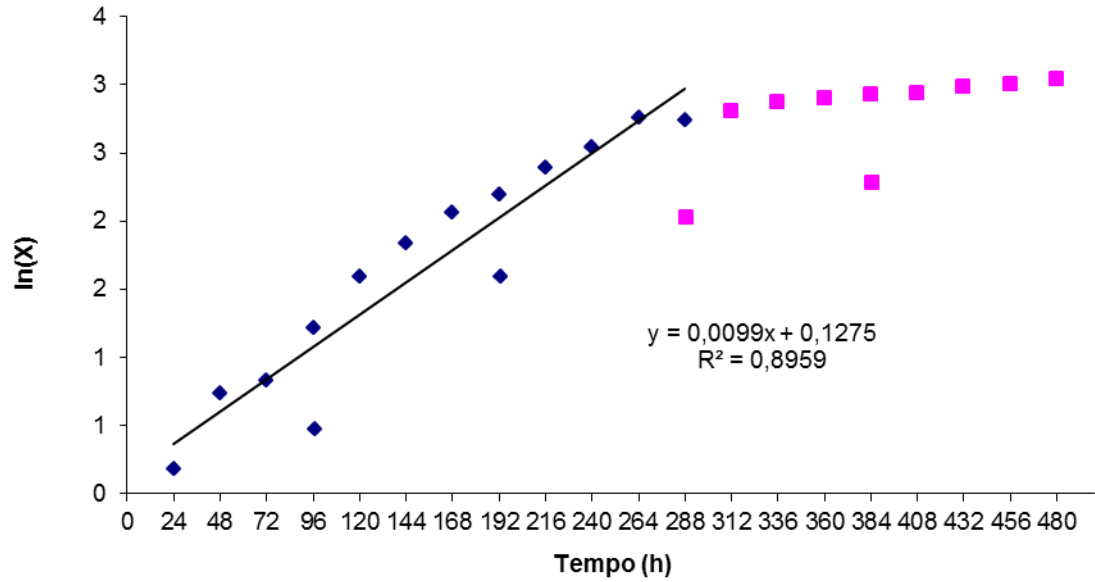


Figura 39 - Linearização do crescimento celular da levedura *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) no processo semicontínuo com meio agroindustrial.

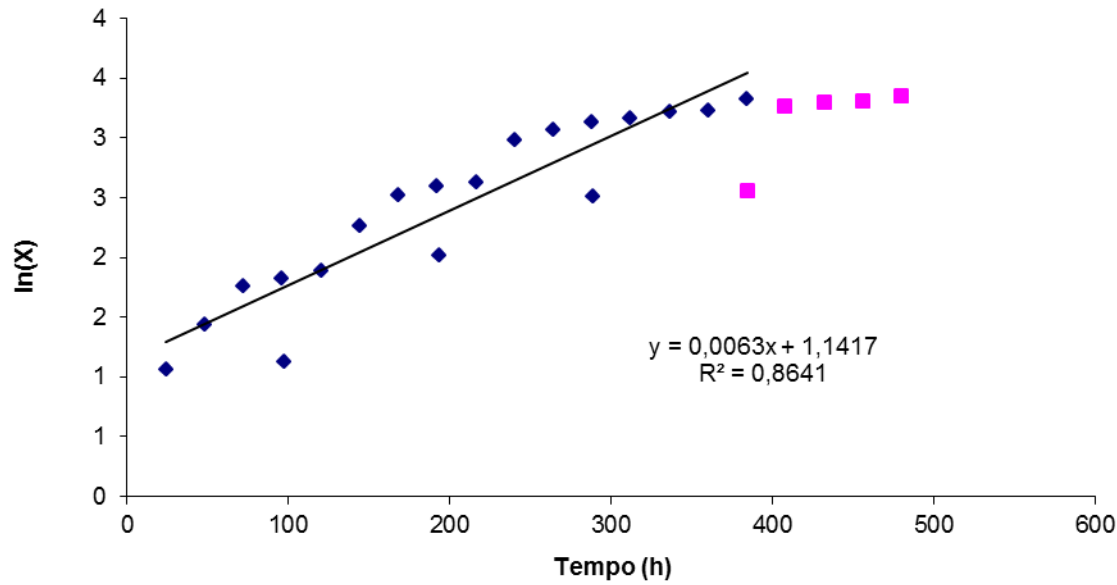


Figura 40 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

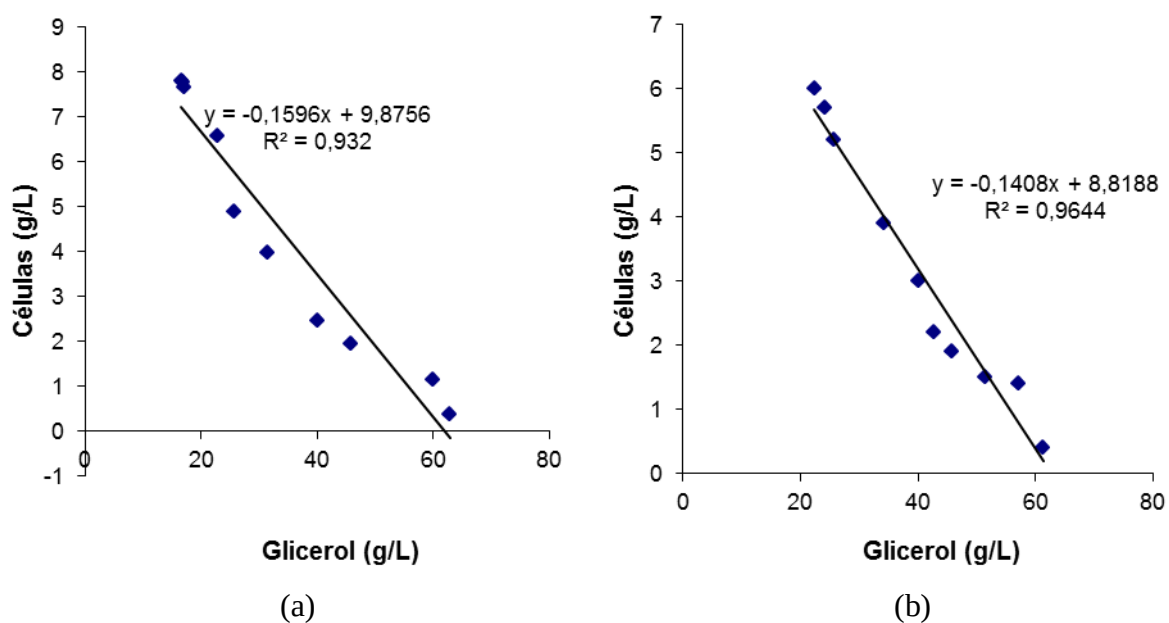


Figura 41 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

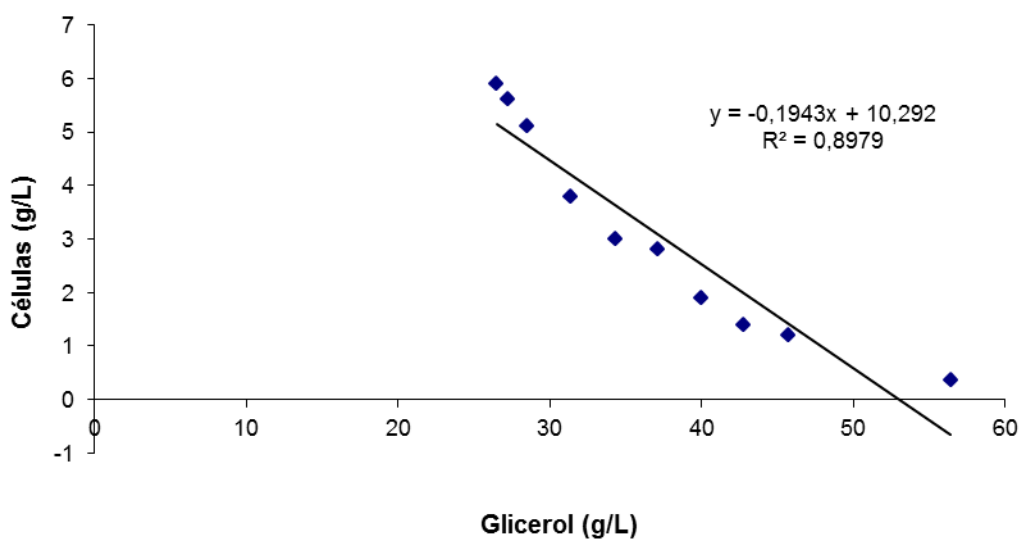


Figura 42 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.

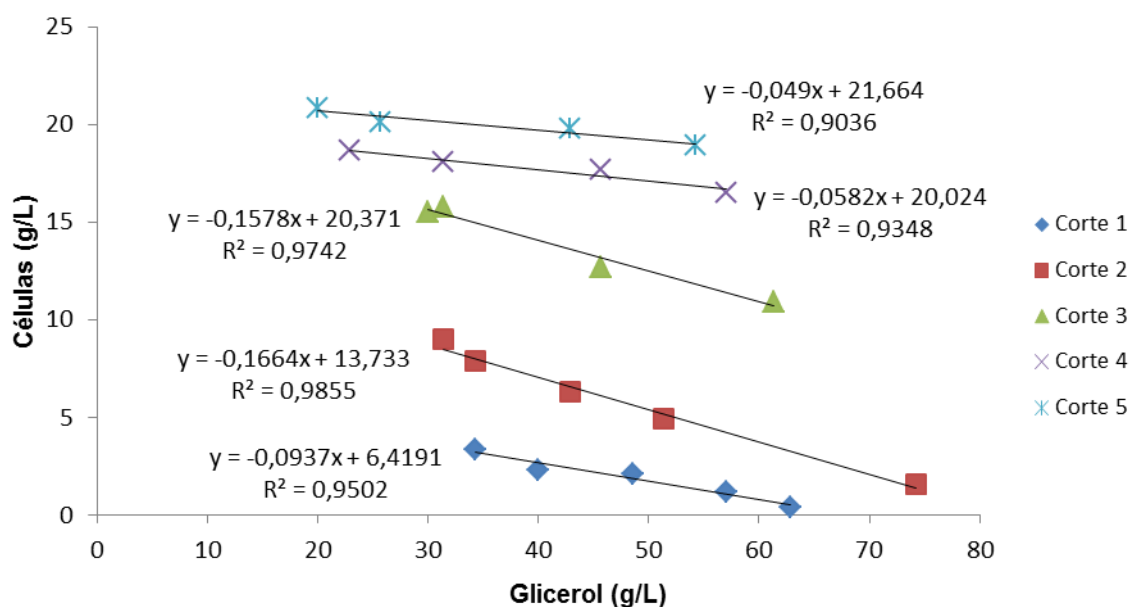


Figura 43 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

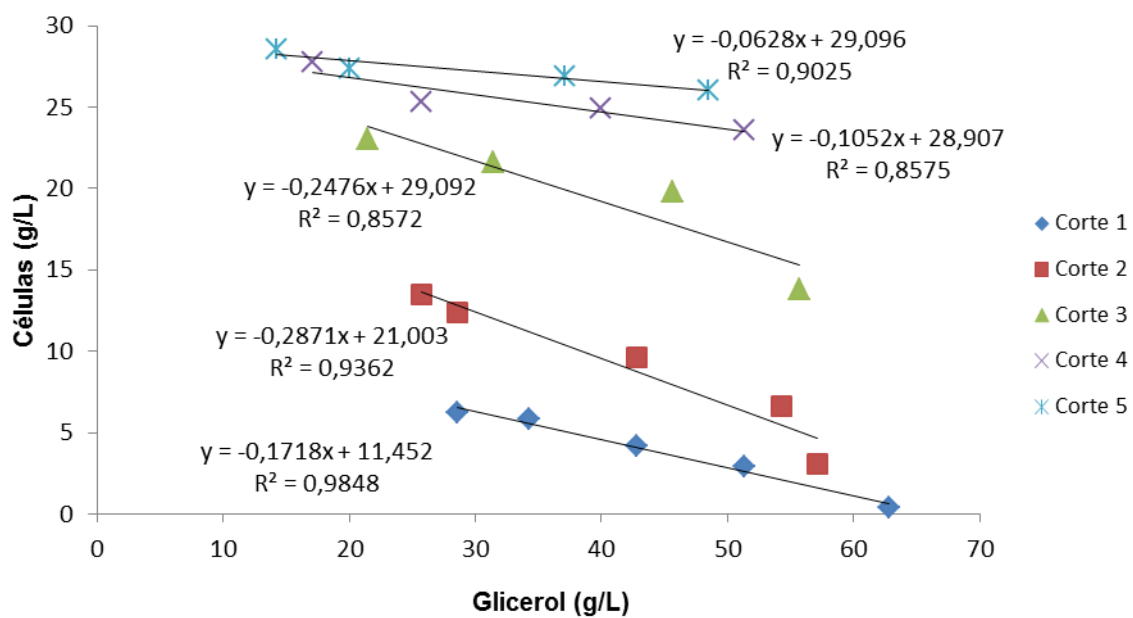


Figura 44 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

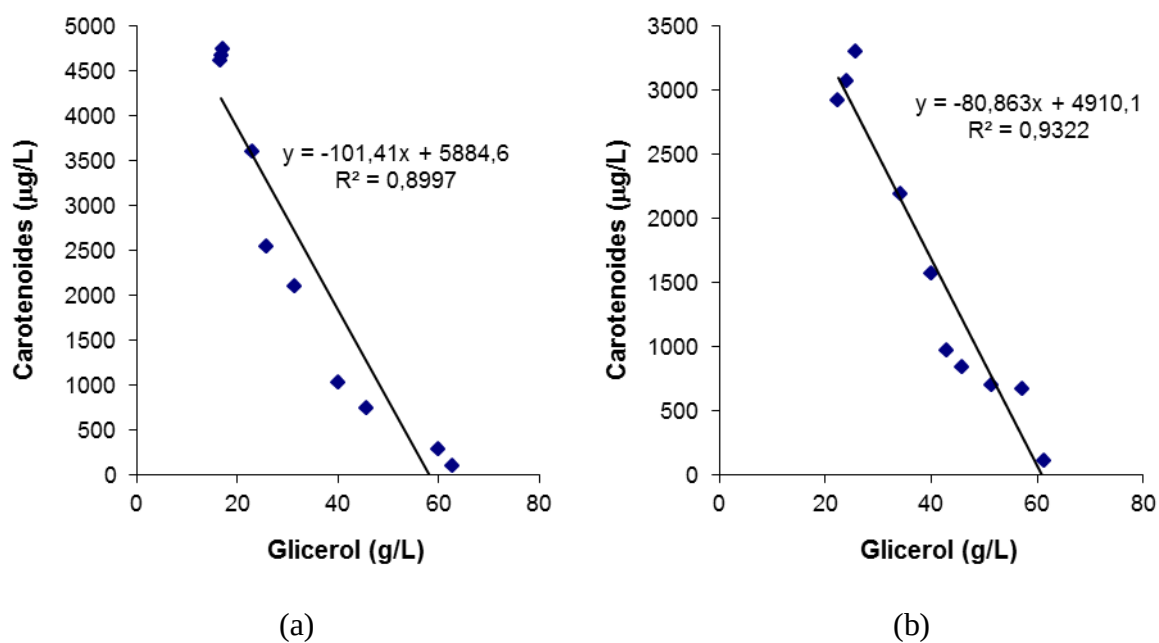


Figura 45 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

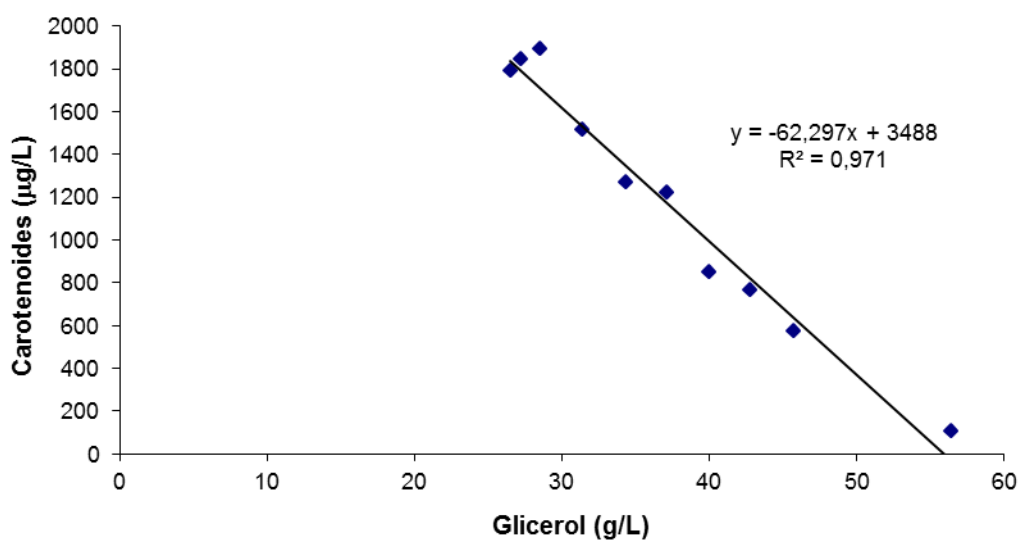


Figura 46 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio comercial.

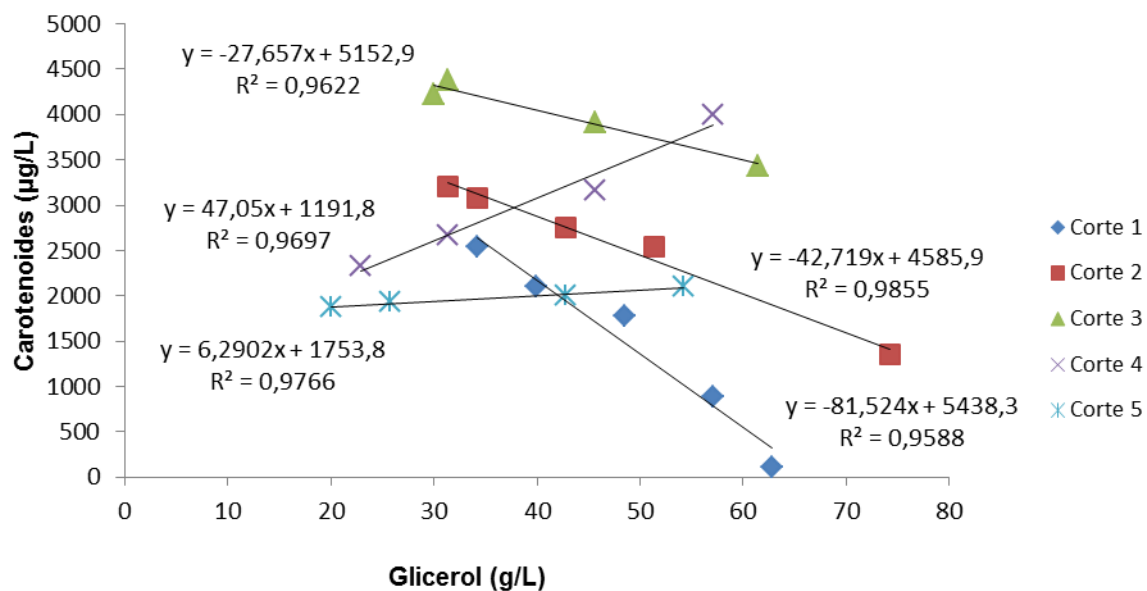


Figura 47 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em glicerol para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

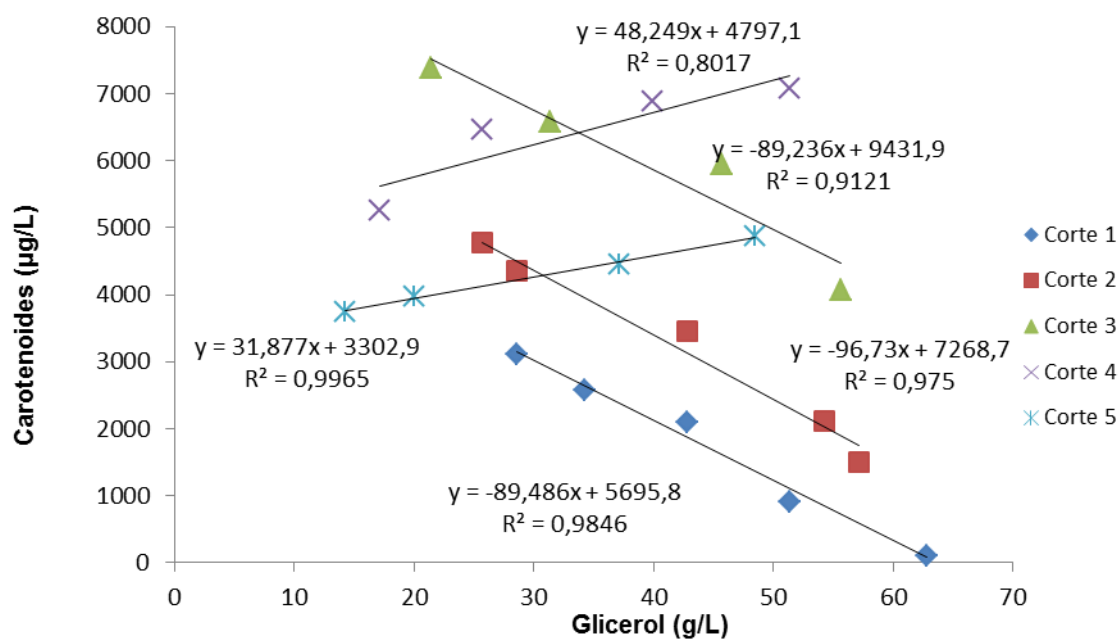


Figura 48 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

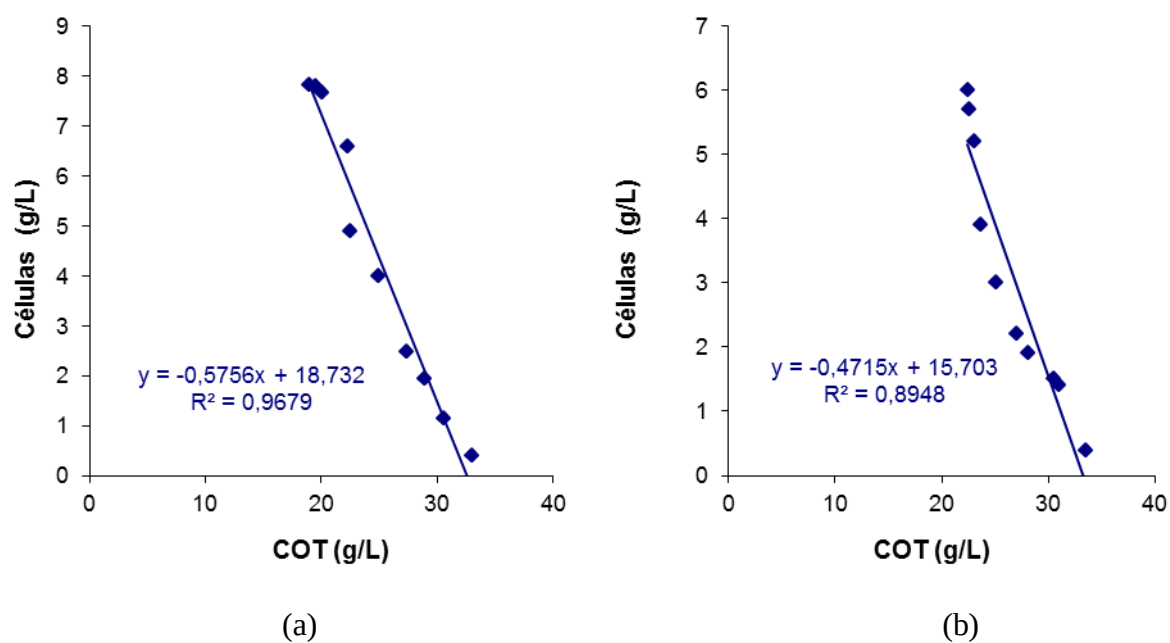


Figura 49 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

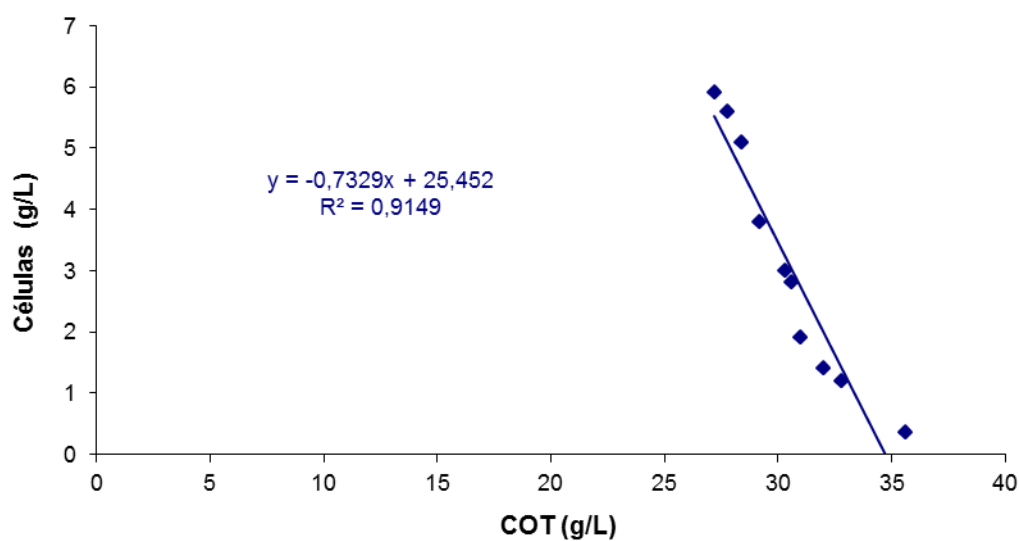


Figura 50 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio comercial.

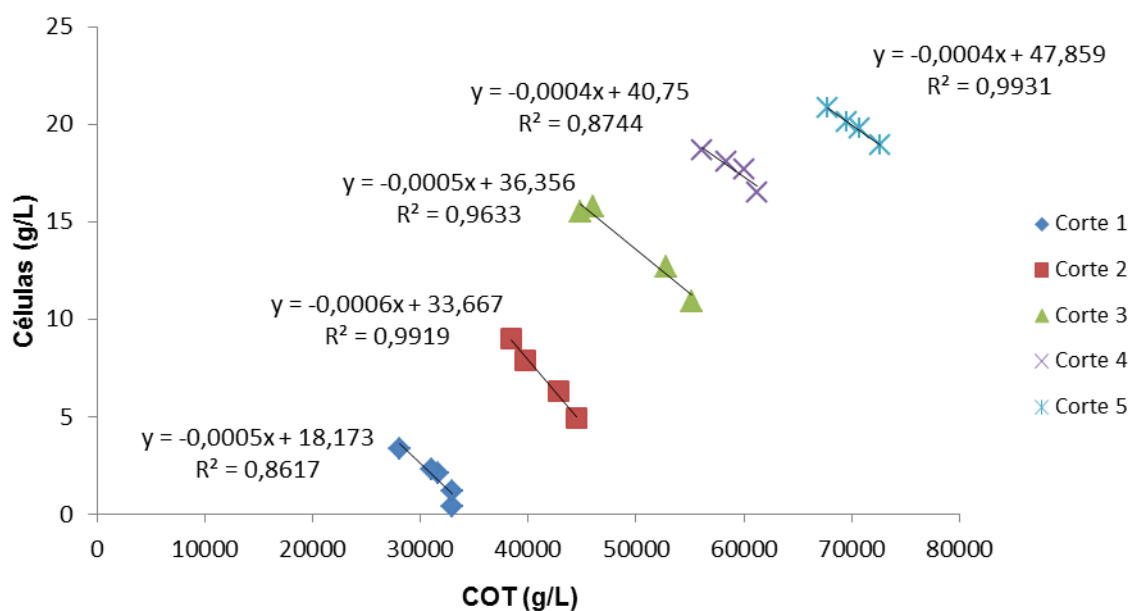


Figura 51 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

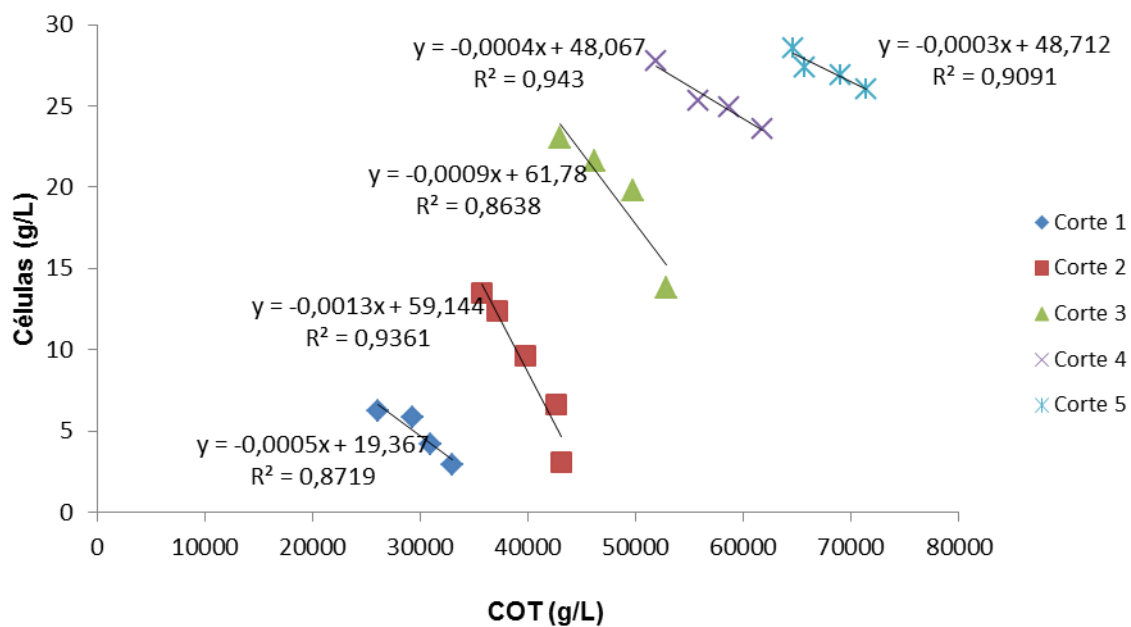


Figura 52 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o Ensaio 1(a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

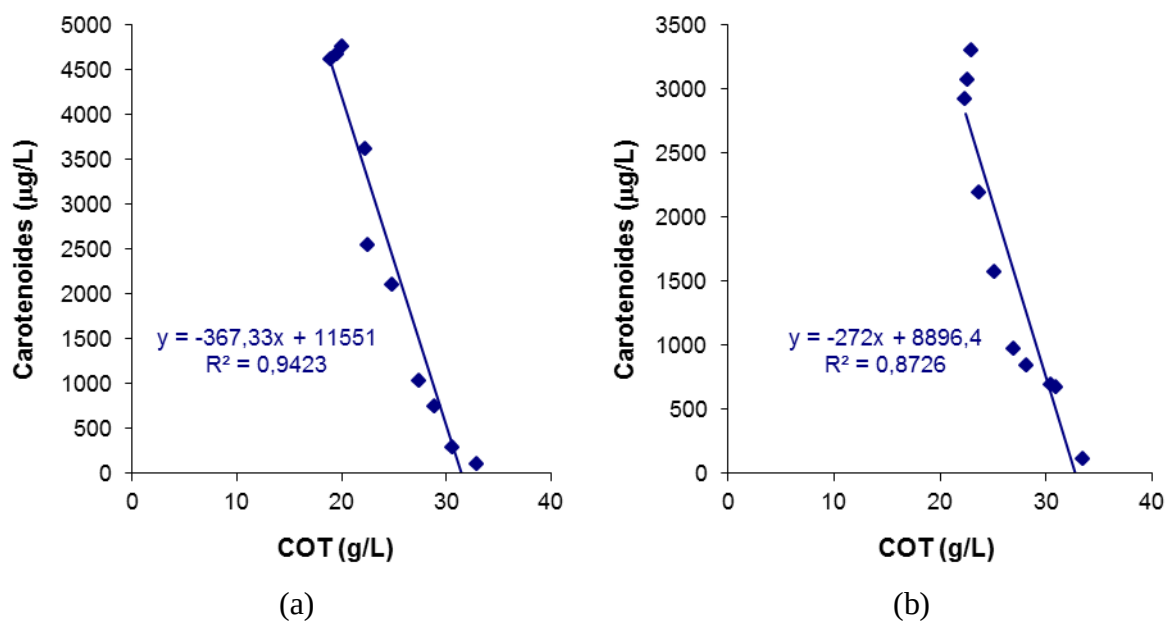


Figura 53 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

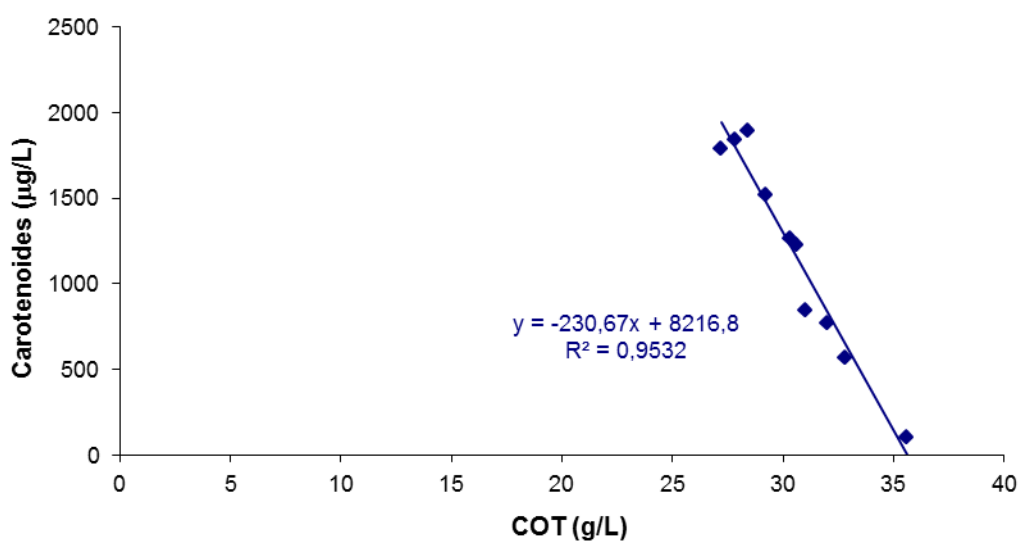


Figura 54 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio comercial.

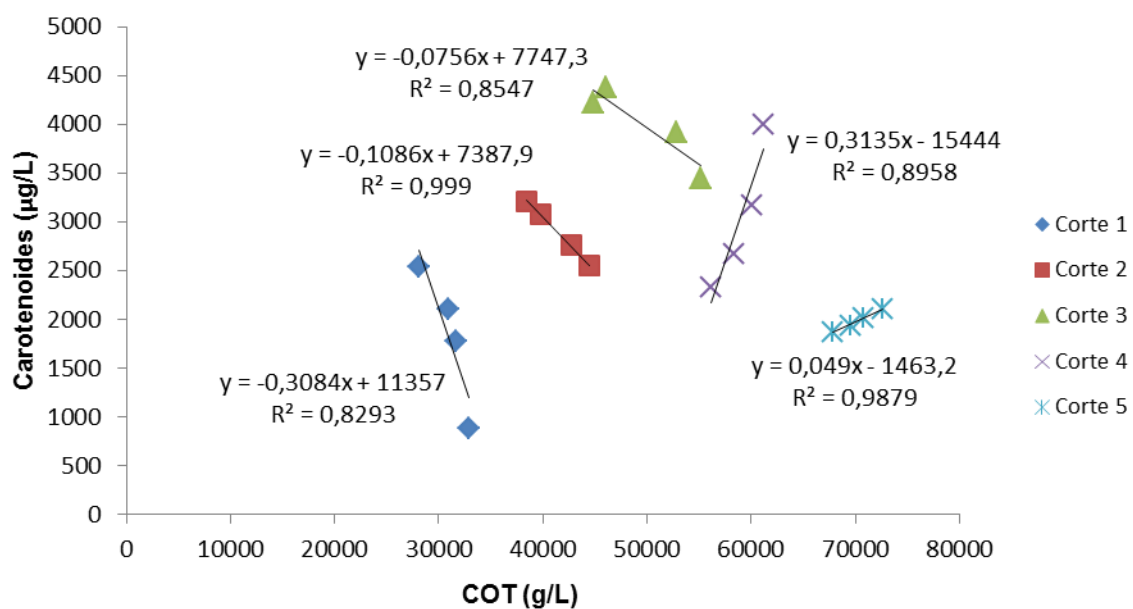


Figura 55 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em COT para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

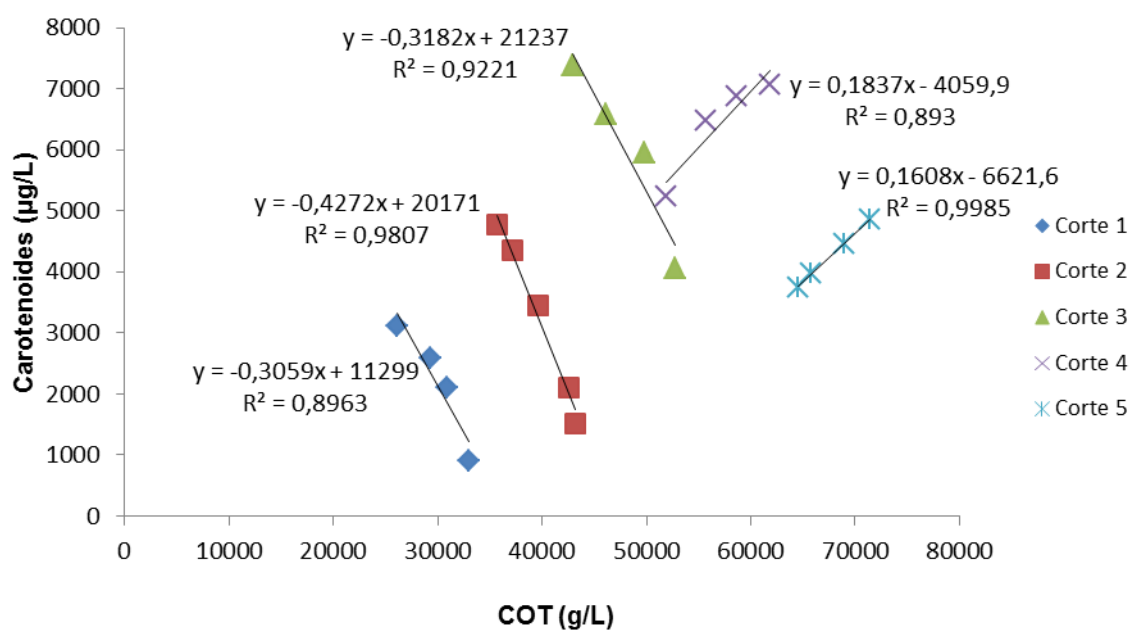


Figura 56 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1 (a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

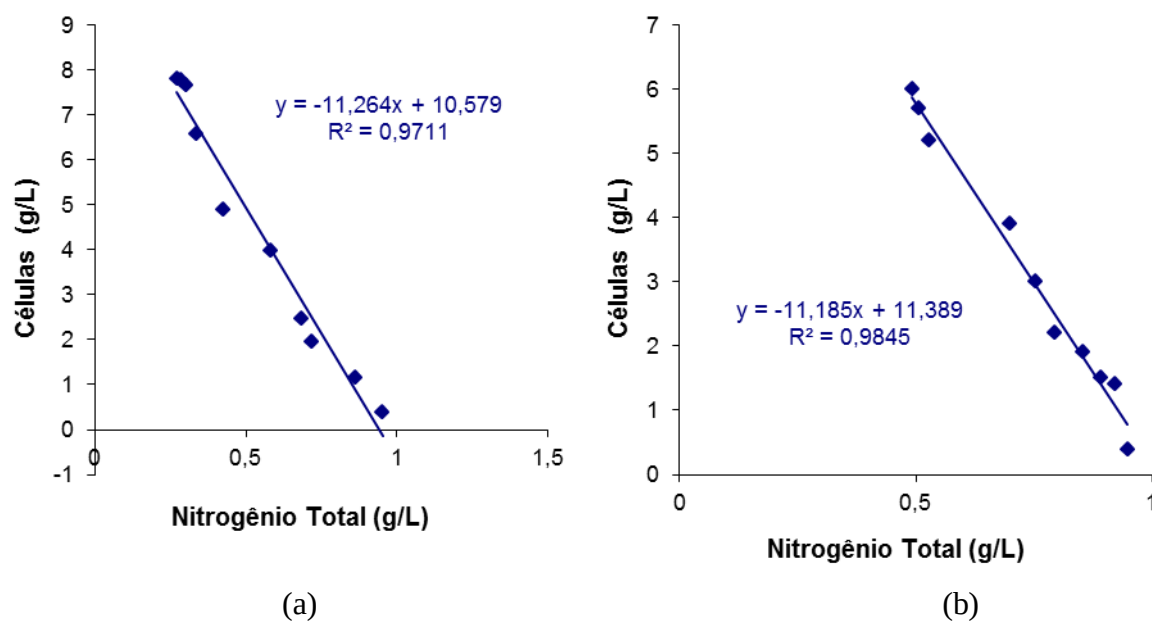


Figura 57 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

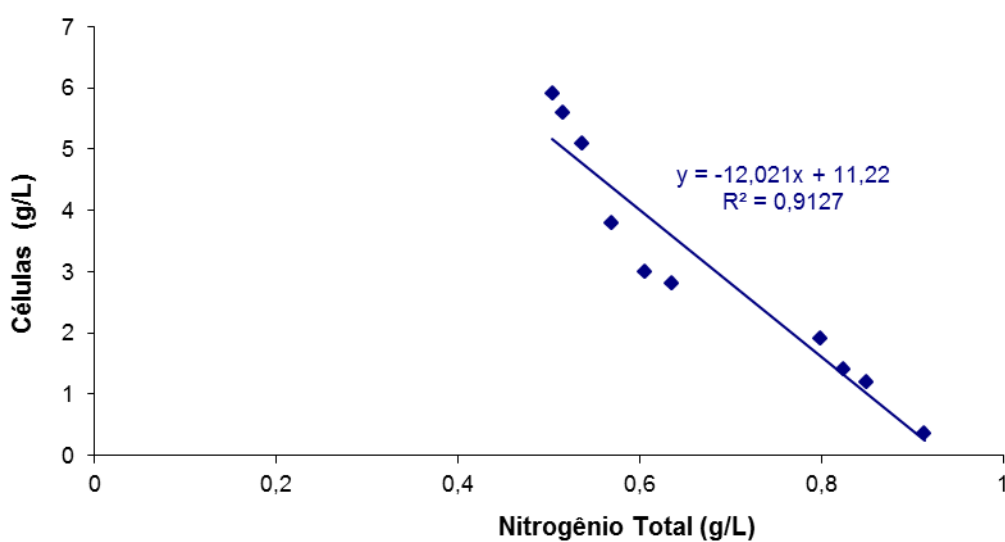


Figura 58 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio comercial.

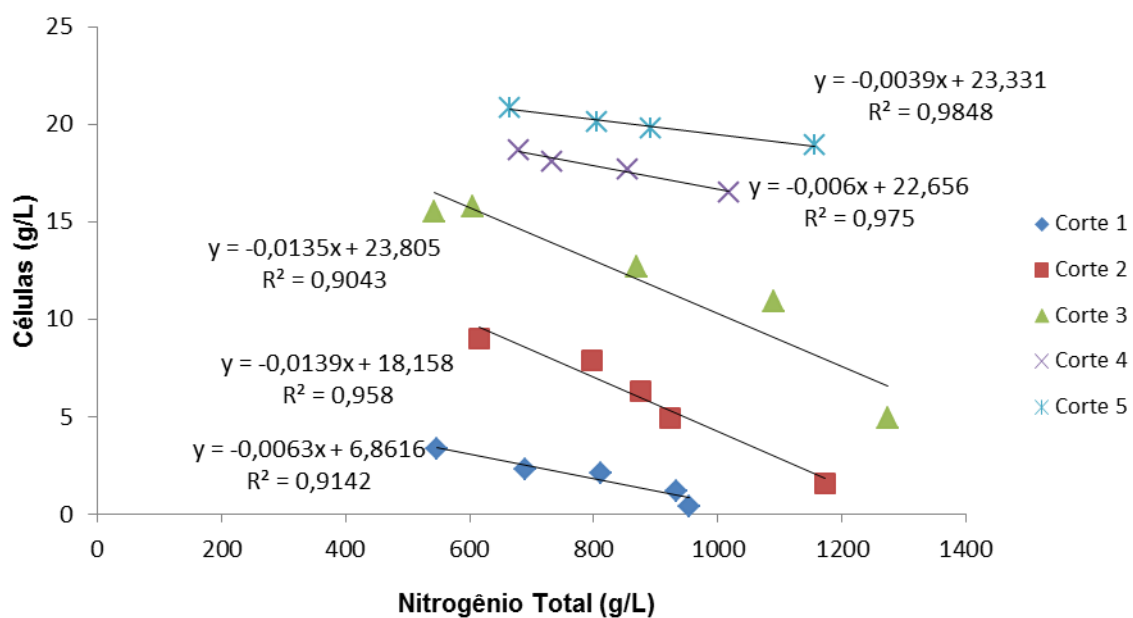


Figura 59 - Determinação do fator de conversão $Y_{X/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.

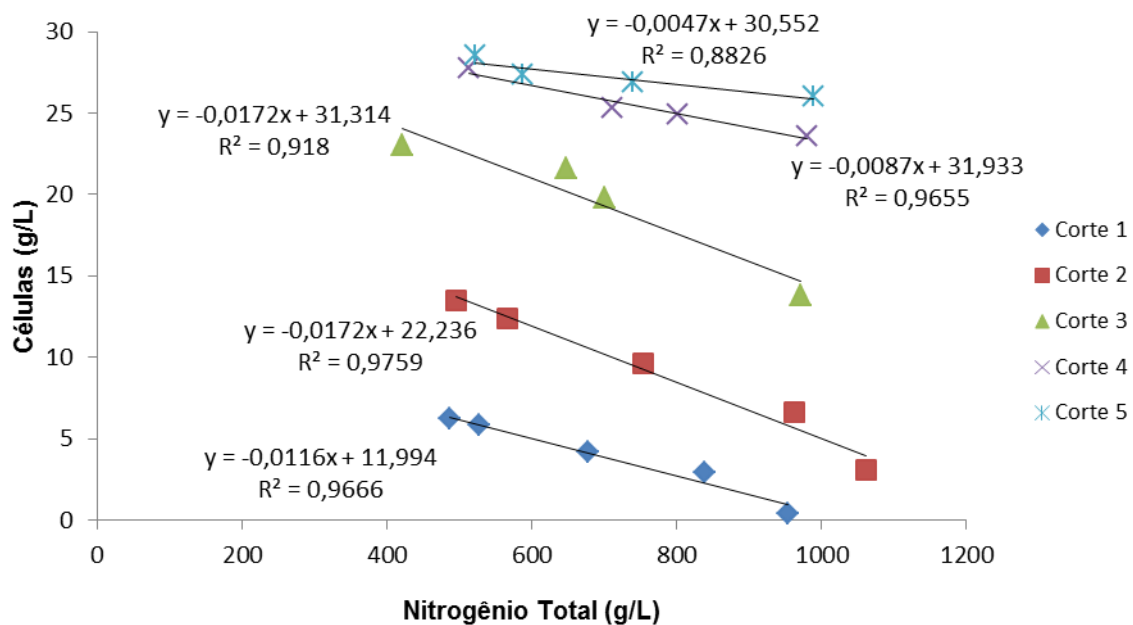


Figura 60 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 1 (a) e para o Ensaio 2 (b) em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

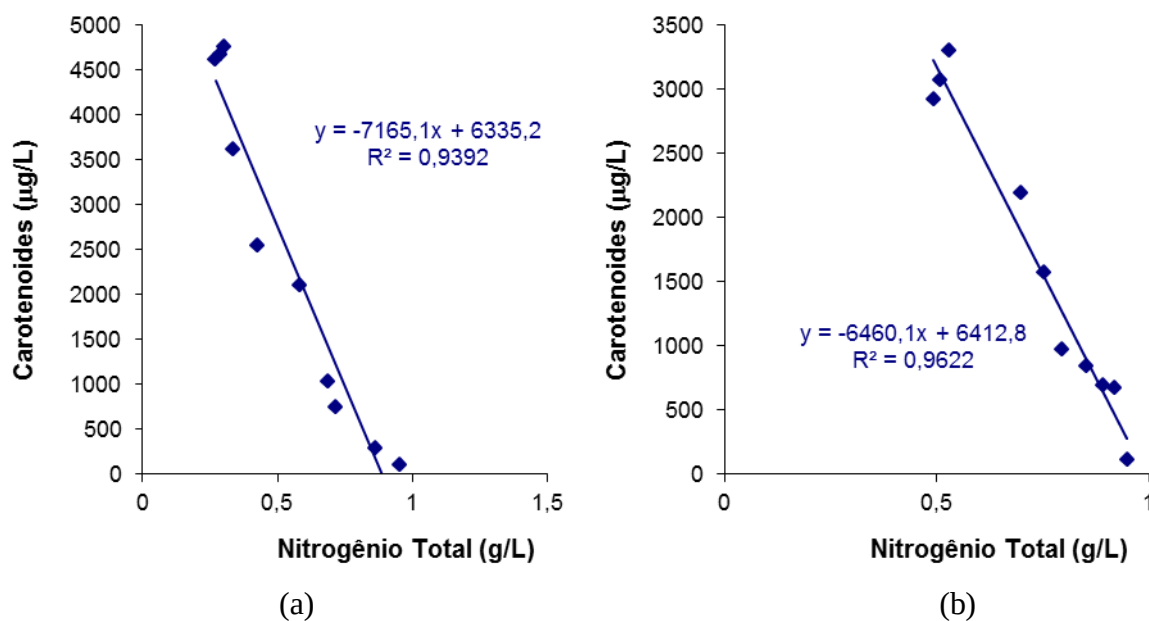


Figura 61 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o Ensaio 3 em batelada alimentada com resíduo agroindustrial.

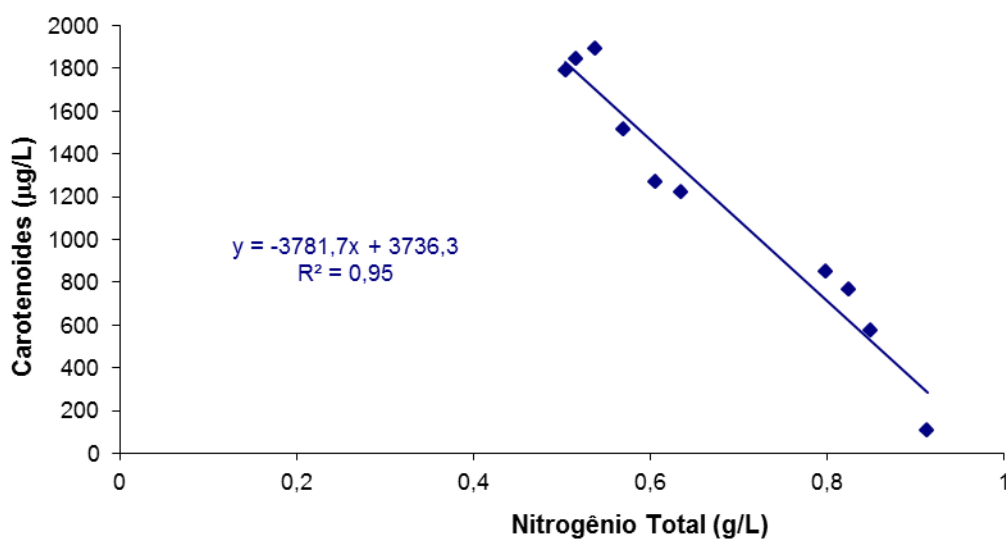


Figura 62 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio comercial.

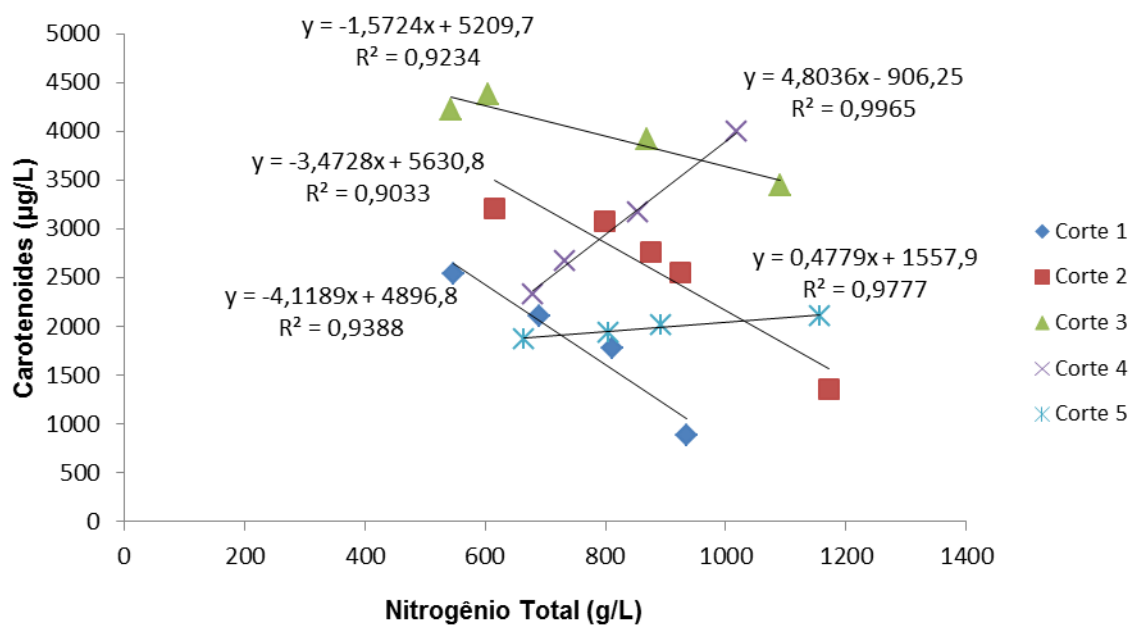
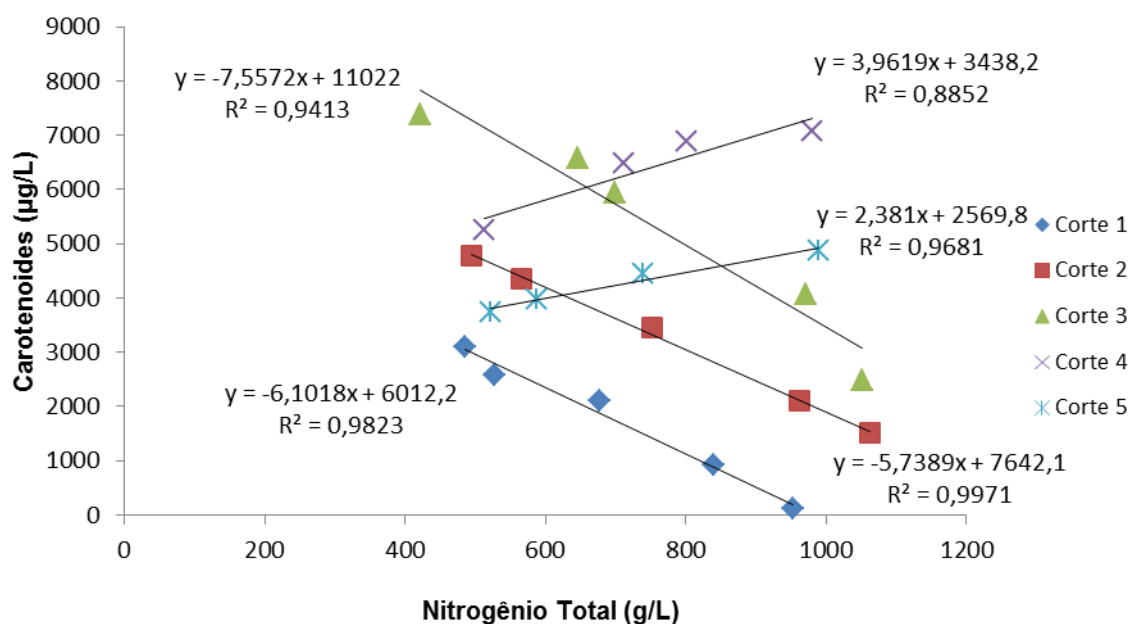


Figura 63 - Determinação do fator de conversão $Y_{P/S}$ com base em nitrogênio total para o processo semicontínuo com meio agroindustrial.



PUBLICAÇÕES

Artigo Publicado

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

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. COLET, R., URNAU, L., TRENTIN, D., MARCON, N. S., DI LUCCIO, M., VALDUGA, E. Comparação de Processo Batelada alimentada e semicontínuo para bioprodução de carotenoides por *S. salmonicolor* em biorreator. In: 19ª Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e 15º Encontro de Iniciação Científica, 2014, Erechim – RS.
2. BAMPI, J., COLET, R., VALDUGA, E. Otimização da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus Salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados com resíduos agroindustriais. In: 19ª Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e 15º Encontro de Iniciação Científica, 2014, Erechim - RS.
3. BAMPI, J., COLET, R., URNAU, L., VALDUGA, E. Produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em batelada alimentada em biorreator. In: Mostra Científica das Ciências Agrárias e Ciências Biológicas, 2014, Erechim - RS.
4. COLET, R., URNAU, L., ZANATTA, J., TRENTIN, D., MARCON, N. S., VALDUGA, E. Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em processo semicontínuo em biorreator. In: 18ª Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e 14ª Encontro de Iniciação Científica, 2013, Erechim – RS.
5. ROSSETO, A. P., VALDUGA, E., COLET, R. Planejamento de experimentos para a bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 e frascos agitados com substratos agroindustriais. In: Anais da IV Mostra de Iniciação Científica do Instituto Federal Catarinense, 2014, Concórdia - SC.
6. COLET, R., ROSSETO, A. P., DI LUCCIO, M., VALDUGA, E. Utilização de substratos agroindustriais na bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em frascos agitados. In: Anais do 10º

- Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2013, Campinas/SP. P.1322 – 1322.
7. COLET, R., URNAU, L., TRENTIN, D., MARCON, N. S., DI LUCCIO, M., VALDUGA, E. Parâmetros cinéticos da produção de carotenoides totais por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada. In: Anais do XVII Seminário de Integração de Pesquisa e Pós-Graduação, 2013, Erechim - RS.
 8. COLET, R.; URNAU, L.; MARCON, N. S.; BAMPI, J.; COLET, R.; LUCCIO, MARCO DI; VALDUGA, E. Comparação da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em diferentes processos: Batelada simples, Batelada alimentada e Semicontínuo. In: Anais do IX Simpósio de Alimentos, Passo Fundo - RS, 2015.
 9. COLET, R.; URNAU, L.; MARCON, N. S.; BAMPI, J.; COLET, R.; VALDUGA, E. Comparação de diferentes processos na bioprodução de carotenoides com resíduos agroindustriais. In: I Congresso Internacional de Gestão, Tecnologia e Inovação, 2015, Erechim – RS.
 10. COLET, R.; URNAU, L.; BAMPI, J.; MARCON, N. S.; LUCCIO, MARCO DI; VALDUGA, E. Comparação da bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em batelada alimentada com meio sintético e com resíduos agroindustriais. In: II Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2015, Blumenau - SC.
 11. COLET, R.; URNAU, L.; BAMPI, J.; MARCON, N. S.; LUCCIO, MARCO DI; VALDUGA, E. Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* em biorreator em processo semicontínuo com cortes de 25, 50 e 75 % do volume de meio de cultivo. In: II Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos, 2015, Blumenau - SC.
 12. COLET, R.; SANTIN, M.; LUCCIO, M. DI.; VALDUGA, E. Parâmetros estequiométricos da produção de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator em batelada alimentada. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2013, Foz de Iguaçu - PR.
 13. COLET, R.; URNAU, L.; TRENTIN, Dom; MARCON, N. S.; LUCCIO, M. DI.; VALDUGA, E. Bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator: processo batelada alimentada e

semicontínuo. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2015, Fortaleza - CE.

Resumos publicados em anais de congressos

1. COLET, R.; URNAU, L; TRENTIN, D.; VALDUGA, E. Bioprodução de Carotenoides por *Sporidiobolus Salmonicolor* CBS 2636 em Processo Semicontínuo em Biorreator com Resíduo Agroindustrial. In: Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXIV CBCTA) Aracaju - SE, 2014.
2. COLET, R.; URNAU, L; LUCCIO, M. DI.; VALDUGA, E. Bioprodução de Carotenoides por *Sporidiobolus Salmonicolor* CBS 2636 em Processo Semicontínuo em Frascos Agitados Utilizando Resíduos Agroindustriais. In: Anais do III Semana de Engenharia e Tecnologia em Alimentos, Umuarama - PR, 2013.

Capítulo de livro publicado

1. COLET, R., URNAU, L., STEFFENS, C., DI LUCCIO, M., VALDUGA, E. Produção e Recuperação de Biocorantes In: Processos tecnológicos, biotecnológicos e engenharia de processos em alimentos. 1 ed. Erechim: EDIFAPES, 2014, v.1, p. 233-248.

Premiação

1. Primeiro lugar, na categoria Processos Tecnológicos e Biotecnológicos, durante a 19 Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e 15 Encontro de Iniciação Científica., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus Erechim, com o trabalho: Comparação de processo batelada alimentada e semicontínuo para bioprodução de carotenoides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator, de Rosicler Colet, Letícia Urnau, Daiane Trentin, Naiane Sabedot Marcon, Luccio, Marco Di, Eunice Valduga.